

Tiago Bortolotto

**INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE DNA POR NOVOS
COMPLEXOS MONONUCLEARES DE Cu(II) e BINUCLEARES
DE Fe(III)Zn(II)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina como para a obtenção do Grau de Doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Hernán Terenzi

Florianópolis
Fevereiro de 2015

Aos meus pais Valmir e Eliane, à
minha esposa Geovana e a todos os
amigos do Centro de Biologia
Molecular Estrutural que contribuíram
de para realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Hernán Terenzi, que neste convívio de seis anos desde o mestrado, deu todo suporte e atenção para realização deste e de outros trabalhos que enormemente contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal e, por seu exemplo, ensinou a mim e a todos os seus alunos agir com ética e caráter na vida acadêmica.

À prof^a Elene Cristina Pereira Maia da Universidade Federal de Minas Gerais e ao prof. Ademir Neves da Universidade Federal de Santa Catarina, bem como seus então respectivos doutorandos Priscila Pereira Silva e Tiago Pacheco de Carmago, cuja parceria e colaboração foram essenciais para a execução deste trabalho.

Aos colegas do Centro de Biologia Molecular Estrutural: Alessandra, Angela, Deise, Douglas, Elis, Carol, Jean, Leonardo, Louise, Martina, Henrique e Henrique Lessa, Pri e Vanessa pelas valorosas discussões e contribuições ao meu trabalho, pela amizade criada em Floripa, mas principalmente por fazer do laboratório um lugar mais prazeroso mesmo quando os experimentos teimavam em dar errado... Agradeço especialmente aos colegas da “Feira do DNA”; Cris, Nathi e Lilica, criada pelo convívio dos últimos dois anos e que posso considerar minha “segunda família”. As histórias, discussões, brigas (brigas?) e principalmente as gargalhadas (em alto e bom som) ficarão pra sempre na memória!

Aos meus pais Valmir e Eliane, que desde o mestrado me deram todo amor, atenção e apoio na realização de mais essa etapa da minha vida. Foram eles que me acolheram quando precisei e sei que sempre poderei contar com sua ajuda. Agradeço imensamente. Amo vocês!

À minha esposa Geovana, que no mestrado era namorada, no doutorado virou noiva e agora é esposa... Obrigado pela parceria, paciência, refúgio, compreensão e muito amor durante todos esses anos. Te amo!

À UFSC e ao programa de pós-graduação em Bioquímica, pela estrutura e qualidade de ensino. À CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq, MCT, FINEP, FAPESC e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB) pelo financiamento direto e indireto deste trabalho.

“É que eu adoro o que eu digo. É impressionante como eu me encanto com o que o eu mesmo falo, é impressionante o quanto eu entendo quando eu mesmo explico. Porque tem gente que condena, as pessoas consideram isso arrogância. Mas pare para pensar: Se você vai ter que conviver com você mesmo até o fim, se você vai ter que se aguentar até o fim, se você vai ser espectador de você mesmo até o fim, é melhor que se encante com o que faz.”

Clóvis de Barros Filho

RESUMO

O desenvolvimento de novas moléculas e/ou novas metodologias para clivagem de DNA é um tema de crescente investimento nos últimos anos, seja na descoberta de novas ferramentas para biologia molecular ou de protótipos para fármacos antitumorais. Neste trabalho procurou-se determinar a interação e clivagem de DNA por novos complexos ternários de cobre(II) e que possuem atividade antitumoral frente a uma linhagem de células leucêmicas, com o intuito de determinar se sua atividade citotóxica está relacionada à capacidade de fragmentar DNA. Além disso, estudos da atividade de fotoclivagem de DNA (sob luz UV) foram realizados visando o seu potencial uso em terapia fotodinâmica. Paralelamente, uma potencial estratégia para o aumento da atividade de clivagem de DNA por complexos de Fe(III)Zn(II) foi caracterizada como forma prática para potencializar a atividade de agentes sintéticos que reconhecidamente clivam DNA. Os quatro novos complexos de cobre são: $[\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})]^{2+}$ ($\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})$), $[\text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})]^{2+}$ ($\text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})$), $[\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy})]^{2+}$ ($\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy})$) e $[\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})]^{2+}$ ($\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$), em que: hyd e S-hyd são a hidrazida do ácido 2-furóico e do ácido 2-tiofenocarboxílico e bpy e phen são os ligantes heterocíclicos 2,2'-bipiridina e 1,10-fenantrolina, respectivamente. Todos os quatro complexos foram capazes de clivar o DNA plasmidial de modo concentração-dependente e com diferentes eficiências. Alterações no pH não influenciaram na atividade dos complexos e sua atividade é proveniente da natureza química do complexo: ligante-metal-ligante. Interações eletrostáticas e ligação por sulco mostraram-se ser necessárias para o processo de clivagem de DNA que sugere-se ser predominantemente oxidativo. Os ensaios cinéticos confirmaram a ordem de reatividade dos complexos $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy}) \ll \text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen}) \sim \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$ que segue a ordem de afinidade pelo DNA e indicam que os últimos três complexos são tão ou mais reativos do que os melhores exemplos encontrados na literatura. A velocidade da reação e a capacidade de provocar a morte celular em células tumorais apresentou uma excelente correlação, sugerindo que a atividade antitumoral destas moléculas pode ser proveniente da atividade de clivagem de DNA. Em condições de fotoclivagem, porém, a ordem de reatividade foi: $\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen}) < \text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})$. Quando observada a razão entre a velocidade de fotoclivagem com a clivagem de DNA, vemos que incremento variou de aproximadamente 6 para 146 vezes. Sob condições de fotoclivagem, não houve mudanças no mecanismo de

clivagem de DNA, sugerindo que a exposição à luz UV deve amplificar atividade oxidativa dos complexos frente ao DNA. Ensaios de clivagem com oligonucleotídeos mostraram que todos os complexos foram capazes de fragmentá-lo de modo não específico, ou seja, com eventos de corte ao longo de toda a molécula de DNA. Os complexos com ligante phen mostraram os melhores resultados: ficou evidenciada a formação de fragmentos contendo terminais 3'-fosfoglicolato, cuja formação deve-se a processos oxidativos, reforçando a hipótese que estes complexos clivam o DNA pela geração de ROS. Os ensaios de interação por dicroísmo circular sugerem que o comportamento de ligação dos complexos ao DNA deva ser do tipo não-intercalativo. De modo geral, os quatro complexos de Cu(II) aqui testados mostram-se promissores modelos para desenvolvimento de novos complexos com atividade antitumoral ligada à clivagem de DNA. Além disso, mais uma vez o uso de exposição a luz UV mostrou-se apto para aumentar a atividade dos complexos, o que traz à discussão um possível uso como protótipo a droga para Terapia Fotodinâmica. Os complexos de Fe(III)Zn(II) estudados; $[\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LP1}]$ (FeZnLP1) e $[\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LP2}]$ (FeZnLP2) são derivados pireno-substituídos do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LH}]$ (FeZnOH). Ambos os complexos foram capazes de clivar o DNA plasmidial gerando não só quebras-simples, bem como quebras-duplas, efeito não observado para o complexo FeZnOH. A variação do pH afeta fortemente a atividade de ambos os complexos e concorda com a hidrólise do éster de fosfato 2,4-BDNPP, sugerindo que o mesmo mecanismo de hidrólise do éster modelo pode ser aplicado ao DNA. Todos os complexos tiveram sua atividade fortemente inibida pela adição crescente de NaCl ou NaClO₄ sugerindo a participação de interações eletrostáticas entre os complexos e o DNA. Nenhum sequestrador de ROS foi capaz de inibir a atividade dos complexos, sugerindo um mecanismo predominantemente hidrolítico o que já havia sido visto com o complexo FeZnOH. Ambos os complexos apresentaram preferência pela interação com o sulco menor, o que também foi observado nos ensaios com dicroísmo circular. Os ensaios cinéticos revelaram que a introdução de um único grupo pireno levou ao aumento de mais de 11,3 vezes na atividade deste complexo em comparação ao complexo modelo. Já a adição de dois grupos pireno aumentou ainda mais esta atividade atingindo um incremento de 18,6 vezes. Quando se compara os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 entre si, vemos um aumento de 1,65 vezes na atividade de FeZnLP2 vs FeZnLP1, ou seja, corroborando os resultados anteriores que apontavam FeZnLP2 como mais reativo que FeZnLP1. Nenhum dos complexos

mostrou-se apto a clivar o oligonucleotídeo de 49-mer, mas ensaios de *Footprinting* por DNase I revelaram que os complexos tendem a ligar mais fortemente em regiões contendo sequências AT, sendo sugerido que quanto maior o volume que o complexo ocupa no espaço, maior é a extensão da interação. De modo geral, o incremento substancial da atividade dos complexos pireno modificados ratifica a hipótese de que a introdução de grupos que se ligam ao DNA é uma viável estratégia para potencializar a ação de agentes artificiais de clivagem de DNA.

Palavras-chave: clivagem de DNA; fotoclivagem de DNA; ligação com DNA; complexos metálicos; nucleases artificiais;

ABSTRACT

The development of new molecules and/or new strategies for DNA cleavage is an increasing investment issue in recent years for the discovery of new molecular biology tools or prototypes for antitumor drugs. In this study aimed to determine the DNA interaction and cleavage by new ternary complexes of copper(II) which have anti-tumor activity against a strain of leukemia cells in order to determine whether their cytotoxic activity is related to the ability to fragment DNA. In addition, DNA photocleavage studies (under UV light) were conducted to analyze their potential use in photodynamic therapy. Meanwhile, a potential strategy to increase the DNA cleavage activity of Fe(III)Zn(II) complexes was characterized as a practical way to enhance the activity of synthetic agents that are known to cleave DNA. The four new copper complexes are $[\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})]^{2+}$ ($\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})$), $[\text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})]^{2+}$ ($\text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})$), $[\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy})]^{2+}$ ($\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy})$) e $[\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})]^{2+}$ ($\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$) where: S-hyd and hyd are hydrazides from 2-furoic acid and 2-thiophenecarboxylic acid and bpy and phen are the heterocyclic ligands 2,2'-bipyridine and 1,10-phenanthroline, respectively. All four complexes were able to cleave the plasmid DNA in a concentration-dependent manner with different efficiencies. Changes in pH did not influence the activity of the complex and its activity should be derived from the chemical nature of the complex formation: ligand-metal-ligand. Electrostatic interactions and groove binding shown to be required for the DNA cleavage which, is suggested, be predominantly oxidative. The kinetic experiments confirmed the reactivity order of the complex $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy}) \ll \text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen}) \sim \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$ which follow the order of DNA affinity, indicating that the last three complexes are among the most reactive examples found in the literature. The speed of reaction and the ability to trigger cell death in tumor cells showed an excellent correlation suggesting that the antitumour activity of these molecules can be derived from the DNA cleavage activity. In photocleavage conditions, however, the reactivity order was: $\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen}) < \text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})$. The ratio of the observed rates of DNA photocleavage by DNA cleavage ranged from about 6 to 146-fold. Under conditions of photocleavage, no changes in DNA cleavage mechanism were found; suggesting that exposure to UV light should amplify the oxidative activity of the complexes towards DNA. Oligonucleotide cleavage assays revealed that all the complexes were able to fragment the DNA in a non-specific way, with scission events

throughout the DNA molecule. Complexes containing phen ligand showed the best results was evidenced the formation of fragments containing terminal 3'-phosphoglycolate, whose formation is related to oxidative processes, reinforcing the hypothesis that these complexes cleaves the DNA for the generation of ROS. Circular Dichroism assays suggest that the DNA binding behavior of these complexes must proceed as a non-intercalative way. In general, the tested four Cu(II) complexes showed as promise for development of new models complexes with antitumor activity linked to DNA cleavage. In addition, the use of UV light exposure was shown to be able to increase the activity of the complex, which moots a possible use as a prototype drug for Photodynamic Therapy. The studied Fe(III)Zn(II) complexes $[\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LP1}]$ (FeZnLP1) and $[\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LP2}]$ (FeZnLP2) are pyrene derivatives from $[\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LH}]$ complex (FeZnOH). Both complexes were able to cleave the plasmid DNA generating not only single- but also double-strand breaks, which were not observed for the FeZnOH complex. The pH variation strongly affects the activity of both complex and agrees with the hydrolysis of 2,4-BDNPP phosphate ester, suggesting that the same mechanism hydrolysis of the ester model can be applied to DNA. Both complexes had their activity strongly inhibited by the increasing addition of NaCl or NaClO₄ suggesting the participation of electrostatic interactions between the complex and the DNA. None of ROS inhibitors were able to inhibit the activity of the complex, suggesting a predominantly hydrolytic mechanism which had already been seen with the FeZnOH complex. Both complexes have preference for interaction with the DNA minor groove, which was also observed in Circular Dichroism assays. Kinetic studies showed that introduction of a single pyrene group led to an increase of 11.3-fold compared to FeZnOH. Besides, the addition of two pyrene groups further increased this activity 18.6-fold. When comparing the FeZnLP1 to FeZnLP2 an increase of 1.65-fold was observed, confirming the previous results which showed that FeZnLP2 is more reactive than FeZnLP1. None of the complexes were able to cleave a short oligonucleotide, but DNase footprinting assays revealed that the complexes tend to bind preferentially (and more affinity) to AT-rich regions and suggested that as much larger was the complex (in terms of volume), the greater is the extent of the interaction. In general, the substantial increase in activity of the modified pyrene complexes exemplifies the hypothesis that the introduction of groups that bind to DNA is a viable strategy to enhance the action of artificial DNA cleaving agents.

Keywords: DNA cleavage; DNA photocleavage; DNA binding; metal complexes; Artificial Nucleases;

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estrutura dos desoxirribonucleotídeos (A) que compõem o DNA e ribonucleotídeos que compõem o RNA (B). Abaixo dos nomes vê-se a nomenclatura de letra única que define cada nucleotídeo. A letra minúscula “d” e “r”, faz referência ao desoxirribonucleotídeos e ribonucleotídeos, respectivamente. As letras em maiúsculo “MP” fazem referência a forma monofosfatada dos nucleotídeos. Adaptado de Nelson e Cox (2000). 38
- Figura 2. Representação da estrutura química de uma cadeia linear de DNA e RNA. Na caixa em cinza escuro, destaca-se a estrutura da ligação fosfodiéster que une os nucleotídeos. Adaptado de Nelson e Cox (2000). 40
- Figura 3. Representação da estrutura química de um ribonucleotídeo (esq.) e um desoxirribonucleotídeo (dir.) destacando, em verde, a posição C-2' na pentose (A). Esquema representando uma reação intramolecular numa cadeia de RNA, onde a hidroxila localizada em C-2' age como nucleófilo e ataca a ligação fosfodiéster, rompendo a cadeia e gerando uma extremidade 5'-OH livre e uma extremidade 2',3'-monofosfato cíclica que pode se decompor em uma mistura de produtos com extremidades 2' ou 3'-fosfato. Adaptado de Nelson e Cox (2000). 41
- Figura 4. Representação da estrutura química de uma cadeia dupla de DNA. No eixo central da imagem, destacam-se a formação das ligações de hidrogênio entre os nucleotídeos AT e GC, formando os dímeros denominados “pares de bases”. Observa-se também a orientação invertida de uma cadeia em relação a outra, gerando uma estrutura antiparalela, onde a cadeia de sentido 3'→5' (à esq.) se justapõe a cadeia de sentido 5'→3' (à dir.). Adaptado de Lodish e colaboradores (2007). (LODISH et al., 2007). 42
- Figura 5. Representação estrutural, mostrando diferentes domínios, de um RNA transportador (tRNA); um exemplo de RNA de cadeia única (simples-fita) (A). Estrutura tridimensional do tRNA ao lado exibindo em diferentes cores os domínios destacados (B). Adaptado de Nobles e colaboradores (2002). (NOBLES et al., 2002). 44
- Figura 6. Ilustração mostrando a estrutura de dupla-hélice de três formas diferentes de DNA: A-DNA, B-DNA e Z-DNA. Cada cadeia de nucleotídeos está representada por uma cor (vermelha e verde). Dentro do retângulo, destacam-se os grupos fosfatos (em vermelho e dourado) e as bases nitrogenadas (em azul). Adaptado de PDB (2001). (PDB, 2001) 46
- Figura 7. Esquema mostrando a estrutura superenovelada do DNA plasmidial (A). Micrografias de diferentes plasmídios com ordem crescente (esq. para dir.) de superenovelamento (maior número de voltas). Fonte: adaptado de Nelson e Cox (2000). 47
- Figura 8. Representação da estrutura dos complexos Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina) (A) e Cu(II)-([9]aneN₃)Cl₂ (B). Adaptado de Hegg e Burstyn (1998) e do autor. 50
- Figura 9. Esquema demonstrando a interação entre um complexo mononuclear de Cu(II) com o DNA por meio de interações eletrostáticas e de hidrogênio

entre uma guanidina presente no complexo com o fosfato da ligação fosfodiéster. Adaptado de Belousoff e colaboradores (2007).	52
Figura 10. Representação estrutural da cisplatina (A) e estrutura cristalográfica de um DNA de dupla-hélice com uma molécula de cisplatina covalentemente ligado a um dímero GG (1,2-d(GpG)) (B). Adaptado de Todd e Lippard (2009). (TODD e LIPPARD, 2009)	53
Figura 11. Representação estrutural da netropsina (A) e estrutura cristalográfica de um DNA de dupla-hélice com uma molécula de ligada ao sulco menor (B). Adaptado de Dolenc e colaboradores (2006). (DOLENC et al., 2006)	55
Figura 12. Representação estrutural do brometo de etídeo (A) e estrutura proposta da intercalação de uma molécula de brometo de etídeo com a dupla-hélice do DNA (B). Adaptado de Cerny e Hobza (2007). (CERNY e HOBZA, 2007)	56
Figura 13. Representação estrutural dos complexos Cu(II)-neamina (A) Cu(II)(dox)(phen) e Cu(tc)(phen), onde dox e tc são os antibióticos ligantes doxiciclina e tetraciclina e phen é o ligante 1,10-fenantrolina (B). Adaptado de Sreedhara, Freed e Cowan (2000) e Silva e colaboradores (2011).	57
Figura 14. Representação do sítio ativo da fosfatase ácida púrpura do feijão vermelho (kbPAP) (A) em comparação com o complexo de Fe(III)Zn(II) descrito por Peralta e colaboradores (2010) (B). Adaptado de Peralta e colaboradores (2010).	59
Figura 15. Representação estrutural geral das bleomicinas destacando os grupos funcionais responsáveis pela ligação do DNA, reconhecimento celular e formação de ROS. Adaptado de Jiang e colaboradores (2007)	63
Figura 16. Representação da estrutura dos complexos Cu(hyd)(bpy), Cu(hyd)(phen), Cu(S-hyd)(bpy) e Cu(S-hyd)(phen). Adaptado de Silva (2014). (SILVA, 2013)	68
Figura 17. Representação estrutural dos complexos $[Fe^{III}-(\mu-OH)Zn^{II}LH]$ (FeZnOH, A) descrito por Peralta e colaboradores (2010), $[Fe^{III}-(\mu-OH)Zn^{II}LP1]$ (FeZnLP1, B) e $[Fe^{III}-(\mu-OH)Zn^{II}LP2]$ (FeZnLP2, C).	70
Figura 18. Ilustração e micrografias das três formas do DNA plasmidial (acima) e a sua diferenciação após eletroforese em gel de agarose (abaixo). Adaptado de Bortolotto (2011). (BORTOLOTTTO, 2011)	72
Figura 19. Representação da sequência e estrutura secundária hipotética do oligonucleotídeo de 49-mer utilizado neste trabalho. Em vermelho e azul destacam-se as regiões ricas em AT e GC, respectivamente. Em verde, localiza-se o <i>haripin loop</i> de TTTT. A letra “F” refere-se ao grupo fluorescente fluoresceína ligada à extremidade 5'-fosfato do DNA.	80
Figura 20. Representação de um gel de poliacrilamida desnaturante contendo amostras de um ensaio de footprinting de DNA por DNase I (A). A primeira canaleta possui somente o DNA tratado com a enzima e exibe um padrão de fragmentação onde alguns fragmentos são mais frequentes (banda de cor mais intensa) e outros menos (banda de cor mais intensa). Junto a esta amostra seguem as amostras de DNA que foram tratadas com DNase I na presença de concentrações crescentes de um determinado ligante, como uma proteína ou	

pequena molécula. Com o aumento da concentração do ligante vê-se a diminuição da intensidade de algumas bandas, ou seja, diminuição de geração de alguns fragmentos. Estes fragmentos correspondem aos sítios de DNA protegidos ao ataque da DNase I e, portanto, os possíveis sítios de interação do ligante ao DNA. Ao lado, vê-se a representação estrutural da actinomomicina D, uma pequena molécula que se liga ao DNA, bem com uma proposição estrutural da interação ligante-DNA e um radiografia de um gel de um ensaio de footprinting de DNA por DNase I destacando os nucleotídeos envolvidos no evento de interação (B). Adaptado de Urbach e Waring (2005) e Bailly e colaboradores (2005). (URBACH e WARING, 2005) 82

Figura 21. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(hyd)(bpy) (A) e Cu(hyd)(phen) em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 10 a 50 µM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. 88

Figura 22. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(S-hyd)(bpy) (A) e Cu(S-hyd)(phen) (B) em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 10 a 50 µM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. 89

Figura 23. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos em comparação com o sal de cobre(II) (CuCl₂) e os ligantes. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo/sal de cobre(II)/ligantes] = 50 µM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. 91

Figura 24. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo Cu(hyd)(bpy) em função de diferentes concentrações de NaCl (A) e NaClO₄ (B). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 50 µM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. 93

Figura 25. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo Cu(hyd)(phen) em função de diferentes concentrações de NaCl (A) e NaClO₄ (B). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 25 µM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. 94

Figura 26. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo Cu(S-hyd)(bpy) em função de diferentes concentrações de NaCl (A) e NaClO₄ (B). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 25 µM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao

abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.....	95
Figura 27. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo Cu(S-hyd)(phen) em função de diferentes concentrações de NaCl (A) e NaClO ₄ (B). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 25 µM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.....	96
Figura 28. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(hyd)(bpy) (A) e Cu(hyd)(phen) (B) na presença de diferentes inibidores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 50 µM (Cu(hyd)(bpy) e 25 µM (Cu(hyd)(phen)); [DMSO] = 2 M; [SOD] = 20 unidades; [KI] = 0,5 mM; [NaN ₃] = 0,5 mM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes. .	99
Figura 29. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(S-hyd)(bpy) (A) e Cu(S-hyd)(phen) (B) na presença de diferentes inibidores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 50 µM para ambos; [DMSO] = 2 M; [SOD] = 20 unidades; [KI] = 0,5 mM; [NaN ₃] = 0,5 mM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.	100
Figura 30. Mecanismo proposto por Tan, Wang e Zhu (2009) para a clivagem de DNA por via oxidativa pelo complexo [Cu(quercetina ₂)] ²⁺ na ausência de um co-reagente. Como a geração e ataque de ROS ocorre após a ligação do complexo ao DNA o bloqueio da reação por inibidores de radical hidroxila (no caso DMSO e glicerol) fica prejudicado. Adaptado de Tan, Wang e Zhu (2009).	103
Figura 31. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(hyd)(bpy) (A) e Cu(hyd)(phen) na presença dos diferentes bloqueadores de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 50 µM (Cu(hyd)(bpy) e 25 µM (Cu(hyd)(phen)); [Net] ou [VM] = 50 µM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.	105
Figura 32. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(S-hyd)(bpy) (A) e Cu(S-hyd)(phen) (B) na presença dos diferentes bloqueadores de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 50 µM para ambos; [Net] ou [VM] = 50 µM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.	106
Figura 33. Plotes relacionando os valores de IC ₅₀ (em células tumorais, A), K _b (em CT-DNA, B) e k ₂ (em DNA plasmidial, C).....	110

Figura 34. Diagrama de Jablonski mostrando os processos envolvidos na fotoexcitação de elétrons. (1) Absorção de um fóton e conversão para o estado excitado S1, (2) retorno ao estado não-excitado S0 com emissão de fluorescência, (3) conversão interna, (4) conversão interna inter-sistema do estado S1 para T1, (5) retorno do estado T1 a S0 com emissão de fosforescência, (6) retorno do estado T1 a S0 por decaimento não-radioativo, (7) transferência eletrônica do estado T1 para uma molécula aceptora, (8) reações do Tipo I, (9) transferência eletrônica do estado T1 para o dióxigênio e (10) reações do Tipo II. Adaptado de Bortolotto (2011).	112
Figura 35. Clivagem de DNA plasmidial pBSK-II induzida pelo complexo Cu(hyd)(bpy) na ausência (A) e presença (B) de exposição a luz UV e em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 10 a 50 µM; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos ao abrigo de luz (A) ou sob luz UV (B). Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.	114
Figura 36. Clivagem de DNA plasmidial pBSK-II induzida pelo complexo Cu(hyd)(phen) na ausência (A) e presença (B) de exposição a luz UV e em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 10 a 50 µM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 5 minutos ao abrigo de luz (A) ou sob luz UV (B). Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.	115
Figura 37. Clivagem de DNA plasmidial pBSK-II induzida pelo complexo Cu(S-hyd)(bpy) na ausência (A) e presença (B) de exposição a luz UV e em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 10 a 50 µM; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos ao abrigo de luz (A) ou sob luz UV (B). Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.	116
Figura 38. Clivagem de DNA plasmidial pBSK-II induzida pelo complexo Cu(S-hyd)(phen) na ausência (A) e presença (B) de exposição a luz UV e em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 10 a 50 µM; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos ao abrigo de luz (A) ou sob luz UV (B). Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.	117
Figura 39. Fotoclivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos mononucleares de Cu(II) em comparação com o sal de cobre(II) (CuCl ₂) e os seus ligantes. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo/sal de cobre(II)/ligantes] = 25 µM; Temperatura = ambienteambiente; Tempo = 5 minutos sob luz UV. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.	118
Figura 40. Fotoclivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(hyd)(bpy) (A) e Cu(hyd)(phen) (B) na presença de diferentes inibidores de	

ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μ M; [DMSO] = 2 M; [SOD] = 20 unidades; [KI] = 0,5 mM; [NaN ₃] = 0,5 mM; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos sob luz UV. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.....	120
Figura 41. Fotoclivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(S-hyd)(bpy) (A) e Cu(S-hyd)(phen) (B) na presença de diferentes inibidores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μ M; [DMSO] = 2 M; [SOD] = 20 unidades; [KI] = 0,5 mM; [NaN ₃] = 0,5 mM; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos sob luz UV. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.....	121
Figura 42. Comparação do perfil cinético da clivagem (linha preta) e fotoclivagem (linha vermelha) do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo Cu(hyd)(bpy) (A) e Cu(hyd)(phen) (B). Condições reacionais dos ensaios de fotoclivagem: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 10 μ M; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos sob luz UV. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.....	123
Figura 43. Comparação do perfil cinético da clivagem (linha preta) e fotoclivagem (linha vermelha) do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo Cu(S-hyd)(bpy) (A) e Cu(S-hyd)(phen) (B). [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 10 μ M; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos sob luz UV. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.	124
Figura 44. Clivagem do oligonucleotídeo de 49-mer pelos complexos Cu(hyd)(bpy) (1), Cu(hyd)(phen) (2), Cu(S-hyd)(bpy) (3) e Cu(S-hyd)(phen) (4) ao abrigo da luz (A e C) e sob luz UV (B e D). A marcação "C" em cima das figuras se refere ao controle sem a presença dos complexos. A caixa em branco na porção superior do gel faz referência a uma região de difícil resolução (separação dos fragmentos) compreendendo os nucleotídeos C33 a A39. Os nucleotídeos em vermelho se referem ao nucleotídeo terminal dos fragmentos gerados pelo marcador A+G de Maxam-Gilbert. Os painéis C e D são ampliações de A e B, respectivamente, da região contendo A4 a C23. Os sinais "≡" mostram os fragmentos que exibem as terminações 3'-fosfato (banda superior) e 3'-fosfoglicolato (banda inferior).	129
Figura 45. Esquema mostrando a clivagem de DNA mediada pelo complexo Fe(II)-Bleomicina detalhando a oxidação em C'4 resultando na abertura do anel da desoxirribose e decomposição da pentose, resultando na fragmentação da cadeia do DNA com extremidades 5'-fosfato e 3'-fosfoglicolato, bem como a liberação de base-propenal.	130
Figura 46. Espectro de dicróismo circular de DNA na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos Cu(hyd)(bpy) (A) e Cu(hyd)(phen) (B). Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μ M; [Tampão] = 10 mM de Tris-HCl pH 7,4; [complexo] = 0 a 300 μ M; Temperatura = 37 °C.	135

Figura 47. Espectro de dicroísmo circular de DNA na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos Cu(S-hyd)(bpy) (A) e Cu(S-hyd)(phen) (B). Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μ M; [Tampão] = 10 mM de Tris-HCl pH 7,4; [complexo] = 0 a 300 μ M; Temperatura = 37 $^{\circ}$ C. ... 136

Figura 48. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos FeZnLP1 (A) e FeZnLP2 (B) em diferentes concentrações e em comparação ao complexo FeZnOH de Peralta e colaboradores (2010). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, \sim 25 μ M; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 0,5 a 10 μ M; Temperatura = 37 $^{\circ}$ C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. 137

Figura 49. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos FeZnLP1 (A) e FeZnLP2 (B) em diferentes pHs. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, \sim 25 μ M; [Tampão] = MES (10 mM, pH 6,0 e 6,5)/HEPES (10 mM, pH 7,0 e 7,5)/CHES (10 mM, pH 8,0 e 9,0); [complexo] = 5 μ M; Temperatura = 37 $^{\circ}$ C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. 140

Figura 50. Proposta do mecanismo de hidrólise do 2,4-BDNPP pelo complexo FeZnLP1. Na primeira etapa o substrato coordena-se ao centro de Zn(II) pelo deslocamento de uma molécula de água. Em seguida o íon hidróxido presente no centro de Fe(III) atua como nucleófilo, atacando o átomo de fósforo do substrato, ocorrendo então a clivagem da ligação fosfodiéster e a conseqüente liberação do 2,4-dinitrofenolato. O monoéster, 2,4-dinitrofenilfosfato, permanece coordenado ao complexo, podendo ser deslocado pela presença de excesso do substrato 2,4-BDNPP, reiniciando o processo catalítico. Retirado de Camargo (2013). 141

Figura 51. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 em comparação com FeSO₄ e ZnSO₄. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, \sim 25 μ M; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,4); [complexo ou o sal] = 5 μ M; Temperatura = 37 $^{\circ}$ C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. 142

Figura 52. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZnLP1 em função de diferentes concentrações de NaCl (A) e NaClO₄ (B). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, \sim 25 μ M; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μ M; Temperatura = 37 $^{\circ}$ C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. 144

Figura 53. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZnLP2 em função de diferentes concentrações de NaCl (A) e NaClO₄ (B). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, \sim 25 μ M; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μ M; Temperatura = 37 $^{\circ}$ C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. 145

Figura 54. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos FeZnLP1 (A) e FeZnLP2 (B) na presença de diferentes inibidores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, \sim 25 μ M; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0);

[complexo] = 5 μ M; [DMSO] = 2 M; [SOD] = 20 unidades; [KI] = 0,5 mM; [NaN₃] = 0,5 mM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.147

Figura 55. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos FeZnLP1 (A) e FeZnLP2 (B) na presença dos diferentes inibidores de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μ M; [Net] ou [VM] = 50 μ M; Temperatura = 37 °C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.148

Figura 56. *Footprinting* por DNase I do oligonucleotídeo de 49-mer titulado com complexos. FeZnAld, FeZnLP1 e FeZnLP2. Os nucleotídeos em preto se referem aos sítios de clivagem da DNase I, enquanto os em vermelho são os sítios protegidos pelos complexos.153

Figura 57. Representação estrutural dos complexos derivados de Fe(II)EDTA conjugados a moléculas de afinidade pelo DNA: o Fe(II)EDTA-Distamicina (A), penta-N-metilpirrolcarboximida-Fe(II)EDTA (B), Bis(Distamicina-Fe(II)EDTA) (C) e P₄E-M(III)EDTA (D), onde P₄E é o peptídeo artificial formado por um trímero de tetra-N-metilpirrolcarboxiamida ligados por β -alanina. Adaptado de: Schultz e Dervan (1983b), Schultz e Dervan (1983a), Hertzberg e Dervan (1982) e Youngquist e Dervan (1987).155

Figura 58. Representação esquemática dos sítios de clivagem de DNase I protegidos (nucleotídeos em vermelho) que indicam os possíveis sítios de interação dos complexos FeZnLAla, FeZnLP1 e FeZnLP2.156

Figura 59. Espectro de dicroísmo circular de DNA na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos FeZnAld (A), FeZnLP1 (B) e FeZnLP2 (C). Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 60 μ M; Temperatura = 37 °C.158

Figura 60. Diminuição da intensidade da banda de 275 nm do CT-DNA medida por dicroísmo circular na presença de diferentes razões de complexo/DNA...159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constante observada de clivagem de DNA (k_{obs}), tempo de meia-vida da forma superenovelada do DNA ($t_{1/2}$) e constante de segunda-ordem reacional (k_2) obtida com complexos nos ensaios cinéticos.	108
Tabela 2. Comparação das constantes de segunda-ordem reacional (k_2) obtida com complexos nos ensaios cinéticos sob luz UV (+UV) com as obtidas nos ensaios ao abrigo da luz (-UV).	125
Tabela 3. Comparação da variação da temperatura média de desnaturação do DNA (ΔT_m) obtida para os complexos de Cu(II) em estudo com suas constantes intrínsecas de ligação do CT-DNA (K_b).....	133
Tabela 4. Constante observada de clivagem de DNA (k_{obs}), tempo de meia-vida da forma superenovelada do DNA ($t_{1/2}$) e fator de incremento da atividade ν_s FeZnAld obtida com complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 nos ensaios cinéticos.	149
Tabela 5. Comparação da variação da temperatura média de desnaturação do DNA (ΔT_m) obtida para os complexos de Cu(II) em estudo com suas constantes intrínsecas de ligação do CT-DNA (K_b).....	156

LISTA DE ABREVIATURAS

- A – Adenina
APS – Persulfato de Amônio (do inglês, *Ammonium Persulfate*)
bpy – 2,2'-bipiridina
C – Citosina
CD – Dicroísmo circular (do inglês, *circular dichroism*)
CHES – Ácido *N*-ciclohexil-2-aminoetanosulfônico
CT-DNA – DNA de timo de bezerro (do inglês, *calf thymus deoxyribonucleic acid*)
DNA – Ácido desoxirribonucléico (do inglês, *deoxyribonucleic acid*)
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenediamine*)
F I – forma Superenovelada do DNA plasmidial, forma I
F II - forma Circular Aberta do DNA plasmidial, forma II
F III - forma Linear do DNA plasmidial, forma III
FAM – 6-fluorasceína
G – Guanina
HEPES – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
hyd – hidrazida do ácido 2-furóico
 K_b – Constante intrínseca de ligação do DNA
kbPAP – PAP do feijão-vermelho (do inglês, *kidney bean Purple Acid Phosphatase*)
 k_{obs} – Constante observada de clivagem de DNA
LAld – derivado do ligante LH contendo um aldeído terminal
LH – ligante 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)(2-hidroxibenzil)aminometil]fenol
LP1 – 2-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-6-[[([2-hidroxi-5-metil-3-[[4-[(piren-1-ilmetil)amino]butil]amino)metil]fenil]metil)(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol LP2 – 2-[[([3-[[4-[[bis(piren-1-ilmetil)amino]butil]amino)metil]-2-hidroxi-5-metilfenil]metil)(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol.
MES – Ácido 2-(*N*-morfolino)etanosulfônico
MPE – refere-se ao ligante metilpropídio
msDNA - DNA de fita simples e múltiplas cópias (do inglês, *multicopy single-stranded DNA*)
Net – Netropsina
PAP – Fosfatase Ácida Púrpura (do inglês, *Purple Acid Phosphatase*)
pb – par de base do DNA
PDT – Terapia Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Therapy*)
phen – 1,10-fenantrolina

RNA – Ácido ribonucléico (do inglês, *ribonucleic acid*)

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio (do inglês, *Reactive Oxygen Species*)

S-hyd – hidrazida do ácido tiofenocarboxílico

TEMED – *N,N,N',N'*-tetrametiletano-1,2-diamina
tetraacetic acid)

T_m – Temperatura média de desnaturação do DNA

Tris-HCl – hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano

tRNA – RNA transportador (do inglês, *transfer RNA*)

VM – Verde de metila

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	37
1.1	O ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO (DNA)	37
1.1.1	Estrutura e propriedades biológicas.....	37
1.1.2	O DNA plasmidial: estrutura e usos em biologia molecular.....	46
1.2	INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE DNA POR PEQUENAS MOLÉCULAS.....	48
1.2.1	Breve histórico.....	48
1.2.2	Modos gerais de interação	51
1.2.3	Complexos mononucleares de Cu(II) derivados de antibióticos	56
1.2.4	Complexos binucleares de Fe(III)/Zn(II) miméticos da Fosfatase Ácida Púrpura	58
1.3	O USO DE PEQUENAS MOLÉCULAS COMO FERRAMENTAS MOLECULARES.....	59
1.3.1	Papel biotecnológico	60
1.3.2	Papel terapêutico	61
2	OBJETIVOS	65
2.1	OBJETIVO GERAL.....	65
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	65
3	MATERIAL E MÉTODOS	67
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	67
3.2	COMPLEXOS EM ESTUDO	67
3.2.1	Complexos Mononucleares de Cu(II).....	67

3.2.2	Complexos Binucleares de Fe(III)Zn(II).....	69
3.3	OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	
	PBSK-II.....	71
3.4	CLIVAGEM DE DNA PLASMIDIAL.....	72
3.4.1	Procedimento geral.....	72
3.4.2	Efeito do pH.....	74
3.4.3	Efeito dos ligantes e dos metais isolados	74
3.4.4	Efeito da força iônica	75
3.4.5	Efeito dos sequestradores de ROS.....	76
3.4.6	Efeito dos bloqueadores de sulco	77
3.4.7	Ensaio cinéticos	78
3.5	CLIVAGEM DE OLIGONUCLEOTÍDEOS.....	79
3.6	FOOTPRINTING DE DNA POR DNASE I.....	81
3.7	INTERAÇÃO COM CT-DNA.....	83
3.7.1	Desnaturação térmica de DNA.....	84
3.7.2	Espectroscopia de dicroísmo circular (CD).....	84
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	87
4.1	COMPLEXOS MONONUCLEARES DE CU(II).....	87
4.1.1	CLIVAGEM DE DNA PLASMIDIAL.....	87
4.1.1.1	Efeito da concentração dos complexos	87
4.1.1.2	Efeito do pH.....	90
4.1.1.3	Efeito dos ligantes e dos metais isolados	90
4.1.1.4	Efeito da força iônica	91
4.1.1.5	Efeito dos sequestradores de ROS	97
4.1.1.6	Efeito dos bloqueadores de sulco	103
4.1.1.7	Ensaio cinéticos	107
4.1.2	FOTOCLIVAGEM DE DNA PLASMIDIAL	111

4.1.2.1	Efeito da concentração dos complexos.....	111
4.1.2.2	Efeito dos ligantes e dos metais isolados.....	118
4.1.2.3	Efeito dos sequestradores de ROS.....	119
4.1.2.4	Ensaio cinético	122
4.1.3	CLIVAGEM DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	127
4.1.4	INTERAÇÃO COM O DNA	132
4.1.4.1	Desnaturação térmica de DNA	132
4.1.4.2	Dicroísmo circular	133
4.2	COMPLEXOS BINUCLEARES DE FE(III)ZN(II)	136
4.2.1	Clivagem de DNA plasmidial.....	136
4.2.1.1	Efeito da concentração dos complexos.....	136
4.2.1.2	Efeito do pH	139
4.2.1.3	Efeito dos ligantes e dos metais isolados.....	142
4.2.1.4	Efeito da força iônica	143
4.2.1.5	Efeito dos sequestradores de ROS.....	146
4.2.1.6	Efeito dos bloqueadores de sulco	148
4.2.1.7	Ensaio cinético	149
4.2.2	CLIVAGEM DE OLIGONUCLEOTÍDEOS	150
4.2.3	FOOTPRINTING DE DNA POR DNASE I.....	151
4.2.4	INTERAÇÃO COM DNA	156
4.2.4.1	Desnaturação térmica de DNA	156
4.2.4.2	Dicroísmo circular	157
5	CONCLUSÕES	161
5.1	COMPLEXOS MONONUCLEARES DE Cu(II)	161
5.2	COMPLEXOS BINUCLEARES DE Fe(III)Zn(II).....	163
6	PERSPECTIVAS	167

7	REFERÊNCIAS.....	169
----------	-------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

1.1 O ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO (DNA)

1.1.1 Estrutura e propriedades biológicas

O DNA (do inglês, *deoxyribonucleic acid*) é uma macromolécula, do grupo dos ácidos nucleicos, com extrema relevância nos meios biológicos, pois possui a função de manter e perpetuar as características hereditárias dos indivíduos, bem como, controlar todo o metabolismo dos organismos vivos (ALBERTS, 2008; BLACKBURN e GAIT, 1995). Isso porque o DNA contém toda a base informativa (na forma de genes) para síntese das biomoléculas funcionais dos organismos vivos, como as proteínas (principalmente as enzimas) e outros ácidos nucleicos como o RNA (do inglês, *ribonucleic acid*) (NELSON e COX, 2000). Embora de papel extremamente relevante, pouca atenção foi dada a sua descoberta até a década de 50, pois sua natureza e estrutura química não chamavam a atenção dos pesquisadores da época (ALBERTS, 2008). Os ácidos nucleicos, de modo geral, são longos e repetitivos biopolímeros de extremidades livres compostos de pequenas unidades monoméricas denominadas nucleotídeos. O DNA humano, por exemplo, possui cerca de 6 bilhões de nucleotídeos que se fossem “esticados” em uma fita única possuiria um pouco mais de 1 m de comprimento (BLACKBURN e GAIT, 1995). Os nucleotídeos são compostos, por sua vez, de três grupos funcionais distintos: um grupo fosfato, uma pentose e uma base nitrogenada (Figura 1).

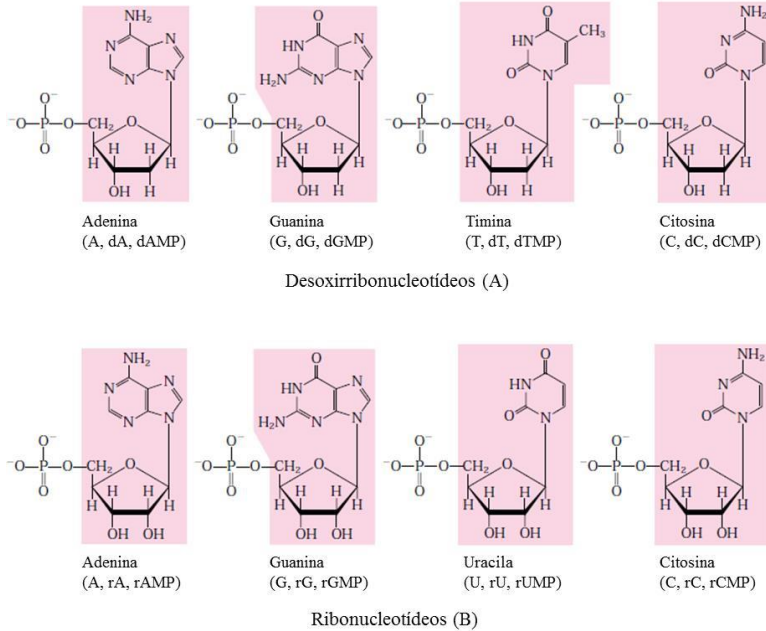


Figura 1. Estrutura dos desoxirribonucleotídeos (A) que compõem o DNA e ribonucleotídeos que compõem o RNA (B). Abaixo dos nomes vê-se a nomenclatura de letra única que define cada nucleotídeo. A letra minúscula “d” e “r”, faz referência ao desoxirribonucleotídeo e ribonucleotídeo, respectivamente. As letras em maiúsculo “MP” fazem referência a forma monofosfatada dos nucleotídeos. Adaptado de Nelson e Cox (2000).

A pentose tem papel muito relevante na distinção de DNA e RNA, servindo até como referência para nomeação destes ácidos nucléicos. Caso a pentose do nucleotídeo em questão seja uma D-ribose, o ácido nucléico composto por estes monômeros deverá ser o RNA, ao passo que se a pentose for a 2-desóxi-D-ribose, o ácido nucléico será o DNA. Por esta característica, inclusive, os nucleotídeos que formam o RNA são chamados de ribonucleotídeos enquanto os que formam o DNA são chamados de desoxirribonucleotídeos. Quanto às bases nitrogenadas, três delas encontram-se tanto em DNA como RNA. São elas: as purinas, guanina (G) e adenina (A); e a pirimidina, citosina (C). Ainda entre as pirimidinas, destacam-se o papel da timina (T) e uracila (U), cuja presença é exclusiva em DNA e RNA respectivamente. Deve-se notar, porém, que a timina nada mais é que um derivado metilado da

uracila (ALBERTS, 2008; BLACKBURN e GAIT, 1995; NELSON e COX, 2000).

Os nucleotídeos encontram-se unidos entre si por meio de ligações fosfodiéster. O grupo fosfato em C-5' de um nucleotídeo é ligado à hidroxila em C-3' da pentose do nucleotídeo seguinte (Figura 2). A ligação fosfodiéster é uma das mais resistentes ligações químicas existentes na natureza. Como o pKa dos grupos fosfato na molécula de DNA (e RNA) é próximo de zero, em pH ~7.0, estes encontram-se negativamente carregados (DOMINGOS et al., 2003; WESTHEIMER, 1987). Os ácidos nucléicos, portanto, são longos polímeros altamente aniônicos. A natureza polianiônica dos ácidos nucléicos dificulta a ação de nucleófilos gerais (não orientados), prevenindo assim o ataque de quaisquer agentes externos à sua estrutura e garantindo sua estabilidade. Há de se salientar, no entanto, que o DNA possui uma estrutura muitíssimo mais estável que seu “análogo” RNA. Não surpreende que o DNA tenha sido a molécula selecionada pela natureza como reservatório permanentemente da informação genética, enquanto o RNA, geralmente, é uma forma transitória de informação. Essa característica surge por duas principais propriedades: serem formados por desoxirribonucleotídeos no lugar de ribonucleotídeos e, diferentemente do RNA, possuírem capacidade de se arranjar em cadeias duplas e pareadas (ALBERTS, 2008; BLACKBURN e GAIT, 1995; NELSON e COX, 2000).

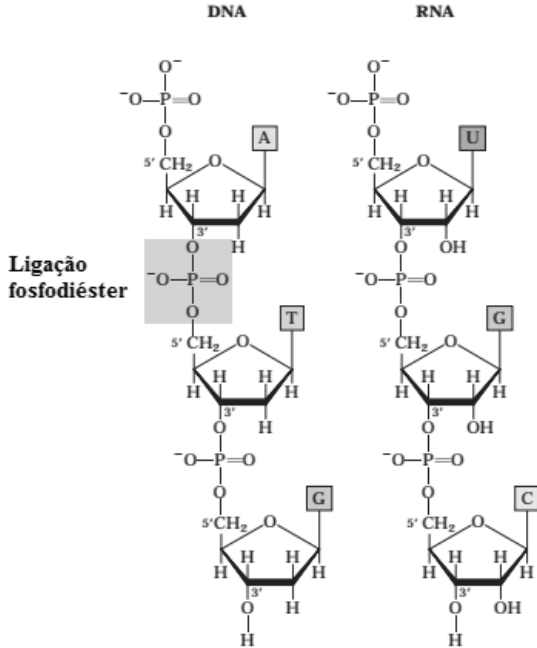


Figura 2. Representação da estrutura química de uma cadeia linear de DNA e RNA. Na caixa em cinza escuro, destaca-se a estrutura da ligação fosfodiéster que une os nucleotídeos. Adaptado de Nelson e Cox (2000).

Como mencionado anteriormente, a pentose presente nos desorribonucleotídeos é a 2-desóxi-D-ribose, ou seja, uma D-ribose similar à encontrada nos ribonucleotídeos, mas sem a hidroxila na posição C-2' (2'-OH). O grupo 2'-OH pode, em meios alcalinos principalmente, agir como um nucleófilo e atacar a ligação fosfodiéster adjacente rompendo a estrutura polimérica (BREAKER et al., 2003; FEDOR e WILLIAMSON, 2005) (Figura 3). Por este motivo, as moléculas de RNA são extremamente instáveis em pHs elevados. Estima-se que em pH neutro (~ 7.0), o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da ligação fosfodiéster no RNA seja de ~ 110 anos ao passo que no DNA a mesma ligação possui um $t_{1/2}$ de 31 milhões de anos (SCHROEDER et al., 2006). Deve-se mencionar, porém, que as moléculas de RNA podem em casos específicos possuir poder de catálise principalmente em reações que envolvem processos de transesterificação intra- e intermolecular (DOHERTY e DOUDNA, 2000; LILLEY, 2003). A

essas moléculas de RNA que possuem poder de catálise dá-se o nome de ribozimas, ou seja, “enzimas de RNA” (FEDOR e WILLIAMSON, 2005; SERGANOV e PATEL, 2007) e estão presentes em vários organismos de todos os reinos incluindo de vírus aos seres humanos (SALEHI-ASHTIANI et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2004).

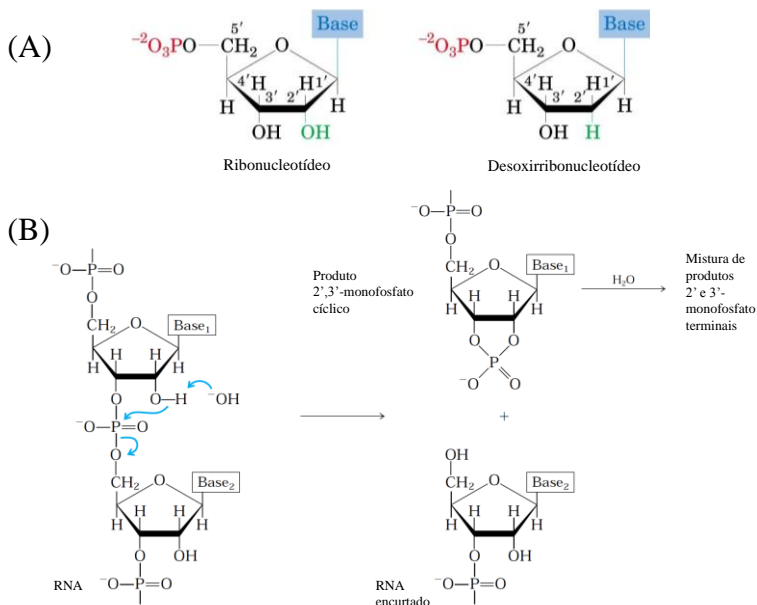


Figura 3. Representação da estrutura química de um ribonucleotídeo (esq.) e um desoxirribonucleotídeo (dir.) destacando, em verde, a posição C-2' na pentose (A). Esquema representando uma reação intramolecular numa cadeia de RNA, onde a hidroxila localizada em C-2' age como nucleófilo e ataca a ligação fosfodiéster, rompendo a cadeia e gerando uma extremidade 5'-OH livre e uma extremidade 2',3'-monofosfato cíclica que pode se decompor em uma mistura de produtos com extremidades 2' ou 3'-fosfato. Adaptado de Nelson e Cox (2000).

A segunda propriedade que confere alta estabilidade ao DNA sobre o RNA é a capacidade de arranjo em estruturas pareadas. No final da década de 40, o austríaco Erwin Chargaff, identificou que o número de moléculas de adenina no DNA era o mesmo que de timina, enquanto o número de moléculas de guanina era idêntico ao número de moléculas de citosina (VISCHER e CHARGAFF, 1948). Anos mais tarde, em 1953,

James Watson e Francis Crick desvendaram o mistério dessa proporcionalidade. Por meio de métodos estruturais observou-se que o DNA não se constitui de uma única longa cadeia (usualmente chamada de “fita”) de desorribonucleotídeos, mas sim por duas cadeias antiparalelas ao longo de um eixo central (WATSON e CRICK, 1953) (Figura 4). As bases nitrogenadas dos desorribonucleotídeos de cada cadeia interagem entre si por meio de ligações de hidrogênio formando pares: timina e adenina, com duas ligações; e guanina e citosina, com três ligações.

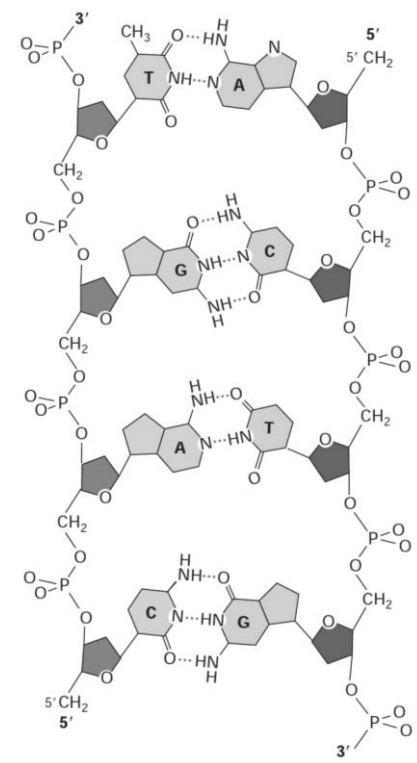


Figura 4. Representação da estrutura química de uma cadeia dupla de DNA. No eixo central da imagem, destacam-se a formação das ligações de hidrogênio entre os nucleotídeos AT e GC, formando os dímeros denominados “pares de bases”. Observa-se também a orientação invertida de uma cadeia em relação a outra, gerando uma estrutura antiparalela, onde a cadeia de sentido 3’→5’ (à esq.) se justapõe a cadeia de sentido 5’→3’ (à dir.). Adaptado de Lodish e colaboradores (2007).

Surge assim o conceito de “par de bases” (pb) que é a unidade dimérica comumente utilizada em biologia molecular para designar o número de nucleotídeos presentes em uma molécula de DNA de dupla-fita. O advento da estrutura de dupla-hélice do DNA deu base para o entendimento não apenas estrutural, mas também funcional, incluindo muitas implicações nos processos de replicação celular e na hereditariedade em si. Essa macroestrutura torna a molécula de DNA mais rígida e ainda mais resistente à ação de ataques nucleofílicos (ALBERTS, 2008; BLACKBURN e GAIT, 1995; NELSON e COX, 2000)

Isso não implica que necessariamente o DNA deva adotar sempre uma estrutura de dupla fita em hélice e o RNA de fita única e simples. Existem formas e até situações em processos celulares nas quais estes ácidos nucléicos adotam macroestruturas diferenciadas. Um típico exemplo é o do RNA transportador. Essas moléculas são formadas por uma única e longa fita de RNA cujos ribonucleotídeos conseguem formar pareamentos internos, ou seja, na mesma cadeia (Figura 5). Esses pareamentos internos criam regiões onde o RNA encontra-se na forma de dupla-hélice, tal qual o DNA (ALBERTS, 2008; BLACKBURN e GAIT, 1995; NELSON e COX, 2000). Em contrapartida, o DNA pode assumir a forma de fita simples em alguns processos metabólicos ou em estruturas perenes. Durante os processos de replicação ou reparação do DNA, determinados tipos de enzimas são capazes de romper as ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas separando as fitas transitoriamente (ALBERTS, 2008). Em outros casos pequenas sequências de DNA de simples-fita podem existir covalentemente ligadas a moléculas de RNA dando origem a moléculas de DNA de fita simples e múltiplas cópias (msDNA, do inglês, *multicopy single-stranded DNA*) cuja função ainda permanece desconhecida (LAMPSON; INOUE e INOUE, 2005).

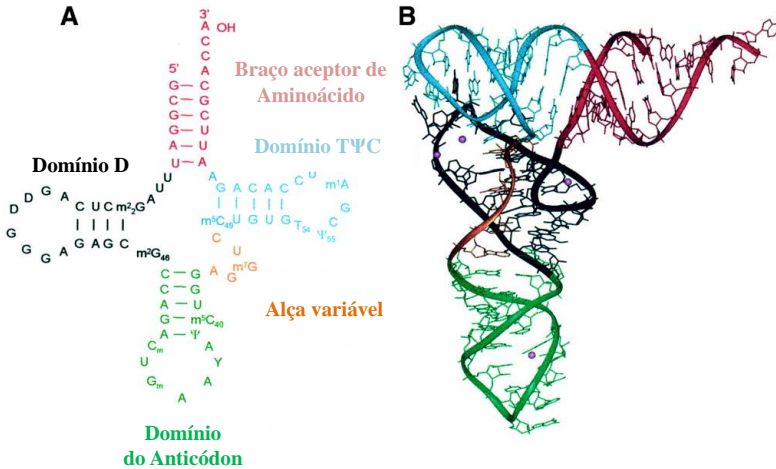


Figura 5. Representação estrutural, mostrando diferentes domínios, de um RNA transportador (tRNA); um exemplo de RNA de cadeia única (simples-fita) (A). Estrutura tridimensional do tRNA ao lado exibindo em diferentes cores os domínios destacados (B). Adaptado de Nobles e colaboradores (2002).

A estrutura de dupla hélice encontrada no DNA possui características muito particulares relacionados à sua torção (helicidade). Dependendo do ambiente e sequência nucleotídica (isto é, ordem e tipo de cada nucleotídeo presente na fita) a hélice pode adotar uma estrutura específica (BLACKBURN e GAIT, 1995) (Figura 6). No ambiente celular, de baixo conteúdo salino e altamente hidratado, temos primordialmente a forma de B-DNA que é a forma clássica de hélice preconizada por Watson e Crick em 1953. No B-DNA, o pareamento das bases fica voltado ao centro do eixo da hélice e, deste modo, empilhadas predominantemente acima das bases vizinhas na mesma fita e perpendiculares ao eixo da hélice. A cada, aproximadamente, 10 pares de base, a hélice dá uma volta completa sobre si mesma girando à direita. Cada fita fica afastada 10,8 Å uma da outra e a distância entre as ligações de hidrogênio provenientes do pareamento de bases é de 2,8 a 3,0 Å. A estrutura da hélice conforme segue a sequência do DNA não é completamente regular devido às conformações das bases nitrogenadas e da pentose. Com isso vemos que a hélice é torcida ao longo do eixo criando duas regiões bem distintas: o sulco menor e o sulco maior. No B-DNA, a profundidade dos sulcos menor e maior possui pouca

diferença (7,5 e 8,8 Å, respectivamente) o que não dificulta a acessibilidade de moléculas externas ao DNA ao centro da hélice. Porém o tamanho da abertura dos sulcos é bastante diferente e, por esta razão, os diferencia. O sulco menor possui uma largura de 5,7 Å enquanto o maior é de 11,7 Å, mais que o dobro do menor. Isso limita em muito o acesso ao eixo da hélice. Por isso, proteínas compostas por aminoácidos que reconhecem sequências específicas de DNA (como os fatores de transcrição) em geral conseguem interagir com as bases nitrogenadas por meio do sulco maior do DNA, uma vez que as proteínas quase sempre possuem uma estrutura tridimensional maior que a hélice do DNA (ALBERTS, 2008; BLACKBURN e GAIT, 1995; NELSON e COX, 2000). Pelo sulco menor, somente pequenas moléculas muito menores que proteínas conseguem ter acesso a esse meio (DERVAN e BÜRLI, 1999; KOPKA et al., 1985; NEIDLE, 2001; NELSON; FERGUSON e DENNY, 2007; TRAUGER; BAIRD e DERVAN, 1996; WHITE et al., 1998). Outros arranjos de hélice como o A-DNA e o Z-DNA podem ser obtidos sob condições de alta salinidade e/ou baixa hidratação. Ambas possuem características muito particulares, mas se apresentam raramente com condições biológicas comuns. O Z-DNA é comumente conhecido por sua hélice torcida à esquerda que difere de todas as demais formas de hélice de DNA que são torcidas à direita (BLACKBURN e GAIT, 1995).

Com o entendimento da estrutura do DNA, surgiu o conceito do “dogma da Biologia Molecular” cuja definição vem sendo modificada e atualizada ao longo dos anos. Francis Crick propôs na década de 70 que o fluxo da informação genética seguia linearmente do DNA ao RNA pelo processo de transcrição e de RNA às proteínas pelo processo de tradução (CRICK, 1970). As proteínas atuavam como pilares estruturais nos organismos vivos e nos diversos processos de catálise, incluindo a própria manutenção do DNA. Sob esta ótica, vê-se que o fator primordial para existência da vida de modo geral é a presença do DNA, onde “dele tudo provém e nele tudo está contido”. Antes do descobrimento dos *prions*, por Stanley Prusiner em 1982, acreditava-se que somente o DNA tem a capacidade de transmitir de um indivíduo a outro uma característica que resulte em função (PRUSINER, 1982; PRUSINER, 1998). Nos dias atuais o conceito do “dogma” inclui a possibilidade de que tanto RNA quanto proteínas possam ser depósitos de informação hereditária bem como outras muitas evidências de que a “triade” (DNA, RNA e proteínas) não é a única responsável por tantos efeitos no genótipo e fenótipo dos organismos vivos, vide os recentes exemplos advindos do estudo da epigenética (SHAPIRO, 2009).

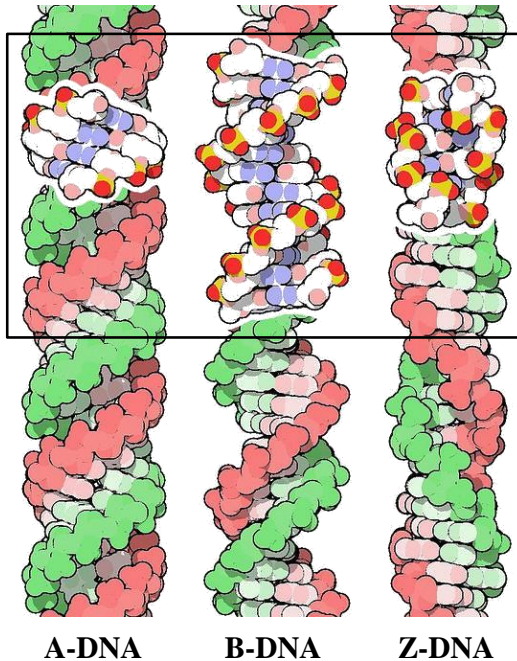


Figura 6. Ilustração mostrando a estrutura de dupla-hélice de três formas diferentes de DNA: A-DNA, B-DNA e Z-DNA. Cada cadeia de nucleotídeos está representada por uma cor (vermelha e verde). Dentro do retângulo, destacam-se os grupos fosfatos (em vermelho e dourado) e as bases nitrogenadas (em azul). Adaptado de PDB (2001).

1.1.2 O DNA plasmidial: estrutura e usos em biologia molecular

As bactérias são organismos unicelulares procarióticos, dotados de estrutura e fisiologia distinta dos organismos ditos superiores como os eucariotos. Devido ao seu tamanho reduzido (de 0,2 a poucos micrômetros) toda a estrutura celular deve ser compactada. Isso afeta principalmente grandes macromoléculas como o DNA. É por esse motivo que vemos este tipo molécula em alto grau de condensação. Há, no entanto, outros modos de acondicionar informação genética sem que haja necessidade de grande espaço físico. Um modo elegante e selecionado pela natureza é a presença de estruturas extracromossomais (ou seja, fora do cromossomo bacteriano que é único e de grande

tamanho) denominadas de plasmídeos. Os plasmídeos são pequenas cadeias de DNA de dupla-hélice cujas extremidades terminais são ligadas entre si. Desta forma os plasmídeos se apresentam como formas de DNA circular, bem diferente dos cromossomos mitóticos que usualmente são lineares e com extremidades terminais livres (BLACKBURN e GAIT, 1995; NELSON e COX, 2000).

A circularização do DNA plasmidial confere uma segunda propriedade que é estrutural: a super-helicidade (Figura 7). Também conhecido por superenovelamento, a dupla hélice do plasmídeo é torcida várias vezes sob um mesmo eixo criando uma superestrutura altamente compactada ocupando um espaço mínimo na célula (DEL SOLAR et al., 1998). O superenovelamento é conduzido no meio intracelular por enzimas específicas (as DNA girases, uma topoisomerase de tipo II) (GELLERT et al., 1976). Por causa dessa supertorção, o DNA superenovelado é altamente tensionado e uma perturbação até mesmo física pode propiciar o relaxamento da estrutura retornando a condição circular (e aberta) original (WITZ e STASIAK, 2010).

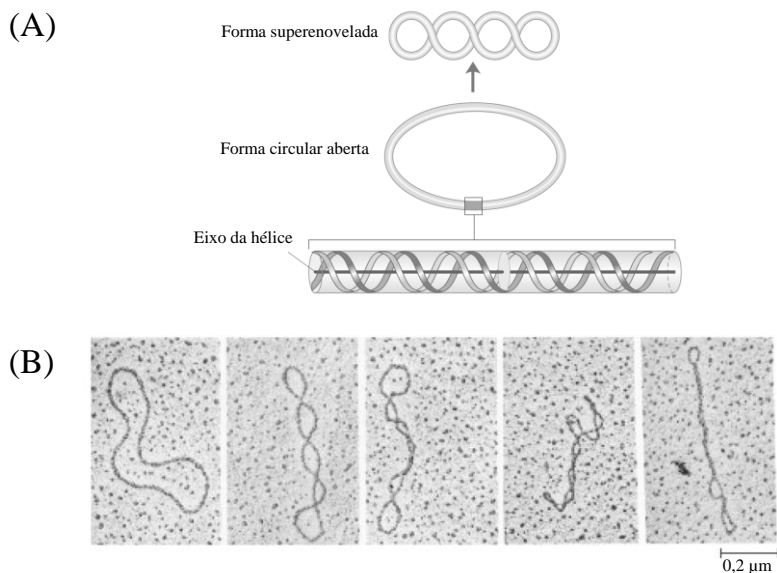


Figura 7. Esquema mostrando a estrutura superenovelada do DNA plasmidial (A). Micrografias de diferentes plasmídios com ordem crescente (esq. para dir.) de superenovelamento (maior número de voltas). Fonte: adaptado de Nelson e Cox (2000).

Do ponto de vista biológico, os plasmídeos são essenciais para garantir uma mínima variabilidade genética em organismos assexuados como as bactérias (que não possuem outros mecanismos de recombinação genética, por exemplo, conjugação bacteriana). Os plasmídeos podem ser transferidos horizontalmente entre uma célula bacteriana e outra, carregando consigo genes que podem ou não trazer benefícios aos indivíduos. Muitos dos processos de resistência a antibióticos ou até de virulência são propiciados pela transferência de genes contidos em plasmídeos (CARATTOLI, 2009). Devido à facilidade com a qual genes podem ser transferidos entre células por meio dos plasmídeos, grande uso se faz desses em técnicas de biologia molecular e clonagem (SAMBROOK e RUSSELL, 2001). De modo geral, um plasmídeo pode receber um gene de um organismo de interesse e levá-lo a outro organismo com facilidade. Para isso são necessárias “ferramentas moleculares” para abrir (isto é, fragmentar, clivar) a estrutura do plasmídeo a fim de se inserir um gene exógeno em sua sequência. Estas ferramentas são enzimas chamadas nucleases, cuja função é clivar ácidos nucleicos como o DNA. A grande parte das nucleases bacterianas são específicas para sequências entre seis e oito pares de bases (BLACKBURN e GAIT, 1995; NELSON e COX, 2000). Sua fidelidade é extremamente elevada, o que dificulta sua ação em alvos generalizados. A busca por novas nucleases ou desenvolvimento de moléculas ou sistemas que possam realizar tal função é frequente na biologia molecular e faz parte do objetivo maior do presente trabalho.

1.2 INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE DNA POR PEQUENAS MOLÉCULAS

1.2.1 Breve histórico

Uma das mais importantes enzimas que participam do metabolismo de DNA é a DNA polimerase, que é responsável pela síntese de novas moléculas de DNA a partir de um molde de DNA já existente (NELSON e COX, 2000). Seu mecanismo até a década de 90 não era completamente elucidado e do final anos 80, Sigman e colaboradores (1979) buscavam confirmar se a DNA polimerase I de *Escherichia coli* era uma metaloenzima dependente de Zn(II). Essa hipótese era reforçada por trabalhos anteriores que mostraram a inibição da atividade desta enzima pela 1,10-fenantrolina, um forte quelante de íons de metais de transição (D'AURORA; STERN e SIGMAN, 1977;

D'AURORA; STERN e SIGMAN, 1978). A proposta era de que a 1,10-fenantrolina se ligasse fortemente ao íon de Zn(II) dentro da polimerase impedindo sua atividade. Entretanto, um estudo posterior conduzido pelo próprio grupo de Sigman mostrou um resultado inesperado. Na realidade, quantidades traço do íon de Cu(II) presentes no meio reacional e a 1,10-fenantrolina davam origem a um complexo: o Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina) (Figura 8).

Depois de formado, o complexo Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina) era capaz de degradar (clivar) o DNA que servia de substrato para a DNA polimerase. A falta de substrato impedia a observação da atividade da polimerase sem haver correlação alguma com a proposição da presença de Zn(II) em sua estrutura. O mecanismo pelo qual este complexo degrada o DNA se dá pela geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS, do inglês, *Reactive Oxygen Species*) que são capazes de oxidar a desoxirribose do DNA (SIGMAN et al., 1979). Embora Sigman e seus colegas tenham falhado na tentativa de demonstrar a presença de um íon de Zn(II) na estrutura da DNA polimerase I de *E. coli*, estes trabalhos deram início às pesquisas sobre a interação de pequenos complexos metálicos com DNA (GRAHAM et al., 1980; MARSHALL et al., 1981; REICH et al., 1981). Além disso, foi demonstrado que os ligantes de 1,10-fenantrolina do complexo exerciam papel fundamental na ligação deste ao sulco menor do DNA (KUWABARA et al., 1986). Assim, a clivagem de DNA por este complexo não seria de todo aleatória como a promovida pelas ROS geradas pelo Cu(II)_{aq} na presença de um agente redutor ou oxidante, por exemplo.

Em 1996, dezessete anos após a descoberta de Sigman e colaboradores (1979), Hegg e Burstyn (1996) relataram a clivagem de DNA pelo complexo Cu(II)-([9]aneN₃)Cl₂, no qual [9]aneN₃ é o ligante triazaciclononano na ausência de oxigênio, diferentemente do Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina), cuja atividade era limitada à presença de oxigênio. Em anaerobiose a clivagem deve ocorrer sem a participação de ROS e, portanto, por um mecanismo possivelmente hidrolítico, como desempenhado pelas enzimas de restrição. Esta proposição é plausível uma vez que este complexo foi capaz de hidrolisar cataliticamente ésteres de fosfato com grande eficiência (DEAL e BURSTYN, 1996; DEAL; HENGGE e BURSTYN, 1996). No entanto, a presença de oxigênio aumenta em 30% a clivagem de DNA por este complexo, o que indicaria a presença do mecanismo oxidativo, ao menos em aerobiose. Comportamento semelhante foi também observado na clivagem de RNA (HEGG et al., 1997). Curiosamente, o complexo Cu(II)-([9]aneN₃)Cl₂ mostrou-se apto à clivagem de ligações peptídicas

em proteínas antes de se demonstrar sua habilidade em hidrolisar DNA (HEGG e BURSTYN, 1995). O contrário se aplica ao complexo Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina), cuja capacidade de clivar proteínas só foi observada uma década após a descoberta de sua habilidade em clivar DNA (GALLAGHER et al., 1998). A hidrólise de ácidos nucleicos e proteínas por um mesmo complexo metálico é uma propriedade incomum e pouco reportada na literatura. A essa propriedade dá-se a designação de promiscuidade catalítica, atribuída ao complexo de cobre(II) CuMFF (no qual MFF é o ligante 2-[(bis(piridilmetil)amino)metil]-4-metil-6-formilfenol), como relatado por nosso grupo (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2005b).

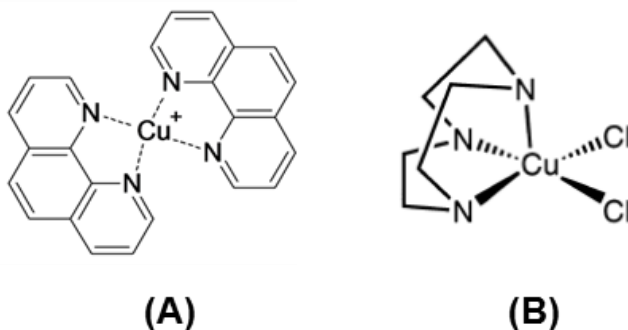


Figura 8. Representação da estrutura dos complexos Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina) (A) e Cu(II)-([9]aneN₃)Cl₂ (B). Adaptado de Hegg e Burstyn (1998) e do autor.

Desde então, a capacidade de interação com o DNA já foi relatada para diversos pequenos compostos sintéticos, dando destaque aos compostos de metais de transição e de lantanídeos. Estes não apenas são capazes de se ligar ao DNA, mas também de clivá-lo sob diferentes condições reacionais e mecanismos, o que foi tema de muitas revisões ao longo de mais de vinte e cinco anos de pesquisa (DESBOUIS et al., 2012; HEGG e BURSTYN, 1998; JIANG et al., 2007; LIPPERT, 1992; MANCIN et al., 2005; SHELL e MOHLER, 2007; SIGMAN e CHEN, 1990; SREEDHARA e COWAN, 2001a). O desenvolvimento de novas moléculas sintéticas com tais propriedades permite utilizá-las como ferramentas para biologia molecular e biotecnologia, na manipulação de ácidos nucleicos, bem como, potencialmente, para a terapêutica, como

indutor de morte celular em tecidos com alta taxa de replicação de DNA.

1.2.2 Modos gerais de interação

As interações entre pequenas e macromoléculas ao DNA se dão por meio de forças intermoleculares clássicas (ligação covalente, ligação de hidrogênio, interações eletrostáticas, interações tipo π - π , ligações de Van der Waals, interações hidrofóbicas, entre outras), associadas a uma região ou macroestrutura da hélice do DNA (bases nitrogenadas, sulco maior ou menor, eixo da hélice ou esqueleto de fosfato-carbono, por exemplo). No entanto, a literatura aborda pelo menos quatro grandes tipos de interação de pequenas moléculas com o DNA que não envolvem (necessariamente) a clivagem do ácido nucléico. São elas: interações eletrostáticas; ligação covalente; ligação por sulco; e intercalação. Em todas elas há uma combinação de uma força intermolecular com uma estrutura/região do ácido nucléico, mas didaticamente, os estes “modos de ligação” não individualizam as forças e as estruturas envolvidas, mas sim os tomam como parte de um único mecanismo de interação.

Como mencionado anteriormente, o DNA é uma molécula polianiônica de grande extensão e massa molar. Assim muitos cátions monovalentes (Na^+ e Li^+) e divalentes (Mg^{2+} e Mn^{2+}) tendem a ser facilmente atraídos ao DNA (BLACKBURN e GAIT, 1995). Como a natureza aniônica do DNA é proveniente dos grupos fosfato, era de se esperar que cátions interagissem exclusivamente com esta porção da macromolécula. No entanto, alguns estudos veem demonstrando que existem regiões (em termos de sequência nucleotídica) preferenciais para ligação de cátions mono e divalentes (EGLI, 2002). As bases nitrogenadas dos desorribonucleotídeos em determinada ordem podem criar “bolsões” altamente eletronegativos facilitando a atração desses cátions (YOUNG; JAYARAM e BEVERIDGE, 1997). Uma vez que cátions inorgânicos pequenos como Na^+ possam também a interagir com as bases nitrogenadas, sua ligação com o DNA deixa de ser limitada pela esfera de solvatação e torna-se menos “aleatória”.

É o observado com um grande grupo de pequenas moléculas que interagem com o DNA por ligações eletrostáticas, as poliaminas biogênicas: putrescina, cadaverina, espermina e espermidina. As interações eletrostáticas entre os grupos terminais amínicos destas moléculas com as bases nitrogenadas do DNA ocorrem especificamente no interior do sulco menor. Isto significa que trata-se de uma interação

mista, onde há participação de interações eletrostáticas e interação por sulco (BRYSONT e GREENALL, 2000; KABIR; HOSSAIN e KUMAR, 2013; KABIR e SURESH KUMAR, 2013; N^oSOUKPOÉ-KOSSI et al., 2008; OUAMEUR e TAJMIR-RIAH, 2004). Interações eletrostáticas mistas também são observadas com pequenas moléculas sintéticas modificadas com guanidina. Nestas, o complexo interage via sulco, mas a carga positiva da guanidina interage com os grupos fosfato das ligações fosfodiéster estabilizando a interação (CHEN et al., 2008a; TJIOE et al., 2010; TJIOE et al., 2011b; TJIOE et al., 2011c) (Figura 9).

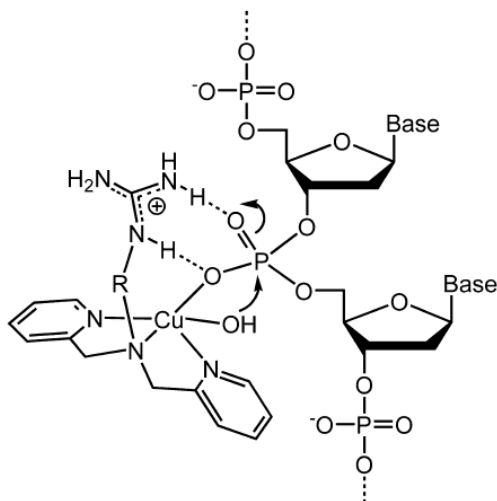


Figura 9. Esquema demonstrando a interação entre um complexo mononuclear de Cu(II) com o DNA por meio de interações eletrostáticas e de hidrogênio entre uma guanidina presente no complexo com o fosfato da ligação fosfodiéster. Adaptado de Belousoff e colaboradores (2007).

Um segundo modo de interação entre pequenas moléculas e DNA está baseado na ligação covalente entre estas espécies (ENOCH e CRONIN, 2010). Geralmente esta interação é bastante observada para íons livres e pequenos complexos metálicos (LIPPERT, 1992). Um clássico exemplo é o do complexo *cis*-Pt(NH₃)₂Cl₂ conhecido popularmente por cisplatina (SIDDIK, 2003a; WANG e LIPPARD, 2005). Em solução os íons cloreto ligados ao metal são substituídos por moléculas de água de alta labilidade e o centro de platina tende a ligar-se covalentemente ao N7 da guanina (JAMIESON e LIPPARD, 1999).

No entanto, o aduto mais comum provocado pela ligação da cisplatina ao DNA é formado com o dímero 1,2-d(GpG) (desoxiguanina-fosfato-desoxiguanina) (BLOMMAERT et al., 1995) e, por esta razão, sequências de DNA com alto conteúdo de guaninas em repetição (*in tandem*) são alvos preferenciais para ligação de compostos de platina baseados na cisplatina (BAIK; FRIESNER e LIPPARD, 2003) (Figura 10). Deve-se salientar, porém, que nem todos os complexos de platina que se ligam ao DNA o fazem de modo covalente (NATILE e MARZILLI, 2006). Neste caso é possível que esta ocorra por meio de ligação ao sulco menor (COLLINS; RIXON e ALDRICH-WRIGHT, 2000), intercalação (LU; VICIC e BARTON, 2005) ou mesmo interações eletrostáticas (ODANI et al., 1991). De modo geral, a ligação covalente de pequenas moléculas ao DNA depende muito da sequência nucleotídica, pois a ligação ocorre justamente nas bases. De forma similar aos complexos de platina que se ligam em repetições GG, íons de Hg^{2+} tipicamente ligam-se covalentemente em repetições TT (FRØYSTEIN e SLETTEN, 1994).

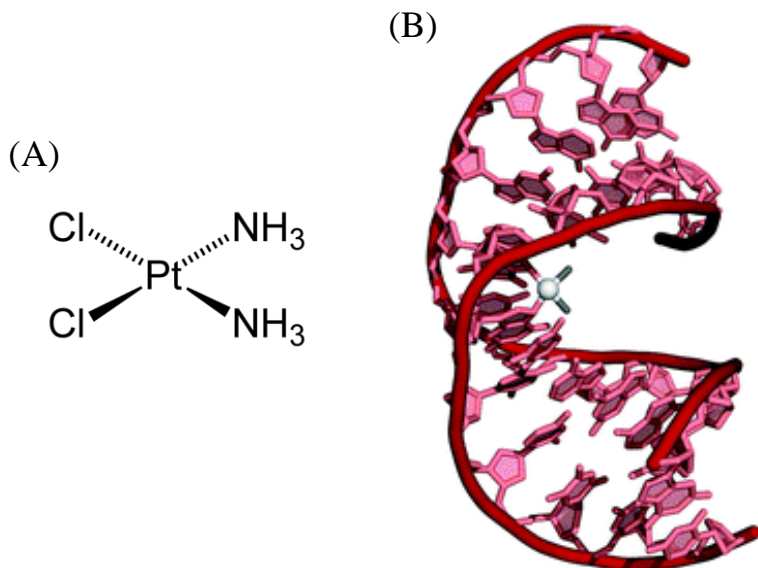


Figura 10. Representação estrutural da cisplatina (A) e estrutura cristalográfica de um DNA de dupla-hélice com uma molécula de cisplatina covalentemente

ligado a um dímero GG (1,2-d(GpG)) (B). Adaptado de Todd e Lippard (2009).

O terceiro mecanismo se refere à ligação pelos sulcos do DNA. Como mencionado anteriormente, os sulcos menor e maior são muito diferentes entre si no B-DNA, em termos de largura, o que impossibilita o acesso de alguns tipos de moléculas em seu interior e, conseqüentemente, a informação contida na seqüência nucleotídica das bases nitrogenadas presentes no sulco (NELSON e COX, 2000). Moléculas que interagem com o DNA por ligação aos sulcos geralmente apresentam fidelidade e especificidade a determinadas seqüências (BLACKBURN e GAIT, 1995) (Figura 11). No caso de pequenas moléculas, há uma vasta coleção de exemplos de ligantes ao sulco menor explorados em diversas revisões de literatura (DAMIA e BROGGINI, 2005; JI et al., 2007; JOHNSON e THOMAS, 2002; KHAN et al., 2012; LAURIA et al., 2007; MIŠKOVIĆ et al., 2013; NELSON; FERGUSON e DENNY, 2007; PANDYA et al., 2010; ZIHLIF et al., 2010). A ligação de pequenas moléculas ao sulco maior é menos observada, mas não menos importante, pois abre um diferente campo de opções (BLECKING et al., 2011; BREMER et al., 2001; HAMILTON e ARYA, 2012; KHALID et al., 2007; KIM e NORDEN, 1993; LEE et al., 2012; MONACO, 2007; WILLIS e ARYA, 2006).

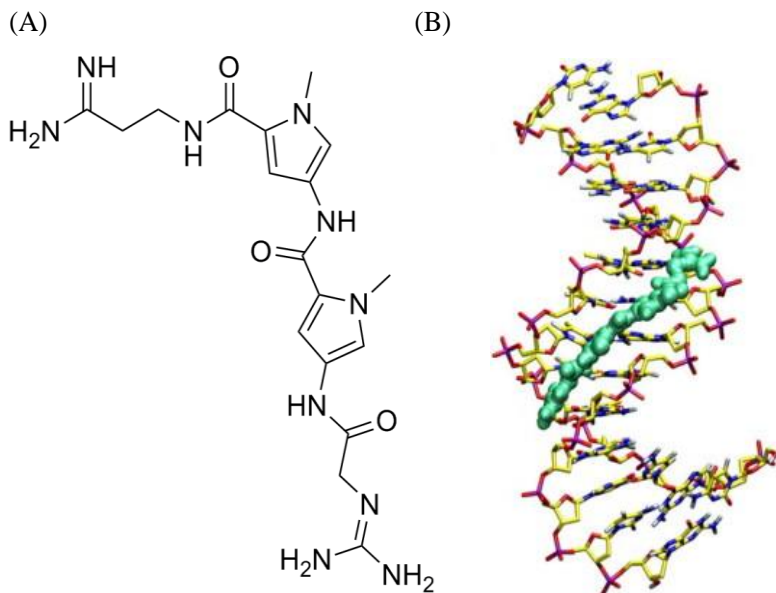


Figura 11. Representação estrutural da netropsina (A) e estrutura cristalográfica de um DNA de dupla-hélice com uma molécula de ligada ao sulco menor (B). Adaptado de Dolenc e colaboradores (2006).

O quarto modo de ligação do DNA é um dos mais clássicos e mais conhecidos: a intercalação. Este tipo de interação somente é possível graças à estrutura de dupla hélice que os ácidos nucleicos podem adotar, ou seja, é exclusiva para este tipo de macromolécula (BLACKBURN e GAIT, 1995; NELSON e COX, 2000). O mais conhecido e clássico exemplo da literatura é do brometo de etídio (WARING, 1965). Esta molécula interage diretamente com as bases nitrogenadas no centro da hélice, pela formação de ligações tipo π - π entre a porção planar da molécula e os anéis das bases (LEPECQ e PAOLETTI, 1967; LI et al., 2009; MEYER-ALMES e PORSCHE, 1993) (Figura 12). Neste tipo de interação há pouca seletividade e preferência por sequências nucleotídicas específicas. Porém, há uma estabilidade maior entre alguns tipos de pares de bases com os agentes intercalantes, conferindo assim uma maior “especificidade” (REINHARDT e KRUGH, 1978). Complexos metálicos com motivos estruturais planares quase sempre exibem propensão a serem intercalantes o que é tema de diversas revisões de literatura

(ARMITAGE, 2005; BIVER; SECCO e VENTURINI, 2008; BRAÑA et al., 2001; DENNY, 2002; ERKKILA; ODOM e BARTON, 1999; LIU e SADLER, 2011; NAVARRO et al., 2003; STREKOWSKI e WILSON, 2007; ZEGLIS; PIERRE e BARTON, 2007).

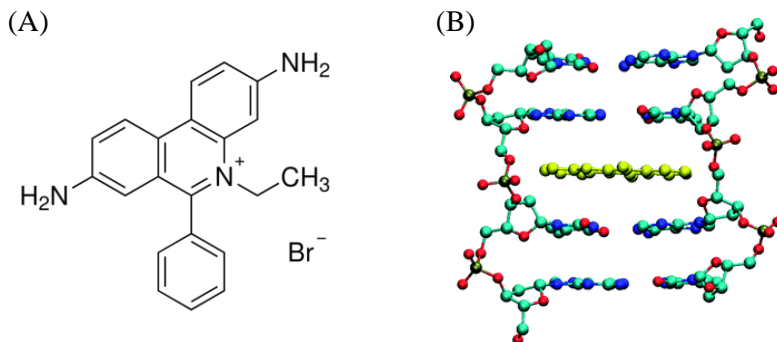


Figura 12. Representação estrutural do brometo de etídeo (A) e estrutura proposta da intercalação de uma molécula de brometo de etídeo com a dupla-hélice do DNA (B). Adaptado de Cerny e Hobza (2007).

Existem ainda outros modos de ligação que envolvem parcialmente os meios acima citados ou cujo mecanismo ainda não está bem compreendido. Destaca-se o descoberto por Jacqueline Barton: a inserção. Neste modo de ligação, uma pequena molécula consegue não somente atingir profundamente a estrutura do DNA como criar interações entre as bases nitrogenadas de nucleotídeos adjacentes de modo que a própria molécula se comporta como nucleotídeo “truncado” (CORDIER; PIERRE e BARTON, 2007; KOMOR e BARTON, 2014; ZEGLIS et al., 2009). Este tipo de interação foi observado em regiões de DNA pareadas incorretamente (do inglês, *mismatch*) o que acaba criando anomalias na estrutura da dupla hélice e oportunizando modos de ligação não comuns como a inserção.

1.2.3 Complexos mononucleares de Cu(II) derivados de antibióticos

No final da década de 90, James Cowan conduziu uma série de trabalhos reportando a interação e clivagem de DNA por um novo grupo de complexos de Cu(II) contendo como ligantes antibióticos e seus

derivados, bem como aminoglicosídeos (SREEDHARA e COWAN, 2001a). A essas moléculas dá-se o nome de metaloantibióticos, cuja estrutura e função vêm sendo amplamente estudados nos últimos anos a fim de se desenvolver novos fármacos e estratégias para quimioterapia antimicrobiana (MING, 2003). Os complexos desenvolvidos por Cowan mostraram-se capazes de clivar DNA (PATWARDHAN e COWAN, 2001; SREEDHARA e COWAN, 1998; SREEDHARA; FREED e COWAN, 2000) e RNA (SREEDHARA; PATWARDHAN e COWAN, 1999), bem como clivar seletivamente um tipo de mRNA da bactéria *Escherichia coli* (CHEN e COWAN, 2002) e o RNA do vírus HIV-1 (SREEDHARA e COWAN, 2001b) (Figura 13A).

Desde então muita atenção vem sendo dada a essa nova classe de compostos derivados de antibióticos com Cu(II) que são capazes de clivar ácidos nucleicos, com os ligantes: amicacina (JEZOWSKA-BOJCZUK et al., 2002), gentamicina (LESNIAK et al., 2003), sisomicina (SZCZEPANIK et al., 2004), actinomicina D (SZCZEPANIK; KACZMAREK e JEZOWSKA-BOJCZUK, 2004), sinefungina (MUCHA et al., 2006), apramicina (BALENCI et al., 2009), higromicina B (GAGGELLI et al., 2010) e ciprofloxacina (FARROKHOPOUR et al., 2014). Outra estratégia que vem sendo utilizada é com compostos ternários de Cu(II) de estrutura Cu(II)(antib)(phen), em que “phen” é o ligante sintético 1,10-fenantrolina e “antib” é um antibiótico. Estes exemplos incluem como ligante de antibiótico: o ácido nalidíxico (RAMIREZ-RAMIREZ et al., 1998), a norfloxacina (KATSAROU et al., 2008; RUÍZ et al., 2007) e a ciprofloxacina (HERNÁNDEZ-GIL et al., 2009).

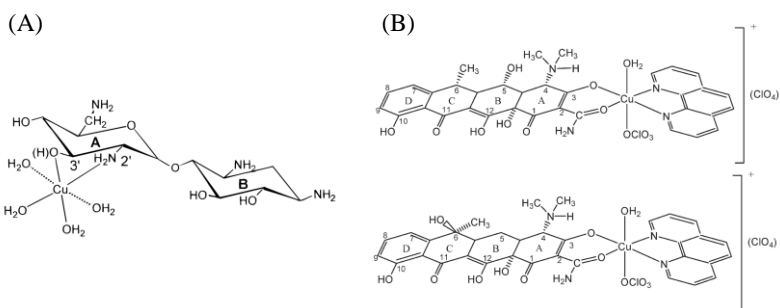


Figura 13. Representação estrutural dos complexos Cu(II)-neamina (A) $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{tc})(\text{phen})]^{2+}$, onde dox e tc são os antibióticos ligantes

doxiciclina e tetraciclina e phen é o ligante 1,10-fenantrolina (B). Adaptado de Sreedhara, Freed e Cowan (2000) e Silva e colaboradores (2011).

Recentemente uma série de complexos de Cu(II)(antib)(phen), onde o ligante “antib” são derivados de tetraciclina, teve sua interação e clivagem de DNA reportada por nosso grupo. Estes complexos mostraram-se muito ativos frente ao DNA plasmidial fragmentando completamente o ácido nucléico em poucas horas (Figura 13B) (SILVA et al., 2011). Neste trabalho, também foi relatada uma forte atividade antitumoral por parte dos complexos e assim questionamentos foram levantados na tentativa de ligar o efeito antitumoral ao de clivagem de DNA. Isso porque alguns metaloantibióticos naturais, como a bleomicina, possuem atividade antimicrobiana e antitumoral devido à sua potente capacidade de clivagem de DNA (BURGER, 1998; GALM et al., 2005; POVIRK et al., 1977). Além disso, outra propriedade pouco explorada por esta promissora classe de compostos é sua foto-ativação. Alguns antibióticos, como as tetraciclina, são fotossensíveis (CULLEN; CATALANO e HELFMAN, 1966; ORENTREICH; HARBER e TROMOVITCH, 1961; WIEBE e MOORE, 1977) e por isso são capazes de catalisar reações mediadas por luz como a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) que lesionam fortemente um grande número de biomoléculas (KHAN; MUSTAFA e MUSARRAT, 2003). Na presença de centros metálicos, os ligantes de antibiótico atuam como “captadores de luz”, gerando ROS por catálise metal-assistida, assim foto-clivando o DNA (BORTOLOTTI et al., 2011). A fotoclivagem de DNA é um campo de extremo interesse, pois apresenta uma propriedade com grande aplicação na terapêutica, a capacidade de modular a atividade de uma molécula com o “ligar-ou-desligar” de uma fonte de luz. Esses exemplos demonstram que há um novo e pouco explorado campo para novos complexos de Cu(II) derivados de antibióticos, sendo que os estudos sobre foto-ativação são ainda mais inexplorados.

1.2.4 Complexos binucleares de Fe(III)Zn(II) miméticos da Fosfatase Ácida Púrpura

A fosfatase ácida púrpura (PAP do inglês, *Purple Acid Phosphatase*) é uma metaloenzima, ou seja, possui metais associados ao seu sítio catalítico e hidrolisa ésteres de fosfato. O sítio ativo desta metaloenzima se constitui de um centro binuclear de Fe(III)M(II), sendo M(II) um íon divalente de Fe, Zn ou Mn, dependendo do organismo

vivo ao qual a enzima pertence (MITIĆ et al., 2006). Seu mecanismo catalítico ainda é alvo de muitos estudos o que inspira o desenvolvimento de moléculas que mimetizem o seu centro ativo. São esses os chamados complexos biomiméticos. Os complexos biomiméticos são desenvolvidos para mimetizar propriedades estruturais e funcionais das enzimas originais (ZHAO et al., 2013). Com isso há uma diminuição da complexidade do sistema o que facilita a compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de catálise. Em 2007, Ademir Neves conduziu o desenvolvimento do primeiro modelo biomimético da PAP do feijão-vermelho (kbPAP, do inglês, *kidney bean Purple Acid Phosphatase*) cujo sítio ativo constitui-se de um centro metálico de Fe(III)/Zn(II) (NEVES et al., 2007). Este complexo (Figura 14) modelo mostrou-se não apenas semelhante à enzima mimetizada em aspectos estruturais e físico-químicos, mas também, funcionais sendo ativo na hidrólise de ésteres de fosfato ativados (PERALTA et al., 2010a).

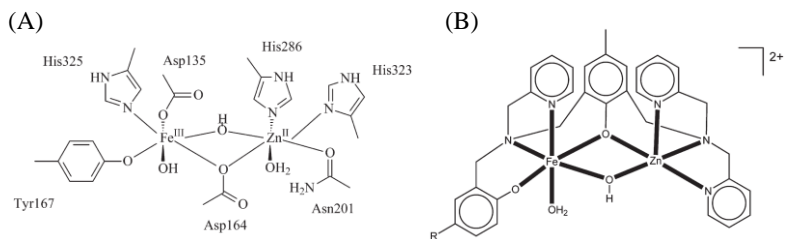


Figura 14. Representação do sítio ativo da fosfatase ácida púrpura do feijão vermelhor (kbPAP) (A) em comparação com o complexo de Fe(III)Zn(II) descrito por Peralta e colaboradores (2010) (B). Adaptado de Peralta e colaboradores (2010).

Este mesmo complexo modelo, no entanto, também foi capaz de hidrolisar um fosfato não ativado, no caso a ligação fosfodiéster do DNA. Em vista desse potencial, novos estudos vêm sendo realizados e novos complexos sendo desenvolvidos para aumentar este potencial e fornecer subsídios para controle de sua atividade.

1.3 O USO DE PEQUENAS MOLÉCULAS COMO FERRAMENTAS MOLECULARES

1.3.1 Papel biotecnológico

Os princípios básicos da biologia molecular quase sempre necessitam de manipulação gênica, isto é, modificar a sequência de DNA de um organismo (AUSUBEL et al., 1999; SAMBROOK e RUSSELL, 2001). Processos como clonagem requerem ativamente a clivagem de diferentes sequências de DNA a fim de inseri-las em outro organismo. Nesta situação, se faz uso de enzimas que sejam capazes de clivar seletivamente regiões do DNA a fim de remover genes inteiros ou permitir a inserção de outros (HARRIS, 2000). Estas são as enzimas de restrição, provenientes exclusivamente de bactérias. Embora de grande variedade, cada enzima reconhece somente um único tipo de sequência alvo o que limita em algumas situações o seu uso. Nota-se aí a necessidade em desenvolver novas ferramentas que possuam menor limitação (maior espectro de sequências alvo). Além disso, enzimas de modo geral sofrem eventuais problemas na rotina laboratorial como: alta suscetibilidade de perda de atividade com frequentes ciclos de congelamento/descongelamento, necessidade de uso de tampões de atividade com restritas condições de pH e relativa adsorção em recipientes plásticos. Pequenas moléculas sintéticas possuem uma síntese consideravelmente mais barata que uma enzima recombinante e geralmente apresentam maior estabilidade e atividade em condições não tão restritivas. Dentro deste cenário, moléculas sintéticas que sejam capazes de clivar ácidos nucleicos podem ser viáveis candidatos a substituir as atuais enzimas de restrição e encorajam os pesquisadores em seu desenvolvimento e caracterização.

Existe uma diversidade de técnicas que utilizam enzimas para clivar ácidos nucleicos como o *DNA footprinting* ou *nick translation* e que poderiam ter suas enzimas substituídas por agentes sintéticos de clivagem. A técnica de *DNA footprinting*, por exemplo, utiliza geralmente como agente de clivagem a enzima DNase I, que tem preferência em hidrolisar a ligação fosfodiéster adjacente à uma pirimidina (C ou T) (HAMPSHIRE et al., 2007). Portanto, esta enzima pode oferecer alguma especificidade por sítio, o que nem sempre é o ideal para a técnica (BLECKING et al., 2011; BREMER et al., 2001; HAMILTON e ARYA, 2012; KHALID et al., 2007; KIM e NORDEN, 1993; LEE et al., 2012; MONACO, 2007; WILLIS e ARYA, 2006). Em muitas ocasiões, para se atingir a máxima resolução nucleotídica, se faz o uso de Fe(EDTA)^{2-} um pequeno complexo que cliva indiscriminadamente qualquer sequência de DNA pela geração de radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$) (TULLIUS e GREENBAUM, 2005).

Embora eficiente para sequências curtas de DNA, a digestão de grandes fragmentos pode tomar muito tempo até a obtenção das condições reacionais ótimas (JAIN e TULLIUS, 2008). Outros agentes de clivagem como o Fe(II)-MPE, no qual MPE é o ligante metilpropídio (um análogo de etídio) (HERTZBERG e DERVAN, 1982; VAN DYKE e DERVAN, 1983) e o próprio Cu(I)-bis-1,10-fenantrolina já foram utilizados em alguns estudos (PAPAVASSILIOU e HEUMANN, 1994). A literatura relata que mesmo agentes sintéticos sem especificidade por sequências, como o Fe(II)-MPE, podem apresentar algum tipo de padrão de clivagem, o que não é o esperado para ensaios como os de *DNA footprinting*. Portanto, complexos altamente reativos e sem qualquer especificidade podem ser ferramentas de grande valor comercial no que se refere a sua aplicação no método de *DNA footprinting* de grandes sequências, o que não significa que o desenvolvimento de complexos metálicos com sítios específicos de clivagem não atraíam interesse para aplicação em outras técnicas.

Nos últimos anos vem crescendo o interesse pela “edição” de sequências gênicas em organismos inteiros. Nestes casos, deletar e inserir genes usando enzimas de restrição não é possível, pois geralmente os organismos alvo não possuem as sequências reconhecidas por estas enzimas. Hoje alguns métodos utilizam sistemas com Ce(IV)/EDTA (AIBA e KOMIYAMA, 2012; AIBA; SUMAOKA e KOMIYAMA, 2011; KOMIYAMA, 2013; KOMIYAMA et al., 2008; MIYAJIMA et al., 2009) ou motivos de “dedos de zinco” (KIM et al., 2012; LEE; KIM e KIM, 2010; PORTEUS e CARROLL, 2005; SHUKLA et al., 2009; SZCZEPEK et al., 2007; WEINTHAL et al., 2010) para seletivamente ligar e clivar regiões em megagenomas (genomas maiores que 1 milhão de pares de base) tanto em animais como plantas.

1.3.2 Papel terapêutico

O DNA é cerne do controle metabólico celular o que significa que alterações em sua estrutura e dinâmica afetam diretamente a manutenção da integridade celular. Neste contexto, moléculas que sejam capazes de interagir com o DNA são fortes candidatos a possuírem efeitos diretos na saúde do ambiente celular. A cisplatina, por exemplo, é um dos complexos de metais de transição capazes de interagir com o DNA bloqueando os processos de transcrição e, principalmente, de replicação levando a morte celular (REEDIJK e LOHMAN, 1985). Células tumorais são alvos frequentes de moléculas como a cisplatina,

pois estão em constante divisão celular e desta maneira, com o seu material genético mais exposto à ação de xenobiontes. Por isso, muitos complexos de metais exibem atividade antitumoral expressiva.

Embora a cisplatina tenha uma potente atividade antitumoral por se ligar fortemente ao DNA, essa interação não leva à clivagem do ácido nucléico (SIDDIK, 2003b). Outros exemplos, no entanto, mostram que algumas moléculas tem uma atividade antitumoral diretamente relacionada à atividade de clivagem de DNA. É o caso das bleomicinas que são glicopeptídeos obtidos de *Streptomyces verticillus* com potente ação bactericida e antitumoral (Figura 15). (GALM et al., 2005). Essas propriedades se devem à eficiente clivagem oxidativa de DNA, na presença de íons de ferro e oxigênio dissolvido, formando o “complexo ativado de Fe(II)-bleomicina” (BURGER, 1998). A substituição do metal na estrutura do complexo metal-bleomicina modifica radicalmente sua atividade frente ao DNA. Por exemplo, o sistema Co(III)-bleomicina é capaz de clivar DNA somente na presença de luz UV (CHANG e MEARES, 1982), ao passo que o sistema Cu(II)-bleomicina não tem atividade relevante (SUZUKI; KUWAHARA e SUGIURA, 1985).

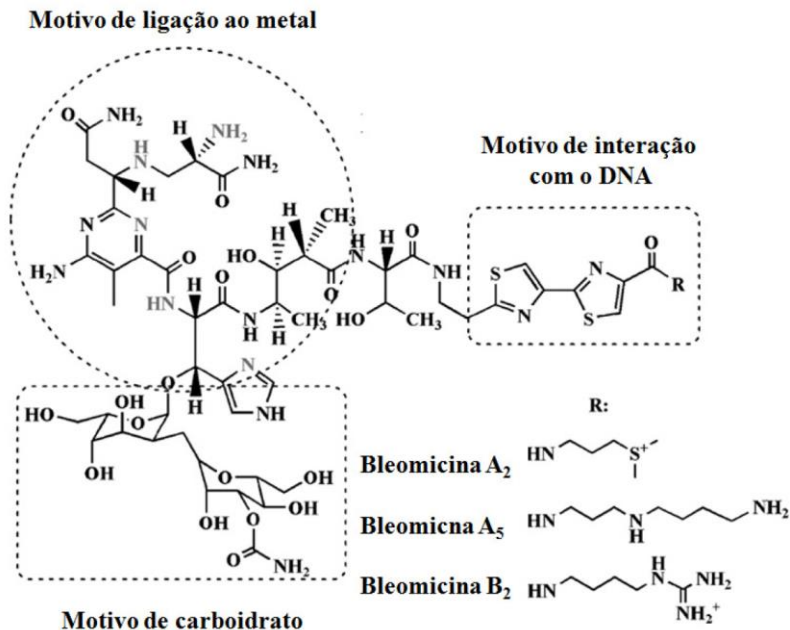


Figura 15. Representação estrutural geral das bleomicinas destacando os grupos funcionais responsáveis pela ligação do DNA, reconhecimento celular e formação de ROS. Adaptado de Jiang e colaboradores (2007).

Vários outros compostos de metais já demonstraram ser capazes de clivar ácidos nucleicos e exibirem atividade antitumoral, embora haja poucos estudos mostrando uma associação direta entre tais propriedades (BORTOLOTTI et al., 2011; GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2009b; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ et al., 2005; PERALTA et al., 2010a; REY et al., 2009; SILVA et al., 2011). Além disso, já se demonstrou que muitos complexos de metais podem interferir em processos celulares como a expressão gênica, sendo então promissores modelos como agentes terapêuticos (BOERNER e ZALESKI, 2005; FU e TURRO, 2001; MAPP et al., 2000; RAJA e NAIR, 2008; SORASAENEE et al., 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a interação e clivagem de DNA por quatro complexos mononucleares de Cu(II) e três novos complexos binucleares Fe(III)Zn(II).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a clivagem de DNA pelos complexos em estudo sob diferentes condições reacionais com fim de se identificar as condições ótimas para catálise.
- Comparar o efeito dos sais (dos metais correspondentes) e ligantes com os dos complexos em termos de clivagem de DNA.
- Verificar a influência da força iônica na atividade de clivagem de DNA pelos complexos em estudo.
- Determinar o mecanismo de atuação dos complexos na clivagem de DNA por meio da adição de sequestradores de espécies reativas de oxigênio às reações.
- Analisar o modo de clivagem de DNA pelos complexos na presença de inibidores específicos do sulco menor e maior.
- Determinar os parâmetros cinéticos das reações de clivagem de DNA plasmidial pelos complexos em estudo a fim de determinar a ordem de reatividade dos complexos.
- Determinar de que forma a exposição à luz UV modifica a atividade e mecanismo dos complexos mononucleares de Cu(II).
- Verificar a interação e/ou clivagem de DNA em sítios específicos, utilizando-se de pequenos oligonucleotídeos como substrato de DNA e o *Footprinting* de DNA por DNase I.

- Analisar a interação dos complexos com DNA por meio de métodos espectroscópicos tais como: desnaturação térmica acoplada a espectroscopia de UV-Vis e espectroscopia de dicroísmo circular.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados nos ensaios com DNA possuíam grau de biologia molecular e suas soluções foram preparadas em água ultrapura Milli-Q (resistividade a 25 °C de no máximo 18,2 MΩ.cm, com Teor de Carbono Orgânico Total < 10 ppb) obtida pelo sistema Milli-Q Sinergy (Millipore, USA). Nos casos onde havia necessidade do uso de solventes orgânicos, como etanol e acetonitrila, os reagentes utilizados possuíam grau analítico para espectroscopia UV-Vis. Todas as soluções (incluindo as dos complexos) foram previamente esterilizadas, utilizando-se filtros de membrana tipo Millex de 0,22 µm (Millipore, USA) para evitar a contaminação bacteriana.

3.2 COMPLEXOS EM ESTUDO

3.2.1 Complexos Mononucleares de Cu(II)

Os complexos de Cu(II) que foram utilizados nesta seção foram sintetizados pela aluna de doutorado em Química, Priscila Pereira da Silva, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Elene Cristina Pereira Maia, do Instituto de Ciências Exatas (ICEX), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Assim como os complexos (Figura 16), os respectivos ligantes também foram cedidos ao nosso laboratório para serem utilizados como controles. Os complexos são: $[\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})]^{2+}$ (dorovante Cu(hyd)(bpy)), $[\text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})]^{2+}$ (dorovante Cu(hyd)(phen)), $[\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy})]^{2+}$ (dorovante Cu(S-hyd)(bpy)) e $[\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})]^{2+}$ (dorovante Cu(S-hyd)(phen)), em que: hyd e S-hyd são a hidrazida do ácido 2-furóico e do ácido 2-tiofenocarboxílico e bpy e phen são os ligantes heterocíclicos 2,2'-bipiridina e 1,10-fenantrolina, respectivamente.

Suas estruturas foram determinadas por cristalografia de raios-X, com exceção a do complexo Cu(S-hyd)(bpy) (SILVA et al., 2014). Entretanto, devido sua natureza química ser muito similar ao complexo Cu(hyd)(bpy) cuja estrutura foi resolvida, acredita-se que ambos os complexos possuam estruturas tridimensionais semelhantes (Apêndice A). Embora sejam relativamente solúveis em água, estes complexos apresentam ótima solubilidade em acetonitrila (~8 mM). Por este motivo, os complexos foram solubilizados em água acetonitrila e as

reações com o DNA foram realizadas em meio acetonitrila:água (25:75, v/v).

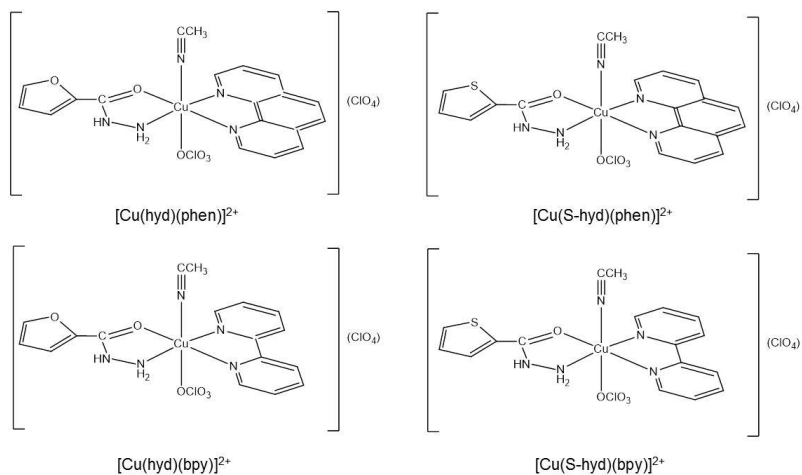


Figura 16. Representação da estrutura dos complexos $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})$, $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})$, $\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy})$ e $\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$. Adaptado de Silva (2014).

Resultados prévios indicam que estes complexos tem a capacidade de penetrar em células de leucemia mielóide crônica K562 com grande eficiência e com isso promover uma forte citotoxicidade (SILVA et al., 2014). Nossos estudos terão como foco procurar estabelecer as relações entre a atividade antitumoral destes complexos e sua provável interação com DNA a ser doravante caracterizada. Além disso, estes complexos são ternários, ou seja, possuem três diferentes “partes”: um centro coordenante ocupado por $\text{Cu}(\text{II})$ e dois ligantes independentes. Os complexos $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})$ e $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})$ partilham do mesmo ligante hyd, mas diferenciam-se pela presença do ligante bpy (em $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})$) e phen (em $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})$) que possuem diferentes afinidades pelo DNA. De modo semelhante, $\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy})$ e $\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$ partilham do mesmo ligante S-hyd, mas diferenciam-se pela presença do ligante bpy. Quando analisamos a construção dos complexos, podemos separá-los em “duplas cruzadas”, pois $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})$ e $\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy})$ possuem o mesmo ligante bpy e $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})$ e $\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$ possuem o mesmo ligante phen.

Além da análise de suas propriedades de interação e clivagem de DNA, uma avaliação da reatividade destes complexos de Cu(II) em termos de fotoclivagem de DNA. Esta abordagem segue o proposto por Bortolotto (2011), cujo trabalho foi desenvolvido com complexos ternários de Cu(II) derivados dos antibióticos que apresentam semelhanças químicas com os complexos abordados nesta tese.

3.2.2 Complexos Binucleares de Fe(III)Zn(II)

Os complexos de Fe(III)Zn(II) que foram utilizados nesta seção foram sintetizados pelo aluno de doutorado em Química, Tiago Pacheco de Camargo, sob orientação do Prof. Dr. Ademir Neves, do Departamento de Química (QMC/CFM), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os complexos são: $[\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LP1}]$ (doravante FeZnLP1) e $[\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LP2}]$ (doravante FeZnLP2), onde LP1 é o ligante assimétrico binucleante 2-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-6-[[[(2-hidroxi-5-metil-3-[[4-[(piren-1-ilmetil)amino]butil]amino)metil]fenil]metil](piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol e LP2 é o ligante 2-[[[3-[[4-[[bis(piren-1-ilmetil)amino]butil]amino)metil]-2-hidroxi-5-metilfenil]metil](piridin-2-ilmetil)amino]metil]-6-[[bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil]-4-metilfenol. Uma aproximação da estrutura dos complexos foi determinada pelos responsáveis pela síntese, pois não foi possível a obtenção de cristais (Figura 17). Estes complexos apresentam boa solubilidade em acetonitrila (~2 mM). Por este motivo, os complexos foram solubilizados em água / acetonitrila e as reações com DNA foram realizadas em meio acetonitrila:água (25:75, v/v).

Estes complexos são derivados pireno-substituídos do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LH}]$ (onde LH é o ligante 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-piridilmetil)(2-hidroxibenzil)aminometil]fenol) descrito por Peralta e colaboradores (2010). Este complexo (doravante FeZnOH) foi sintetizado como mimético do sítio ativo da fosfatase ácida púrpura do feijão vermelho, apresentando uma grande similaridade estrutural (Apêndice B) e funcional, já que demonstrou capacidade de hidrolisar ésteres de fosfato com grande eficiência. Por este último motivo, o complexo foi desafiado a hidrolisar um éster de fosfato de baixa reatividade: a ligação fosfodiéster presente no DNA. No entanto, sua atividade mostrou-se relativamente baixa hidrolisando aproximadamente 10 % do DNA plasmidial após 16 h de reação a 50 °C em pH ótimo. Seu mecanismo,

entretanto, é predominantemente hidrolítico o que desperta atenção para algumas aplicações biotecnológicas específicas.

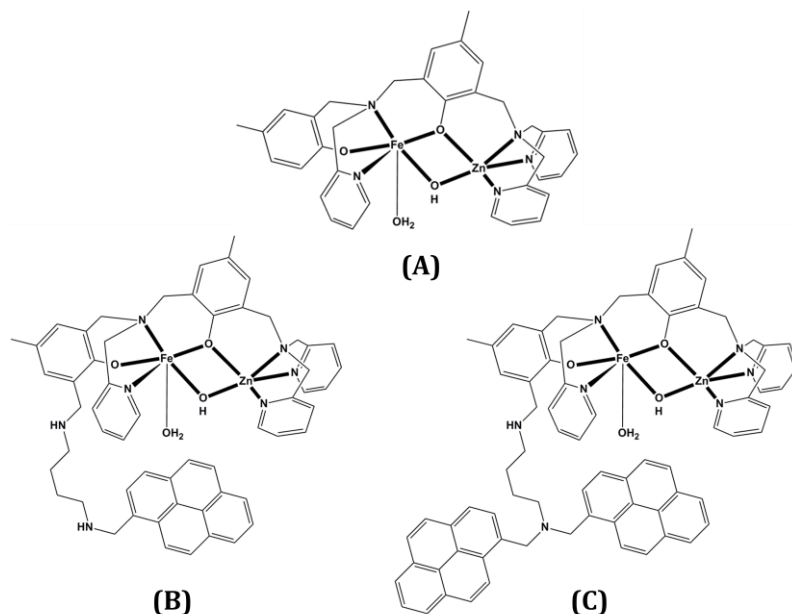


Figura 17. Representação estrutural dos complexos $[\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LH}]$ (FeZnOH , A) descrito por Peralta e colaboradores (2010), $[\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LP1}]$ (FeZnLP1 , B) e $[\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LP2}]$ (FeZnLP2 , C).

O pireno é uma molécula planar com grande interação com o DNA via intercalação (WOLFE; SHIMER e MEEHAN, 1987). Diversos estudos vêm demonstrando que a incorporação de grupos funcionais (que possuem afinidade pelo DNA) em ligantes parece ser uma interessante alternativa para aumentar a eficiência de complexos de metais em termos de catálise (AN et al., 2006; BELOUSOFF et al., 2008; BOSEGGIA et al., 2004; CHEN et al., 2009; HE et al., 2008; KELLETT et al., 2012; TJIOE et al., 2011a; TJIOE et al., 2011c), embora alguns exemplos tenham falhado com esta estratégia (TSENG e BURSTYN, 2008). Esta seção do presente trabalho destina-se a investigar de que modo a inserção de um ou dois grupos pireno no ligante de um complexo de baixa reatividade altera suas propriedades funcionais.

3.3 OBTENÇÃO E PURIFICAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL PBSK-II

Nos ensaios de clivagem de DNA foi utilizado o plasmídeo pBSK-II superenovelado de dupla-fita (Stratagene, USA) com 2961 pares de base (pb) como substrato de DNA. A forma superenovelada do DNA plasmidial (forma I, F I) é altamente tensionada. Ao sofrer uma quebra-simples (ssb, do inglês, *single-strand break*), isto é, em apenas uma das fitas, há o afrouxamento desta estrutura e o DNA plasmidial assume uma conformação do tipo circular aberta (forma II, F II). Caso ocorra uma segunda quebra próxima à primeira, mas na fita oposta, há a formação de uma quebra-dupla (dsb, do inglês, *double-strand break*). Com isso, o DNA plasmidial sofre a conversão para sua forma linear (forma III, F III). Estas três conformações de DNA são topologicamente distintas e possuem mobilidades eletroforéticas diferentes. Portanto, quando uma amostra de DNA plasmidial previamente tratada com um agente de interesse (como um complexo) é submetida à eletroforese de gel de agarose, pode-se separar cada uma de suas formas e, pela proporção de cada uma, determinar a presença e extensão das quebras induzidas ao DNA (Figura 18).

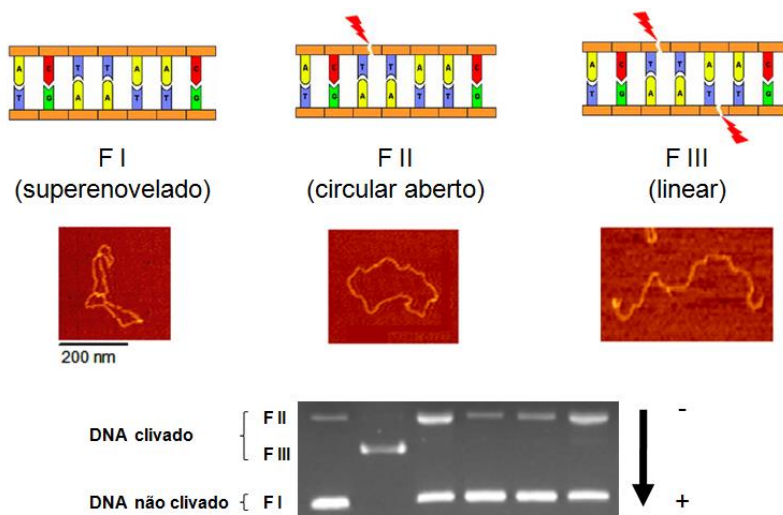


Figura 18. Ilustração e micrografias das três formas do DNA plasmidial (acima) e a sua diferenciação após eletroforese em gel de agarose (abaixo). Adaptado de Bortolotto (2011).

O plasmídeo pBSK II foi inserido em células de *Escherichia coli* DH5 α competentes, utilizando-se o protocolo preconizado por Ausubel e colaboradores (1995) e detalhadamente descrito por Oliveira (2006). Após a multiplicação celular, a cultura bacteriana foi centrifugada e o DNA purificado segundo os procedimentos do kit extração e purificação de DNA plasmidial HiSpeedTM Plasmid Maxi Kit (Qiagen) que se baseia na extração do ácido nucléico por fase sólida em colunas de sílica. A concentração do DNA plasmidial extraído foi quantificada por espectrofotometria UV-Vis ($A_{260} = 1,0 = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DNA) e a integridade verificada por eletroforese em gel de agarose. (AUSUBEL et al., 1999; OLIVEIRA, 2006)

3.4 CLIVAGEM DE DNA PLASMIDIAL

3.4.1 Procedimento geral

O procedimento geral aplicado aos complexos monucleares de Cu(II) foi adaptado de Silva e colaboradores (2011). Numa reação típica de clivagem de 20 μL , 330 ng do plasmídeo pBSK II ($\sim 25 \mu\text{M}$ em pb) foram tratados com os complexos (em diferentes concentrações) em

meio tamponado com 10 mM de Tris-HCl (pH 7,4). O tempo padrão de reação foi de 16 h sendo as amostras mantidas a 37 °C (em estufa e ao abrigo da luz) durante todo o experimento. Devida à alta atividade que estes complexos demonstraram sob estas condições reacionais (conforme observado nas primeiras aproximações experimentais), o tempo de reação foi diminuído para 4 horas. Para finalizar as reações de clivagem, foram adicionados às misturas reacionais 5 µL de tampão de corrida 6X concentrado (EDTA 0,25 M em pH 8,0, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01%). Em seguida, 20 µL das amostras foram armazenadas a 4°C até serem submetidas à eletroforese em gel de agarose (1 %) contendo brometo de etídio ($0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$) por 100 min a 90 V em tampão TBE 0,5X (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM em pH 8,0). Os géis resultantes foram fotografados pelo sistema de fotodocumentação DigiDoc-It (UVP, USA) e as frações de cada forma de DNA plasmidial quantificadas por densitometria, utilizando o software KODAK Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health, USA). Uma vez que o brometo de etídio possui uma maior dificuldade de intercalar-se com a forma superenovelada do DNA plasmidial, há uma menor emissão de fluorescência por esta forma de DNA em relação às demais. Para corrigir a real quantidade de DNA superenovelado da amostra, deve-se multiplicar o valor encontrado por 1,42 e corrigir por proporcionalidade os valores obtidos para as demais formas (BERNADOU et al., 1989). Para efeito de entendimento, a fração ou quantidade de DNA clivado (%) será considerada como a soma das frações de DNA na forma circular aberta (F II) e linear (F III), enquanto a fração ou quantidade de DNA intacto (%) será considerada como a fração de DNA na forma superenovelada.

Os ensaios em condições de fotoativação, no caso com incidência de luz UV, seguiram os procedimentos padronizados por Bortolotto (2011). Toda a preparação das reações seguiu o mesmo protocolo acima, excetuando-se o fato de que após a adição de todos os reagentes, as misturas reacionais foram expostas à luz UV de um transluminador (UVP, USA) por somente 5 minutos. Os tubos tipo Eppendorf contendo as reações foram dispostos verticalmente sobre o transluminador, sendo então a distância entre a reação e a fonte de luz UV-A praticamente desprezível.

Por sua vez, o procedimento geral aplicado aos complexos binucleares Fe(III)Zn(II) segue o trabalho de Peralta e colaboradores (2010) com alterações: numa reação de clivagem de 20 µL, 330 ng do plasmídeo pBSK II (~25 µM em pb) foram tratados com os complexos (em diferentes concentrações de 5 a 50 µM) em meio tamponado com

10 mM de HEPES (pH 7,0). O tampão HEPES foi escolhido em substituição ao Tris-HCl, pois o complexo modelo FeZnOH apresentou baixa reatividade em tampões não pertencentes ao da série de Good (GOOD et al., 1966) nas primeiras aproximações experimentais (dados não mostrados). O tempo padrão de reação foi de 16 h sendo as amostras mantidas a 37 °C (em estufa e ao abrigo da luz) durante todo o experimento. Para finalizar as reações de clivagem, foram adicionados às misturas reacionais 5 µL de tampão de corrida 6X concentrado (EDTA 0,25 M em pH 8,0, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01%). Todos os demais procedimentos relacionados à eletroforese das amostras, quantificação e interpretação dos resultados obtidos seguem o método aplicado aos ensaios com os complexos monucleares de Cu(II).

3.4.2 Efeito do pH

A variação do pH exerce forte papel na interação e reatividade de compostos de metais com o DNA, pois muda o equilíbrio das espécies químicas no meio e sua disponibilidade para participação nas reações. Como o tampão de escolha para os complexos monucleares de Cu(II) foi o Tris-HCl, ensaios em sua faixa de tamponamento (7,0 a 9,0) foram realizadas. O pH com melhor resultado foi o utilizado para os demais ensaios. A concentração de complexo utilizada nos ensaios foi de 50 µM para o Cu(hyd)(bpy) e 25 µM para os demais complexos monucleares de Cu(II). Estes mesmos ensaios não foram realizados em condições de fotoativação, pois não há evidências que justifiquem uma mudança no comportamento reacional destes complexos na presença de uma fonte de luz.

Como o tampão escolhido para os testes iniciais com os complexos binucleares Fe(III)Zn(II) foi o HEPES (pH 7,0), outros tampões da série de Good com faixa de tamponamento entre 6,0 a 9,0 foram utilizados. O pH com melhor resultado foi o utilizado para os demais ensaios. A concentração dos complexos utilizada nestes ensaios foi de 5 µM para ambos os complexos.

3.4.3 Efeito dos ligantes e dos metais isolados

Servindo de controle para os experimentos, foram realizados ensaios substituindo os complexos por seus ligantes isolados e pelo sal do metal (CuCl₂, ZnCl₂, FeSO₄) com o objetivo de verificar a clivagem de DNA por cada componente dos complexos isoladamente. Além disso, um controle na ausência dos complexos, ligantes ou dos sais foi

realizado nas mesmas condições reacionais para determinar a fragmentação espontânea do DNA. Excetuando-se pelos sais dos metais que podem ser solubilizados em água Milli-Q todos os demais ligantes foram solubilizados em água acetonitrila. A concentração de complexo utilizada nos ensaios foi de 50 μM para o Cu(hyd)(bpy) e 25 μM para os demais complexos monucleares de Cu(II). CuCl₂ e ligantes, também foram testados na concentração de 50 μM . Em paralelo, estes ensaios também foram realizados em condições de fotoativação, excetuando-se somente da concentração de complexo utilizada que foi de 25 μM para todos os complexos, ligantes e CuCl₂.

Ensaio semelhante foram realizados com os complexos binucleares de Fe(III)Zn(II), na concentração de 5 μM . No entanto, sua atividade só pode ser comparada com os sais dos metais, ZnSO₄ e FeSO₄, pois os ligantes não complexados mostraram-se solúveis somente na presença de solventes orgânicos como metanol e THF (tetrahydrofurano) que não são adequados para ensaios contendo DNA.

3.4.4 Efeito da força iônica

O aumento da força iônica no meio reacional neutraliza as cargas negativas do DNA proveniente dos grupos fosfato, diminuindo as interações eletrostáticas entre o DNA e o meio, interferindo no modo e atividade dos complexos conforme visto para diversos complexos na literatura (BELOUSOFF et al., 2008; DE ALMEIDA et al., 2013; DESBOUIS et al., 2012; MUXEL et al., 2014; REDDY; MOHAN e RAO, 2004; SILVA et al., 2011; TAN; WANG e ZHU, 2009; TAN; ZHU e WANG, 2009; TJIOE et al., 2010; TJIOE et al., 2011b; TJIOE et al., 2011c; ZHU et al., 2010).

O efeito da força iônica na clivagem de DNA foi verificado pela adição de concentrações crescentes de NaCl (0 a 500 mM) ao DNA antes do tratamento com os complexos. Na maior parte dos trabalhos Cu(II) citados no parágrafo acima, o aumento da força iônica tende a clivagem de DNA mediada pelos complexos. Sugere-se que o aumento da [Na⁺] no meio reacional neutraliza as cargas negativas do DNA, diminuindo a atração eletrostática entre o DNA (ânion) e os complexos (cátions). Há de ressaltar, porém, que os íons Cl⁻ podem se coordenar aos centros metálicos dos complexos e interferindo na sua atividade, ou seja, criando um artefato. Para burlar essa possibilidade, uma série de experimentos foi realizada em paralelo substituindo-se o NaCl por NaClO₄, pois o íon ClO₄⁻ coordena-se mais fracamente que os íons Cl⁻. A comparação entre os resultados obtidos nos ensaios utilizando NaCl e

NaClO_4 poderá distinguir se as interferências na atividade dos complexos deve-se às propriedades coordenativas dos íons $\text{Cl}^-/\text{ClO}_4^-$ ou da neutralização das cargas negativas do DNA pelos íons Na^+ . Todas as concentrações de NaCl e NaClO_4 foram testadas na ausência dos complexos e nenhuma clivagem de DNA superior ao controle (contendo somente DNA) foi observada. A concentração de complexo utilizada nos ensaios foi de $50 \mu\text{M}$ para o $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})$ e $25 \mu\text{M}$ para os demais complexos monucleares de $\text{Cu}(\text{II})$. Estes mesmos ensaios não foram realizados em condições de fotoativação, pois não há evidências que justifiquem uma mudança no comportamento reacional destes complexos na presença de uma fonte de luz.

Ensaio semelhante foram realizados com os complexos binucleares de $\text{Fe}(\text{III})\text{Zn}(\text{II})$, na concentração de $5 \mu\text{M}$. No caso dos complexos de $\text{Fe}(\text{III})\text{Zn}(\text{II})$ estes ensaios são ainda de maior relevância, pois sabe-se que “braço” de 1,4-diaminobutano que liga os grupos pirenos ao ligante original dos complexos deve sofrer uma deprotonação em pH neutro tornando-os ainda mais catiônicos em solução. Além disso e como mencionado anteriormente, o complexo FeZnOH mostrou-se capaz de hidrolisar DNA, ou seja, sua atividade é dependente da formação de um nucleófilo ligado ao metal. Neste caso, a discriminação do papel dos íons $\text{Cl}^-/\text{ClO}_4^-$ e Na^+ na atividade dos complexos frente ao DNA se faz ainda mais necessária.

3.4.5 Efeito dos sequestradores de ROS

Conforme mencionado anteriormente no item 1.2.1, a clivagem de DNA pode ocorrer via dois mecanismos distintos: o hidrolítico e o oxidativo. O mecanismo oxidativo é usualmente acompanhado pela geração de ROS (BURROWS e MULLER, 1998; POGOZELSKI e TULLIUS, 1998). Assim, com o objetivo de verificar a geração de ROS na clivagem de DNA plasmidial, uma série de ensaios foi realizada na presença de diferentes tipos de sequestradores de ROS. Foram utilizados: DMSO (2 M), sequestrador do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$); KI (0,5 mM), que acelera a decomposição de peróxidos (R-O-OH); 20 U de enzima SOD (superóxido-dismutase), sequestrador do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$); NaN_3 (0,5 mM), “sequestrador” de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Todos os inibidores foram testados na ausência dos complexos e nenhuma clivagem de DNA superior ao controle (contendo somente DNA) foi observada. A concentração de complexo utilizada nos ensaios foi de $50 \mu\text{M}$ para o $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})$ e $25 \mu\text{M}$ para os demais complexos monucleares de $\text{Cu}(\text{II})$. Em paralelo, estes ensaios também foram

realizados em condições de fotoativação, excetuando-se somente da concentração de complexo utilizada que foi de 25 μM para todos os complexos.

Conforme salientado no item 3.1.4.4, Peralta e colaboradores (2010) sugere que o mecanismo de clivagem de DNA mediado pelo complexo modelo FeZnOH é hidrolítico. Por esse motivo, espera-se que os complexos derivados com pireno FeZnLP1 e FeZnLP2 devam apresentar o mesmo mecanismo. Deve-se ressaltar, porém, que as mudanças no ligante sofridas com a incorporação dos grupos pireno pode interferir na química redox dos centros de Fe(III) , permitindo a geração de ROS via reação de Fenton. Por isso, ensaios na presença de sequestradores de ROS também foram realizados com estes complexos com o objetivo, também, de verificar se a adição dos grupos pirenos pode interferir no mecanismo geral de clivagem. A concentração dos complexos utilizada nestes ensaios foi de 5 μM para ambos os complexos.

3.4.6 Efeito dos bloqueadores de sulco

A dupla hélice do DNA ocasiona a formação de duas estruturas secundárias denominadas de sulco maior e sulco menor. Visando determinar a necessidade de ligação aos sulcos do DNA para o processo de clivagem, foram adicionados aos meio reacionais antes dos complexos dois ligantes de sulco. São elas: a netropsina, que se liga ao sulco menor (VAN DYKE; HERTZBERG e DERVAN, 1982) e o verde de metila, que se liga ao sulco maior (KIM e NORDEN, 1993). Os inibidores (50 μM) foram pré-incubados com o DNA tamponado (10 mM Tris-HCl, pH 7,4 para os complexos de Cu(II) ; e 10 mM HEPES pH 7,0 para os complexos de Fe(III)Zn(II)) por 30 minutos antes da adição dos complexos. Ambos inibidores foram testados na ausência dos complexos e nenhuma clivagem de DNA superior ao controle (contendo somente DNA) foi observada. A concentração de complexo utilizada nos ensaios foi de 50 μM para o Cu(hyd)(bpy) e 25 μM para os demais complexos monucleares de Cu(II) . Estes mesmos ensaios não foram realizados em condições de fotoativação, pois não há evidências que justifiquem uma mudança no comportamento reacional destes complexos na presença de uma fonte de luz. Neste caso, ainda, há uma forte fotoclivagem de DNA provocado pelo próprio ligante de sulco maior Verde de Metila (dados não mostrados) o que dificulta a interpretação dos resultados obtidos.

Embora seja o grupo pireno uma molécula intercalante, a intercalação pode ser precedida pela interação por um dos sulcos do DNA (LI et al., 2009). Portanto, acredita-se que os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2, possam ter alguma afinidade pelos sulcos do DNA do mesmo modo que complexo modelo FeZnOH exibiu tal dependência (PERALTA et al., 2010a). A concentração dos complexos utilizada nestes ensaios foi de 5 μM para ambos os complexos.

3.4.7 Ensaios cinéticos

A velocidade da reação de clivagem é ponto chave para comparação entre diferentes catalisadores no que diz respeito a sua eficiência. De modo geral as reações de clivagem de DNA foram realizadas conforme descrito: num volume final de 120 μL , 2 μg de pBSK II em 10 mM de tampão (Tris-HCl, pH 7,4 para os complexos de Cu(II); e HEPES pH 7,0 para os complexos de Fe(III)/Zn(II)) foram tratados com uma concentração única de complexo a 37 °C e ao abrigo de luz. Após o início da reação, uma alíquota de 20 μL de amostra foi retirada em diferentes intervalos de tempo e parada com 5 μL de tampão de corrida 6X concentrado e submetidas à eletroforese em gel de agarose. Controles nas mesmas condições reacionais, mas na ausência dos complexos, foram realizados para observar a degradação espontânea do DNA. Dependendo da reatividade dos complexos, o intervalo necessário para coleta das alíquotas diferente e, deste modo, ajustado caso a caso. As informações a cerca das concentrações de complexo utilizadas, o tempo total de reação e os tempos das retiradas das alíquotas estão claramente discriminados nas figuras e suas respectivas legendas bem como na seção de Resultados e Discussão.

No caso dos ensaios de fotoclivagem de DNA, onde a reação total se dá num intervalo muito curto de tempo (entre 4 e 5 minutos), é inviável a retirada de alíquotas de DNA sem que haja grandes variações no tempo de exposição das reações à luz. A fim de evitar este tipo de erro experimental, as cinéticas sob luz UV seguiram um procedimento diferente: o DNA tamponado foi separado em tubos Eppendorf onde cada um correspondia a um tempo específico de exposição (de 0 até 5 minutos, com intervalos de 1 em 1 minuto). Em seguida, o complexo foi adicionado ao primeiro tubo (tubo “1 minuto”) e exposto à luz UV pelo tempo previsto (1 minuto). As reações foram finalizadas (conforme descrito acima) e o transluminador desligado por pelo menos o mesmo tempo da exposição (isto é, 1 minuto de exposição era intercalada por pelo menos 1 minuto de desligamento). Posteriormente, deu-se início ao

procedimento com o segundo tubo (tubo “2 minutos”) e para todos os demais tubos. Com isso se garantiu que a temperatura na superfície do transluminador não interferisse na temperatura da reação fazendo, deste modo, com que a atividade observada fosse exclusivamente mediada pelos complexos em fotoativação. O tubo de tempo “0 (zero)” foi preparado somente com DNA e na ausência de complexo e fotoativação, representando com fidelidade a condição do DNA plasmidial antes de qualquer tipo de reação. Como a luz UV proveniente de transluminadores pode induzir a formação de quebras no DNA diretamente (JIANG et al.), uma análise cinética da fotoclivagem de DNA provocada somente pela luz UV sob nossas condições experimentais também foi realizada. Como todos estes ensaios cinéticos foram realizados de modo descontínuo e em reações (tubos) separados, tomou-se o cuidado de serem realizados pelo menos quatro experimentos independentes a fim de garantir a repetitividade dos resultados. Demais informações a cerca das concentrações de complexo utilizadas, o tempo total de reação e os tempos das retiradas das alíquotas estão claramente discriminados nas figuras e suas respectivas legendas bem como na seção de Resultados e Discussão.

Considerando as condições reacionais apresentadas, onde o catalisador (complexo) encontra-se em excesso quando comparado à concentração de substrato (DNA), o perfil cinético do processo de clivagem de DNA foi considerado como de pseudo-primeira-ordem. Deste modo, as constantes observadas de clivagem de DNA (k_{obs}) foram obtidas a partir da representação gráfica do plote do logaritmo neperiano da fração intacta de DNA (no caso F I) em função do tempo da reação.

3.5 CLIVAGEM DE OLIGONUCLEOTÍDEOS

A fim de se determinar a capacidade e possíveis sequências nucleotídicas preferenciais de clivagem, uma série de ensaios foram realizados substituindo o plasmídeo pBSK II por um oligonucleotídeo sintético de 49-mer (Figura 19). O oligonucleotídeo é composto por uma única fita que apresenta uma região auto-complementar de 42 nucleotídeos (21 pb), que correspondem a duas voltas completas de dupla hélice, sendo a extremidade 5' ligada covalentemente ao marcador fluorescente fluorascéina (FAM). Esta região de 21 pb possui duas subdivisões: uma rica em AT e outra em GC. Deste modo, é possível numa única molécula de DNA, verifica se existem preferências (em termos de nucleotídeo) para o reconhecimento e clivagem do ácido nucléico. Além disso, por causa da natureza de fita única, há a formação

de uma região não pareada de DNA (em inglês, *hairpin*) que oferece características estruturais diferentes das encontradas na dupla-hélice, aumentando ainda mais a quantidade de informações que podem ser obtidas a partir de um único “substrato” de DNA.



Figura 19. Representação da sequência e estrutura secundária hipotética do oligonucleotídeo de 49-mer utilizado neste trabalho. Em vermelho e azul destacam-se as regiões ricas em AT e GC, respectivamente. Em verde, localiza-se o *hairpin loop* de TTTT. A letra “F” refere-se ao grupo fluorescente fluoresceína ligada à extremidade 5'-fosfato do DNA.

As reações de clivagem do oligonucleotídeo seguiram as melhores condições encontradas para cada complexo, conforme os ensaios de clivagem de DNA plasmidial. Primeiramente, uma amostra de oligonucleotídeo (2,5 pmol/ μL) foi tamponada (10 mM de tampão Tris-HCl, pH 7,4 para os complexos de Cu(II); e 10 mM HEPES pH 7,0 para os complexos de Fe(III)Zn(II)) e submetida ao aquecimento a 95 °C por 5 minutos para a completa desnaturação de possíveis pareamentos inespecíficos de DNA. Em seguida, a 15 μL da amostra foi transferida para os tubos de reação e mantidas em temperatura ambiente por 1 h para permitir o correto anelamento do DNA. Por fim, o complexo (5 μL) foi adicionado aos tubos e a reação foi mantida ao abrigo da luz por 24 h. Os ensaios realizados com fotoativação seguiram os mesmos procedimentos, excetuando-se pelo tempo de reação que foi de 5 minutos. Demais informações a cerca das concentrações de complexo utilizadas, o tempo total de reação e os tempos das retiradas das alíquotas estão claramente discriminados nas figuras e suas respectivas legendas bem como na seção de Resultados e Discussão. Ao final da reação, uma mistura de 2 μL de acetato de sódio (3 M , pH 5,2) e 2 μL de glicogênio (20 mg/mL) foram adicionadas às reações sendo, logo em seguida, adicionados mais 3x o volume corrigido da amostra (3 x 24 μL = 72 μL) de etanol 100 % com objetivo de iniciar o processo de precipitação do oligonucleotídeo e finalizando assim a reação. As amostras foram então mantidas em precipitação em -20 °C por pelo menos 16 h. Em seguida, o DNA precipitado foi isolado por

centrifugação (4 °C, 16000 x g por 40 min). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 50 µL de etanol 70% e re-centrifugado (4 °C, 16000 x g por 10 min). O etanol 70% foi evaporado em um concentrador a vácuo e o DNA precipitado foi ressuscitado em 5 µL de tampão de amostra desnaturante (80 % de formamida, 10 mM de NaOH, 1 mM de EDTA e 0,05% de azul de bromofenol). Um marcador tipo Maxam-Gilbert A + G (MAXAM e GILBERT, 1977) foi preparado conforme descrito na literatura sem alterações (ECKERT, 2001) e utilizado para identificar fragmentos terminados em A ou G.

As amostras de DNA já ressuscitadas foram então submetidas à eletroforese vertical em gel de poli(acrilamida) desnaturante (16% acrilamida:bis-acrilamida 19:1, TBE 1x e 7 M de ureia). O gel (42 cm x 33 cm x 0,4 mm) foi preparado num volume total de 100 mL e polimerizado com 0,6 mL de persulfato de amônio (APS, 10% m/v) e 60 µL de TEMED entre duas placas de vidro. O gel foi submetido a uma pré-corrída eletroforética por ~1h a 50 W (~1700 V) em TBE 1x até que a temperatura do gel atingisse ~50 °C. Neste momento as amostras de DNA foram aquecidas por 3 min a 95 °C para a completa desnaturação de possíveis pareamentos inespecíficos de DNA e 2 µL (~20 pmols de DNA) de amostra foram aplicados em cada poço. A corrida eletroforética foi realizada com potência constante (50 W) por pelo menos 150 minutos. Em seguida, o gel ainda dentro das placas de vidro, foi digitalizado com ajuda do sistema de fotodocumentação FLA-9000 (Fuji) no modo de fluorescência específico para FAM.

3.6 FOOTPRINTING DE DNA POR DNASE I

Os complexos que eventualmente não sejam capazes de clivar o oligonucleotídeo utilizado nos ensaios mencionados no item 3.1.5, foram submetidos ao ensaio de Footprinting de DNA por DNase I. Nesta metodologia, enzima DNase I cliva o DNA com grande eficiência e baixa especificidade de sequência, é desafiada a fragmentar um substrato de DNA na ausência e na presença dos complexos (BAILLY et al., 2005). O perfil de clivagem na ausência dos complexos é comparado com o perfil obtido na presença de concentrações crescentes de complexo (titulação) a fim de se observarem mudanças no perfil de fragmentação de DNA provocado pela DNase I. A diminuição ou mudança desse perfil são indícios da ligação de pequenas moléculas ao DNA. Isso porque a ligação destas pequenas moléculas dificulta e/ou inibe a atividade da DNase I em sítios específicos. Portanto, os sítios de clivagem de DNase I que forem perturbados pela presença dos

complexos estão próximos aos mesmos sítios de ligação destes complexos ao DNA. Desta forma, não se pode detectar diretamente a região de ligação de uma pequena molécula ao DNA, mas sim uma evidência indireta, como uma “pegada”. Daí o nome Footprinting que em inglês quer dizer “impressão de pegada” (Figura 20). Os procedimentos utilizados nestes ensaios seguem o preconizado pela literatura (KIKUTA; AOKI e KIMURA, 2002; KIKUTA et al., 1999) com modificações.

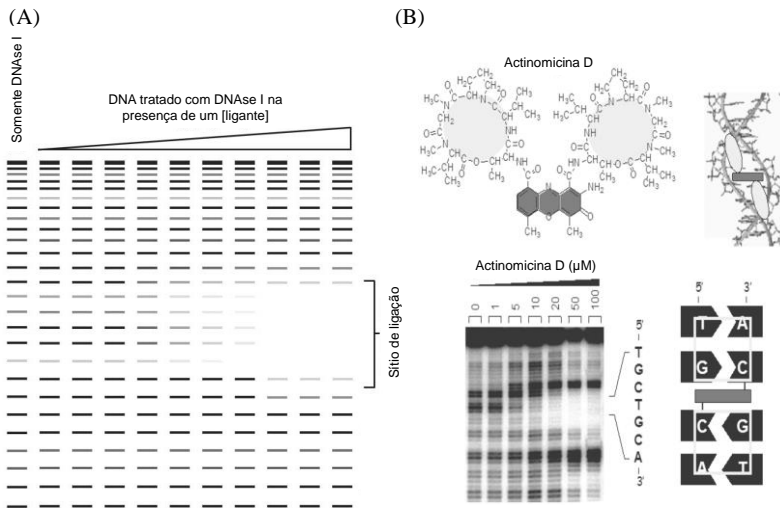


Figura 20. Representação de um gel de poliacrilamida desnaturante contendo amostras de um ensaio de footprinting de DNA por DNase I (A). A primeira canaleta possui somente o DNA tratado com a enzima e exibe um padrão de fragmentação onde alguns fragmentos são mais frequentes (banda de cor mais intensa) e outros menos (banda de cor mais intensa). Junto a esta amostra seguem as amostras de DNA que foram tratadas com DNase I na presença de concentrações crescentes de um determinado ligante, como uma proteína ou pequena molécula. Com o aumento da concentração do ligante vê-se a diminuição da intensidade de algumas bandas, ou seja, diminuição de geração de alguns fragmentos. Estes fragmentos correspondem aos sítios de DNA protegidos ao ataque da DNase I e, portanto, os possíveis sítios de interação do ligante ao DNA. Ao lado, vê-se a representação estrutural da actinomicina D, uma pequena molécula que se liga ao DNA, bem com uma proposição estrutural da interação ligante-DNA e um radiografia de um gel de um ensaio de footprinting de DNA por DNase I destacando os nucleotídeos envolvidos no

evento de interação (B). Adaptado de Urbach e Waring (2005) e Bailly e colaboradores (2005).

Primeiramente, uma amostra de oligonucleotídeo (2,5 pmols/ μ L) foi tamponada com 10 mM de HEPES (pH 8,0) e submetida ao aquecimento a 95 °C por 5 minutos para a completa desnaturação de possíveis pareamentos inespecíficos de DNA. Em seguida, 50 pmols do DNA da amostra foram transferidas para os tubos de reação e mantidas em temperatura ambiente por 1 h para permitir o correto anelamento do DNA. Passado o resfriamento das amostras, 100 μ M de CT-DNA (DNA do timo de bezerro, do inglês, *Calf Thymus DNA*) foram adicionados ao oligonucleotídeo anelado. Este DNA serve tanto para diminuir as interações inespecíficas entre os complexos e o oligonucleotídeo como para aumentar a velocidade da DNase I a ser usada posteriormente (saturação da enzima com excesso de substrato). Nesta etapa os complexos em diferentes concentrações foram adicionados às amostras e estas mantidas por 1h a temperatura ambiente para formação do equilíbrio complexo-DNA. A reação de clivagem de DNA se inicia com a adição da 0,03 unidades de DNase I (em 2,5 mM de CaCl_2 e 5,0 mM de MgCl_2) e mantida por 90 segundos. Ao final da reação, uma mistura de 10 μ L de acetato de sódio (3 M , pH 5,2), 5 μ L de glicogênio (20 mg/mL), 10 μ L de EDTA (50 mM) e 30 μ L de H_2O foram adicionadas às reações sendo, logo em seguida, adicionados mais 3x o volume corrigido da amostra (3 x 100 μ L = 300 μ L) de etanol 100 % com objetivo de iniciar o processo de precipitação do oligonucleotídeo e finalizando assim a reação. Todos os demais procedimentos para precipitação do oligonucleotídeo das amostras, ressuspensão, eletroforese e análise dos géis, segue o descrito no item 3.1.5.

3.7 INTERAÇÃO COM CT-DNA

Todos os ensaios realizados para observar a interação entre complexo e DNA por ligação basearam-se em métodos espectroscópicos. Nestes ensaios o substrato de DNA utilizado foi o de CT-DNA, cuja estrutura longa, linear e heterogênea (com cadeias variando de 1 a 10 kb) dificulta sua clivagem pelos complexos em estudo, permitindo assim avaliar majoritariamente efeitos relacionados à ligação das moléculas ao DNA.

3.7.1 Desnaturação térmica de DNA

A dupla-fita de DNA se mantém íntegra por diversos fatores, sendo um deles a presença de ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas. Com o aumento da temperatura, ocorre o rompimento destas ligações, permitindo que as fitas se separem e transformando a dupla-fita de DNA em duas simples-fitas. A esse processo dá-se o nome de desnaturação térmica de DNA. A temperatura necessária para que metade do DNA seja desnaturado é conhecida como temperatura média de desnaturação (T_m). Quando um agente externo se liga ao DNA, há uma mudança em sua T_m , sendo que o aumento ou diminuição deste parâmetro possui diferentes significados.

Portanto, a T_m do CT-DNA na ausência ou presença dos complexos foi determinada utilizando o espectrofotômetro de UV-Vis Ultrospec 2100 (Amersham Biosciences, USA) com sistema Peltier de controle de temperatura. A desnaturação térmica de DNA pode ser observada acompanhando a A_{260} nm do DNA em função do incremento progressivo da temperatura. Isto porque as bases nitrogenadas no DNA de dupla-fita estão voltadas para o interior da hélice, enquanto no de simples-fita, estão voltadas para o meio, permitindo que esta estrutura absorva mais luz que a primeira.

Para tanto, 50 μ M de CT-DNA foram tratados com 10 μ M dos complexos por 10 minutos na temperatura de início do experimento (40 °C), para uniformizar a temperatura entre a amostra e a cubeta. Em seguida, a temperatura foi progressivamente aumentada em 1 °C min⁻¹ até a temperatura de 90 °C. Diferentemente dos ensaios de clivagem, o tampão Tris-HCl ou HEPES foi substituído pelo tampão de desnaturação de DNA (1 mM de tampão fosfato pH 7,2 e 2 mM de NaCl) que é priorizado nos ensaios de desnaturação (ARIAS et al., 2009; BORTOLOTTI, 2011; BORTOLOTTI et al., 2011; GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2007; GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2009a). Um controle contendo somente CT-DNA tamponado foi realizado para observar a desnaturação natural da amostra. A T_m foi obtida pelo ponto médio da progressão não-linear sigmoide de Boltzmann e confirmada pela primeira derivada da A_{260} nm pela temperatura.

3.7.2 Espectroscopia de dicroísmo circular (CD)

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD, do inglês, *circular dichroism*) é um método espectroscópico capaz de mensurar a diferença de absorção de luz circularmente polarizada por moléculas opticamente

ativas em solução (BEROVA; NAKANISHI e WOODY, 2000). O DNA do tipo B (B-DNA), presente no CT-DNA, possui alguns componentes estruturais que conferem a esta molécula sinais de CD característicos: uma banda positiva em 275 nm, própria do empilhamento de bases; e uma banda negativa em 245 nm, devido a helicidade direita do DNA. As mudanças no espectro de CD do DNA pela presença de uma pequena molécula é uma evidência de interação entre esta e o ácido nucléico em estudo.

Os ensaios de CD foram realizados com o espectropolarímetro de CD modelo J-815 (Jasco, USA). Uma amostra de 100 μM de CT-DNA em 5 mM de tampão (Tris-HCl, pH 7,4 para os complexos de Cu(II); e HEPES pH 7,0 para os complexos de Fe(III)/Zn(II)) foi titulada com concentrações crescentes dos complexos (10 a 500 μM). As varreduras (com acumulação de cinco espectros) foram realizadas na faixa de 220 a 500 nm, a 37 °C, imediatamente após a adição dos complexos. Espectros contendo somente os complexos foram determinados na ausência de DNA e nenhum sinal significativo foi encontrado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPLEXOS MONONUCLEARES DE CU(II)

4.1.1 Clivagem de DNA plasmidial

4.1.1.1 Efeito da concentração dos complexos

A atividade dos quatro complexos mononucleares de Cu(II) frente à clivagem de DNA plasmidial foi inicialmente verificada em termos de concentração dos complexos em um longo período de reação (16 h) a 37 °C. Nestas condições todos os complexos (com exceção de Cu(hyd)(bpy)) mostraram-se capazes de completamente clivar o DNA plasmidial utilizado (dados não mostrados). Por causa dessa grande atividade, o tempo reacional foi reduzido de 16 para 4 horas a fim de se observar mais detalhadamente o efeito dos complexos (e a variação de sua concentração) no DNA. Estes resultados estão expostos nas figuras 21 a 22.

Todos os complexos foram capazes de clivar o DNA de modo concentração-dependente, ou seja, à medida que a concentração do complexo aumenta no meio reacional aumenta também sua capacidade de clivagem de DNA. O complexo Cu(hyd)(bpy) mostrou a menor capacidade de clivagem de DNA (Figura 21, A). O DNA tratado com 10 μM de Cu(hyd)(bpy) mostrou o aparecimento de ~20 % de F II, indicando que a forma superenovelada do DNA plasmidial (F I) foi clivada por quebras-simples para a forma circular aberta (F II). O aumento progressivo na concentração de Cu(hyd)(bpy) aumentou a clivagem de DNA atingindo ~60 % de F II com 50 μM . O complexo Cu(hyd)(phen), em comparação com Cu(hyd)(bpy), demonstrou ser muito mais ativo, pois mesmo na menor concentração testada (10 μM) cerca de 70 % de DNA apresentava-se em F II (Figura 21, B). A partir de 25 μM , observa-se a formação de DNA linear (F III) com ~10 %, cujo surgimento é indicativo da formação de quebras-duplas na estrutura do DNA. Na maior concentração testada (50 μM), todo o DNA plasmidial tratado apresenta-se clivado, com ~80 % em F II e ~20 % em F III.

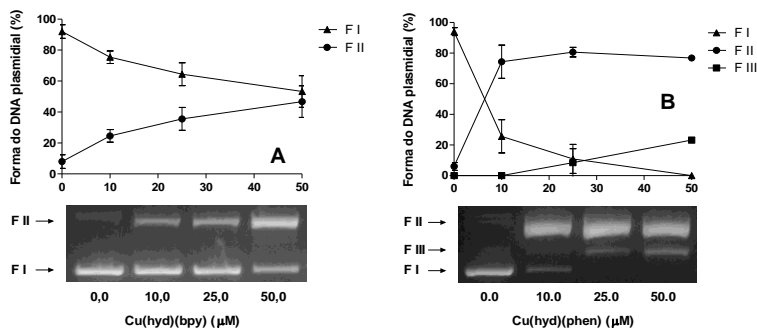


Figura 21. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(hyd)(bpy) (A) e Cu(hyd)(phen) em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 10 a 50 μM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Resultados semelhantes aos obtidos com Cu(hyd)(phen) foram observados com o complexo Cu(S-hyd)(bpy), em termos de clivagem de DNA em função da concentração de complexo (Figura 22, A). Por fim, o complexo Cu(S-hyd)(phen) mostrou-se o mais ativo, pois além de gerar ~80% de DNA clivado com apenas 10 μM de complexo, utilizando-se 50 μM, observou-se completa conversão do DNA intacto para suas formas fragmentadas, sendo 50% de DNA na forma circular aberta e os outro 50% na forma linear (Figura 22, B).

Embora a ordem de reatividade possa ser mais bem esclarecida pelos ensaios cinéticos, no momento pode-se sugerir que essa seja: Cu(hyd)(bpy) << Cu(S-hyd)(bpy) ~ Cu(hyd)(phen) < Cu(S-hyd)(phen). Quando comparamos complexos com diferentes ligantes com afinidade ao DNA (bpy x phen) vê-se que os complexos com ligante phen que possui maior afinidade, também possuem maior atividade frente ao DNA que seus análogos com bpy, o que é evidenciado para diversos complexos na literatura (LAHIRI et al., 2009; PATRA et al., 2007; PATRA et al., 2008; PATRA et al., 2003; PATRA et al., 2005; PATRA; NETHAJI e CHAKRAVARTY, 2005; PATRA; NETHAJI e CHAKRAVARTY, 2007; PATRA; ROY e CHAKRAVARTY, 2009; ROY et al., 2007a; ROY et al., 2007b).

Quando o efeito dos ligantes derivados de hidrazia é comparado, observa-se que a substituição do ligante hyd por S-hyd

significativamente aumenta a atividade dos seus complexos análogos, independente do ligante de afinidade pelo DNA, pois Cu(S-hyd)(bpy) possui atividade semelhante à Cu(hyd)(phen). Além disso, é notória a diferença na atividade dos complexos “nos extremos”: Cu(S-hyd)(phen) comparado à Cu(hyd)(bpy). O efeito da substituição dos ligantes hyd por S-hyd deve influenciar diretamente na catálise pelo centro metálico, seja na formação do nucleófilos (se o mecanismo for hidrolítico) ou nos processos redox relacionados (se o mecanismo for oxidativo). Ensaios posteriores poderão auxiliar na compreensão deste efeito.

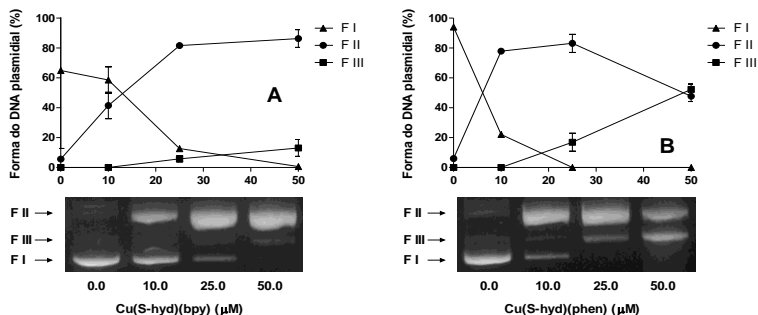


Figura 22. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(S-hyd)(bpy) (A) e Cu(S-hyd)(phen) (B) em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 10 a 50 µM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

É válido ressaltar a falta de um co-reagente para mediar a clivagem de DNA pelos complexos em estudo. Em muitos casos na literatura é necessária a participação de um agente oxidante como o H₂O₂ ou KHSO₅ (PATWARDHAN e COWAN, 2001; SREEDHARA e COWAN, 1998), um redutor como o ascorbato, 3-ácido mercaptopropanóico ou ditiotreitól (ARIAS et al., 2009; GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2009a; GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2009b; GÓMEZ-SAIZ et al., 2009; JIN e COWAN, 2005; JIN et al., 2007) e até mesmo na presença de ambos (GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2007). Detalhes acerca desta propriedade serão melhores discutidos adiante.

4.1.1.2 Efeito do pH

Depois de realizados dos ensaios iniciais, experimentos em diferentes pHs (7,0 a 9,0) foram realizados a fim de se determinar o pH ótimo reacional. Utilizando 50 μM de complexo, não se observaram diferenças significativas na clivagem de DNA realizada em pH 7,0 a 9,0 (dados não mostrados). Por esse motivo não se alterou o pH (7,4) nos ensaios posteriores.

4.1.1.3 Efeito dos ligantes e dos metais isolados

Procurando garantir se a atividade dos complexos deve-se de fato à formação de um complexo e não dos reagentes isolados, avaliou-se o efeito dos ligantes frente ao DNA separadamente bem como de um sal de cobre(II) (Figura 23). Nenhum dos componentes dos complexos em estudo apresentou atividade isoladamente quando comparados aos respectivos complexos. Isto que sugere que a atividade dos complexos é de fato proveniente da formação de um complexo em solução..

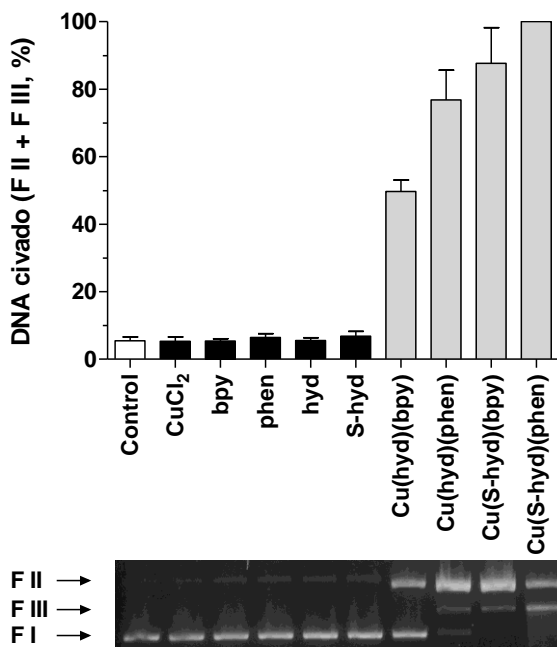


Figura 23. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos em comparação com o sal de cobre(II) (CuCl_2) e os ligantes. Condições reacionais: $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$, $\sim 25 \text{ } \mu\text{M}$; $[\text{Tampão}] = \text{Tris-HCl}$ (10 mM, pH 7,4); $[\text{complexo/sal de cobre(II)/ligantes}] = 50 \text{ } \mu\text{M}$; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4.1.1.4 Efeito da força iônica

Como citado anteriormente, as interações eletrostáticas podem estar presentes no mecanismo pelo qual ocorre a ligação de uma pequena molécula ao DNA. Levando em consideração que as ligações fosfodiéster no DNA encontram-se negativamente carregadas nas condições reacionais que foram utilizadas ao longo deste trabalho (DOMINGOS et al., 2003; WESTHEIMER, 1987) é plausível sugerir que as interações eletrostáticas entre o DNA e o meio possam em alguma extensão contribuir com a ligação e consequente clivagem de DNA pelos complexos.

Conforme os resultados apresentados nas figuras 24 a 27, todos os complexos tiveram sua atividade fortemente inibida pela adição crescente de NaCl. O mesmo ocorre quando o NaCl foi substituído por NaClO₄. Como a atividade dos complexos foi afetada na mesma proporção tanto por NaCl quanto por NaClO₄, pode-se sugerir que o efeito dos íons Na⁺ no meio reacional apresenta um papel muito mais determinante na atividade dos complexos que os íons Cl⁻/ClO₄⁻. Os íons de Na⁺ tendem a estabilizar a conformação do DNA, reduzindo a repulsão dos grupos fosfato carregados negativamente, tornando o DNA “mais rígido” (HAGERMAN, 1988). Observa-se, porém, que os complexos que possuem phen como ligante ainda são capazes de promover uma clivagem ao DNA (com ~20 a 40% de F II) mesmo sob altíssimas condições salinas (0,5 M). Desse modo é possível sugerir que os complexos que possuem o ligante bpy são mais dependentes destas interações eletrostáticas, enquanto os complexos que possuem o ligante phen não. Essa possibilidade existe já que o ligante phen possui uma afinidade pelo DNA maior que o ligante bpy, o que transpõe a necessidade das interações iônicas entre DNA e o meio. Estes ensaios também exibem a primeira evidência de que a clivagem de DNA pelos complexos depende de sua ligação à estrutura do ácido nucléico. Isso porque outros complexos como Fe(II)EDTA são capazes de clivar efetivamente o DNA, mas por ser carregado negativamente, este é repellido pelos grupos fosfato não interagindo com o ácido nucléico (LU et al., 1990).

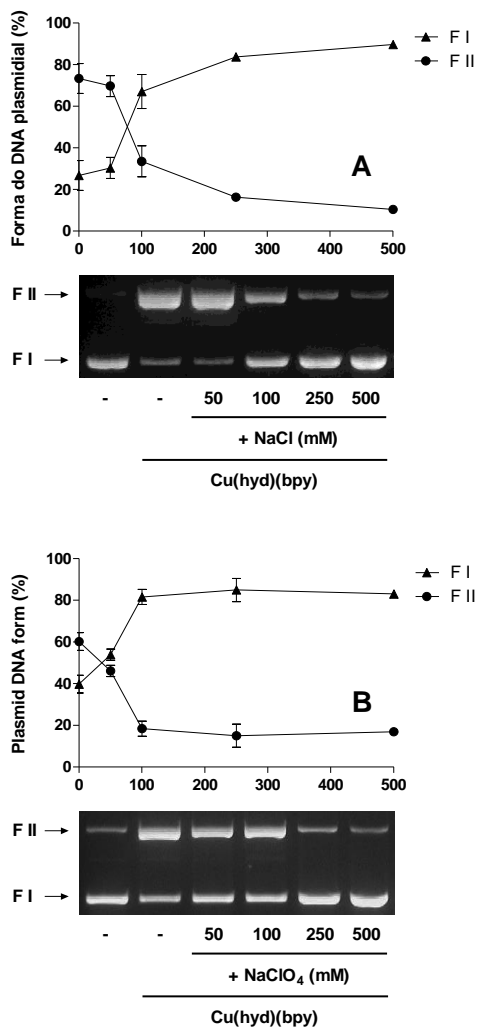


Figura 24. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo Cu(hyd)(bpy) em função de diferentes concentrações de NaCl (A) e NaClO₄ (B). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 50 μM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

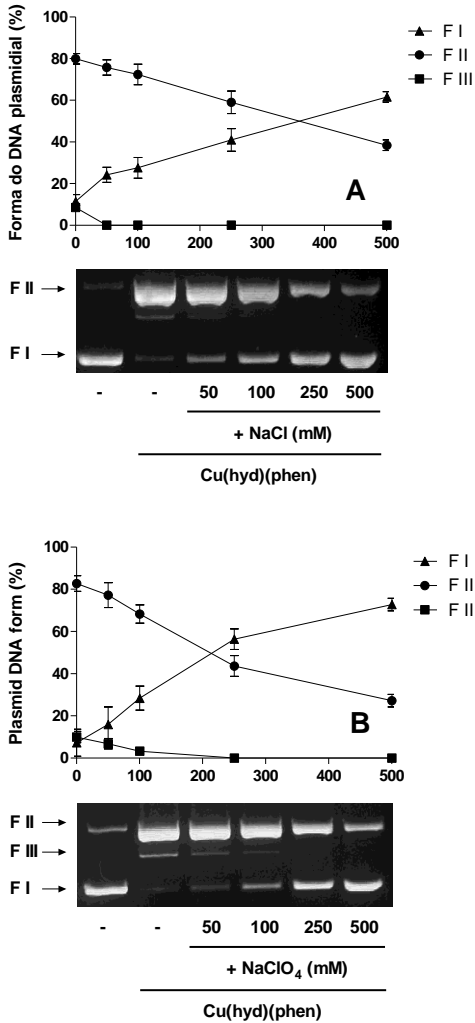


Figura 25. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo Cu(hyd)(phen) em função de diferentes concentrações de NaCl (A) e NaClO₄ (B). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 25 μM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

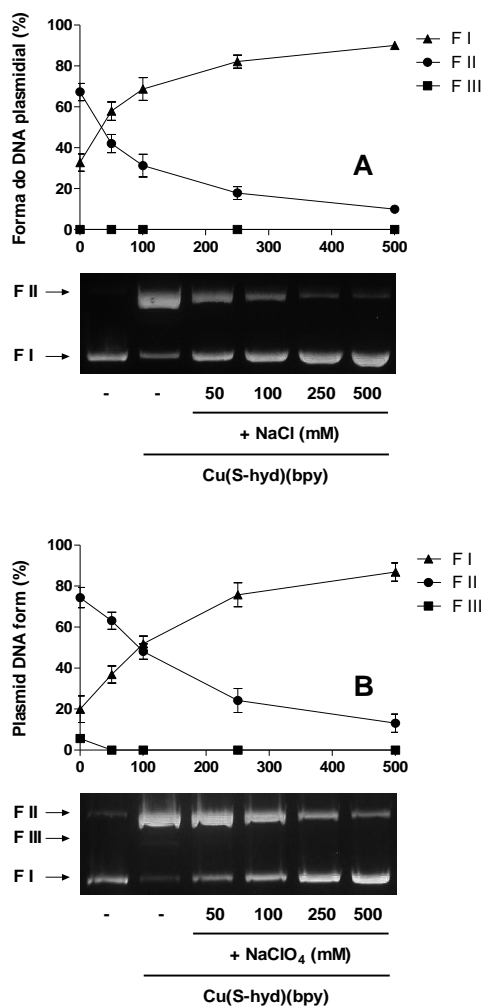


Figura 26. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo Cu(S-hyd)(bpy) em função de diferentes concentrações de NaCl (A) e NaClO₄ (B). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 25 μM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

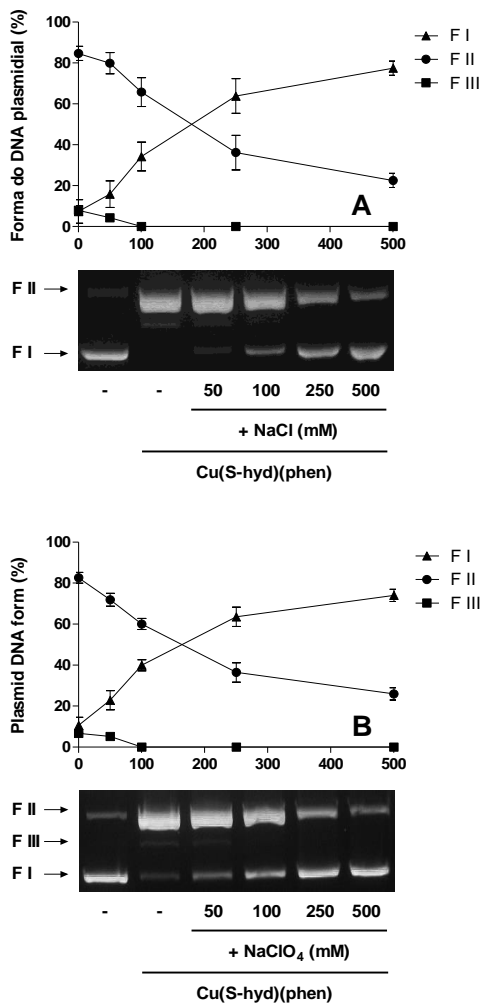


Figura 27. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo Cu(S-hyd)(phen) em função de diferentes concentrações de NaCl (A) e NaClO₄ (B). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 25 μM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

4.1.1.5 Efeito dos sequestradores de ROS

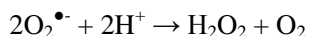
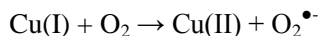
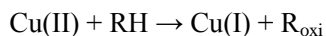
Desde a descoberta de Sigman e colaboradores (1979) de que um complexo metálico pode clivar o DNA gerando ROS na presença de um co-reagente (reductor; ditioneitol e oxidante; H_2O_2), faz-se necessária a investigação do mecanismo de clivagem para um novo complexo. Quando há tanto um reductor como um oxidante, a reação tipo-Fenton (abaixo) é a principal via utilizada na clivagem oxidativa do DNA. Nestes casos o metal reduzido (no exemplo Cu(I)) reage com H_2O_2 gerando como ROS o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) que é um fortíssimo oxidante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Esquema 1



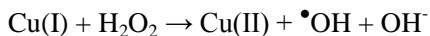
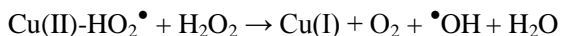
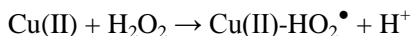
Na presença somente de um agente reductor, o mecanismo sofre algumas alterações. O metal é reduzido pelo reductor e reage com o oxigênio molecular gerando como ROS o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$), que rapidamente dismuta a H_2O_2 e participa na geração de $\bullet\text{OH}$.

Esquema 2



O Cu(II) pode também gerar ROS mesmo na presença somente de H_2O_2 (PECCI; MONTEFOSCHI e CAVALLINI, 1997) em que o Cu(II) reage com o H_2O_2 , gerando uma espécie tipo metal-peróxido. Este por sua vez reage com outra molécula de H_2O_2 formando um equivalente de Cu(I) e o próprio radical OH^\bullet . Em condições de excesso de H_2O_2 , o Cu(I) pode seguir a reação tipo-Fenton.

Esquema 3



Por esta razão, os complexos que necessitam de um co-reagente necessariamente apresentarão um mecanismo oxidativo de clivagem de DNA. Em muitos casos na literatura esse co-reagente é um oxidante como o H_2O_2 ou KHSO_5 (PATWARDHAN e COWAN, 2001; SREEDHARA e COWAN, 1998), um redutor como o ascorbato, 3-ácido mercaptopropanóico ou ditiotreitól (ARIAS et al., 2009; GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2009a; GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2009b; GÓMEZ-SAIZ et al., 2009; JIN e COWAN, 2005; JIN et al., 2007) e até mesmo é necessária a presença de tanto um oxidante quanto de um redutor (GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2007).

Por outro lado, a ausência da necessidade de um co-reagente para o processo de clivagem pode erroneamente sugerir um mecanismo do tipo hidrolítico. O equívoco ocorre porque alguns complexos são capazes de sofrer diferentes processos redox sem a participação de co-reagentes, gerando ROS ou oxidando diretamente a molécula de DNA (BORAH et al., 1998; MAHESWARI et al., 2006; MAHESWARI et al., 2008; MELVIN et al., 2000; MELVIN et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2005a; SILVA et al., 2011; TAN; WANG e ZHU, 2009). Em outros casos há também a participação de mecanismos mistos, envolvendo tanto a geração de ROS como a hidrólise das ligações fosfodiéster (PERALTA et al., 2010b). Por isso se faz necessário verificar o efeito de inibidores de ROS na atividade dos complexos de Cu(II) mesmo que eles não necessitem co-reagentes, pois ainda sim estas moléculas podem gerar ROS por outros mecanismos. Os resultados destes ensaios encontram-se nas figuras 28 e 29.

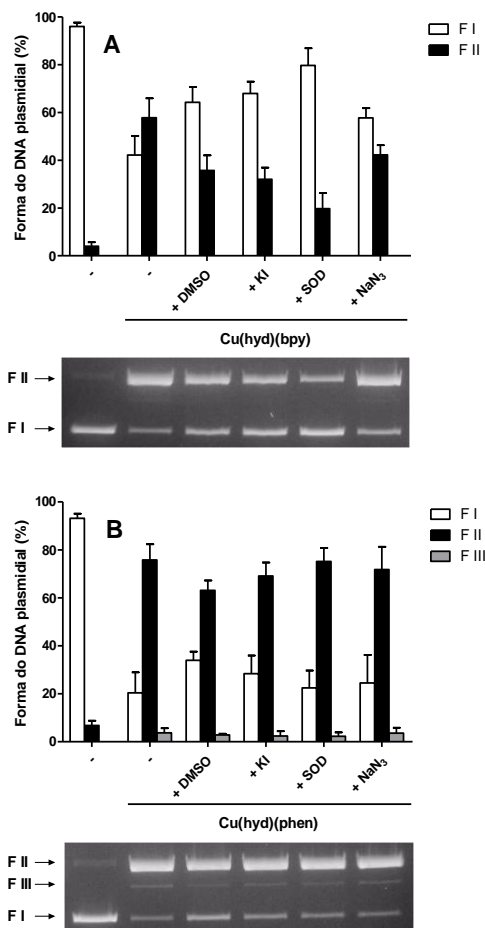


Figura 28. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(hyd)(bpy) (A) e Cu(hyd)(phen) (B) na presença de diferentes inibidores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 50 μ M (Cu(hyd)(bpy) e 25 μ M (Cu(hyd)(phen)); [DMSO] = 2 M; [SOD] = 20 unidades; [KI] = 0,5 mM; [NaN₃] = 0,5 mM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

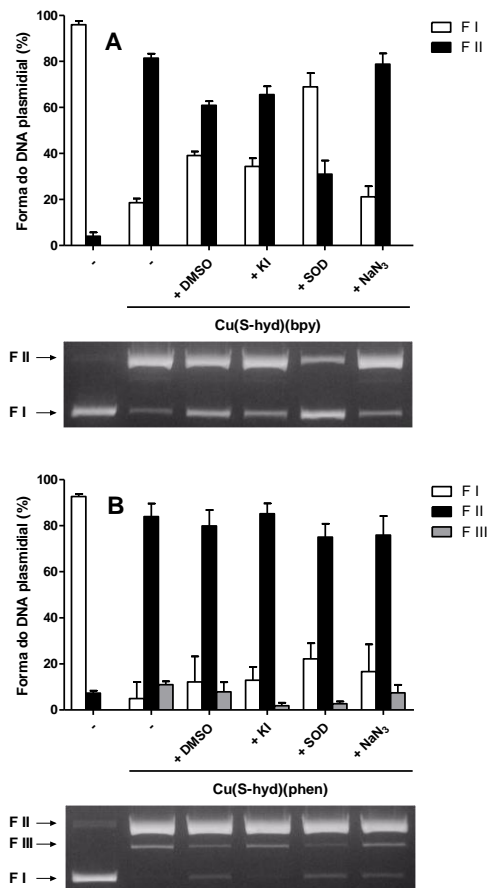


Figura 29. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(S-hyd)(bpy) (A) e Cu(S-hyd)(phen) (B) na presença de diferentes inibidores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 50 μ M para ambos; [DMSO] = 2 M; [SOD] = 20 unidades; [KI] = 0,5 mM; [NaN₃] = 0,5 mM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Os inibidores DMSO, KI e SOD foram capazes de reduzir parcialmente a atividade dos complexos que possuem o ligante bpy. Isto

sugere que as ROS $\bullet\text{OH}$, $\text{O}_2\bullet^-$ e também de espécies do tipo metal-peróxido (Cu(II)-OOH) devem estar envolvidos no evento de clivagem de DNA por estes complexos. Isso sugere que mesmo na ausência de um co-reagente, estes complexos mostraram-se capazes de clivar o DNA oxidativamente pela produção dessas ROS e não por um mecanismo exclusivamente hidrolítico. É importante salientar que durante as aproximações experimentais conduzidas no início do trabalho, uma série de redutores (3-ácido mercaptopropionico, ditiotreitolo, ascorbato de sódio e glutatona reduzida) foi capaz aumentar fortemente a atividade de todos os complexos, reforçando a hipótese de que a geração de ROS metal-catalisada é um mecanismo plausível para estes complexos (dados não mostrados).

Já os complexos que possuem o ligante phen sofreram somente uma leve inibição por todos os inibidores testados. Entretanto, esta falta de uma inibição contundente da clivagem de DNA não é indicativa de que o mecanismo de clivagem utilizado por estes complexos é hidrolítico. Um típico exemplo é relatado por Tan, Wang e Zhu (2009). Nesse trabalho, diferentes ensaios sugerem a geração de ROS na ausência de um co-reagente pelo complexo de $[\text{Cu(II)-(quercetina)}_2]^{2+}$. No entanto, a inibição dessas espécies por sequestradores como DMSO e glicerol não foi observada. Foi então proposto que se a geração de ROS for mediada pelo complexo somente ligado ao DNA (ou muito próximo dele) é muito provável de que os inibidores utilizados não possam bloquear efetivamente a atividade do complexo (Figura 30). Humphreys e colaboradores (2002) observam o mesmo comportamento, mas com uma peculiaridade ainda maior: a clivagem de DNA pelo complexo de Cu(II) por eles estudados é estritamente dependente de um redutor. Isso significa que a geração de ROS pelo complexo deveria seguir uma química redox tipicamente tipo-Fenton o que, todavia, não parece ocorrer. Estes exemplos mostram que os resultados obtidos nos ensaios com sequestradores de ROS devem ser interpretados cuidadosamente caso a caso.

Essa proposta pode explicar o comportamento dos complexos Cu(hyd)(phen) e Cu(S-hyd)(phen) . Isso porque estes complexos são os que possuem maior afinidade ao DNA (SILVA et al., 2014). Sugere-se aqui que a forte ligação destes complexos ao DNA diminui a propagação das ROS difusíveis no meio reacional, diminuindo a efetividade de seus sequestradores não sendo possível inibir a clivagem de DNA mediada por estes complexos. Deve-se lembrar de que moléculas como Fe(II)EDTA que não se ligam ao DNA, mas o clivam com grande eficiência, geram radicais difusíveis no meio

(POGOZELSKI; MCNEESE e TULLIUS, 1995). Com isso, acredita-se que todos os quatro complexos de Cu(II) aqui testados são oxidativos, embora não seja possível por meio destes ensaios definir quais são as ROS geradas pelos complexos com ligantes tipo phen.

A ausência de um co-reagente dificulta a proposição do mecanismo de geração das ROS mediada por estes complexos. O mesmo desafio foi observado por Oliveira e colaboradores (2005) com o complexo Cu₂BMXD (onde BMXD = [(bis(piridilmetil)amino)metil]-4-metil-6-formilfenol). Neste trabalho, a habilidade do complexo Cu₂BMXD clivar DNA oxidativamente pela produção de ROS sem a necessidade de um co-reagente é extensamente descrita. Evidências experimentais apontam que o DNA poderia estar agindo como redutor do complexo, desencadeando a geração de ROS pelo mecanismo descrito pelo Esquema 2 anteriormente. Mesmo que a redução do Cu₂BMXD pelo DNA seja termodinamicamente desfavorável, esta reação deve ser favorável em termos cinéticos. Com base neste trabalho novos ensaios devem ser propostos para elucidar se o próprio DNA poderia ser o agente redutor dos quatro complexos de Cu(II) no presente estudo.

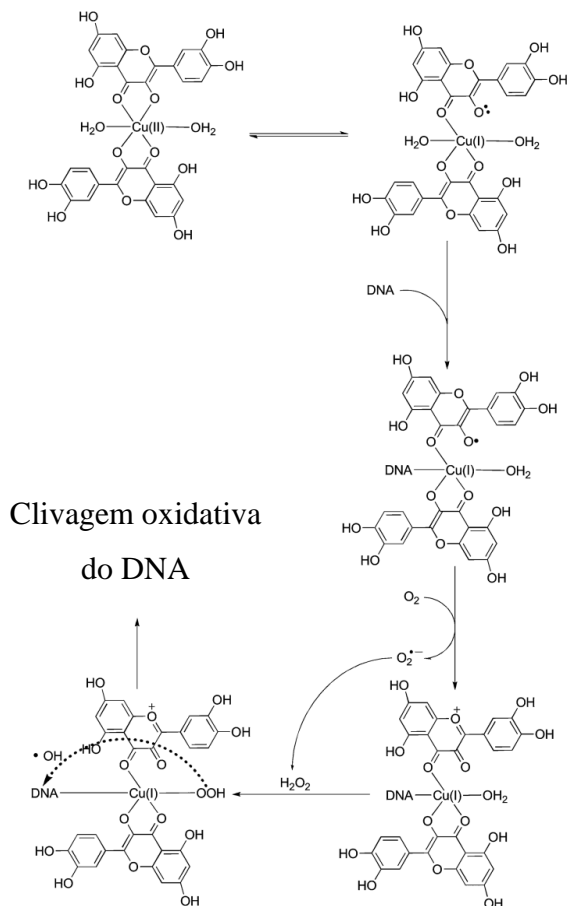


Figura 30. Mecanismo proposto por Tan, Wang e Zhu (2009) para a clivagem de DNA por via oxidativa pelo complexo $[Cu(\text{quercetina})]^{2+}$ na ausência de um co-reagente. Como a geração e ataque de ROS ocorre após a ligação do complexo ao DNA o bloqueio da reação por inibidores de radical hidroxila (no caso DMSO e glicerol) fica prejudicado. Adaptado de Tan, Wang e Zhu (2009).

4.1.1.6 Efeito dos bloqueadores de sulco

Após a determinação do mecanismo de clivagem de DNA, procurou-se determinar se esta atividade possui relação/dependência pelos sulcos menor e/ou maior do DNA. Para isso, o bloqueador de

sulco menor, netropsina, e do sulco maior, verde de metila, foram utilizados nos ensaios de clivagem em ensaios de competição. Os resultados obtidos nos ensaios são apresentados nas figuras 31 e 32. Ambos os inibidores mostraram a capacidade de parcialmente inibir a clivagem de DNA mediada pelos complexos. Estes resultados sugerem que os complexos não possuem especificidade por um dos sulcos de DNA, embora necessitem da interação por um deles, para que o processo de clivagem do ácido nucléico ocorra.

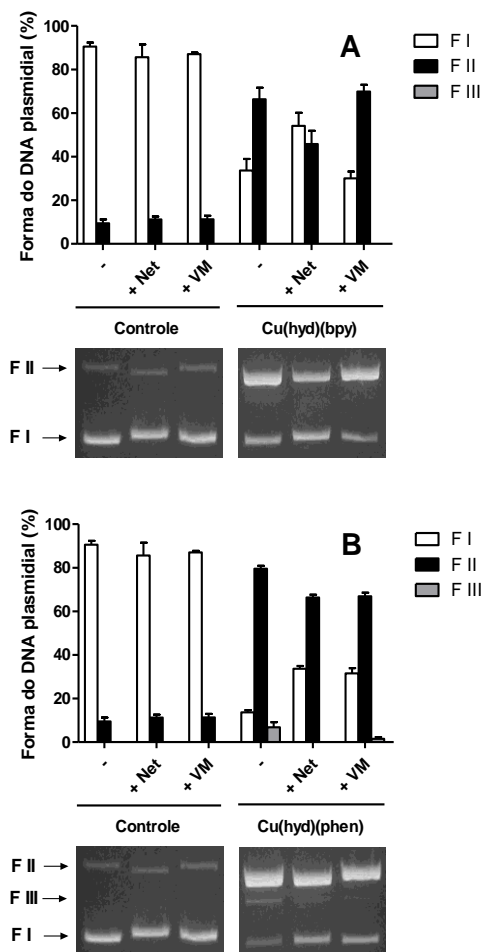


Figura 31. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(hyd)(bpy) (A) e Cu(hyd)(phen) na presença dos diferentes bloqueadores de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 50 μ M (Cu(hyd)(bpy) e 25 μ M (Cu(hyd)(phen); [Net] ou [VM] = 50 μ M; Temperatura = 37 $^{\circ}$ C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

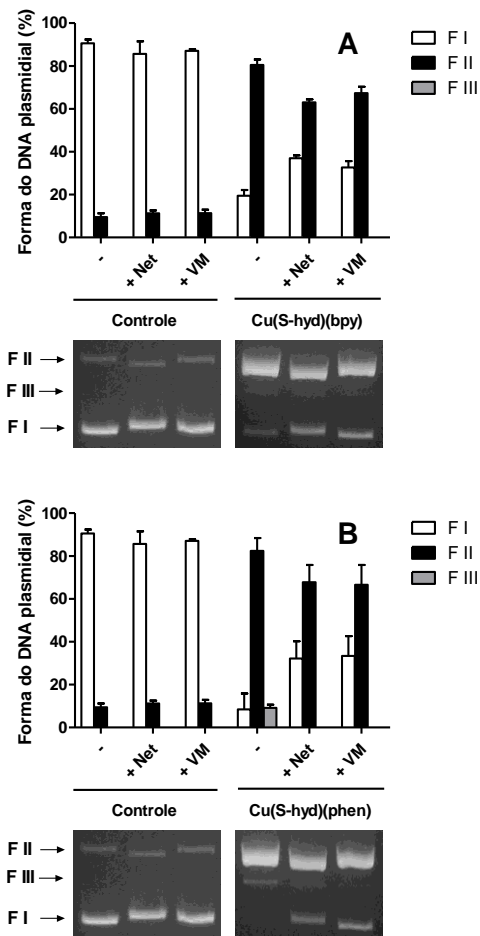


Figura 32. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(S-hyd)(bpy) (A) e Cu(S-hyd)(phen) (B) na presença dos diferentes bloqueadores de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 50 μ M para ambos; [Net] ou [VM] = 50 μ M; Temperatura = 37 $^{\circ}$ C; Tempo = 4 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4.1.1.7 Ensaios cinéticos

Por fim, o perfil cinético da clivagem de DNA pelos complexos em estudo foi determinado pelo desaparecimento de forma superenovelada do DNA plasmidial (F I) em função do tempo. Nestes ensaios a concentração dos complexos Cu(hyd)(bpy) e Cu(S-hyd)(bpy) foi de 25 μM , enquanto a utilizada com os complexos Cu(hyd)(phen) e Cu(S-hyd)(phen) foi de 10 μM . As concentrações escolhidas tiveram como base as melhores condições experimentais para cada complexo. Isso porque reações com concentrações maiores que 25 μM de complexo apresentaram comportamentos não lineares de clivagem de DNA em função do tempo, ao passo que concentrações menores que 10 μM mostraram-se pouco reativas no intervalo correspondente à linearidade da reação. As constantes observadas de clivagem de DNA (k_{obs}) foram extraídas da inclinação da reta originada do plote de $\ln(\text{F I})$ pelo tempo quando $R^2 > 0,95$. Tratando os dados como uma cinética de pseudo-primeira-ordem, onde há um excesso de catalisador em relação ao substrato, os valores de (k_{obs}) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de F I foram estimados e sumarizados na tabela 1.

A tabela 1 ainda traz resultados de três complexos cujo perfil cinético de clivagem de DNA foi determinado de modo muito semelhante ao realizado no presente estudo: $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{tcphen})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{quercetina2})]^{2+}$, mas na concentração de 100 μM . Para comparar o efeito cinético mediado por outros complexos sob diferentes condições experimentais e concentrações, uma constante de segunda-ordem (k_2) pode ser utilizada (calculada pela equação abaixo), onde: k_2 é a constante de segunda-ordem de clivagem de DNA, k_{obs} é a constante observada de clivagem e $[\text{complexo}]$ é a concentração de complexo utilizada no ensaio (JOYNER; REICHHFIELD e COWAN, 2011).

$$k_2 = k_{\text{obs}}/[\text{complexo}]$$

Tabela 1. Constante observada de clivagem de DNA (k_{obs}), tempo de meia-vida da forma superenovelada do DNA ($t_{1/2}$) e constante de segunda-ordem reacional (k_2) obtida com complexos nos ensaios cinéticos.

Complexo	k_{obs} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	k_2 ($\text{M}^{-1} \text{h}^{-1}$)	K_b (M^{-1})
Cu(hyd)(bpy)	$0,13 \pm 0,01$	$\sim 5,39$	$5,2 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$
Cu(hyd)(phen)	$0,92 \pm 0,03$	$\sim 0,78$	$9,2 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$
Cu(S-hyd)(bpy)	$0,48 \pm 0,05$	$\sim 1,35$	$2,0 \times 10^4$	$6,7 \times 10^3$
Cu(S-hyd)(phen)	$0,90 \pm 0,09$	$\sim 0,77$	$9,0 \times 10^4$	$5,1 \times 10^4$
$[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$	2,14	$\sim 0,35$	$2,1 \times 10^4$	$1,0 \times 10^5$
$[\text{Cu}(\text{tc})\text{phen}]^{2+}$	2,52	$\sim 0,27$	$2,5 \times 10^4$	$1,1 \times 10^5$
$[\text{Cu}(\text{quercetina})_2]^{2+}$	1,68	$\sim 0,41$	$1,7 \times 10^4$	-

- Condições reacionais dos complexos de Cu(II) em estudo: [DNA] = 330 ng, $\sim 25 \mu\text{M}$; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 10 μM para Cu(hyd)(phen) e Cu(S-hyd)(phen) e 25 μM para Cu(hyd)(bpy) e Cu(S-hyd)(bpy); Temperatura = 37°; Tempo = até 50 minutos ao abrigo da luz.

- k_{obs} e K_b dos complexos $[\text{Cu}(\text{dox})\text{phen}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{tc})\text{phen}]^{2+}$ obtidos de Silva e colaboradores (2011) e Bortolotto (2011).

- k_{obs} do complexo $[\text{Cu}(\text{quercetina})_2]^{2+}$ obtido de Tan, Wang e Zhu (2009)

- Todos os valores de k_2 e $t_{1/2}$ foram estimados pelo autor a partir de dados próprios ou de dados obtidos nos trabalhos citados.

Mancin e colaboradores (2005) sugerem que um complexo protótipo de “nuclease artificial” deve ser capaz de reduzir a meia-vida do DNA para menos de 2 h, o que foi alcançado com sucesso pelos complexos Cu(hyd)(phen), Cu(S-hyd)(bpy) e Cu(S-hyd)(phen). Observa-se que os valores de k_2 para os complexos Cu(hyd)(phen), Cu(S-hyd)(bpy) e Cu(S-hyd)(phen) encontram-se na mesma ordem de grandeza que os determinados para $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{tc})\text{phen}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{quercetina})_2]^{2+}$. Portanto, três dos quatro complexos deste estudo podem ser considerados como uns dos mais eficientes exemplos já descritos na literatura. Curiosamente, os valores de k_2 para complexos oxidativos, mas que utilizam co-reagentes como ascorbato e/ou H_2O_2 variam de 10^3 a $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (JIN e COWAN, 2005; JOYNER; REICHFELD e COWAN, 2011). Isso significa que mesmo na ausência de um co-reagente, todos os complexos de Cu(II) aqui testados exibem

um k_2 equiparável a complexos oxidativos que necessitam de co-reagentes, o que chama ainda mais atenção deste grupo de moléculas.

Nos primeiros ensaios de clivagem de DNA em função da concentração de complexo, houve uma tentativa inicial de estabelecer a ordem de reatividade dos complexos onde: $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy}) \ll \text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen}) \sim \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$. No entanto, é usual que a ordem de reatividade seja mais bem estabelecida em termos cinéticos. Baseando-se nos valores de k_{obs} ou k_2 vê-se que a ordem mais correta é: $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen}) \sim \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$. Silva e colaboradores (2014) determinaram as constantes intrínsecas de ligação do DNA (K_b) destes quatro complexos relacionando-as com a concentração inibitória de 50% (IC_{50}) de uma linhagem de células tumorais cultivadas na presença destas moléculas. O que se observa (Figura 33, A) é que com o aumento de K_b há uma diminuição nos valores de IC_{50} , ou seja, quanto maior a afinidade do DNA maior o efeito antitumoral do complexo, sendo que esta relação segue a ordem: $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen}) \sim \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$. Quando se relaciona k_2 e K_b vê-se um comportamento semelhante (Figura 33, B), onde quanto maior a afinidade do DNA mais eficiente (em termos cinéticos) é a clivagem do DNA, na ordem: $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen}) \sim \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$. Em vista disso, ao se relacionar IC_{50} e k_2 (Figura 33, C), tem-se uma surpreendente relação linear ($R^2 = 0,9976$) com uma excelente correlação de Pearson ($r = -0,9994$; $p < 0,001$).

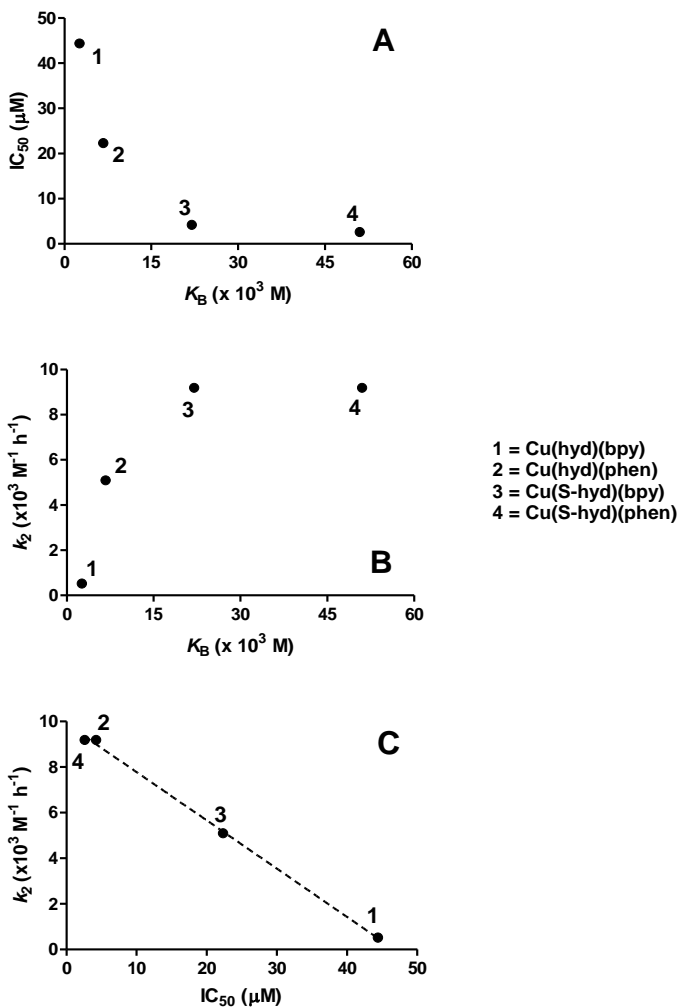


Figura 33. Plotes relacionando os valores de IC_{50} (em células tumorais, A), K_b (em CT-DNA, B) e k_2 (em DNA plasmidial, C).

Estes resultados sugerem que a velocidade da clivagem de DNA deve estar relacionada com a capacidade de ligação desta molécula ao ácido nucléico, pois quanto maior K_b maior também é k_2 . Isto era de certa forma esperado, pois complexos com ligantes bpy tem menor afinidade pelo DNA que os que possuem ligantes phen (LAHIRI et al.,

2009; PATRA et al., 2007; PATRA et al., 2008; PATRA et al., 2003; PATRA et al., 2005; PATRA; NETHAJI e CHAKRAVARTY, 2005; PATRA; NETHAJI e CHAKRAVARTY, 2007; PATRA; ROY e CHAKRAVARTY, 2009; ROY et al., 2007a; ROY et al., 2007b).

Além disso, o efeito antitumoral destas moléculas pode sim estar relacionado à eficiência na clivagem de DNA, pois quanto maior k_2 menor é a IC_{50} do complexo. Embora de difícil correlação, alguns trabalhos na literatura conseguiram com sucesso relacionar a atividade antitumoral de complexos metálicos com a sua capacidade de clivagem de DNA (GONZÁLEZ-ÁLVAREZ et al., 2008; LUIS GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2009; TAN; WANG e ZHU, 2009).

4.1.2 Fotoclivagem de DNA plasmidial

4.1.2.1 Efeito da concentração dos complexos

Muitos complexos metálicos com ligantes heterocíclicos são capazes de absorver energia em forma de luz. Os vários processos possíveis após a irradiação de uma molécula fotossensível são mostrados abaixo (Figura 34) no diagrama de Jablonski (SZACIŁOWSKI et al., 2005). Quando uma molécula absorve um fóton de luz, o elétron presente nesta transição ganha energia e passa a ocupar um orbital mais energético. Neste momento pode-se dizer que a molécula encontra-se num estado excitado (singlete). Este estado tem uma meia-vida muito curta e por isso tende a decair para o estado não-excitado, liberando em forma de fluorescência o fóton previamente absorvido. No entanto, o estado excitado pode sofrer uma conversão interna inter-sistema para o estado triplete, que é uma forma excitada mais estável. O estado triplete pode reagir como o oxigênio molecular, gerando ROS ou decair para o estado não-excitado emitindo fosforescência. Nos casos, porém, em que o estado triplete da molécula reage com o oxigênio molecular duas reações podem ocorrer: a reação Tipo 1, onde o oxigênio molecular é reduzido, gerando o radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), que dismuta para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e na presença de metais de transição pode formar o radical hidroxila ($^{\bullet}OH$); ou a reação do Tipo 2, envolvendo a excitação do oxigênio molecular no estado triplete, gerando o oxigênio singlete (1O_2). As ROS produzidas na reação do Tipo 1 tendem a oxidar a desoxirribose, enquanto as do Tipo 2 tendem a oxidar as bases nitrogenadas, especialmente guanina (ARMITAGE, 1998; SZACIŁOWSKI et al., 2005).

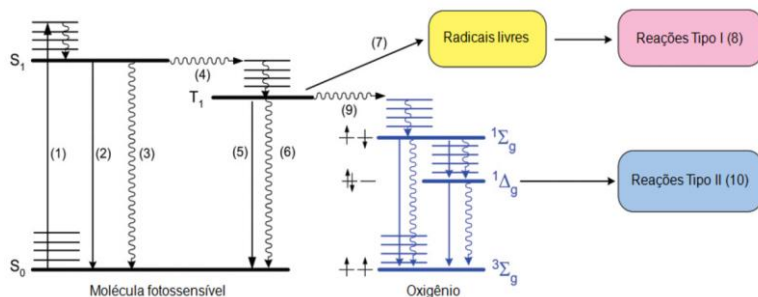


Figura 34. Diagrama de Jablonski mostrando os processos envolvidos na fotoexcitação de elétrons. (1) Absorção de um fóton e conversão para o estado excitado S1, (2) retorno ao estado não-excitado S0 com emissão de fluorescência, (3) conversão interna, (4) conversão interna inter-sistema do estado S1 para T1, (5) retorno do estado T1 a S0 com emissão de fosforescência, (6) retorno do estado T1 a S0 por decaimento não-radioativo, (7) transferência eletrônica do estado T1 para uma molécula aceitadora, (8) reações do Tipo I, (9) transferência eletrônica do estado T1 para o dióxigênio e (10) reações do Tipo II. Adaptado de Bortolotto (2011).

Baseando-se na lógica do trabalho de Bortolotto e colaboradores (2011) derivado do trabalho de Silva e colaboradores (2011), os quatro complexos de Cu(II) analisados na seção anterior também tiveram sua atividade testada frente à exposição à luz UV na tentativa que esta estratégia possa amplificar a atividade dos complexos. Utilizando os complexos $[\text{Cu}(\text{dox})(\text{phen})]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{tc})(\text{phen})]^{2+}$, foi observado um aumento de quase 40 vezes nos valores de k_{obs} das reações de clivagem de DNA realizadas na luz UV quando comparadas às mesmas reações conduzidas ao abrigo da luz (BORTOLOTTO et al., 2011). Neste exemplo, sugere-se que a luz UV é absorvida pelos complexos estimulando a redução do centro de Cu(II) e propiciando a formação de ROS. Estes resultados estimulam a pesquisa por novas moléculas fotossensíveis, pois geralmente sua atividade é muito superior aos catalisadores comuns. Embora os quatro complexos aqui testados apresentem atividades significantes em termos de clivagem de DNA, a possibilidade torná-la ainda maiores utilizando a exposição à luz UV é de grande interesse.

Assim, os resultados de fotoclivagem de DNA em função da concentração do complexo obtidos com os quatro complexos de Cu(II) sob luz UV estão dispostos nas figuras 35 a 38. Como mencionado na seção 3.4.1, o tempo de reação foi de apenas 5 minutos o que contrasta

radicalmente com as 4 horas de reação dos ensaios ao abrigo da luz (expostos nas figuras 21 e 22). Por esse motivo, todos os ensaios ao abrigo da luz foram refeitos em 5 minutos para que o efeito da luz UV fosse mais facilmente observado.

Todos os complexos foram capazes de clivar o DNA de modo concentração-dependente, ou seja, à medida que a concentração do complexo aumenta no meio reacional aumenta também sua capacidade de clivagem de DNA. Em relação com complexo Cu(hyd)(bpy), nenhuma indício de clivagem de DNA foi observada em nenhuma das concentrações testadas (10 a 50 μM) quando as reações foram conduzidas ao abrigo da luz (Figura 35, A). Como este complexo mostrou-se o menos reativo dos quatro complexos da série, essa baixa (nula) atividade deve ser atribuída ao curto período de reação de apenas 5 minutos. Sob luz UV, no entanto, a fotoclivagem de DNA mediada pelo complexo Cu(hyd)(bpy) mostrou-se muito significativa (Figura 35, B). Na menor concentração testada (10 μM) já se vê ~50% de DNA clivado (sendo todo na forma circular aberta). Com o aumento da concentração de complexo, tem-se um aumento significativo na fotoclivagem do DNA, atingindo 100% de fragmentação com 50 μM de complexo. Nesta concentração, também já se vê a formação de ~10% de DNA linear, o que não havia sido observado para este complexo em nenhuma das condições experimentais mostradas neste trabalho. Estes resultados permitem afirmar que a exposição à luz UV aumentou significativamente a atividade do complexo Cu(hyd)(bpy), de tal modo que este se mostrou capaz de não somente provocar quebras simples, mas também agora duplas ao DNA.

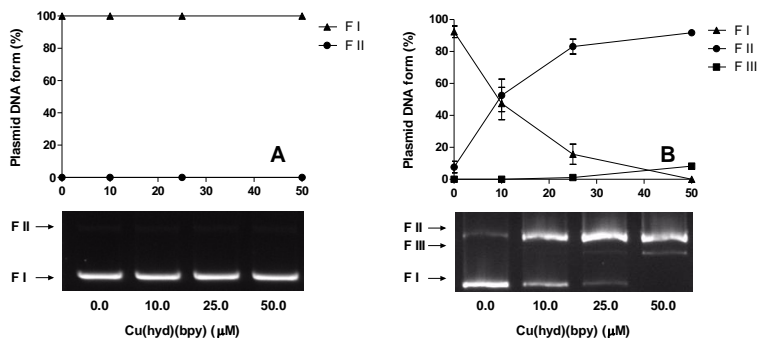


Figura 35. Clivagem de DNA plasmidial pBSK-II induzida pelo complexo Cu(hyd)(bpy) na ausência (A) e presença (B) de exposição a luz UV e em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, $\sim 25 \mu\text{M}$; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 10 a 50 μM ; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos ao abrigo de luz (A) ou sob luz UV (B). Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Já o complexo Cu(hyd)(phen), mostrou-se capaz de clivar o DNA ao abrigo da luz mesmo no curto intervalo de tempo de 5 minutos (Figura 36, A). Nestas condições, cerca de 40% de DNA foi clivado utilizando-se 50 μM de complexo. Sob luz UV, entretanto, a fotoclivagem de DNA mediada pelo complexo foi ainda maior (Figura 36, B). Com 25 μM de complexo, já se foi capaz de fotoclivar completamente o DNA tratado, gerando $\sim 5\%$ de DNA linear. Na maior concentração testada, a formação de DNA linear chegou a $\sim 20\%$.

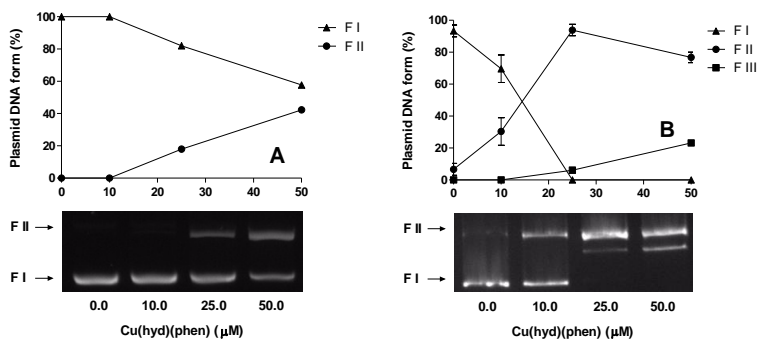


Figura 36. Clivagem de DNA plasmidial pBSK-II induzida pelo complexo Cu(hyd)(phen) na ausência (A) e presença (B) de exposição a luz UV e em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 10 a 50 µM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 5 minutos ao abrigo de luz (A) ou sob luz UV (B). Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

O complexo Cu(S-hyd)(bpy), somente o terceiro mais reativo da série, apresentou uma atividade levemente superior à observada para o complexo Cu(hyd)(bpy) ao abrigo da luz (Figura 37, A). Nestas condições, cerca de 10% de DNA foi clivado utilizando-se 50 µM de complexo. De forma semelhante à vista com os complexos anteriores, sob luz UV, a fotoclivagem de DNA mediada pelo complexo foi substancialmente aumentada (Figura 37, B). Na maior concentração testada, 100% do DNA foram fragmentados embora com pouca formação de DNA linear (~5%). Este efeito será debatido adiante.

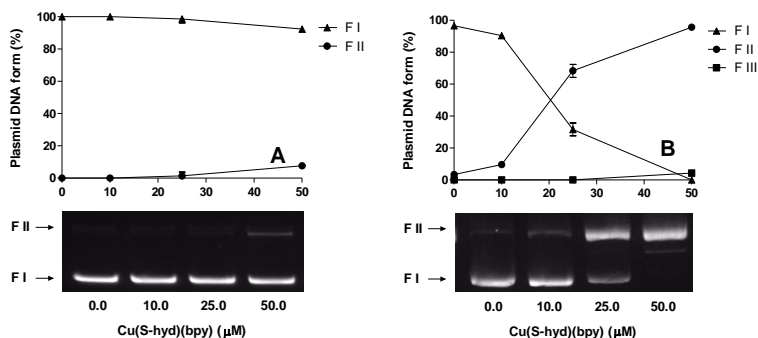


Figura 37. Clivagem de DNA plasmidial pBSK-II induzida pelo complexo Cu(S-hyd)(bpy) na ausência (A) e presença (B) de exposição a luz UV e em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 10 a 50 µM; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos ao abrigo de luz (A) ou sob luz UV (B). Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Por fim apresentam-se os resultados obtidos com o complexo Cu(S-hyd)(phen), que não surpreendentemente mostraram-se semelhantes aos observados com o complexo Cu(hyd)(phen) ao abrigo da luz (Figura 38, A). Mesmo com apenas 5 minutos de reação, cerca de 20% de DNA foi clivado utilizando-se 50 µM de complexo. Quando submetidas à luz UV, a fotoclivagem de DNA catalisada pelo complexo foi muito aumentada (Figura 38, B).

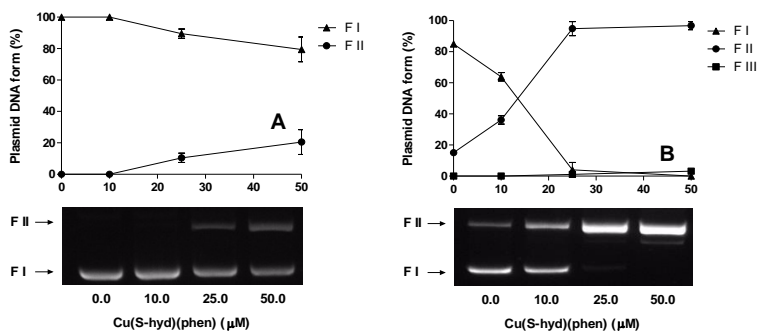


Figura 38. Clivagem de DNA plasmidial pBSK-II induzida pelo complexo Cu(S-hyd)(phen) na ausência (A) e presença (B) de exposição a luz UV e em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 µM; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo] = 10 a 50 µM; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos ao abrigo de luz (A) ou sob luz UV (B). Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

Com 25µM de complexo, já se foi capaz de fotoclivar completamente o DNA tratado, mas gerando apenas ~2% de DNA linear. Na maior concentração testada, a formação de DNA linear cegou a ~5%. Esta formação menor de DNA linear mesmo após a completa degradação do DNA também foi observada com o complexo Cu(S-hyd)(bpy) e agora repete-se com o complexo Cu(S-hyd)(phen). Este efeito não foi observado com os complexos Cu(hyd)(bpy) e Cu(hyd)(phen), onde a formação de DNA linear flutuou entre 10 e 20%. É possível imaginar que os complexos contendo o ligante S-hyd tiveram sua atividade menos estimulada pela luz que os complexos contendo o ligante hyd e por isso uma menor geração de DNA linear. Quando a geração de DNA linear ocorre somente depois que a maior parte do DNA já foi convertida para a forma circular aberta, é provável que essa se originou de um acúmulo de eventos de quebras-simples até que duas quebras encontraram-se aleatoriamente gerando uma quebra-dupla (FREIFELDER e TRUMBO, 1969). Como todos os quatro complexos apresentaram este comportamento, acredita-se que a menor produção de DNA na forma linear pelos complexos Cu(S-hyd)(bpy) e Cu(S-hyd)(phen) esteja mais relacionada com uma menor atividade geral do que por alguma propriedade que dificulta a geração de quebras-duplas

ao DNA por estas moléculas. Novamente os ensaios cinéticos serão necessários para determinar a ordem de reatividade e ratificar esta hipótese.

4.1.2.2 Efeito dos ligantes e dos metais isolados

Após estes ensaios iniciais, também se procurou avaliar se os ligantes dos complexos poderiam ser capazes de fotoclivar o DNA, o que não seria incomum já que muitas moléculas orgânicas possuem essa propriedade (ARIAS et al., 2009; FERNÁNDEZ et al., 2001; TERRY et al., 2011; WILSON et al., 2008a; WILSON et al., 2008b; WILSON et al., 2005). Os resultados destes ensaios encontram-se na figura 39. Observa-se que nenhum dos ligantes é capaz de ter uma atividade significativa quando comparado aos complexos. Isso sugere que a atividade dos complexos deve estar intimamente relacionada à formação de um complexo em si e não da simples “mistura” do metal e dos ligantes na mesma reação.

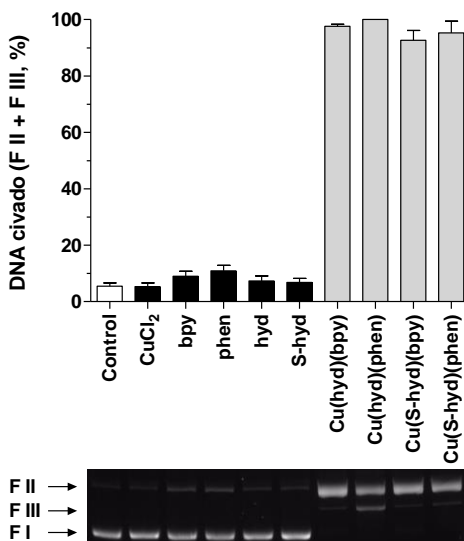


Figura 39. Fotoclivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos mononucleares de Cu(II) em comparação com o sal de cobre(II) (CuCl₂) e os seus ligantes. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM; [Tampão] =

Tris-HCl (10 mM, pH 7,4); [complexo/sal de cobre(II)/ligantes] = 25 μ M; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos sob luz UV. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4.1.2.3 Efeito dos sequestradores de ROS

Além de aumentar a atividade dos complexos frente ao DNA plasmidial, a exposição destas moléculas a uma fonte de iluminação pode desencadear uma série de transferências eletrônicas intramoleculares (conforme descrito na figura 34). Com isso, o mecanismo de clivagem de DNA pode ser modificado. Souza e colaboradores (2010) relataram que dependendo do comprimento de onda utilizado para a iluminação, diferentes tipos de ROS podem ser produzidos. Enquanto sob luz UV há uma geração de ROS por processos do tipo II (produzindo $^1\text{O}_2$), sob luz vermelha ($\lambda = 635 \text{ nm}$) a formação de ROS se dá por processos do tipo I (produzindo $\bullet\text{OH}$ e $\text{O}_2\bullet^-$). Além disso, Bortolotto e colaboradores (2011) mostraram que a exposição à luz UV diversifica os tipos de ROS produzidos por dois complexos de Cu(II) em comparação com os produzidos ao abrigo da luz. Em virtude disso, necessário se faz analisar se a luz UV modifica quais tipos de ROS são geradas pelos complexos aqui testados, cujos resultados estão expostos nas figuras 40 a 41.

De forma semelhante aos ensaios ao abrigo da luz, todos os inibidores foram capazes de diminuir a atividade dos complexos frente ao DNA. Novamente, viu-se o efeito menor dos inibidores aos complexos contendo ligante phen, o que mais uma vez sugere que a geração de radical deve estar sendo realizada quando o complexo já está ligado ao DNA ou muito próxima ao ácido nucléico. Diferente dos exemplos da literatura citados no parágrafo anterior, a exposição à luz UV não modificou substancialmente a geração do ROS mediada pelos complexos. Como a fotoclivagem de DNA é um processo exclusivamente oxidativo (ARMITAGE, 1998), a falta desta modificação reforça que a exposição à luz UV somente amplificou o mecanismo oxidativo já presente nos complexos, ou seja, a geração de ROS catalisada por metal que foi extensamente discutida anteriormente.

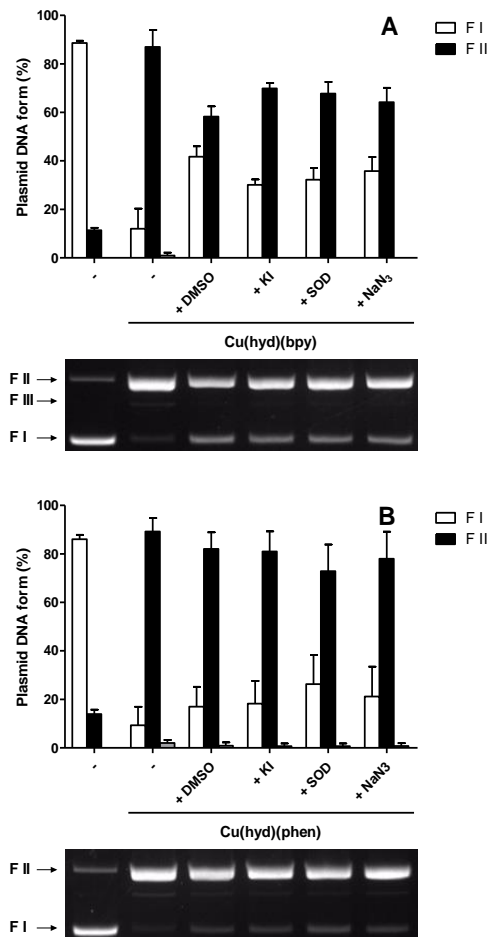


Figura 40. Fotoclivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(hyd)(bpy) (A) e Cu(hyd)(phen) (B) na presença de diferentes inibidores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μ M; [DMSO] = 2 M; [SOD] = 20 unidades; [KI] = 0,5 mM; [NaN₃] = 0,5 mM; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos sob luz UV. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

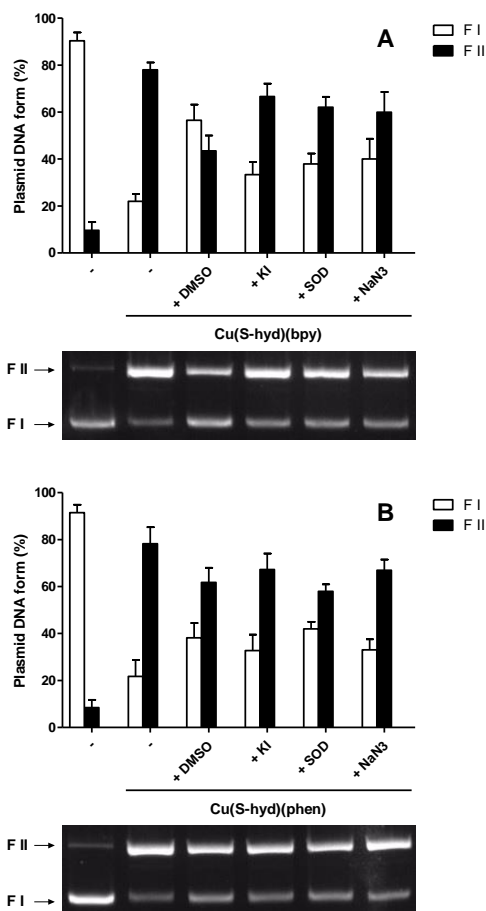
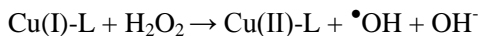
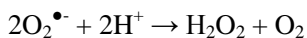
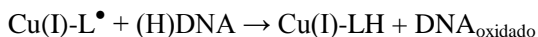
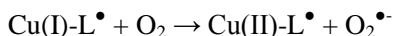
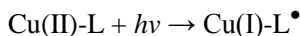


Figura 41. Fotoclivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos Cu(S-hyd)(bpy) (A) e Cu(S-hyd)(phen) (B) na presença de diferentes inibidores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μ M; [DMSO] = 2 M; [SOD] = 20 unidades; [KI] = 0,5 mM; [NaN₃] = 0,5 mM; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos sob luz UV. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Sob luz UV a proposição do mecanismo de geração de ROS é facilitada, pois há muitos exemplos na literatura. O mecanismo

proposto por Souza e colaboradores (2010) parece bem adequado para os quatro complexos de Cu(II) deste trabalho (Esquema 4). O complexo absorve a luz UV e um elétron do ligante fica desemparelhado e reduz o centro metálico por meio de Transferência de Carga Ligante-Metal (TCLM) (GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2013; PATRA; NETHAJI e CHAKRAVARTY, 2007). O complexo reduzido desencadeia as reações descritas no Esquema 2 e/ou oxida diretamente o DNA abstraído um próton, sem haver fragmentação do ácido nucléico.

Esquema 4



4.1.2.4 Ensaios cinéticos

Todos os resultados até o momento sugerem que a exposição à luz UV não altera o mecanismo de clivagem mediado pelos quatro complexos de Cu(II), mas sim potencializa sua atividade. Como mencionado anteriormente, o perfil cinético dos complexos é o modo mais prático para determinar a ordem de reatividade de uma série de complexos. Os resultados obtidos a partir dos ensaios cinéticos estão dispostos nas figuras 42 e 43. Além da comparação direta do perfil cinético exibido entre todos os complexos, uma comparação entre os valores de k_{obs} obtidos sob luz UV e ao abrigo da luz também foi realizada.

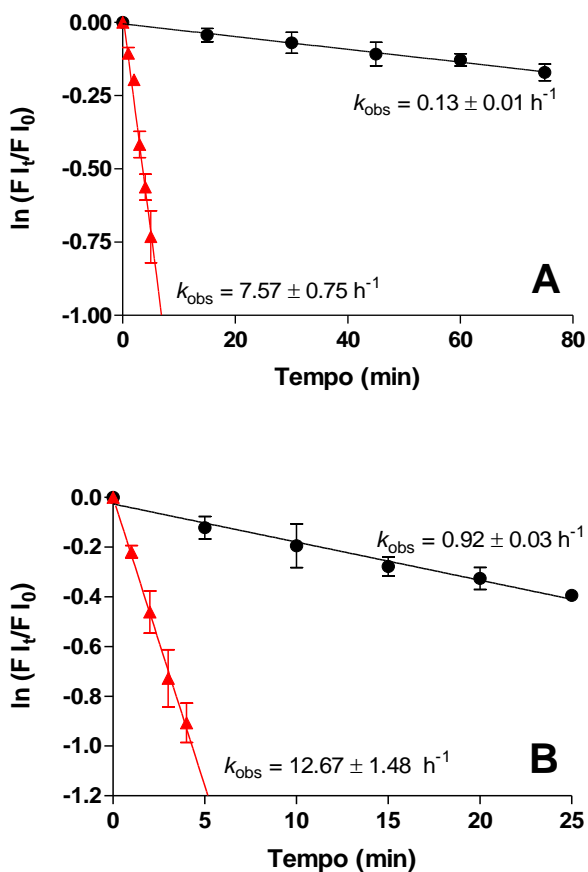


Figura 42. Comparação do perfil cinético da clivagem (linha preta) e fotoclivagem (linha vermelha) do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo Cu(hyd)(bpy) (A) e Cu(hyd)(phen) (B). Condições reacionais dos ensaios de fotoclivagem: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM ; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 10 μM ; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos sob luz UV. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

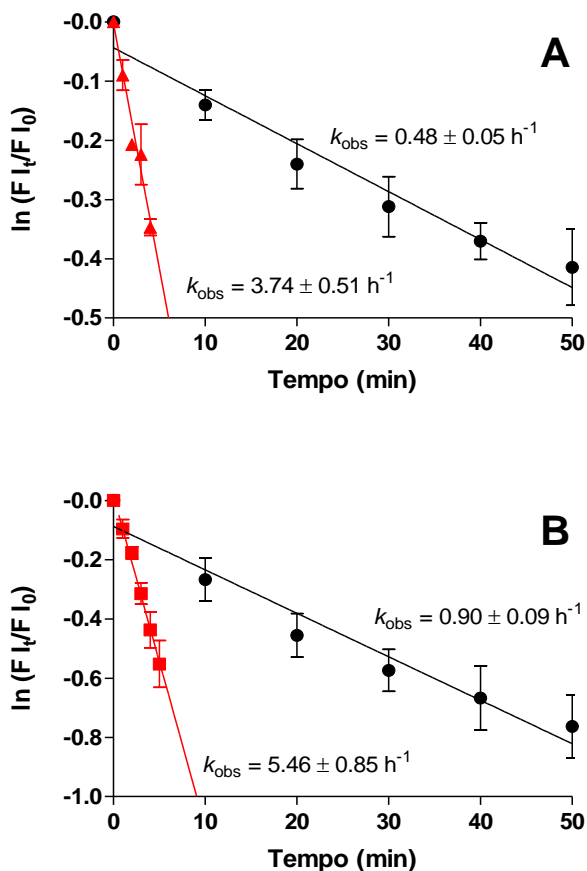


Figura 43. Comparação do perfil cinético da clivagem (linha preta) e fotoclivagem (linha vermelha) do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo Cu(S-hyd)(bpy) (A) e Cu(S-hyd)(phen) (B). [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM ; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 10 μM ; Temperatura = ambiente; Tempo = 5 minutos sob luz UV. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Como esperado, a exposição à luz UV acelera a atividade dos complexos. A clivagem de DNA pelo complexo Cu(bpy)(phen) (25 μM) ao abrigo da luz apresentou um k_{obs} de $0,13 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ enquanto a de fotoclivagem atingiu $7,57 \pm 0,75 \text{ h}^{-1}$ utilizando apenas 10 μM de

complexo. Numa comparação direta, isso significa que a velocidade da reação aumentou 58 vezes. No entanto, como a concentração do complexo utilizada em cada ensaio foi diferente, novamente se faz necessário o uso da constante de segunda-ordem para melhor interpretação do efeito observado. Quando os valores de k_2 (Tabela 2) são confrontados entre si, vê-se que sob luz UV, a velocidade da reação é quase 146 vezes maior!

Tabela 2. Comparação das constantes de segunda-ordem reacional (k_2) obtida com complexos nos ensaios cinéticos sob luz UV (+UV) com as obtidas nos ensaios ao abrigo da luz (-UV).

Complexo	k_2 ($M^{-1} h^{-1}$) +UV	k_2 ($M^{-1} h^{-1}$) -UV	$\frac{+UV}{-UV}$	K_b (M^{-1})
Cu(hyd)(bpy)	$7,6 \times 10^5$	$5,2 \times 10^3$	~146	$2,6 \times 10^3$
Cu(hyd)(phen)	$1,3 \times 10^6$	$9,2 \times 10^4$	~14	$2,2 \times 10^4$
Cu(S-hyd)(bpy)	$3,8 \times 10^5$	$2,0 \times 10^4$	~19	$6,7 \times 10^3$
Cu(S-hyd)(phen)	$5,5 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	~6	$5,1 \times 10^4$
[Cu(dox)(phen)] ²⁺	$8,4 \times 10^5$	$2,1 \times 10^4$	~39	$1,0 \times 10^5$
[Cu(tc)phen] ²⁺	$9,6 \times 10^5$	$2,5 \times 10^4$	~37	$1,1 \times 10^5$
[Tb(tdzp)(acac) ₃]	$1,0 \times 10^5$	-	-	-

- Condições reacionais dos complexos de Cu(II) em estudo: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = Tris-HCl (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 10 μ M para Cu(hyd)(phen) e Cu(S-hyd)(phen) e 25 μ M para Cu(hyd)(bpy) e Cu(S-hyd)(bpy); Temperatura = 37°; Tempo = até 50 minutos ao abrigo da luz.

- Valores de K_b , k_2 +UV e k_2 -UV dos complexos [Cu(dox)(phen)]²⁺ e [Cu(tc)phen]²⁺ obtidos por Silva e colaboradores (2011) e por Bortolotto e colaboradores (2011).

- Valores de k_2 +UV do complexo [Tb(tdzp)(acac)₃] estimados pelo autor a partir dos dados obtidos por Cavalett e colaboradores (2012).

- Todos os demais valores foram estimados pelo autor a partir de dados próprios ou de dados obtidos nos trabalhos citados.

O complexo Cu(hyd)(phen) que já havia apresentado o melhor k_{obs} nos ensaios ao abrigo da luz com $0,92 \pm 0,03 h^{-1}$ também apresentou

o melhor k_{obs} sob luz UV, com $12,67 \pm 1,48 \text{ h}^{-1}$, o que significa um aumento de atividade de quase 14 vezes. O terceiro mais reativo complexo ao abrigo da luz, Cu(S-hyd)(bpy), também mostrou um grande incremento de atividade atingindo um k_{obs} de $3,74 \pm 0,51 \text{ h}^{-1}$ que corresponde um aumento de quase 19 vezes na atividade quando sob luz UV. Por fim, o complexo Cu(S-hyd)(phen) que já havia apresentado uma das melhores reatividades ao abrigo da luz, mostrou-se ser o menos estimulado pela luz UV, pois com um k_{obs} de $5,46 \pm 0,85 \text{ h}^{-1}$ o aumento da atividade sob luz UV foi de apenas 6 vezes.

Como os quatro complexos de Cu(II) mostraram resultados muito semelhantes de fotoclivagem de DNA (conforme mostrados na seção 4.1.2.1), nenhuma tentativa para estabelecer a ordem de reatividade foi realizada. Agora com os dados ensaios cinéticos é possível observar que ordem segue: Cu(S-hyd)(bpy) < Cu(S-hyd)(phen) < Cu(hyd)(bpy) < Cu(hyd)(phen). Observa-se que sob luz UV a ordem de reatividade é bem diferente da proposta para as reações ao abrigo da luz. Nesta, o complexo Cu(hyd)(bpy) era de longe o menos reativo, mas na fotoclivagem ficou ordenado como o segundo mais reativo. Curiosamente, os complexos com ligante S-hyd foram menos ativos na fotoclivagem de DNA que os complexos com o ligante hyd. No entanto, o complexo de maior K_b com mesmo ligante hidrazida-derivado (hyd ou S-hyd), sempre foi o mais ativo: Cu(hyd)(bpy) < Cu(hyd)(phen) e Cu(S-hyd)(bpy) < Cu(S-hyd)(phen).

Isto pode indicar dois aspectos: 1) as propriedades fotoquímicas do ligante hyd devem ser diferentes das do ligante S-hyd, o que de alguma forma facilita a geração de ROS e justifica a maior reatividade dos complexos contendo hyd frente aos contendo S-hyd; e 2) quanto maior a força de ligação do complexo ao DNA, mais fortemente a fotoclivagem deve ocorrer, pois quanto mais facilitada é a ligação do complexo ao DNA mais rapidamente as ROS geradas podem atuar sobre a estrutura do ácido nucléico. Este segundo aspecto é reforçado pelo comportamento que os complexos com ligante phen apresentaram nas seções 4.1.1.5 e 4.1.2.3 que se refere aos ensaios com sequestradores de ROS ao abrigo da luz e sob luz UV, respectivamente.

Quando observada a razão entre a velocidade de fotoclivagem com a clivagem de DNA, vemos que incremento variou de aproximadamente 6 para 146 vezes. A ordem de sensibilidade à luz UV foi: Cu(S-hyd)(phen) < Cu(hyd)(phen) < Cu(S-hyd)(bpy) < < Cu(hyd)(bpy). Vê-se neste ordenamento um efeito contrário a todas as ordens de reatividade propostas. Os complexos com ligante phen, embora tenham sido mais reativos sob luz UV que seus análogos com

ligantes bpy, foram proporcionalmente menos estimulados. Provavelmente, isso ocorre porque os complexos com ligantes bpy foram bem menos reativos que os complexos com ligante phen ao abrigo da luz. Logo a razão da fotoclivagem pela clivagem de DNA resultou em números bem mais expressivos para os complexos cuja clivagem de DNA ao abrigo de luz. Esse fato é facilmente observado com o complexo Cu(hyd)(bpy). Embora sua atividade de fotoclivagem de DNA tenha sido apenas 1,7 vezes menor que seu análogo Cu(hyd)(phen) a diferença na atividade de clivagem foi 17,7 vezes! Excluindo o complexo Cu(hyd)(bpy) cujo aumento da atividade pela luz UV pode ser sido despropositadamente inflacionada, todos os demais complexos tiveram incrementos de atividade abaixo dos observados na literatura. Bortolotto e colaboradores (2011), observaram que sob luz UV a fotoclivagem do DNA pelos complexos [Cu(dox)(phen)]²⁺ e [Cu(tc)(phen)]²⁺ foi de 39 e 37 vezes, respectivamente. Quando comparados os valores de k_2 referentes à fotoclivagem de DNA, todos os complexos encontram-se entre 10^5 a 10^6 M⁻¹ h⁻¹ o que se mostrou compatível com os poucos exemplos da literatura (BORTOLOTTO et al., 2011; CAVALETT et al., 2012).

Por fim, os ensaios cinéticos deixam claro que a exposição à luz UV estimula a atividade de todos os complexos testados e em particular o complexo Cu(hyd)(bpy). O aumento da atividade em 146 vezes é surpreendente e encoraja novos estudos. Como o mecanismo dos complexos parece não ter sido alterado pela luz UV, sugere-se que esta estratégia de fotoexposição é muito adequada para impulsionar a atividade de agentes sintéticos de clivagem de DNA para, ao menos, os quatro complexos aqui apresentados. No entanto, para cada nova pequena molécula um estudo detalhado e comparativo entre clivagem e fotoclivagem de DNA deve se realizado a fim de se garantir os resultados desejados.

4.1.3 Clivagem de Oligonucleotídeos

Após a maciça caracterização da atividade dos complexos frente ao DNA plasmidial uma investigação foi desenvolvida utilizando-se como substrato de DNA um pequeno oligonucleotídeo (Figura 19). Dependendo de que forma ocorre a fragmentação do oligonucleotídeo, é possível identificar e/ou sugerir a presença de sítios específicos de clivagem. Com isso é possível verificar se os complexos possuem alguma seletividade em termos de estrutura secundária/sequência nucleotídica do DNA. Como o DNA plasmidial é muito extenso para

tais métodos, este deve ser substituído por uma curta sequência de DNA que seja capaz de trazer informações relevantes para a análise de seletividade. Além disso, outros fatores relevantes em relação ao mecanismo de clivagem (se oxidativo ou hidrolítico) também podem ser analisados por este método, conforme discutido adiante.

Todos os quatro complexos de Cu(II) foram desafiados a clivar e fotoclivar um oligonucleotídeo de 49-mer e os resultados são observados na figura 44. Observa-se que ao abrigo de luz, todos os quatro complexos são capazes de promover a fragmentação do DNA em regiões discretas, isto é, gerando fragmentos de massa regular e distinguíveis no gel de poliacrilamida. Esses fragmentos são mais evidentes com os complexos Cu(hyd)(phen) e Cu(S-hyd)(phen), o que era esperado visto que se mostraram os complexos mais reativos frente ao DNA plasmidial nos ensaios dependentes de concentração (seção 4.1.1.1) e cinéticos (4.1.1.7). Embora não se tenha observada uma fragmentação disseminada ao longo de todo o oligonucleotídeo, isto é, em todas as posições, vê-se que nas regiões de melhor resolução do gel (entre os fragmentos terminados em G3 a C23) fragmentos em todas as posições possíveis. Isto sugere que nenhum dos complexos possui seletividade em termos de sequência nucleotídica. Além disso, todas estas fragmentações ocorreram na região de dupla-hélice de DNA e não na região de simples-fita (*hairpin loop*, fragmentos terminados em T24 a T28) indicando a preferência pela clivagem de sequências onde há a formação de uma estrutura helecoidal típica. Isso concorda e dá suporte aos resultados observados anteriormente em relação aos ensaios com bloqueadores de sulco (4.1.1.6), onde a clivagem de DNA pelos complexos era dependente da existência dos sulcos maior e menor que só ocorrem em função da estrutura de dupla hélice de DNA.

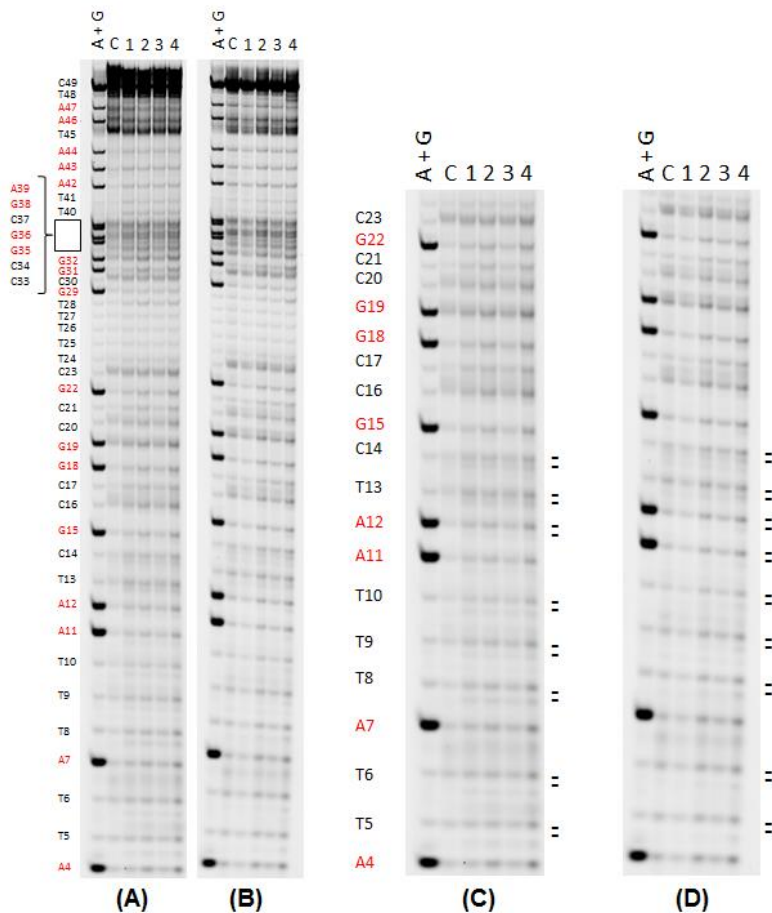


Figura 44. Clivagem do oligonucleotídeo de 49-mer pelos complexos Cu(hyd)(bpy) (1), Cu(hyd)(phen) (2), Cu(S-hyd)(bpy) (3) e Cu(S-hyd)(phen) (4) ao abrigo da luz (A e C) e sob luz UV (B e D). A marcação “C” em cima das figuras se refere ao controle sem a presença dos complexos. A caixa em branco na porção superior do gel faz referência a uma região de difícil resolução (separação dos fragmentos) compreendendo os nucleotídeos C33 a A39. Os nucleotídeos em vermelho se referem ao nucleotídeo terminal dos fragmentos gerados pelo marcador A+G de Maxam-Gilbert. Os painéis C e D são ampliações de A e B, respectivamente, da região contendo A4 a C23. Os sinais “=” mostram os fragmentos que exibem as terminações 3'-fosfato (banda superior) e 3'-fosfoglicolato (banda inferior).

Outro resultado que chama muita atenção é a presença de bandas duplas na região que compreende os fragmentos terminados em C17 a A4. Os fragmentos gerados pelos complexos possuem o mesmo padrão de migração dos fragmentos contidos no marcador A+G de Maxam-Gilbert. Estes são originados pelo tratamento com piperidina gerando fragmentos de extremidades 3'-fosfato (MAXAM e GILBERT, 1977). Deste modo, é possível sugerir que os fragmentos gerados pelos complexos testados também possuem extremidades 3'-fosfato, fato esse observado para outros complexos na literatura (GONZÁLEZ-ÁLVAREZ et al., 2003; HUMPHREYS et al., 2002; MASSOUD et al., 2014; PITIÉ; BURROWS e MEUNIER, 2000). No entanto, a banda “extra” de menor intensidade e que migra abaixo à banda correspondente aos fragmentos com extremidade 3'-fosfato não corresponde a outro fragmento (com um nucleotídeo a menos), mas sim ao mesmo fragmento com outro tipo de extremidade. Uma destas extremidades é a 3'-fosfoglicolato derivada da oxidação do C'4 da desoxirribose do DNA (POGOZELSKI e TULLIUS, 1998), cuja detecção pode ser realizada por eletroforese em gel de poliácridamida de alta resolução. Neste caso, a banda referente a um fragmento cujo terminal é 3'-fosfoglicolato possui uma mobilidade eletroforética levemente maior que a correspondente contendo 3'-fosfato.

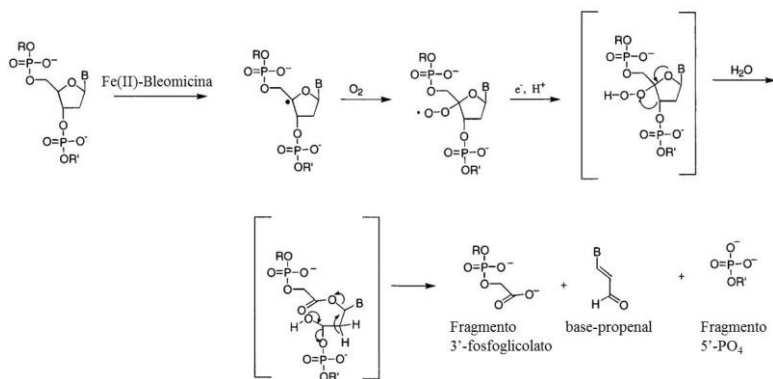


Figura 45. Esquema mostrando a clivagem de DNA mediada pelo complexo Fe(II)-Bleomicina detalhando a oxidação em C'4 resultando na abertura do anel da desoxirribose e decomposição da pentose, resultando na fragmentação da cadeia do DNA com extremidades 5'-fosfato e 3'-fosfoglicolato, bem como a liberação de base-propenal.

Na figura 45 vê-se um esquema demonstrando a geração de fragmentos com terminais 3'-fosfoglicolato, mediado pela Fe(II)-Bleomicina na presença de O₂, derivados da decomposição da desoxirribose. Com isso observa-se também a geração de outros produtos como a base-propenal, cuja origem é exclusiva da oxidação em C⁴, tornando este produto um marcador específico para este mecanismo oxidativo (ANGELE-MARTINEZ; GOODMAN e BRUMAGHIM, 2014; JIANG et al., 2007; POGOZELSKI e TULLIUS, 1998). Como não foi verificada a geração de base-propenal pelos complexos em estudo não se pode garantir que fragmentos de DNA com terminais 3'-fosfoglicolato estão sendo gerados. O outro terminal que também pode ser observado por eletroforese em gel de poliacrilamida de alta resolução é o 3'-fosfoglicolaldeído. Fragmentos contendo terminais 3'-fosfoglicolaldeído possuem uma mobilidade eletroforética menor que seus correspondentes 3'-fosfato (POGOZELSKI e TULLIUS, 1998; SITLANI et al., 1992). Como a banda "extra" migra logo abaixo a banda referente aos fragmentos com terminal 3'-fosfato, supõem-se que a primeira possui uma aparente mobilidade eletroforética maior em relação a segunda. Essa observação não corresponde com predito para os fragmentos contendo terminais 3'-fosfoglicolaldeído. Além disso, fragmentos contendo terminais 3'-fosfoglicolaldeído até então só foram identificados em reações de fotoclivagem por complexos de Rh(III) (SITLANI et al., 1992).

Portanto, mesmo sem evidência de formação de base-propenal, sugere-se aqui que os quatro complexos de Cu(II) testados são capazes de fragmentar o oligonucleotídeo gerando tanto fragmentos com terminais 3'-fosfato como 3'-fosfoglicolato. Estas evidências também dão suporte aos resultados observados anteriormente em relação aos sequestradores de ROS (4.1.1.5), pois os fragmentos com terminais 3'-fosfoglicolato são oriundos da oxidação da desoxirribose e não da hidrólise da ligação fosfodiéster, ou seja, reforçam a hipótese que estes complexos são, de fato, oxidativos.

Os ensaios de fotoclivagem (luz UV) revelaram resultados muito semelhantes aos já observados nas condições de clivagem (ao abrigo da luz). Deve-se recordar, porém, que os ensaios de fotoclivagem foram conduzidos num tempo de reação muito menor que os ensaios de clivagem (5 min vs. 24 h) e mesmo assim observa-se a geração de fragmentos no mesmo intervalo de sequência do oligonucleotídeo (G3 a C23). Entretanto, o controle da reação (sem complexo) apresentou uma fragmentação mais acentuada sob luz UV do que ao abrigo da luz, mostrando que a condição de iluminação mesmo na ausência dos

complexos é suficiente para causar lesões na estrutura do oligonucleotídeo. Este resultado é semelhante ao observado com todos os ensaios envolvendo o uso de DNA plasmidial, cujo controle sempre apresenta mais fragmentação sob luz UV do que ao abrigo da luz. Também foi observada a presença de bandas duplas na região de maior resolução do gel e que, como extensamente discutido acima, devem ser resultado da geração de fragmentos com terminais 3'-fosfoglicolato. No entanto, nota-se uma menor intensidade nas bandas dos fragmentos, o que indica menor quantidade de produto gerado. Este efeito sugere uma menor atividade por parte dos complexos, mas levanta dois questionamentos: 1) esta menor atividade deve-se em função do curto tempo de reação; e/ou 2) a exposição à luz UV leva a foto-oxidação do marcador fluorescente fluorascéina, diminuindo a intensidade dos fragmentos gerados. Em virtude destes questionamentos, novos ensaios deverão ser realizados utilizando outras estratégias a fim de se verificarem apropriadamente como a fotoclivagem do oligonucleotídeo é mediado pelos complexos de Cu(II) em estudo.

4.1.4 Interação com o DNA

4.1.4.1 Desnaturação térmica de DNA

A presença de pequenas moléculas ligadas ao DNA modifica o perfil de desnaturação térmica deste ácido nucléico (Apêndice C). Neste sentido, foi determinada a temperatura média de desnaturação do DNA (T_m) na ausência e na presença dos complexos de Cu(II) e a variação da T_m (ΔT_m) é apresentada na tabela 3.

Estes resultados sugerem que estes complexos são capazes de interagir com o DNA, enrijecendo a estrutura dupla-hélice e dificultando a desnaturação. Em comparação com os resultados exibidos pelos complexos $[\text{Cu}(\text{dox})\text{phen}]^{2+}$ e $[\text{Cu}(\text{tc})\text{phen}]^{2+}$, um ΔT_m muito menor foi obtido com os complexo de Cu(II) testados. Embora não tenha sido possível estabelecer uma relação/correlação (dados não mostrados) entre ΔT_m e K_b , observa-se que há uma tendência de que complexos com menor K_b tenham menor ΔT_m .

Tabela 3. Comparação da variação da temperatura média de desnaturação do DNA (ΔT_m) obtida para os complexos de Cu(II) em estudo com suas constantes intrínsecas de ligação do CT-DNA (K_b).

Complexo	ΔT_m (°C)	K_b (M^{-1})
Cu(hyd)(bpy)	+ 0,4 ± 0,1	2,6 x 10 ³
Cu(hyd)(phen)	+ 1,1 ± 0,1	2,2 x 10 ⁴
Cu(S-hyd)(bpy)	+ 0,6 ± 0,1	6,7 x 10 ³
Cu(S-hyd)(phen)	+ 0,9 ± 0,1	5,1 x 10 ⁴
[Cu(dox)(phen)]	+ 2,6	1,0 x 10 ⁵
[Cu(tc)phen]	+ 2,3	1,1 x 10 ⁵

- T_m e K_b dos complexos [Cu(dox)phen] e [Cu(tc)phen] obtidos de Silva e colaboradores (2011) e Bortolotto (2011).

4.1.4.2 Dicroísmo circular

Por meio da espectroscopia de dicroísmo circular (CD), alterações na estrutura secundária do DNA pelos complexos em estudo, como o empilhamento de bases e a helicidade direita da dupla-fita, foram ser verificadas. Os resultados dos ensaios encontram-se nas figuras 46 e 47. A adição de concentrações crescentes dos complexos ao CT-DNA (100 μM) na razão [Complexo]/[DNA] de 0,5 a 3,0 mostrou novamente diferentes resultados dependendo do complexo analisado. Os complexos com ligante bpy pouco afetaram as típicas bandas do DNA em 275 e 245 nm, mas induziram o aparecimento de uma banda nova na região entre 310 e 320 nm. Os complexos com ligante phen induziram um forte hipercromismo da banda de 275 nm. Todos os complexos foram capazes de provocar um deslocamento batocrômico na banda de 245 nm, enquanto somente os complexos com ligante S-hyd (Cu(S-hyd)(bpy) e Cu(S-hyd)(phen)) também o fizeram para a banda em 275 nm. Estes resultados indicam que todos os complexos são capazes de alterar a estrutura secundária do DNA.

Os deslocamentos batocrômicos observados são geralmente relacionados à exposição do ácido nucléico ao solvente. Isto significa que a interação entre os complexos e o DNA provoca alterações

estruturais que expõem o conteúdo interno da dupla-hélice (as bases nitrogenadas) ao meio, sem perda do empilhamento de bases ou helicidade (sentido da hélice).

A nova banda na região entre 310 e 320 nm observada pela interação dos complexos Cu(hyd)(bpy) e Cu(S-hyd)(bpy) é geralmente atribuída para um não típico tipo de interação com o DNA (BEROVA; NAKANISHI e WOODY, 2000), sendo necessárias outras técnicas para propriamente determiná-la. O hipercromismo na banda de 275 nm provocado pelos complexos Cu(hyd)(phen) e Cu(S-hyd)(phen) é um indicativo de estabilização do empilhamento de bases, ou seja, enrijecimento da estrutura helecoidal do DNA. Silva e colaboradores (2011) relatam que os complexo $[Cu(dox)(phen)]^{2+}$ e $[Cu(tc)(phen)]^{2+}$ provocam tanto o hipercromismo na banda de 275 nm do DNA como um leve hipercromismo na banda de 245 nm, o que não se assemelha nem com o comportamento de intercalação, nem com o de ligação ao sulco e são semelhantes aos encontrados com os complexos Cu(hyd)(phen) e Cu(S-hyd)(phen). Somado aos resultados anteriores de inibição de clivagem de DNA por ligadores de sulcos, acredita-se que o comportamento de interação com o DNA pelos complexos testados neste trabalho deva ser do tipo não-intercalativo, mesmo alguns (Cu(hyd)(phen) e Cu(S-hyd)(phen)) provocando a estabilização do empilhamento de bases do DNA.

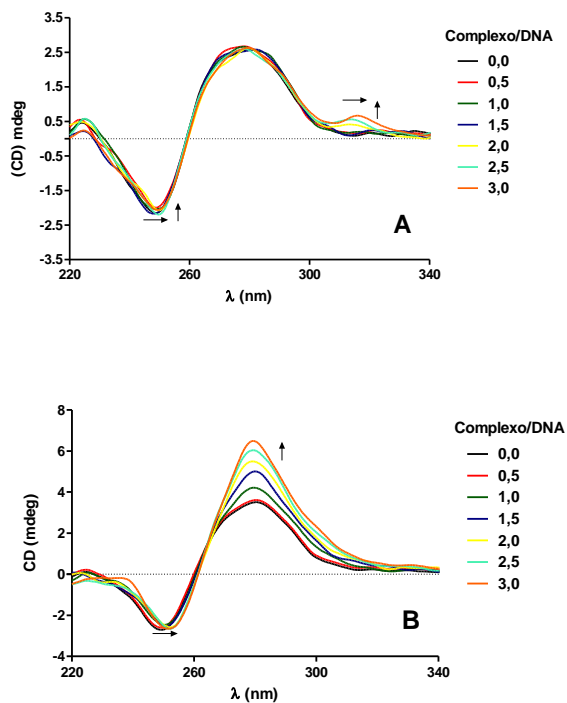


Figura 46. Espectro de dicroísmo circular de DNA na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos Cu(hyd)(bpy) (A) e Cu(hyd)(phen) (B). Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μM ; [Tampão] = 10 mM de Tris-HCl pH 7,4; [complexo] = 0 a 300 μM ; Temperatura = 37 $^{\circ}\text{C}$.

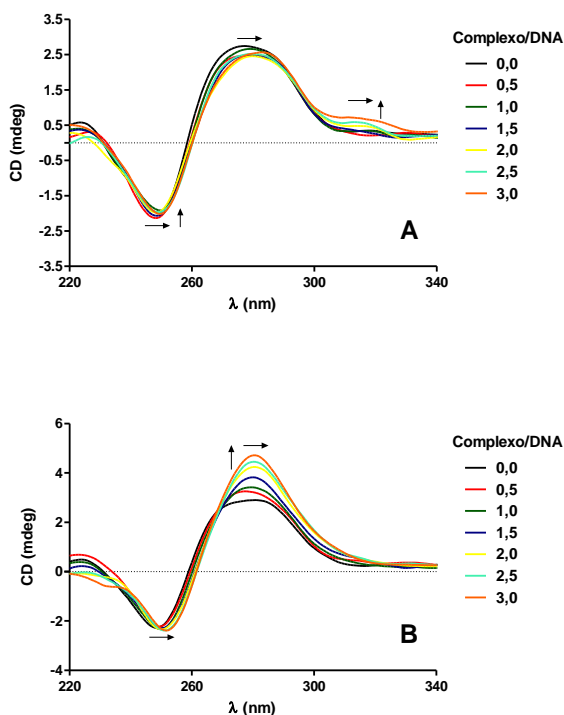


Figura 47. Espectro de dicroísmo circular de DNA na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos Cu(S-hyd)(bpy) (A) e Cu(S-hyd)(phen) (B). Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μ M; [Tampão] = 10 mM de Tris-HCl pH 7,4; [complexo] = 0 a 300 μ M; Temperatura = 37 $^{\circ}$ C.

4.2 COMPLEXOS BINUCLEARES DE FE(III)ZN(II)

4.2.1 Clivagem de DNA plasmidial

4.2.1.1 Efeito da concentração dos complexos

/

A atividade dos complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 frente à clivagem de DNA plasmidial foi inicialmente verificada em termos de concentração dos complexos em um longo período de reação (16 h) a 37 $^{\circ}$ C. Nestas condições ambos os complexos mostraram-se capazes de clivar o DNA plasmidial utilizado somente em concentrações menores

que 10 μM (dados não mostrados). O uso de concentrações acima de 10 μM induziu a precipitação do DNA impedindo a apropriada avaliação da clivagem. Por esse motivo os demais experimentos a serem apresentados não utilizaram mais que 10 μM de complexo por reação.

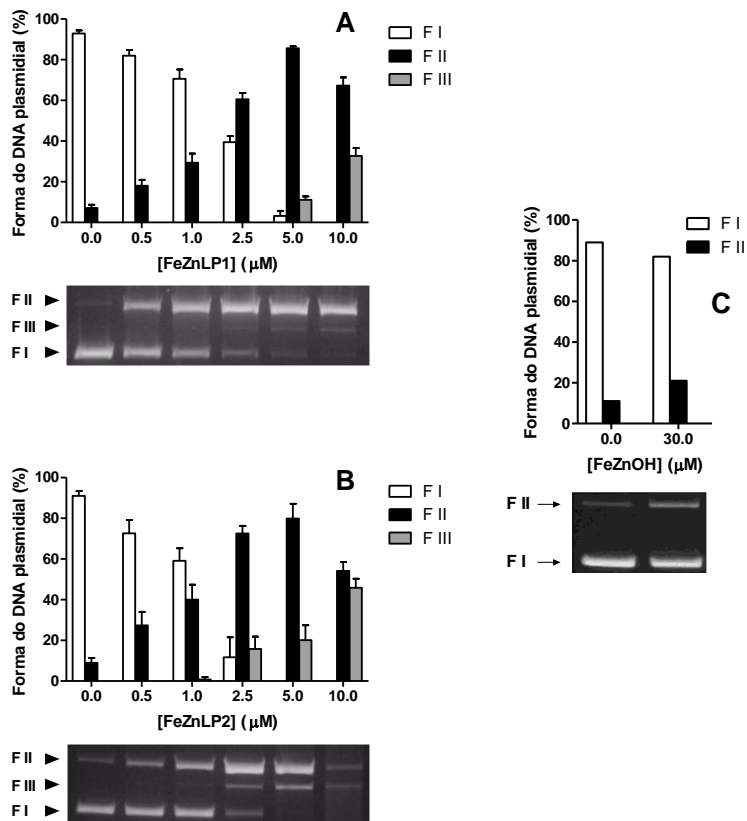


Figura 48. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos FeZnLP1 (A) e FeZnLP2 (B) em diferentes concentrações e em comparação ao complexo FeZnOH de Peralta e colaboradores (2010). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, $\sim 25 \mu\text{M}$; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 0,5 a 10 μM ; Temperatura = 37 $^{\circ}\text{C}$; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Ambos os complexos foram capazes de clivar o DNA de modo concentração-dependente, ou seja, à medida que a concentração do complexo aumenta no meio reacional aumenta também sua capacidade de clivagem de DNA. Entretanto, concentrações maiores que 10 μM levaram a precipitação do DNA nas reações, inviabilizando sua utilização (dados não mostrados). Os complexos mostram perfis semelhantes de atividade até o momento que se utiliza 1 μM de complexo (Figura 48). A partir da concentração de 2,5 μM observa-se que o complexo FeZnLP2 mostra uma maior atividade em relação à FeZnLP1, pois foi capaz de gerar quebras-duplas promovendo o aparecimento da forma linear (F III, ~10%) do plasmídeo, ao passo que FeZnLP1 só terá comportamento semelhante com o dobro desta concentração (5 μM). Este resultado é um indicativo somente, pois somente os ensaios cinéticos podem dimensionar adequadamente a ordem de reatividade destes complexos. Na máxima concentração testada (10 μM), ambos os complexos foram capazes de clivar completamente o DNA plasmidial, mas destaca-se o comportamento do complexo FeZnLP2 que converte o DNA em cerca de 50% na sua forma linear.

Quando comparados os resultados obtidos com os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 com os obtidos com o complexo modelo FeZnOH vê-se claramente o grande aumento na atividade destes complexos, no que se refere à clivagem de DNA, pois: 30 μM de FeZnOH gera ~10% de DNA clivado (na forma de DNA circular aberto) (PERALTA et al., 2010a) enquanto os complexos FeZnLP1 ou FeZnLP2 numa concentração até 3x menor (10 μM), são capazes de clivar completamente o DNA plasmidial sob semelhantes condições reacionais. Esta maior reatividade pode ser explicada pela maior grande afinidade do grupo pireno ao DNA (WOLFE; SHIMER e MEEHAN, 1987), o que facilita a formação do sistema complexo-DNA. Outros exemplos na literatura vêm demonstrando que a incorporação de grupos intercalantes em ligantes parece ser uma interessante alternativa para aumentar a eficiência de complexos de metais em termos de catálise (CHEN et al., 2009; CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2008b). Entretanto, alguns exemplos mostram que nem sempre esta estratégia tem efeito positivo (TSENG e BURSTYN, 2008), sendo necessária uma profunda análise de sua utilização em cada caso (complexo).

4.2.1.2 Efeito do pH

O pH do meio reacional é um dos fatores que mais influencia a clivagem de DNA mediada por um complexo cujo mecanismo é hidrolítico (CAMARGO et al., 2010b; CAMARGO et al., 2010d; MASSOUD et al., 2014; OSÓRIO et al., 2012; PARRILHA et al., 2008; REY et al., 2009; XAVIER et al., 2009). Por serem FeZnLP1 e FeZnLP2 derivados do complexo FeZnOH que cliva o DNA por um mecanismo hidrolítico (PERALTA et al., 2010a), procurou-se analisar a atividade dos complexos em função do pH do meio reacional (Figura 49). A atividade de ambos os complexos mostrou uma grande dependência à variação do pH, seguindo um perfil de sino com o ótimo reacional em pH 7,0. Este comportamento concorda com o observado para a hidrólise do éster de fosfato 2,4-BDNPP (2,4-bis-dinitrofenol-fosfato) que é usado como mimético da ligação fosfodiéster (CAMARGO, 2013).

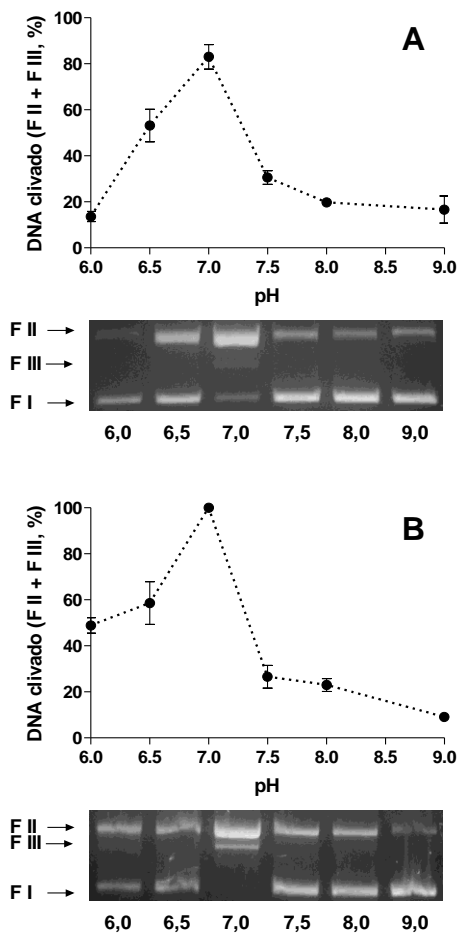


Figura 49. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos FeZnLP1 (A) e FeZnLP2 (B) em diferentes pHs. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = MES (10 mM, pH 6,0 e 6,5)/HEPES (10 mM, pH 7,0 e 7,5)/CHES (10 mM, pH 8,0 e 9,0); [complexo] = 5 μ M; Temperatura = 37 $^{\circ}$ C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

Estes resultados sugerem então que o mecanismo de clivagem de DNA pode seguir o mesmo utilizado na hidrólise do 2,4-BDNPP (Figura

50). Neste caso, uma molécula de água ligada ao Fe(III) sofre uma deprotonação e o íon hidróxido gerado promove um ataque nucleofílico à ligação fosfodiéster do DNA. Embora os ensaios com sequestradores de ROS sejam os que melhores fornecem evidências para a determinação do mecanismo de clivagem é válido lembrar que complexos com mecanismo hidrolítico sofrem grande alteração da atividade com a variação do pH, pois altera a formação das espécies que atuam na catálise (por exemplo, formação do nucleófilo). Isto reforça ainda mais a proposição de que os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 clivam o DNA hidroliticamente, pois pequenas variações no pH influenciam diretamente na atividade dos complexos.

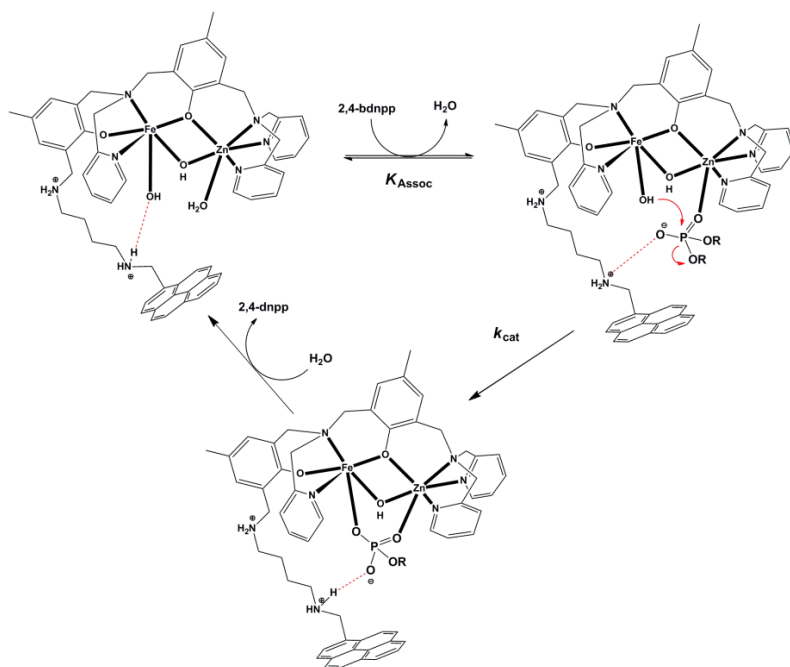


Figura 50. Proposta do mecanismo de hidrólise do 2,4-BDPP pelo complexo FeZnLP1. Na primeira etapa o substrato coordena-se ao centro de Zn(II) pelo deslocamento de uma molécula de água. Em seguida o íon hidróxido presente no centro de Fe(III) atua como nucleófilo, atacando o átomo de fósforo do substrato, ocorrendo então a clivagem da ligação fosfodiéster e a conseqüente liberação do 2,4-dinitrofenolato. O monoéster, 2,4-dinitrofenilfosfato, permanece coordenado ao complexo, podendo ser deslocado pela presença de

excesso do substrato 2,4-BDNPP, reiniciando o processo catalítico. Retirado de Camargo (2013).

4.2.1.3 Efeito dos ligantes e dos metais isolados

Devido à falta de solubilidade dos ligantes em solventes compatíveis com o DNA, como DMSO, acetonitrila ou dimetilformamida, os ensaios que visam verificar se os ligantes dos complexos possuem capacidade própria de clivagem de DNA não foram realizados. Por isso, os ensaios foram realizados somente com os sais dos metais, no caso ZnSO_4 e FeSO_4 (Figura 51). Nenhum dos metais que pertencem aos complexos em estudo apresentou atividade isoladamente quando comparados aos respectivos complexos. Isto que sugere que a atividade dos complexos é de fato proveniente da formação de um complexo em solução ao passo que também indica que no meio reacional o complexo mantém-se estável.

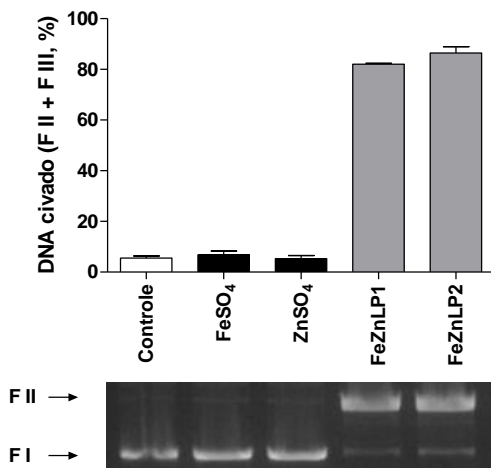


Figura 51. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 em comparação com FeSO_4 e ZnSO_4 . Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM ; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,4); [complexo ou o sal] = 5 μM ; Temperatura = 37°C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4.2.1.4 Efeito da força iônica

Como citado anteriormente, as interações eletrostáticas podem ser um dos mecanismos pelo qual ocorre a interação entre pequenas moléculas e o DNA. Levando em consideração que as ligações fosfodiéster no DNA encontram-se negativamente carregadas nas condições reacionais que foram utilizadas ao longo deste trabalho (DOMINGOS et al., 2003; WESTHEIMER, 1987), é plausível sugerir que as interações eletrostáticas entre o DNA e o meio possam em alguma extensão contribuir com a ligação e consequente clivagem de DNA pelos complexos FeZnLP1 e FeZnLP2. Embora o grupo pireno interaja com o DNA por um mecanismo intercalativo que não é dependente de efeitos de carga, o “braço” (*linker*) de 1,4-butanodiamina que o prende ao ligante binucleante deve se encontrar parcialmente desprotonado em pH 7,0 (CAMARGO, 2013) contribuindo para existência de interações iônicas entre complexo e DNA.

Conforme os resultados apresentados nas figuras 52 e 53, ambos os complexos tiveram sua atividade fortemente inibida pela adição crescente de NaCl. O mesmo ocorre quando o NaCl foi substituído por NaClO₄. Como a atividade dos complexos foi afetada na mesma proporção tanto por NaCl quanto por NaClO₄, pode-se sugerir que o efeito dos íons Na⁺ no meio reacional apresenta um papel muito mais determinante na atividade dos complexos que os íons Cl⁻/ClO₄⁻. Os íons de Na⁺ tendem a estabilizar a conformação do DNA, reduzindo a repulsão dos grupos fosfato carregados negativamente, tornando o DNA “mais rígido” (HAGERMAN, 1988). Segundo o mecanismo proposto por Camargo (2013) para a hidrólise do 2,4-BDNPP (e, de maneira análoga, à ligação fosfodiéster do DNA) (figura 50), a amina carregada no braço de 1,4-butanodiamina contribui positivamente para a estabilização do grupo fosfato no ciclo catalítico. O aumento da concentração de íons de Na⁺ deve diminuir a interação do complexo ao fosfato dificultando o processo de catálise, o que é plenamente observado nos resultados descritos nesta seção. Isto sugere, mais uma vez, que a atividade de clivagem de DNA deve seguir o mecanismo de hidrólise do 2,4-BDNPP concordando com o já observado para o complexo FeZnOH de Peralta e colaboradores (2011).

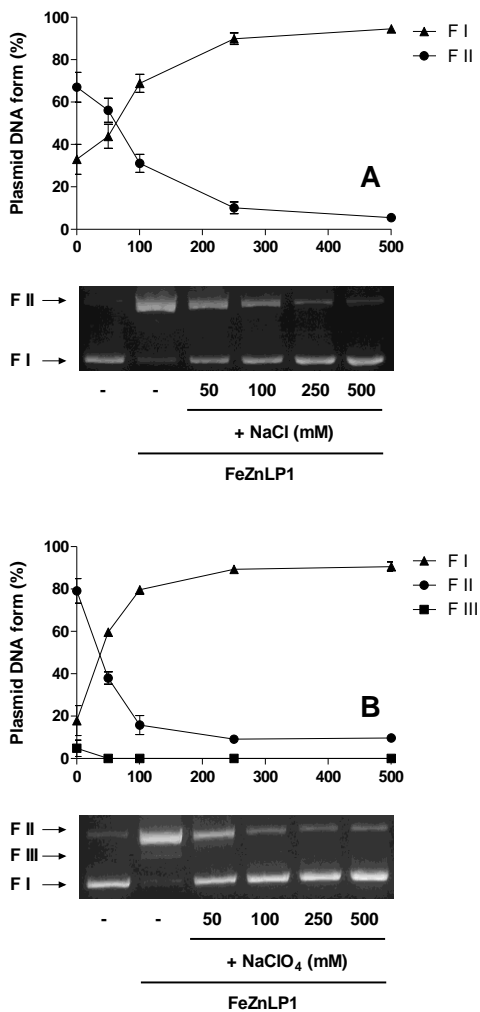


Figura 52. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZnLP1 em função de diferentes concentrações de NaCl (A) e NaClO₄ (B). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz. Resultados expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

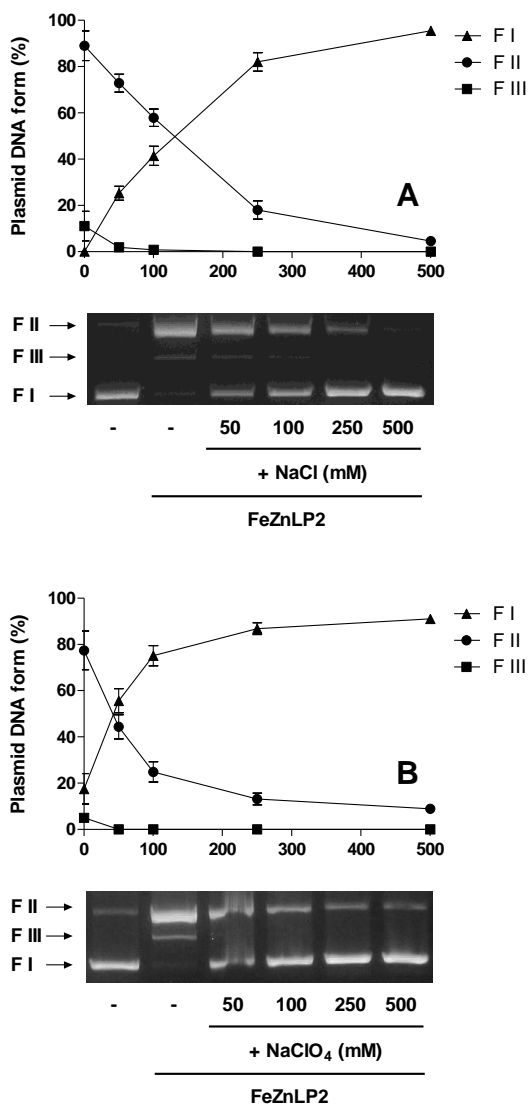


Figura 53. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelo complexo FeZnLP2 em função de diferentes concentrações de NaCl (A) e NaClO₄ (B). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz.

Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4.2.1.5 Efeito dos sequestradores de ROS

Quando os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 foram desafiados a clivar o DNA plasmidial na presença de sequestradores de ROS, mais uma vez se observam evidências que levam a um mecanismo hidrolítico (Figura 54), pois nenhum inibidor foi capaz de prevenir a clivagem de DNA mediada pelos complexos. Todos os resultados obtidos até aqui sugerem que os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 embora sejam muito mais reativos que o complexo modelo FeZnOH, seu mecanismo de hidrólise de DNA não foi alterado. Este efeito é muito significativo, pois reforça a validade da proposta levantada por estes complexos: aumento da atividade sem que mecanismo seja afetado.

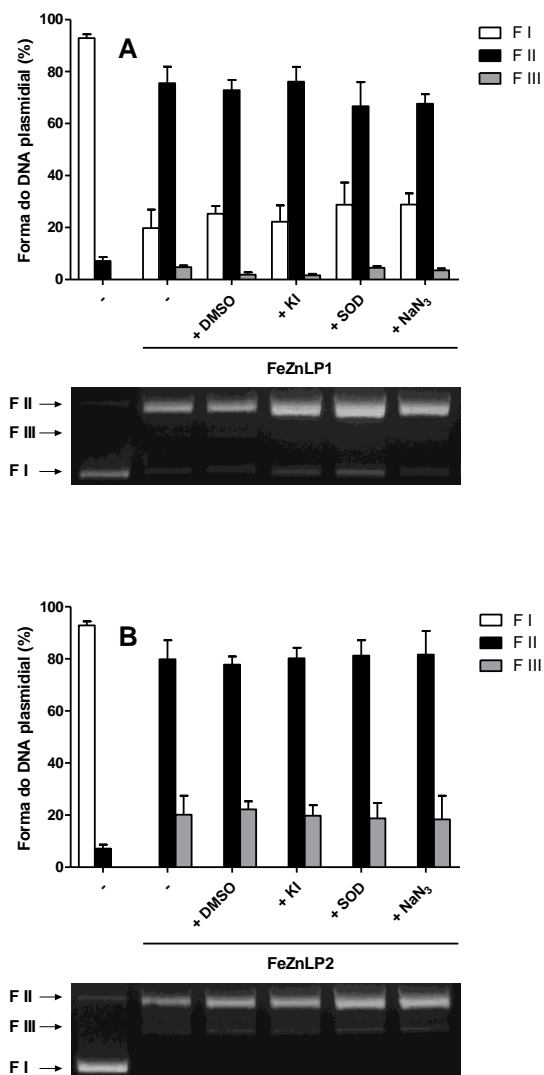


Figura 54. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos FeZnLP1 (A) e FeZnLP2 (B) na presença de diferentes inibidores de ROS. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μ M; [DMSO] = 2 M; [SOD] = 20 unidades; [KI] = 0,5 mM; [NaN₃] = 0,5 mM; Temperatura = 37 °C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz.

Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4.2.1.6 Efeito dos bloqueadores de sulco

Para determinar se há dependência pela interação via sulcos de DNA, os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 tiveram sua atividade frente ao DNA testada na presença do bloqueador de sulco menor, netropsina, e do sulco maior, verde de metila. Os resultados obtidos nos ensaios são apresentados na figura 55. Ambos os bloqueadores mostraram a capacidade de parcialmente inibir a clivagem de DNA mediada pelos dois complexos, porém a netropsina mostrou-se mais eficaz em prevenir o processo de clivagem. Estes resultados sugerem que os complexos possuem uma preferência pela interação com o sulco menor, o que já foi observada com complexos com semelhantes ligantes (CAMARGO et al., 2010a; CAMARGO et al., 2010c). Curiosamente, o complexo FeZnOH não exibiu um resultado de fácil interpretação, pois a presença do bloqueador de sulco menor distamicina aumentava a atividade do complexo (PERALTA et al., 2010a). A ligação da distamicina ao sulco menor pode criar distorções na molécula de DNA que permitem uma melhor interação do complexo ao ácido nucleico (FERRER et al., 2004; THOMAS et al., 2003).

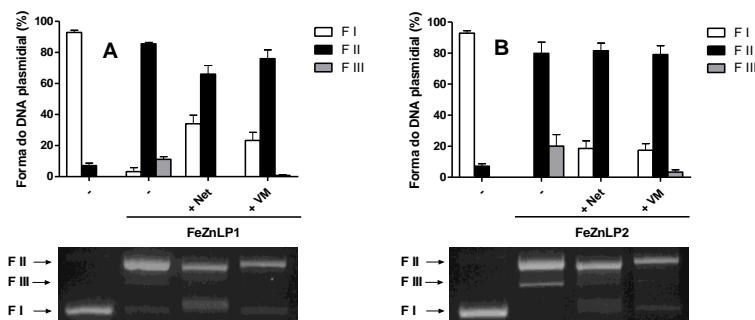


Figura 55. Clivagem do DNA plasmidial pBSK-II pelos complexos FeZnLP1 (A) e FeZnLP2 (B) na presença dos diferentes inibidores de sulcos do DNA, netropsina (Net) ou verde de metila (VM). Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μ M; [Net] ou [VM] = 50 μ M; Temperatura = 37 $^{\circ}$ C; Tempo = 16 horas ao abrigo de luz.

Resultados expressos como média \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

4.2.1.7 Ensaios cinéticos

Finalmente, o perfil cinético da clivagem de DNA pelos complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 foi determinado pelo desaparecimento de forma superenovelada do DNA plasmidial (F I) em função do tempo. Tratando os dados como uma cinética de pseudo-primeira-ordem, onde há um excesso de catalisador em relação ao substrato, a constante observada de clivagem de DNA (k_{obs}) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de F I foram estimados e sumarizados na tabela 4. Nesta constam também os dados referentes ao perfil cinético do complexo $\text{Fe}^{\text{III}}-(\mu\text{-OH})\text{Zn}^{\text{II}}\text{LAlD}$ (doravante FeZnAld) no qual LAlD é o ligante derivante de LP1 e LP2, mas não possui nem o(s) grupo(s) pireno(s) nem o braço de 1,4-diaminobutano. Embora os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 tenham sido originados do complexo FeZnOH, a síntese dos ligantes LP1 e LP2 são derivados do ligante LAlD que é uma adaptação do ligante LH. Portanto, é mais crível comparar os dados obtidos com os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 com o complexo FeZnAld do que com o complexo FeZnOH.

Tabela 4. Constante observada de clivagem de DNA (k_{obs}), tempo de meia-vida da forma superenovelada do DNA ($t_{1/2}$) e fator de incremento da atividade vs FeZnAld obtida com complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 nos ensaios cinéticos.

Complexo	k_{obs} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	$\frac{k_{\text{obs}}(\text{complexo})}{k_{\text{obs}}(\text{FeZnAld})}$
FeZnAld	0,019	~36,3	1,0
FeZnLP1	0,215	~3,2	11,3
FeZnLP2	0,355	~1,9	18,6

- Condições reacionais dos complexos de Fe(III)Zn(II) em estudo: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μM ; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μM ; Temperatura = 37 °C; Tempo = até 8 horas.

Em ensaios de única concentração e tempo de reação, resultados semelhantes foram obtidos com FeZnOH e FeZnAld. No entanto, os resultados cinéticos mostraram diferenças significativas entre eles. Sob

as mesmas condições reacionais ([DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = HEPES (10 mM, pH 7,0); [complexo] = 5 μ M; Temperatura = 37 °C) o complexo FeZnOH cliva o DNA plasmidial com um k_{obs} de 0,004 h⁻¹ enquanto o complexo FeZnAld atinge um k_{obs} de 0,019 h⁻¹. Quando comparados à atividade dos complexos FeZnLP1 e FeZnLP2, observa-se um grande incremento na sua atividade frente ao DNA. O complexo FeZnLP1 mostrou ser 11,3 vezes mais ativo que o complexo FeZnAld, enquanto para o complexo FeZnLP2 esse aumento de foi 18,6 vezes. Quando se compara os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 entre si, vemos um aumento de 1,6 vezes na atividade de FeZnLP2 vs FeZnLP1, ou seja, corroborando os resultados anteriores que apontavam FeZnLP2 como mais reativo que FeZnLP1.

Num primeiro momento pode-se inferir que adição de um ou dois grupos pirenos é a única responsável pelo grande aumento de atividade dos complexos de Fe(III)Zn(II). No entanto, não se pode deixar de destacar que o braço de 1,4-diaminobutano presente nos ligantes LP1 e LP2 (e não em LAld) deve possuir um grande papel na interação dos complexos com o DNA por interações eletrostáticas, conforme visto na seção 4.2.1.4. Um estudo visando verificar o efeito somente do braço “carregado” com diferentes tamanhos de cadeia está sendo executado no momento a fim de melhor definir com qual extensão é essa contribuição na atividade dos complexos contendo pireno. Entretanto, é inegável que só a presença dos grupos pireno já deve ser capaz de aumentar a atividade dos complexos, pois foi notório que o complexo que possui dois grupos pireno mostrou-se mais reativo (1,65 vezes) que aquele que possui somente um grupo. Devido a curta distância entre os grupos pirenos, pouco se acredita na possibilidade de bis-intercalação, onde as cada uma das duas moléculas de pireno interage em regiões diferentes da dupla-hélice. Sugere-se, portanto, que as interações intramoleculares pireno-pireno que devem ocorrer dentro do complexo FeZnLP2 criem um ambiente mais hidrofóbico permitindo ao nucleófilo uma liberdade maior para fazer o ataque à ligação fosfodiéster, justificando sua maior atividade frente à FeZnLP1. Este mesmo princípio também foi observado na hidrólise do 2,4-BDNPP, que não apresenta qualquer possibilidade de interação por intercalação, o que concorda com esta hipótese.

4.2.2 Clivagem de Oligonucleotídeos

Da mesma forma que com os complexos de Cu(II) testados, os três complexos de Fe(III)Zn(II) foram desafiados a clivar um

oligonucleotídeo (Figura 19) a fim de se verificar como a presença dos grupos pireno influencia o padrão de fragmentação em termos de estrutura secundária/sequência nucleotídica. Diferentes condições reacionais foram tentadas em termos de temperatura e tempo de reação e mesmo com elevadas concentrações de complexo, mas não foi observada fragmentação do oligonucleotídeo por nenhum dos três complexos de Fe(III)Zn(II) testados. Mancin e colaboradores (2005) compilam alguns exemplos da literatura que são capazes de clivar DNA plasmidial com grande eficiência, mas não apresentam atividade frente a formas de DNA lineares como os oligonucleotídeos. Por razões macroestruturais, o DNA plasmidial na forma superenovelada facilita a atividade de alguns complexos (SCHNAITH; HANSON e QUE, 1994), enquanto formas de DNA lineares e principalmente curtas dificultam o processo de reconhecimento e hidrólise de suas ligações fosfodiéster (LIU et al., 2002).

4.2.3 *Footprinting* de DNA por DNase I

Uma vez que não foi possível observar a fragmentação do oligonucleotídeo, outra abordagem foi utilizada identificar os sítios de ligação dos complexos de Fe(III)Zn(II) ao DNA: o *footprinting* de DNA por DNase I. Embora utilizada com muita frequência para pequenas moléculas orgânicas (BAILLY et al., 2005), exemplos com o emprego desta técnica para determinar o sítio de ligação de complexos metálicos ao DNA já foram relatados (CHVÁLOVÁ et al., 2006; KIKUTA; AOKI e KIMURA, 2002; KIKUTA et al., 1999; KUWAHARA e SUGIURA, 1988; RÜBA; HART e BARTON, 2004; WARD; SKOROBOGATY e DABROWIAK, 1986).

De modo geral, os ensaios relevaram que os três complexos de Fe(III)Zn(II) protegem o oligonucleotídeo da clivagem pela DNase I de modos distintos (Figura 56). A titulação com complexo FeZnAld mostrou uma forte proteção na região que vai de T9 a A12 (sítio A, TTAA). Duas outras regiões mostraram uma leve atenuação da clivagem pela DNase I: C16-C17 (sítio B) e C23-T24 (sítio C). Nas demais regiões ao longo da sequência do oligonucleotídeo nenhuma proteção à clivagem foi concretamente evidenciada. Estes resultados sugerem que os sítios de ligação deste complexo ao DNA devem estar situados nessas posições (nucleotídeos) citados, sendo o sítio A o de possível maior afinidade, pois é o mais fortemente protegido. Vê-se com isso que o complexo FeZnAld parece possuir uma certa especificidade por regiões ricas em AT. Essa hipótese é reforçada, pois dentre os

possíveis três sítios citados, o sítio A é o único contendo quatro nucleotídeos, ou seja, uma extensão de interação bem maior que a sugerida aos sítios B e C.

A titulação com o complexo FeZnLP1 exibe um comportamento semelhante ao observado com o complexo FeZnAld, mas também ganha novas propriedades. Este complexo protege além dos quatro nucleotídeos do sítio A (TTAA) um quinto nucleotídeo: T13. Com isso, sugere-se que o sítio A de ligação do complexo FeZnLP1 é uma versão “estendida” do sítio A de FeZnAld (sítio A+T13; TTAAT). Além disso, nota-se que a proteção deste sítio ocorre numa concentração de complexo muito menor com FeZnLP1 do que com FeZnAld. A proteção em A12, por exemplo, que ocorre com 30 μM de FeZnAld é semelhante a que ocorre com apenas 10 μM de FeZnLP1. Este comportamento deve estar associado à diferente afinidade pelo DNA que os complexos possuem, onde FeZnAld deve ter menor afinidade que FeZnLP1. Além dos sítios A+T13, B e C, vê-se um quarto ponto de proteção que compreende a região contendo os nucleotídeos T41-A42 e A44 (sítio D). O sítio D possui nucleotídeos complementares ao sítio A, o que reforça a sugestão de que estes complexos interagem com preferência a sítios ricos em AT e praticamente confirma que a região de ligação do complexo FeZnLP1 (ao menos) deve ocorrer em torno da região de hibridização entre os sítios A/D.

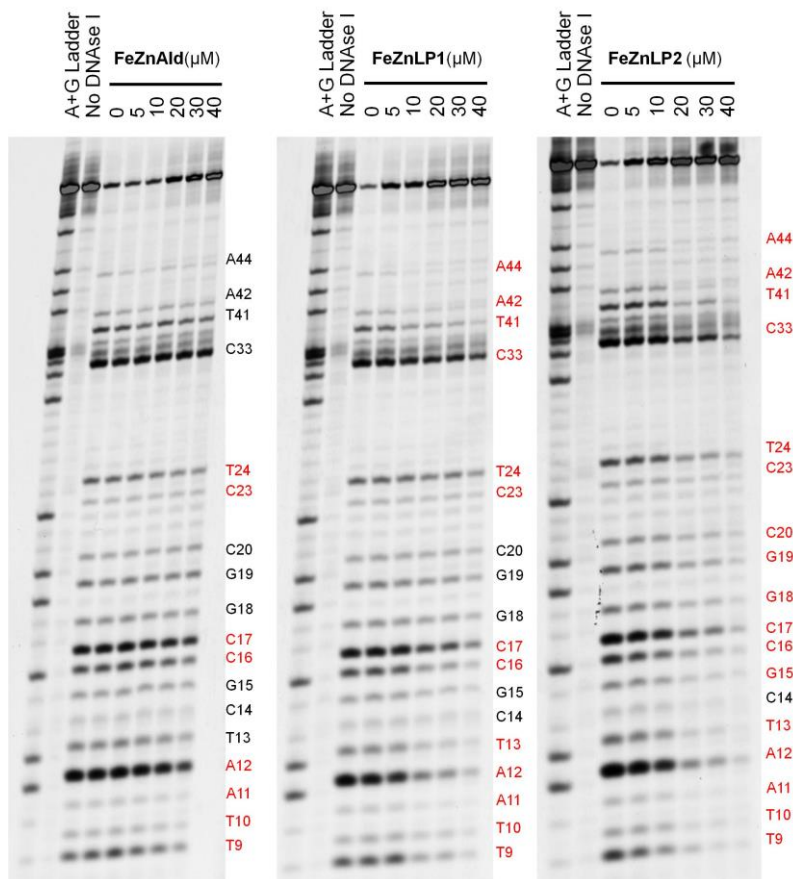


Figura 56. *Footprinting* por DNase I do oligonucleotídeo de 49-mer titulado com complexos FeZnAld, FeZnLP1 e FeZnLP2. Os nucleotídeos em preto se referem aos sítios de clivagem da DNase I, enquanto os em vermelho são os sítios protegidos pelos complexos.

Quando se verifica os resultados obtidos com o complexo FeZnLP2, vê-se não somente todos os mesmos sítios de proteção observados com os complexos FeZnLP1 e FeZnAld, bem como um outro sítio estendido: o **sítio E**, que é a extensão do **sítio B** somado aos nucleotídeos G15 e G18-C20. É possível observar que o **sítio B** encontra-se na região oposta à que contém o nucleotídeo C33 que é aparentemente mais protegido por FeZnLP2 que por FeZnLP1.

Infelizmente a DNase I não possui sítios de clivagem próximos a região que compreende G29-A39, sendo não cauteloso sugerir um outro sítio hibridizado além do **sítio A/D**.

Quanto à afinidade aparente, não se vê grandes diferenças entre as proteção exibidas por FeZnLP1 e FeZnLP2 ao menos nos sítios considerados de maior afinidade (**sítio A/D**). Segundo Carmargo (2013) o K_b estimado para CT-DNA para os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 é de $2,4 \times 10^5$ e $1,2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, respectivamente, mostrando que o complexo FeZnLP2 tem maior afinidade pelo DNA (ao menos CT-DNA) que FeZnLP1. Esta maior afinidade exibida por FeZnLP2 não deve ser a única responsável por propiciar a expansão do **sítio B**. Essa expansão pode estar ligada ao aumento do dimensão da molécula. Este efeito é observado nos estudos com derivados de Fe(II)EDTA conjugados a uma molécula de afinidade ao DNA (Figura 57).

Neste caso em específico a molécula é dotada de dois componentes de diferentes funções: 1) a porção de EDTA, que serve para formação do centro de Fe(II) e geração das ROS que fragmentam o DNA; 2) a molécula que interage especificamente ao DNA. O primeiro “protótipo” foi o Fe(II)EDTA-Distamicina cuja extensão da interação é entre 3 e 4 nucleotídeos (SCHULTZ; TAYLOR e DERVAN, 1982). O segundo complexo é de um pentapeptídeo N-metilpirrólico ligado ao Fe(II)EDTA, que demonstrou não somente mais eficiência na clivagem como maior extensão de ligação: 6 nucleotídeos (SCHULTZ e DERVAN, 1983b). Numa abordagem posterior, duas moléculas de distamicina foram unidas entre si e conjugadas ao Fe(II)EDTA, gerando um complexo capaz de interagir com até 8 nucleotídeos (SCHULTZ e DERVAN, 1983a). Por fim, quando um peptídeo sintético formado por um trímero de tetra-N-metilpirrolcarboxiamida ligados pelo aminoácido β -alanina foi conjugado ao Fe(II)EDTA, uma interação de até 16 nucleotídeos foi conseguida (YOUNGQUIST e DERVAN, 1987). Estes exemplos demonstraram que quanto maior a dimensão da molécula, mais expandido é o sítio de interação e mais pontos de clivagem podem ser alcançados pelo centro de Fe(II) ligado ao EDTA. Esta estratégia ainda encontra-se em evolução dando origem às chamadas “poliamidas de Dervan” (DERVAN, 2001).

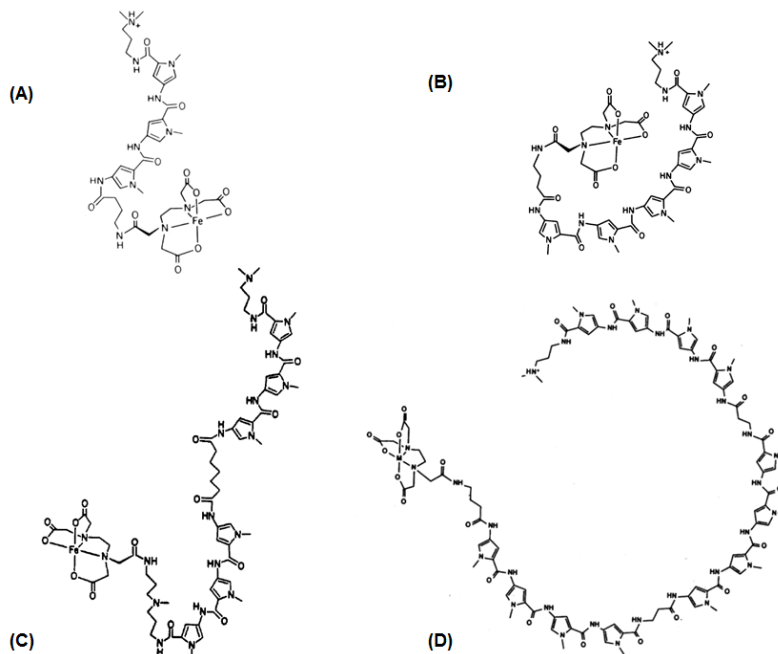


Figura 57. Representação estrutural dos complexos derivados de Fe(II)EDTA conjugados a moléculas de afinidade pelo DNA: o Fe(II)EDTA-Distamicina (A), penta-N-metilpirrolcarboximida-Fe(II)EDTA (B), Bis(Distamicina-Fe(II)EDTA (C) e P4₃E-M(III)EDTA (D), onde P4₃E é o peptídeo artificial formado por um trímico de tetra-N-metilpirrolcarboxiamida ligados por β-alanina. Adaptado de: Schultz e Dervan (1983b), Schultz e Dervan (1983a), Hertzberg e Dervan (1982) e Youngquist e Dervan (1987).

Baseando-se neste modelo é possível imaginar que a presença dos grupos pireno na estrutura de FeZnLP1 e FeZnLP2 aumenta o volume espacial do complexo, permitindo com que mais pontos de interação ocorram dentro de um mesmo sítio. Isto explicaria o comportamento da expansão dos sítios **A** e **B**, primeiro por FeZnLP1 e segundo para FeZnLP2. Na figura 58 vê-se um esquema geral das posições protegidas por cada complexo de Fe(III)/Zn(II) testado.

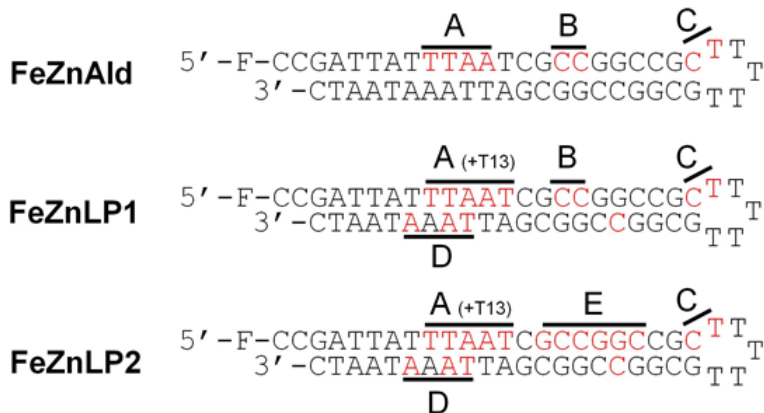


Figura 58. Representação esquemática dos sítios de clivagem de DNase I protegidos (nucleotídeos em vermelho) que indicam os possíveis sítios de interação dos complexos FeZnLald, FeZnLP1 e FeZnLP2.

4.2.4 Interação com DNA

4.2.4.1 Desnaturação térmica de DNA

A presença de pequenas moléculas ligadas ao DNA modifica o perfil de desnaturação térmica deste ácido nucléico (Apêndice D). Neste sentido, foi determinada a temperatura média de desnaturação do DNA (T_m) na ausência e na presença dos complexos de Fe(III)Zn(II) e a variação da T_m (ΔT_m) é apresentada na tabela 5.

Tabela 5. Comparação da variação da temperatura média de desnaturação do DNA (ΔT_m) obtida para os complexos de Cu(II) em estudo com suas constantes intrínsecas de ligação do CT-DNA (K_b).

Complexo	ΔT_m (°C)	K_b (M^{-1})
FeZnLP1	$+5,7 \pm 0,2$	$2,4 \times 10^5$
FeZnLP2	$+7,7 \pm 0,3$	$1,2 \times 10^6$
Netropsina	$+15,3$	$8,8 \times 10^6$

- K_b dos complexos de FeZnLP1 e FeZnLP2 obtidos de Camargo (2013) e da netropsina obtido de Prisecaru e colaboradores (2014).

Os resultados observados sugerem que estes complexos são capazes de interagir com o DNA, enrijecendo a estrutura dupla-hélice e dificultando sua desnaturação. Diferente do observado com os complexos de Cu(II) na seção 4.1.4.1, os valores de ΔT_m obtidos com os complexos de Fe(III)Zn(II) são expressivamente maiores. Há uma tendência de que complexos com menor K_b tenham menor ΔT_m . Como a obtenção desse parâmetro é muito diversificada na literatura (principalmente no que diz respeito a razão [DNA]/[complexo]) fica difícil estabelecer o quão significativos são esses valores. Por isso, um ensaio foi realizado nas mesmas condições dos complexos, mas utilizando como referência a netropsina, cujo K_b é estimado em $8,8 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ (PRISECARU et al., 2014). Nessas condições a ΔT_m da netropsina foi de $15,3 \text{ }^\circ\text{C}$, ou seja, quase 2 a 3 vezes maior que a obtida com os complexos de Fe(III)Zn(II) e segue a tendência do K_b das moléculas testadas. É possível sugerir então que os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 possuem uma grande capacidade de se ligarem ao DNA embora de maneira não tão pronunciada que a netropsina, por exemplo, o que já era esperado em função dos valores de K_b conhecidos.

4.2.4.2 Dicroísmo circular

Por meio da espectroscopia de dicroísmo circular (CD), alterações na estrutura secundária do DNA pelos complexos em estudo, como o empilhamento de bases e a helicidade direita da dupla-fita, foram ser verificadas. Os resultados dos ensaios ao abrigo de luz encontram-se na figura 59. A adição de concentrações crescentes dos complexos ao CT-DNA ($100 \text{ } \mu\text{M}$) na razão [Complexo]/[DNA] de 0,1 a 0,5 mostrou-se semelhante para todos os complexos. Com o aumento da concentração de complexo no meio, as típicas bandas do DNA em 275 e 245 nm tiveram suas intensidades fortemente reduzidas. Ensaio paralelos utilizando somente o solvente dos complexos não provocaram esta alteração, demonstrando, portanto não se tratar de um simples efeito de diluição.

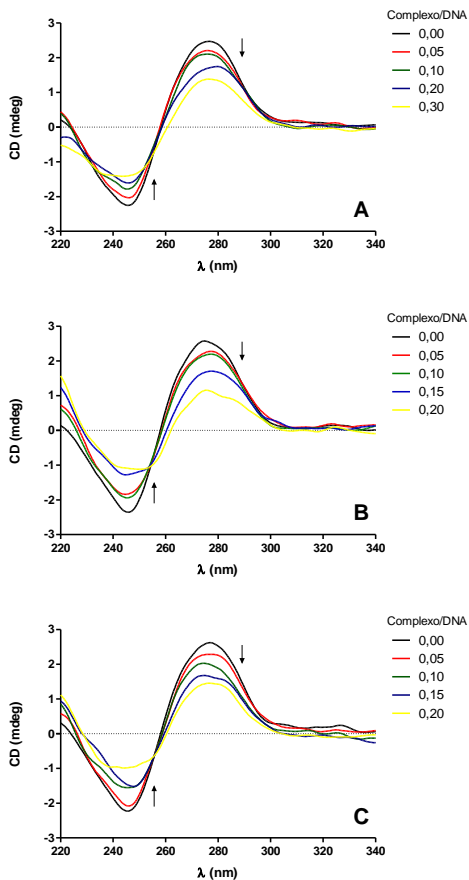


Figura 59. Espectro de dicroísmo circular de DNA na ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos FeZnAld (A), FeZnLP1 (B) e FeZnLP2 (C). Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 60 μ M; Temperatura = 37 $^{\circ}$ C.

Estes resultados indicam que todos os complexos são capazes de alterar a estrutura secundária do DNA de forma muito semelhante entre si. A diminuição da intensidade das típicas bandas do DNA em 275 e 245 nm segue o sentido oposto ao do observado por moléculas tipicamente intercalantes, como o brometo de etídeo (PARODI; KENDALL e NICOLINI, 1975) ou azul de metileno (NORDEN e TJERNELD, 1982). Analisando a resposta encontrada em cada banda

vê-se que a ligação dos complexos tende a diminuir a helicidade direita do DNA e o empilhamento de bases (BEROVA; NAKANISHI e WOODY, 2000). Coincidentemente, este comportamento foi idêntico ao de outros complexos na literatura cujo mecanismo de interação tende a ser mais associado à ligação por sulco do que por intercalação (DEHKORDI et al., 2011; DERAKHSHANKHAH et al., 2012; FU et al., 2014; SHAHABADI e HEIDARI, 2014; SHAHABADI et al., 2012). Embora fossem esperados resultados que apontassem para um mecanismo intercalativo (por causa dos grupos pireno), estes resultados concordam com os observados na seção 4.2.1.6 nos ensaios com bloqueadores de sulco.

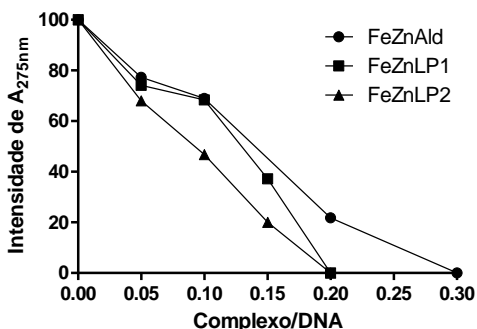


Figura 60. Diminuição da intensidade da banda de 275 nm do CT-DNA medida por dicroísmo circular na presença de diferentes razões de complexo/DNA.

A mais aparente diferença entre os complexos é que a diminuição da intensidade da banda em 275 nm, por exemplo, ocorre numa concentração de complexo menor com FeZnLP1 e FeZnLP2 do que com FeZnAld (Figura 60). Este comportamento deve estar associado à diferente afinidade pelo DNA que os complexos possuem, onde FeZnAld deve ter menor afinidade que FeZnLP1 e FeZnLP2, o que concorda com os resultados observados nos ensaios de Footprinting de DNA por DNase I (seção 4.2.3) e desnaturação térmica de DNA (seção 4.2.4.1).

Por fim estes resultados sugerem que todos os complexos de Fe(II)Zn(II) aqui testados são capazes de interagir com o DNA mudando sua estrutura secundária. Novos ensaios estão sendo realizados no momento por meio de Ressonância Magnética Nuclear a fim de

propriamente definir de qual modo a interação complexo-DNA está ocorrendo.

5 CONCLUSÕES

5.1 COMPLEXOS MONONUCLEARES DE Cu(II)

Todos os quatro complexos foram capazes de clivar o DNA plasmidial de modo concentração-dependente e com diferentes eficiências. O complexo Cu(hyd)(bpy) mostrou-se ser o menos eficiente, pois somente foi capaz de produzir quebras-simples no plasmídeo, enquanto os demais complexos foram capazes de produzir também quebras duplas. Em condições de fotoclivagem, todos os foram capazes de clivar extensivamente o DNA plasmidial de modo concentração-dependente. Nessas condições todos os complexos mostraram-se muito mais reativos que ao abrigo da luz, mostrando que a exposição à luz UV aumenta substancialmente a atividade dos complexos de Cu(II).

Alterações no pH reacional não influenciaram na atividade dos complexos. Nenhum dos componentes (ligantes ou centro de cobre) dos complexos em estudo apresentou atividade isoladamente quando comparados aos respectivos complexos, o que sugere que a atividade é proveniente da natureza química do complexo: ligante-metal-ligante.

Todos os complexos tiveram sua atividade fortemente inibida pela adição crescente de NaCl ou NaClO₄, mas os complexos que possuem phen como ligante ainda são capazes de promover uma clivagem ao DNA mesmo sob altíssimas condições salinas (0,5 M). Isso porque a afinidade pelo DNA dos complexos com ligante phen é maior que os com ligante bpy, podendo haver uma transposição à necessidade das interações iônicas entre DNA e o meio.

A clivagem de DNA mediada pelos todos os complexos de Cu(II) deve ocorrer por um mecanismo oxidativo, mesmo que os sequestradores de ROS pouco tenham inibido a atividade dos complexos com o ligante phen. A forte ligação dos complexos contendo ligante phen ao DNA deve dificultar a inibição da geração de ROS por parte dos sequestradores. Este mesmo comportamento também foi observado nos ensaios de fotoclivagem, o que reforça a hipótese. Além disso, nos ensaios de fotoclivagem, não se observaram mudanças significativas nos tipos de ROS geradas, sugerindo que a exposição à luz UV não muda o mecanismo de geração de ROS, mas sim o amplifica.

Ambos os bloqueadores de sulco mostraram a capacidade de parcialmente inibir a clivagem de DNA mediada pelos complexos. Estes resultados sugerem que os complexos não possuem especificidade por um dos sulcos de DNA, embora necessitem da interação por um deles, para que o processo de clivagem do ácido nucléico ocorra.

Os ensaios cinéticos confirmaram a ordem de reatividade dos complexos $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy}) \ll \text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen}) \sim \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$ que segue a ordem de afinidade pelo DNA. Com exceção do complexo $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})$ os demais mostraram-se tão ou mais reativos do que os melhores exemplos encontrados na literatura. A velocidade da reação e a capacidade de provocar a morte celular em células tumorais apresentou uma excelente correlação, sugerindo que a atividade antitumoral destas moléculas deve ser proveniente da atividade de clivagem de DNA.

Em condições de fotoclivagem, porém, a ordem de reatividade foi: $\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen}) < \text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})$. Curiosamente, os complexos com ligante S-hyd foram menos ativos na fotoclivagem de DNA que os complexos com o ligante hyd. No entanto, o complexo de maior K_b com mesmo ligante hidrazida-derivado (hyd ou S-hyd), sempre foi o mais ativo: $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})$ e $\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy}) < \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$.

Quando observada a razão entre a velocidade de fotoclivagem com a clivagem de DNA, vemos que incremento variou de aproximadamente 6 para 146 vezes. A ordem de sensibilidade à luz UV foi: $\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen}) < \text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen}) < \text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{bpy}) \ll \text{Cu}(\text{hyd})(\text{bpy})$. Os complexos com ligantes bpy foram bem menos reativos que os complexos com ligante phen ao abrigo da luz. Logo a razão da fotoclivagem pela clivagem de DNA resultou em números bem mais expressivos para os complexos cuja clivagem de DNA ao abrigo de luz.

Os ensaios de clivagem com o oligonucleotídeo de 49-mer mostraram que todos os complexos foram capazes de fragmentá-lo de modo não específico, ou seja, com eventos de corte ao longo de toda a molécula de DNA. Os complexos com ligante phen mostraram os melhores resultados ficou evidenciada a formação de fragmentos contendo terminais 3'-fosfoglicolato, cuja formação deve-se a processos oxidativos. Isto reforça a hipótese que estes complexos clivam o DNA pela geração de ROS.

Os ensaios de interação sugerem que o comportamento de ligação dos complexos ao DNA deva ser do tipo não-intercalativo, mesmo que os complexos $\text{Cu}(\text{hyd})(\text{phen})$ e $\text{Cu}(\text{S-hyd})(\text{phen})$ provoquem a estabilização do empilhamento de bases do DNA. De modo geral, os quatro complexos de Cu(II) aqui testados mostram-se promissores modelos para desenvolvimento de novos complexos com atividade antitumoral ligada à clivagem de DNA. Além disso, mais uma vez o uso de exposição a luz UV mostrou-se apta para aumentar a atividade dos complexos, o que traz à discussão um possível uso como protótipo a

droga para terapia fotodinâmica (PDT, do inglês, *Photodynamic Therapy*).

5.2 COMPLEXOS BINUCLEARES DE Fe(III)Zn(II)

Ambos os complexos foram capazes de clivar o DNA plasmidial gerando não só quebras-simples, bem como quebras-duplas, efeito não observado para o complexo modelo FeZnOH e o complexo FeZnAld. A variação do pH afeta fortemente a atividade de ambos os complexos e concorda com a hidrólise do éster de fosfato 2,4-BDNPP, sugerindo que o mesmo mecanismo de hidrólise do éster modelo pode ser aplicado ao DNA. Ao mesmo tempo, indica que o mecanismo de clivagem de DNA deve ser hidrolítico o que era esperado, pois o complexo FeZnOH apresentou o mecanismo semelhante.

Todos os complexos tiveram sua atividade fortemente inibida pela adição crescente de NaCl ou NaClO₄. Segundo o mecanismo proposto por Camargo (2013) para a hidrólise do 2,4-BDNPP (e, de maneira análoga, à ligação fosfodiéster do DNA) a amina carregada no braço de 1,4-butanodiamina contribui positivamente para a estabilização do grupo fosfato no ciclo catalítico. O aumento da concentração de íons de Na⁺ deve diminuir a interação do complexo ao fosfato dificultando o processo de catálise.

Nenhum sequestrador de ROS foi capaz de inibir a atividade dos complexos, novamente sugerindo um mecanismo predominantemente hidrolítico. Estes resultados combinados sugerem que embora os complexos FeZnLP1 e FeZnLP2 sejam muito mais reativos que o complexo modelo FeZnOH seu mecanismo de clivagem do DNA não foi alterado.

Ambos os bloqueadores de sulco mostraram a capacidade de parcialmente inibir a clivagem de DNA mediada pelos complexos, porém a netropsina mostrou-se mais eficaz em prevenir o processo de clivagem. Estes resultados sugerem que os complexos possuem uma preferência pela interação com o sulco menor e também reforça a hipótese de que os complexos possuem um mecanismo hidrolítico de clivagem de DNA, pois a ligação ao sulco menor oferece melhor posicionamento para o ataque nucleofílico das ligações fosfodiéster.

Os ensaios cinéticos revelaram que a introdução de um único grupo pireno levou ao aumento de mais de 11,3 vezes na atividade deste complexo em comparação ao complexo modelo. Já a adição de dois grupos pireno aumentou ainda mais esta atividade atingindo um incremento de 18,6 vezes. Quando se compara os complexos FeZnLP1 e

FeZnLP2 entre si, vemos um aumento de 1,65 vezes na atividade de FeZnLP2 vs FeZnLP1, ou seja, corroborando os resultados anteriores que apontavam FeZnLP2 como mais reativo que FeZnLP1.

Não se pode deixar de destacar que o braço de 1,4-diaminobutano presente nos ligantes LP1 e LP2 deve possuir um grande papel na interação dos complexos com o DNA por interações eletrostáticas. Entretanto, é inegável que só a presença dos grupos pireno já deve ser capaz de aumentar a atividade dos complexos, pois foi notório que o complexo que possui dois grupos pireno mostrou-se mais reativo (1,6 vezes) que aquele que possui somente um grupo.

Devido a curta distância entre os grupos pirenos, pouco se acredita na possibilidade de bis-intercalação, onde as cada uma das duas moléculas de pireno interage em regiões diferentes da dupla-hélice. Sugere-se, portanto, que as interações intramoleculares pireno-pireno que devem ocorrer dentro do complexo FeZnLP2 criem um ambiente mais hidrofóbico permitindo ao nucleófilo uma liberdade maior para fazer o ataque à ligação fosfodiéster, justificando sua maior atividade frente à FeZnLP1. Este mesmo princípio também foi observado na hidrólise do 2,4-BDNPP, que não apresenta qualquer possibilidade de interação por intercalação, o que concorda com esta hipótese.

Nenhum dos complexos de Fe(III)Zn(II) mostrou-se apto a clivar o oligonucleotídeo de 49-mer, mas ensaios de *Footprinting* por DNase I revelaram que os complexos tendem a ligar mais fortemente em regiões contendo sequências AT. Além disso, é possível imaginar que a presença dos grupos pireno na estrutura de FeZnLP1 e FeZnLP2 aumenta o volume espacial do complexo, permitindo com que mais pontos de interação ocorram dentro de um mesmo sítio

Todos os complexos de Fe(II)Zn(II) aqui testados são capazes de interagir com o DNA mudando sua estrutura secundário, entretanto não foram observados indícios de interação por intercalação, o que era esperado para os complexos que possuem grupos pireno. Novos ensaios estão sendo realizados no momento por meio de Ressonância Magnética Nuclear a fim de propriamente definir de qual modo a interação complexo-DNA está ocorrendo.

De modo geral, o incremento substancial da atividade dos complexos pireno modificados ratifica a hipótese de que a introdução de grupos que se ligam ao DNA é uma viável estratégia para potencializar a ação de agentes artificiais de clivagem de DNA. Deve-se salientar, entretanto, que estudos devem ser conduzidos caso a caso para determinar se a modificação com pireno pode modificar o mecanismo original de clivagem mediado pelo complexo, o que não ocorreu com os

complexos de Fe(III)Zn(II) analisados, mas que pode ocorrer com complexos de diferentes naturezas químicas.

6 PERSPECTIVAS

- Caracterizar a atividade dos complexos estudados frente à diferentes substratos de DNA linear de simples-fita e dupla-fita, mas com alta massa molecular, como por exemplo, DNA de fagos e cromossomos inteiros.
- Determinar as constantes termodinâmicas e cinéticas da ligação ao DNA pelos complexos analisados utilizando, respectivamente, Calorimetria de Titulação Isotérmica (ITC, do inglês, *Isothermal Calorimetry Titration*) e Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR, do inglês, *Surface Plasmon Resonance*).
- Utilizar uma metodologia mais robusta e direta para o entendimento da ligação dos complexos estudados com o DNA, por meio de Ressonância Magnética Nuclear ou Cristalografia de Raios-X.
- Verificar por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, do inglês, *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) produtos de oxidação do DNA gerados pelo tratamento com os complexos de cobre(II).
- Realizar uma extensa caracterização das propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos complexos de cobre(II) que auxiliem no entendimento de sua foto-estimulação em termos de clivagem de DNA.
- Utilizar outros oligonucleotídeos de maior tamanho (em pares de base), com diferentes sequências e outras enzimas que hidrolisam DNA (exonuclease III, Benzozase, DNase II, entre outras) para verificar com mais clareza os sítios preferenciais de ligação dos complexos de Fe(III)Zn(II) ao DNA.

7 REFERÊNCIAS

AIBA, Y.; KOMIYAMA, M. Artificial site-selective DNA cutters to manipulate single-stranded DNA. **Polym J**, v. 44, n. 9, p. 929-938, 2012.

AIBA, Y.; SUMAOKA, J.; KOMIYAMA, M. Artificial DNA cutters for DNA manipulation and genome engineering. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 12, p. 5657-5668, 2011.

ALBERTS, B. **Molecular Biology of the Cell: Reference edition**. Garland Science, 2008.

AN, Y. et al. Double-strand DNA cleavage by copper complexes of 2,2[prime or minute]-dipyridyl with electropositive pendants. **Dalton Transactions**, n. 17, p. 2066-2071, 2006.

ANGELE-MARTINEZ, C.; GOODMAN, C.; BRUMAGHIM, J. Metal-mediated DNA damage and cell death: mechanisms, detection methods, and cellular consequences. **Metallomics**, v. 6, n. 8, p. 1358-1381, 2014.

ARIAS, M. S. et al. Synthesis and copper-mediated nuclease activity of a tetracationic tris(2,2'-bipyridine) ligand. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 7, p. 1067-1073, 2009.

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

ARMITAGE, B. A. Cyanine dye-DNA interactions: Intercalation, groove binding, and aggregation. **Topics in Current Chemistry**, v. 253, p. 55-76, 2005.

AUSUBEL, F. M. et al. **Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology**. 4ª edição. New York: Wiley, 1999.

BAIK, M.-H.; FRIESNER, R. A.; LIPPARD, S. J. Theoretical Study of Cisplatin Binding to Purine Bases: Why Does Cisplatin Prefer Guanine over Adenine? **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 46, p. 14082-14092, 2003.

BAILLY, C. et al. DNase I Footprinting of Small Molecule Binding Sites on DNA. In: HERDEWIJN, P. (Ed.). **Oligonucleotide Synthesis**: Humana Press, v.288, 2005. cap. 20, p.319-342. (Methods in Molecular Biology). ISBN 978-1-58829-233-9.

BALENCI, D. et al. Structural features and oxidative stress towards plasmid DNA of apramycin copper complex. **Dalton Transactions**, n. 7, p. 1123-1130, 2009.

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.

BERNADOU, J. et al. Potassium monopersulfate and a water-soluble manganese porphyrin complex, [Mn(TMPyP)](OAc)₅, as an efficient reagent for the oxidative cleavage of DNA. **Biochemistry**, v. 28, n. 18, p. 7268-7275, 1989.

BEROVA, N.; NAKANISHI, K.; WOODY, R. W. **Circular dichroism: Principles and Applications**. New York: Wiley Press, 2000. 912

BIVER, T.; SECCO, F.; VENTURINI, M. Mechanistic aspects of the interaction of intercalating metal complexes with nucleic acids. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 252, n. 10–11, p. 1163-1177, 2008.

BLACKBURN, M. G.; GAIT, M. G. **Nucleic acids in chemistry and biology**. 2nd. England: Oxford, 1995. 528

BLECKING, C. J. et al. A modular synthetic route to dimeric calixarenes: A new family of DNA major groove binders. **Synthesis**, n. 8, p. 1193-1204, 2011.

BLOMMAERT, F. A. et al. Formation of DNA Adducts by the Anticancer Drug Carboplatin: Different Nucleotide Sequence Preferences in Vitro and in Cells. **Biochemistry**, v. 34, n. 26, p. 8474-8480, 1995.

BOERNER, L. J. K.; ZALESKI, J. M. Metal complex-DNA interactions: from transcription inhibition to photoactivated cleavage. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 135-144, 2005.

BORAH, S. et al. Copper-Mediated Nuclease Activity of a Tambjamine Alkaloid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 19, p. 4557-4562, 1998.

BORTOLOTTO, T. **Interação e clivagem de DNA por novos complexos de cobre(II) derivados de tetraciclina e 1,10-fenantrolina**. 2011. 110 (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

BORTOLOTTO, T. et al. Photoinduced DNA cleavage promoted by two copper(II) complexes of tetracyclines and 1,10-phenanthroline. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 10519-10521, 2011.

BOSEGGIA, E. et al. Toward Efficient Zn(II)-Based Artificial Nucleases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 14, p. 4543-4549, 2004.

BRAÑA, M. F. et al. Intercalators as anticancer drugs. **Current Pharmaceutical Design**, v. 7, n. 17, p. 1745-1780, 2001.

BREAKER, R. R. et al. A common speed limit for RNA-cleaving ribozymes and deoxyribozymes. **RNA**, v. 9, n. 8, p. 949-957, 2003.

BREMER, R. E. et al. Inhibition of major groove DNA binding bZIP proteins by positive patch polyamides. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 8, p. 2093-2103, 2001.

BRYSONT, K.; GREENALL, R. J. Binding Sites of the Polyamines Putrescine, Cadaverine, Spermidine and Spermine on A- and B-DNA Located by Simulated Annealing. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 18, n. 3, p. 393-412, 2000.

BURGER, R. M. Cleavage of Nucleic Acids by Bleomycin. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1153-1170, 1998.

BURROWS, C. J.; MULLER, J. G. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1109-1151, 1998.

CAMARGO, M. A. et al. Efficient phosphodiester hydrolysis by luminescent terbium(III) and europium(III) complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 6013-6025, 2010a.

CAMARGO, M. A. et al. Efficient Phosphodiester Hydrolysis by Luminescent Terbium(III) and Europium(III) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 13, p. 6013-6025, 2010b.

CAMARGO, M. A. et al. Synthesis, structure, and phosphatase-like activity of a new trinuclear Gd complex with the unsymmetrical ligand H3L as a model for nucleases. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3057-3063, 2010c.

CAMARGO, M. A. et al. Synthesis, Structure, and Phosphatase-Like Activity of a New Trinuclear Gd Complex with the Unsymmetrical Ligand H3L As a Model for Nucleases. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3057-3063, 2010d.

CAMARGO, T. P. D. **Desenvolvimento de complexos heterobinucleares de FeIII ZnII a partir de ligantes contendo o grupo pireno para estudo de interação com ésteres de fosfato e ácidos nucléicos**. 2013. 113 (Doutorado). Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227-2238, 2009.

CAVALETT, A. et al. Efficient DNA photocleavage promoted by a Tb(III) complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 20, p. 77-80, 2012.

CERNY, J.; HOBZA, P. Non-covalent interactions in biomacromolecules. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 9, n. 39, p. 5291-5303, 2007.

- CHANG, C. H.; MEARES, C. F. Light-induced nicking of deoxyribonucleic acid by cobalt(III) bleomycins. **Biochemistry**, v. 21, n. 25, p. 6332-6334, 1982.
- CHEN, C. A.; COWAN, J. A. *In vivo* cleavage of a target RNA by copper kanamycin A. Direct observation by a fluorescence assay. **Chemical Communications**, n. 3, p. 196-197, 2002.
- CHEN, X. et al. Bisintercalator-containing dinuclear iron(III) complex: An efficient artificial nuclease. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 15, p. 4139-4142, 2009.
- CHEN, X. et al. Efficient enhancement of DNA cleavage activity by introducing guanidinium groups into diiron(III) complex. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 1, p. 109-113, 2008a.
- CHEN, X. Q. et al. Efficient increase of DNA cleavage activity of a diiron(III) complex by a conjugating acridine group. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 34, p. 5400-5407, 2007.
- CHEN, X. Q. et al. Synthesis and DNA cleavage activity of diiron(III) complex bearing pyrene group. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, n. 3, p. 342-344, 2008b.
- CHVÁLOVÁ, K. et al. Deoxyribonuclease I footprinting reveals different DNA binding modes of bifunctional platinum complexes. **FEBS Journal**, v. 273, n. 15, p. 3467-3478, 2006.
- COLLINS, J. G.; RIXON, R. M.; ALDRICH-WRIGHT, J. R. Interaction of [Pt(en)(phen)]²⁺ and [Pt(en)(phi)]²⁺ with the hexanucleotide d(GTTCGAC)₂: Evidence for minor groove binding. **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 19, p. 4377-4379, 2000.
- CORDIER, C.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Insertion of a bulky rhodium complex into a DNA cytosine-cytosine mismatch: An NMR solution study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 40, p. 12287-12295, 2007.
- CRICK, F. Central dogma of molecular biology. **Nature**, v. 227, n. 5258, p. 561-563, 1970.

- CULLEN, S. I.; CATALANO, P. M.; HELFMAN, R. J. Tetracycline sun sensitivity. **Archives of Dermatology**, v. 93, n. 1, p. 77, 1966.
- D'AURORA, V.; STERN, A. M.; SIGMAN, D. S. Inhibition of E. coli DNA polymerase I by 1,10 phenanthroline. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 78, n. 1, p. 170-176, 1977.
- _____. 1,10-Phenanthroline-cuprous ion complex, a potent inhibitor of DNA and RNA polymerases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 80, n. 4, p. 1025-1032, 1978.
- DAMIA, G.; BROGGINI, M. DNA minor groove binding agents. **Drugs of the Future**, v. 30, n. 3, p. 301-309, 2005.
- DE ALMEIDA, V. R. et al. In vitro and in vivo activity of a new unsymmetrical dinuclear copper complex containing a derivative ligand of 1,4,7-triazacyclononane: Catalytic promiscuity of [Cu₂(L)Cl₃]. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 19, p. 7059-7073, 2013.
- DEAL, K. A.; BURSTYN, J. N. Mechanistic Studies of Dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-Catalyzed Phosphate Diester Hydrolysis. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 10, p. 2792-2798, 1996.
- DEAL, K. A.; HENGGE, A. C.; BURSTYN, J. N. Characterization of transition states in dichloro(1,4,7-triazacyclononane)copper(II)-catalyzed activated phosphate diester hydrolysis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 7, p. 1713-1718, 1996.
- DEHKORDI, M. et al. Spectrophotometric Study on the Binding of Two Water Soluble Schiff Base Complexes of Mn (III) with ct-DNA. **Journal of Fluorescence**, v. 21, n. 4, p. 1649-1658, 2011.
- DEL SOLAR, G. et al. Replication and control of circular bacterial plasmids. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 2, p. 434-464, 1998.
- DENNY, W. A. Acridine derivatives as chemotherapeutic agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 18, p. 1655-1665, 2002.
- DERAKHSHANKHAH, H. et al. Synthesis, cytotoxicity and spectroscopy studies of a new copper (II) complex: calf thymus DNA

and T47D as targets. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 9, n. 5, p. 737-746, 2012.

DERVAN, P. B. Molecular recognition of DNA by small molecules. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 2215-2235, 2001.

DERVAN, P. B.; BÜRLI, R. W. Sequence-specific DNA recognition by polyamides. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 6, p. 688-693, 1999.

DESBOUIS, D. et al. Copper(II), zinc(II) and nickel(II) complexes as nuclease mimetics. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, n. 11-12, p. 897-937, 2012.

DOHERTY, E. A.; DOUDNA, J. A. RIBOZYME STRUCTURES AND MECHANISMS. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 597-615, 2000.

DOLENC, J. et al. Configurational Entropy Change of Netropsin and Distamycin upon DNA Minor-Groove Binding. **Biophysical Journal**, v. 91, n. 4, p. 1460-1470, 2006.

DOMINGOS, J. B. et al. A química dos ésteres de fosfato. **Quimica Nova**, v. 26, p. 745-753, 2003.

ECKERT, R. L. DNA Sequencing by the Chemical Method. In: (Ed.). **Current Protocols in Molecular Biology**: John Wiley & Sons, Inc., 2001. ISBN 9780471142720.

EGLI, M. DNA-Cation Interactions: Quo Vadis? **Chemistry & Biology**, v. 9, n. 3, p. 277-286, 2002.

ENOCH, S. J.; CRONIN, M. T. D. A review of the electrophilic reaction chemistry involved in covalent DNA binding. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 40, n. 8, p. 728-748, 2010.

ERKKILA, K. E.; ODOM, D. T.; BARTON, J. K. Recognition and reaction of metallointercalators with DNA. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2777-2795, 1999.

FARROKHPOUR, H. et al. A rare dihydroxo copper(ii) complex with ciprofloxacin; a combined experimental and ONIOM computational study of the interaction of the complex with DNA and BSA. **RSC Advances**, v. 4, n. 67, p. 35390-35404, 2014.

FEDOR, M. J.; WILLIAMSON, J. R. The catalytic diversity of RNAs. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 5, p. 399-412, 2005.

FERNÁNDEZ, M. J. et al. DNA photocleavage by dicationic bisintercalants. **Tetrahedron Letters**, v. 42, n. 33, p. 5701-5704, 2001.

FERRER, S. et al. 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, n. 8, p. 1436-1446, 2004.

FREIFELDER, D.; TRUMBO, B. Matching of single-strand breaks to form double-strand breaks in DNA. **Biopolymers**, v. 7, p. 681-693, 1969.

FRØYSTEIN, N. Å.; SLETTEN, E. Interaction of mercury(II) with the DNA dodecamer CGCGAATTCGCG. A ¹H and ¹⁵N NMR study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 116, n. 8, p. 3240-3250, 1994.

FU, P. K. L.; TURRO, C. Transcription inhibition by Rh(phi)(phen). **Chemical Communications**, n. 3, p. 279-280, 2001.

FU, X.-B. et al. Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, HSA interaction and cytotoxicity of a new copper(II) complex derived from 2-(2'-pyridyl)benzothiazole and glycylglycine. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 276, n. 0, p. 83-95, 2014.

GAGGELLI, E. et al. Coordination pattern, solution structure and DNA damage studies of the copper(ii) complex with the unusual aminoglycoside antibiotic hygromycin B. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 41, p. 9830-9837, 2010.

GALLAGHER, J. et al. Protease activity of 1,10-phenanthroline-copper(I). Targeted scission of the catalytic site of carbonic anhydrase. **Biochemistry**, v. 37, n. 8, p. 2096-2104, 1998.

GALM, U. et al. Antitumor antibiotics: Bleomycin, enediynes, and mitomycin. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 2, p. 739-758, 2005.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L. et al. A dinuclear copper(II) complex with adeninate bridge ligands and prominent DNA cleavage activity. Structural and spectroscopic characterization and magnetic properties. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 17, p. 7178-7188, 2007.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L. et al. Oxidative nuclease activity of ferromagnetically coupled μ -hydroxo- μ -propionato copper(II) complexes $[\text{Cu}_3(\text{L})_2(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-propionato})_2]$ (L = N-(pyrid-2-ylmethyl)R-sulfonamidato, R = benzene, toluene, naphthalene). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 243-255, 2009a.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L. et al. Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with N-(9H-purin-6-yl)benzenesulfonamide and 1,10-phenantroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocytes. Evaluation of p53 and Bcl-2 proteins in the apoptotic mechanism. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 6, p. 923-934, 2009b.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L. et al. DNA binding, nuclease activity, DNA photocleavage and cytotoxic properties of Cu(II) complexes of N-substituted sulfonamides. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 121, n. 0, p. 167-178, 2013.

GELLERT, M. et al. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 73, n. 11, p. 3872-3876, 1976.

GÓMEZ-SAIZ, P. et al. (1,3,4-Oxadiazole)copper(II) Compounds: Dimensionality, Magnetism and Nuclease Activity. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2009, n. 3, p. 373-388, 2009.

GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M. et al. Evaluation of antiproliferative activities and apoptosis induction caused by copper(II)-benzothiazolesulfonamide complexes in Jurkat T lymphocytes and Caco-2 cells. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1249-1265, 2008.

GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M. et al. DNA cleavage studies of mononuclear and dinuclear copper(II) complexes with benzothiazolesulfonamide ligands. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 644-652, 2003.

GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, M. et al. Biological Activity of Flavonoids Copper Complexes. **Zeitschrift für Anorganische und Allgemeine Chemie**, v. 631, n. 11, p. 2181-2187, 2005.

GOOD, N. E. et al. Hydrogen Ion Buffers for Biological Research*. **Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 467-477, 1966.

GRAHAM, D. R. et al. Cleavage of DNA by coordination complexes. Superoxide formation in the oxidation of 1,10-phenanthroline-cuprous complexes by oxygen - relevance to DNA-cleavage reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 102, n. 16, p. 5419-5421, 1980.

HAGERMAN, P. J. Flexibility of DNA. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, v. 17, n. 1, p. 265-286, 1988.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4th. Oxford: Clarendon Press, 2007.

HAMILTON, P. L.; ARYA, D. P. Natural product DNA major groove binders. **Natural Product Reports**, v. 29, n. 2, p. 134-143, 2012.

HAMPSHIRE, A. J. et al. Footprinting: A method for determining the sequence selectivity, affinity and kinetics of DNA-binding ligands. **Methods**, v. 42, n. 2, p. 128-140, 2007.

HARRIS, T. Genetics, genomics and drug discovery. **Medicinal Research Reviews**, v. 20, n. 3, p. 203-211, 2000.

HE, J. et al. Double-strand DNA cleavage by copper complexes of 2,2[prime or minute]-dipyridyl with guanidinium/ammonium pendants. **Dalton Transactions**, n. 24, p. 3207-3214, 2008.

HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Hydrolysis of unactivated peptide bonds by a macrocyclic copper(II) complex: $\text{Cu}([\text{9}]_{\text{aneN}_3})\text{Cl}_2$ hydrolyzes both dipeptides and proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 26, p. 7015-7016, 1995.

_____. 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.

HEGG, E. L. et al. Hydrolysis of Double-Stranded and Single-Stranded RNA in Hairpin Structures by the Copper(II) Macrocyclic $\text{Cu}([\text{9}]_{\text{aneN}_3})\text{Cl}_2$. **Inorganic Chemistry**, v. 36, n. 8, p. 1715-1718, 1997.

HERNÁNDEZ-GIL, J. et al. Synthesis, structure and biological properties of several binary and ternary complexes of copper(II) with ciprofloxacin and 1,10 phenanthroline. **Polyhedron**, v. 28, n. 1, p. 138-144, 2009.

HERTZBERG, R. P.; DERVAN, P. B. Cleavage of double helical DNA by (methidiumpropyl-EDTA)iron(II). **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 1, p. 313-315, 1982.

HUMPHREYS, K. J. et al. Oxidative strand scission of nucleic acids by a multinuclear copper(II) complex. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, n. 7-8, p. 835-842, 2002.

JAIN, S. S.; TULLIUS, T. D. Footprinting protein-DNA complexes using the hydroxyl radical. **Nature protocols**, v. 3, n. 6, p. 1092-1100, 2008.

JAMIESON, E. R.; LIPPARD, S. J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2467-2498, 1999.

JEZOWSKA-BOJCZUK, M. et al. DNA and RNA damage by Cu(II)-amikacin complex. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 22, p. 5547-5556, 2002.

JI, Z. et al. DNA-mediated charge transport by minor groove-binding polyamide. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 7, p. 1667-1671, 2007.

JIANG, Q. et al. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 15-16, p. 1951-1972, 2007.

JIANG, Y. et al. Detecting Ultraviolet Damage in Single DNA Molecules by Atomic Force Microscopy. **Biophysical Journal**, v. 93, n. 5, p. 1758-1767,

JIN, Y.; COWAN, J. A. DNA cleavage by copper-ATCUN complexes. Factors influencing cleavage mechanism and linearization of dsDNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 23, p. 8408-8415, 2005.

JIN, Y. et al. Influence of stereochemistry and redox potentials on the single- and double-strand DNA cleavage efficiency of Cu(II)- and Ni(II)-Lys-Gly-his- derived ATCUN metallopeptides. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 26, p. 8353-8361, 2007.

JOHNSON, H. A.; THOMAS, N. R. Polyhydroxylated azepanes as new motifs for DNA minor groove binding agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, n. 2, p. 237-241, 2002.

JOYNER, J. C.; REICHFELD, J.; COWAN, J. A. Factors Influencing the DNA Nuclease Activity of Iron, Cobalt, Nickel, and Copper Chelates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 39, p. 15613-15626, 2011.

KABIR, A.; HOSSAIN, M.; KUMAR, G. S. Thermodynamics of the DNA binding of biogenic polyamines: Calorimetric and spectroscopic investigations. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 57, n. 0, p. 445-453, 2013.

KABIR, A.; SURESH KUMAR, G. Binding of the Biogenic Polyamines to Deoxyribonucleic Acids of Varying Base Composition: Base Specificity and the Associated Energetics of the Interaction. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e70510, 2013.

KATSAROU, M. E. et al. Novel copper(II) complex of N-propyl-norfloxacin and 1,10-phenanthroline with enhanced antileukemic and DNA nuclease activities. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 470-478, 2008.

KELLETT, A. et al. Radical-induced DNA damage by cytotoxic square-planar copper(II) complexes incorporating o-phthalate and 1,10-phenanthroline or 2,2'-dipyridyl. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 53, n. 3, p. 564-576, 2012.

KHALID, S. et al. Shape effects on the activity of synthetic major-groove binding ligands. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 25, n. 6, p. 794-800, 2007.

KHAN, G. S. et al. Chemistry of DNA minor groove binding agents. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 115, p. 105-118, 2012.

KHAN, M. A.; MUSTAFA, J.; MUSARRAT, J. Mechanism of DNA strand breakage induced by photosensitized tetracycline-Cu(II) complex. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 525, n. 1-2, p. 109-119, 2003.

KIKUTA, E.; AOKI, S.; KIMURA, E. New potent agents binding to a poly(dT) sequence in double-stranded DNA: bis(Zn²⁺-cyclen) and tris(Zn²⁺-cyclen) complexes. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, n. 4-5, p. 473-482, 2002.

KIKUTA, E. et al. Novel Recognition of Thymine Base in Double-Stranded DNA by Zinc(II)-Macrocyclic Tetraamine Complexes Appended with Aromatic Groups. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 23, p. 5426-5436, 1999.

KIM, E. et al. Precision genome engineering with programmable DNA-nicking enzymes. **Genome Research**, v. 22, n. 7, p. 1327-1333, 2012.

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

KOMIYAMA, M. Cut-and-Paste of DNA Using an Artificial Restriction DNA Cutter. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 2, p. 3343-3357, 2013.

KOMIYAMA, M. et al. Artificial restriction DNA cutter for site-selective scission of double-stranded DNA with tunable scission site and specificity. **Nat. Protocols**, v. 3, n. 4, p. 655-662, 2008.

KOMOR, A. C.; BARTON, J. K. An unusual ligand coordination gives rise to a new family of rhodium metalloinsertors with improved selectivity and potency. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 40, p. 14160-14172, 2014.

KOPKA, M. L. et al. The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 5, p. 1376-1380, 1985.

KUWABARA, M. et al. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper ion: Reaction with CGCGAATTCGCG and its complexes with netropsin and EcoRI. **Biochemistry**, v. 25, n. 23, p. 7401-7408, 1986.

KUWAHARA, J.; SUGIURA, Y. Sequence-specific recognition and cleavage of DNA by metallobleomycin: minor groove binding and possible interaction mode. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 8, p. 2459-2463, 1988.

LAHIRI, D. et al. Anaerobic photocleavage of DNA in red light by dicopper(II) complexes of 3,3'-dithiodipropionic acid. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 339-349, 2009.

LAMPSON, B. C.; INOUE, M.; INOUE, S. Retrons, msDNA, and the bacterial genome. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 110, n. 1-4, p. 491-499, 2005.

LAURIA, A. et al. DNA minor groove binders: An overview on molecular modeling and QSAR approaches. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 20, p. 2136-2160, 2007.

LEE, C. et al. Bis-intercalation of a cationic porphyrin dimer linked with triethylene glycol derivative to DNA from the major groove.

Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, v. 16, n. 11, p. 1159-1166, 2012.

LEE, H. J.; KIM, E.; KIM, J.-S. Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases. **Genome Research**, v. 20, n. 1, p. 81-89, 2010.

LEPECQ, J. B.; PAOLETTI, C. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids: Physical—Chemical characterization. **Journal of Molecular Biology**, v. 27, n. 1, p. 87-106, 1967.

LESNIAK, W. et al. Solution Chemistry of Copper(II)–Gentamicin Complexes: Relevance to Metal-Related Aminoglycoside Toxicity. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 5, p. 1420-1429, 2003.

LI, S. et al. Stacking Interactions and DNA Intercalation. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 32, p. 11166-11172, 2009.

LILLEY, D. M. J. The origins of RNA catalysis in ribozymes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 9, p. 495-501, 2003.

LIPPERT, B. From cisplatin to artificial nucleases - the role of metal ion-nucleic acid interactions in biology. **BioMetals**, v. 5, n. 4, p. 195-208, 1992.

LIU, C. et al. DNA Hydrolytic Cleavage by the Diiron(III) Complex Fe₂(DTPB)(μ-O)(μ-Ac)Cl(BF₄)₂: Comparison with Other Binuclear Transition Metal Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 913-922, 2002.

LIU, H.-K.; SADLER, P. J. Metal Complexes as DNA Intercalators. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 5, p. 349-359, 2011.

LODISH, H. et al. **Molecular Cell Biology (Lodish, Molecular Cell Biology)**. W. H. Freeman, 2007.

- LU, M. et al. Charge dependence of Fe(II)-catalyzed DNA cleavage. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 11, p. 3333-3337, 1990.
- LU, W.; VICIC, D. A.; BARTON, J. K. Reductive and oxidative DNA damage by photoactive platinum(II) intercalators. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 22, p. 7970-7980, 2005.
- LUIS GARCÍA-GIMÉNEZ, J. et al. Toward the development of metal-based synthetic nucleases: DNA binding and oxidative DNA cleavage of a mixed copper(II) complex with N-(9H-purin-6-yl)benzenesulfonamide and 1,10-phenanthroline. Antitumor activity in human Caco-2 cells and Jurkat T lymphocytes. Evaluation of p53 and Bcl-2 proteins in the apoptotic mechanism. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 6, p. 923-934, 2009.
- MAHESWARI, P. U. et al. The square-planar cytotoxic [CuII(pyrimol)Cl] complex acts as an efficient DNA cleaver without reductant. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 3, p. 710-711, 2006.
- MAHESWARI, P. U. et al. Structure, cytotoxicity, and DNA-cleavage properties of the complex [CuII(pbt)Br₂]. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 3719-3727, 2008.
- MANCIN, F. et al. Artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, v. 0, n. 20, p. 2540-2548, 2005.
- MAPP, A. K. et al. Activation of gene expression by small molecule transcription factors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 8, p. 3930-3935, 2000.
- MARSHALL, L. E. et al. Cleavage of deoxyribonucleic acid by the 1,10-phenanthroline-cuprous complex. Hydrogen peroxide requirement and primary and secondary structure specificity. **Biochemistry**, v. 20, n. 2, p. 244-250, 1981.
- MASSOUD, S. S. et al. Efficient hydrolytic cleavage of plasmid DNA by chloro-cobalt(ii) complexes based on sterically hindered pyridyl tripod tetraamine ligands: Synthesis, crystal structure and DNA cleavage. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 26, p. 10086-10103, 2014.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 2, p. 560-564, 1977.

MELVIN, M. S. et al. Double-strand DNA cleavage by copper-prodigiosin [24]. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 26, p. 6333-6334, 2000.

MELVIN, M. S. et al. Copper-nuclease efficiency correlates with cytotoxicity for the 4-methoxypyrrrolic natural products. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 87, n. 3, p. 129-135, 2001.

MEYER-ALMES, F. J.; PORSCHKE, D. Mechanism of intercalation into the DNA double helix by ethidium. **Biochemistry**, v. 32, n. 16, p. 4246-4253, 1993.

MING, L. J. Structure and Function of "Metalloantibiotics". **Medicinal Research Reviews**, v. 23, n. 6, p. 697-762, 2003.

MIŠKOVIĆ, K. et al. Antineoplastic DNA-binding compounds: Intercalating and minor groove binding drugs. **Arhiv Za Higijenu Rada i Toksikologiju**, v. 64, n. 4, p. 593-602, 2013.

MITIĆ, N. et al. The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3338-3363, 2006.

MIYAJIMA, Y. et al. Origin of High Fidelity in Target-Sequence Recognition by PNA-Ce(IV)/EDTA Combinations as Site-Selective DNA Cutters. **Journal of the American Chemical Society**, v. 131, n. 7, p. 2657-2662, 2009.

MONACO, R. R. A novel major groove binding site in B-form DNA for ethidium cation. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 25, n. 2, p. 119-125, 2007.

MUCHA, A. et al. Influence of the physiologically widespread substances on the oxidative activity of copper(II) complexes with sinefungin, a nucleoside antibiotic. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 2, p. 178-185, 2006.

MUXEL, A. A. et al. New La(III) complex immobilized on 3-aminopropyl-functionalized silica as an efficient and reusable catalyst for hydrolysis of phosphate ester bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2943-2952, 2014.

N'SOUKPOÉ-KOSSI, C. N. et al. DNA Interaction with Antitumor Polyamine Analogues: A Comparison with Biogenic Polyamines. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 10, p. 2712-2718, 2008.

NATILE, G.; MARZILLI, L. G. Non-covalent interactions in adducts of platinum drugs with nucleobases in nucleotides and DNA as revealed by using chiral substrates. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 250, n. 11-12, p. 1315-1331, 2006.

NAVARRO, M. et al. Design of copper DNA intercalators with leishmanicidal activity. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 401-408, 2003.

NEIDLE, S. DNA minor-groove recognition by small molecules. **Natural Product Reports**, v. 18, n. 3, p. 291-309, 2001.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry** 3^a ed. New York: Worth Publishers, 2000.

NELSON, S. M.; FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Non-covalent ligand/DNA interactions: Minor groove binding agents. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 623, n. 1-2, p. 24-40, 2007.

NEVES, A. et al. An unprecedented FeIII(μ -OH)ZnII complex that mimics the structural and functional properties of purple acid phosphatases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 24, p. 7486-7487, 2007.

NOBLES, K. N. et al. Highly conserved modified nucleosides influence Mg²⁺-dependent tRNA folding. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 21, p. 4751-4760, 2002.

NORDEN, B.; TJERNELD, F. Structure of methylene blue-DNA complexes studied by linear and circular dichroism spectroscopy. **Biopolymers**, v. 21, n. 9, p. 1713-1734, 1982.

ODANI, A. et al. Platinum DNA intercalator-monomucleotide adduct formation. Cooperativity between aromatic ring stacking and electrostatic interactions. **Inorganic Chemistry**, v. 30, n. 9, p. 2133-2138, 1991.

OLIVEIRA, M. C. B. **Nucleases Sintéticas: Caracterização bioquímica e mecanismo de ação sobre o DNA**. 2006. 129 (Doutorado em Química). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, M. C. B. et al. Nucleic acid cleavage by a Cu(II) polyaza macrocyclic complex. **Polyhedron**, v. 24, n. 4, p. 495-499, 2005a.

OLIVEIRA, M. C. B. et al. Mononuclear Cu^{II}-phenolate bioinspired complex is catalytically promiscuous: Phosphodiester and peptide amide bond cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2711-2713, 2009.

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, 2005b.

ORENTREICH, N.; HARBER, L. C.; TROMOVITCH, T. A. Photosensitivity and photo-onycholysis due to demethylchlortetracycline. **Archives of Dermatology**, v. 83, p. 730-737, 1961.

OSÓRIO, R. E. H. M. B. et al. Synthesis, magnetostructural correlation, and catalytic promiscuity of unsymmetric dinuclear copper(II) complexes: Models for catechol oxidases and hydrolases. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 1569-1589, 2012.

OUAMEUR, A. A.; TAJMIR-RIABI, H.-A. Structural Analysis of DNA Interactions with Biogenic Polyamines and Cobalt(III)hexamine Studied by Fourier Transform Infrared and Capillary Electrophoresis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 40, p. 42041-42054, 2004.

PANDYA, P. et al. DNA minor groove binding of small molecules: Experimental and computational evidence. **Journal of Chemical Sciences**, v. 122, n. 2, p. 247-257, 2010.

PAPAVASSILIOU, A.; HEUMANN, H. 1,10-Phenanthroline-Copper Ion Nuclease Footprinting of DNA-Protein Complexes in Situ Following Mobility-Shift Electrophoresis Assays. In: GEOFF KNEALE, G. (Ed.). **DNA-Protein Interactions**: Humana Press, v.30, 1994. cap. 5, p.43-78. (Methods in Molecular Biology™). ISBN 978-0-89603-256-9.

PARODI, S.; KENDALL, F.; NICOLINI, C. A clarification of the complex spectrum observed with the ultraviolet circular dichroism of ethidium bromide bound to DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 2, n. 4, p. 477-486, 1975.

PARRILHA, G. L. et al. A new μ -oxo di-iron complex with suitable features to mimic metallohydrolase activity: X-ray molecular structure, aqua solution behavior and nuclease activity of the complex [Fe(HPCINOL)(SO₄)₂]- μ -oxo. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 11, n. 6, p. 643-647, 2008.

PATRA, A. K. et al. Metal-based netropsin mimics showing AT-selective DNA binding and DNA cleavage activity at red light. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 22, p. 9030-9032, 2007.

PATRA, A. K. et al. DNA cleavage in red light promoted by copper(II) complexes of α -amino acids and photoactive phenanthroline bases. **Dalton Transactions**, n. 48, p. 6966-6976, 2008.

PATRA, A. K. et al. Visible light-induced nuclease activity of a ternary mono-phenanthroline copper(II) complex containing L-methionine as a photosensitizer. **Chemical Communications**, v. 9, n. 13, p. 1562-1563, 2003.

_____. Metal-assisted red light-induced DNA cleavage by ternary L-methionine copper(II) complexes of planar heterocyclic bases. **Dalton Transactions**, n. 5, p. 896-902, 2005.

PATRA, A. K.; NETHAJI, M.; CHAKRAVARTY, A. R. Red-light photosensitized cleavage of DNA by (L-lysine)(phenanthroline

base)copper(II) complexes. **Dalton Transactions**, n. 16, p. 2798-2804, 2005.

_____. Synthesis, crystal structure, DNA binding and photo-induced DNA cleavage activity of (S-methyl-L-cysteine)copper(II) complexes of heterocyclic bases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 2, p. 233-244, 2007.

PATRA, A. K.; ROY, S.; CHAKRAVARTY, A. R. Synthesis, crystal structures, DNA binding and cleavage activity of L-glutamine copper(II) complexes of heterocyclic bases. **Inorganica Chimica Acta**, v. 362, n. 5, p. 1591-1599, 2009.

PATWARDHAN, A.; COWAN, J. A. Highly specific oxidative damage of double-strand DNA by copper aminoglycosides. **Chemical Communications**, n. 16, p. 1490-1491, 2001.

PDB. Molecule of the Month: DNA. PDB RCSB, 2001. Disponível em: <
http://www.rcsb.org/pdb/education_discussion/molecule_of_the_month/download/DNA.pdf>. Acesso em: 14 novembro de 2014.

PECCI, L.; MONTEFOSCHI, G.; CAVALLINI, D. Some new details of the copper-hydrogen peroxide interaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 235, n. 1, p. 264-267, 1997.

PERALTA, R. A. et al. Electronic structure and spectro-structural correlations of Fe IIIZnII biomimetics for purple acid phosphatases: Relevance to DNA cleavage and cytotoxic activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 24, p. 11421-11438, 2010a.

PERALTA, R. A. et al. Catecholase and DNase activities of copper(II) complexes containing phenolate-type ligands. **Journal of Physical Organic Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 1000-1013, 2010b.

PITIÉ, M.; BURROWS, C. J.; MEUNIER, B. Mechanisms of DNA cleavage by copper complexes of 3-Clip-Phen and of its conjugate with a distamycin analogue. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 24, p. 4856-4864, 2000.

POGOZELSKI, W. K.; MCNEESE, T. J.; TULLIUS, T. D. What Species Is Responsible for Strand Scission in the Reaction of [FeII(EDTA)]²⁻ and H₂O₂ with DNA? **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 24, p. 6428-6433, 1995.

POGOZELSKI, W. K.; TULLIUS, T. D. Oxidative strand scission of nucleic acids: Routes initiated by hydrogen abstraction from the sugar moiety. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1089-1107, 1998.

PORTEUS, M. H.; CARROLL, D. Gene targeting using zinc finger nucleases. **Nat Biotech**, v. 23, n. 8, p. 967-973, 2005.

POVIRK, L. F. et al. DNA double-strand breaks and alkali-labile bonds produced by bleomycin. **Nucleic Acids Research**, v. 4, n. 10, p. 3573-3580, 1977.

PRISECARU, A. et al. The phosphate clamp: sequence selective nucleic acid binding profiles and conformational induction of endonuclease inhibition by cationic Triplatin complexes. **Nucleic Acids Research**, 2014.

PRUSINER, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science**, v. 216, n. 4542, p. 136-144, 1982.

_____. Prions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 23, p. 13363-13383, 1998.

RAJA, N. S.; NAIR, B. U. Chromium(III) complexes inhibit transcription factors binding to DNA and associated gene expression. **Toxicology**, v. 251, n. 1-3, p. 61-65, 2008.

RAMIREZ-RAMIREZ, N. et al. Determination of the intracellular targets and in vitro activity of a new class of chemical nuclease complexes derived from antibiotics of the quinolone family. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 3, n. 2, p. 188-194, 1998.

REDDY, P. R.; MOHAN, S. K.; RAO, K. S. DNA hydrolytic cleavage by stable Zn(II) dipeptide complexes. **Indian Journal of Chemistry - Section A Inorganic, Physical, Theoretical and Analytical Chemistry**, v. 43, n. 11, p. 2329-2332, 2004.

REEDIJK, J.; LOHMAN, P. Cisplatin: Synthesis, antitumour activity and mechanism of action. **Pharmacy World & Science**, v. 7, n. 5, p. 173-180, 1985.

REICH, K. A. et al. Cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline-copper ion complex. Superoxide mediates the reaction dependent on NADH and hydrogen peroxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 103, n. 12, p. 3582-3584, 1981.

REINHARDT, C. G.; KRUGH, T. R. A comparative study of ethidium bromide complexes with dinucleotides and DNA: direct evidence for intercalation and nucleic acid sequence preferences. **Biochemistry**, v. 17, n. 23, p. 4845-4854, 1978.

REY, N. A. et al. A synthetic dinuclear copper(II) hydrolase and its potential as antitumoral: Cytotoxicity, cellular uptake, and DNA cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 10, p. 1323-1330, 2009.

ROY, M. et al. New insights into the visible-light-induced DNA cleavage activity of dipyrrodoquinoxaline complexes of bivalent 3d-metal ions. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 26, p. 11122-11132, 2007a.

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, 2007b.

RÜBA, E.; HART, J. R.; BARTON, J. K. [Ru(bpy)₂(L)]Cl₂: Luminescent Metal Complexes That Bind DNA Base Mismatches. **Inorganic Chemistry**, v. 43, n. 15, p. 4570-4578, 2004.

RUÍZ, P. et al. Synthesis, structure, and nuclease properties of several binary and ternary complexes of copper(II) with norfloxacin and 1,10-phenanthroline. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 5, p. 831-840, 2007.

SALEHI-ASHTIANI, K. et al. A Genomewide Search for Ribozymes Reveals an HDV-Like Sequence in the Human CPEB3 Gene. **Science**, v. 313, n. 5794, p. 1788-1792, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHNAITH, L. M.; HANSON, R. S.; QUE, L. Double-stranded cleavage of pBR322 by a diiron complex via a "hydrolytic" mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 2, p. 569-573, 1994.

SCHROEDER, G. K. et al. The time required for water attack at the phosphorus atom of simple phosphodiester and of DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 11, p. 4052-4055, 2006.

SCHULTZ, P. G.; DERVAN, P. B. Sequence-specific double-strand cleavage of DNA by bis(EDTA-distamycin.iron(II)) and EDTA-bis(distamycin).iron(II). **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 26, p. 7748-7750, 1983a.

_____. Sequence-specific double-strand cleavage of DNA by penta-N-methylpyrrolicarboxamide-EDTA·Fe(II). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 22 I, p. 6834-6837, 1983b.

SCHULTZ, P. G.; TAYLOR, J. S.; DERVAN, P. B. Design and synthesis of a sequence-specific DNA cleaving molecule. (Distamycin-EDTA)iron(II). **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 24, p. 6861-6863, 1982.

SERGANOV, A.; PATEL, D. J. Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. **Nat Rev Genet**, v. 8, n. 10, p. 776-790, 2007.

SHAHABADI, N.; HEIDARI, L. Synthesis, characterization and multi-spectroscopic DNA interaction studies of a new platinum complex containing the drug metformin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 128, n. 0, p. 377-385, 2014.

SHAHABADI, N. et al. Interaction of calf thymus dna with the antiviral drug lamivudine. **DNA and Cell Biology**, v. 31, n. 1, p. 122-127, 2012.

SHAPIRO, J. A. Revisiting the Central Dogma in the 21st Century. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1178, n. 1, p. 6-28, 2009.

SHELL, T. A.; MOHLER, D. L. Hydrolytic DNA cleavage by non-lanthanide metal complexes. **Current Organic Chemistry**, v. 11, n. 17, p. 1525-1542, 2007.

SHUKLA, V. K. et al. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. **Nature**, v. 459, n. 7245, p. 437-441, 2009.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47 REV. ISS. 6, p. 7265-7279, 2003a.

SIDDIK, Z. H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7265-7279, 2003b.

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

SIGMAN, D. S. et al. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline.cuprous complex. Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 24, p. 12269-12272, 1979.

SILVA, P. P. **Síntese, Caracterização Físico-Química e Estudo da Atividade Antitumoral de Complexos Ternários de Cu(II) com um Antibiótico e uma a, a-diamina e de Ru(II) com a, a-diaminas"**. 2013. (Doutorado). Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

SILVA, P. P. et al. Correlation between DNA interactions and cytotoxic activity of four new ternary compounds of copper(II) with N-donor heterocyclic ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 132, n. 1, p. 67-76, 2014.

SILVA, P. P. et al. Two new ternary complexes of copper(II) with tetracycline or doxycycline and 1,10-phenanthroline and their potential

as antitumoral: Cytotoxicity and DNA cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 6414-6424, 2011.

SITLANI, A. et al. DNA photocleavage by phenanthrenequinone diimine complexes of rhodium(III): shape-selective recognition and reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 7, p. 2303-2312, 1992.

SORASAENEE, K. et al. Inhibition of Transcription in Vitro by Anticancer Active Dirhodium(II) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 1267-1271, 2003.

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

SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 337-347, 2001a.

SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Targeted site-specific cleavage of HIV-1 viral Rev responsive element by copper aminoglycosides. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 166-172, 2001b.

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

SREEDHARA, A.; PATWARDHAN, A.; COWAN, J. A. Novel reagents for targeted cleavage of RNA sequences: Towards a new family of inorganic pharmaceuticals. **Chemical Communications**, n. 12, p. 1147-1148, 1999.

STREKOWSKI, L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: An overview. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 623, n. 1-2, p. 3-13, 2007.

SUZUKI, T.; KUWAHARA, J.; SUGIURA, Y. Copper-bleomycin has no significant DNA cleavage activity. **Biochemistry**, v. 24, n. 18, p. 4719-4721, 1985.

SZACIŁOWSKI, K. et al. Bioinorganic Photochemistry: Frontiers and Mechanisms. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 6, p. 2647-2694, 2005.

SZCZEPANIK, W.; KACZMAREK, P.; JEZOWSKA-BOJCZUK, M. Identification of copper(II) binding sites in actinomycin D, a cytostatic drug - correlation of coordination with DNA damage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 12, p. 2141-2148, 2004.

SZCZEPANIK, W. et al. ATP, histidine or magnesium ions can protect DNA against sisomicin-induced damage, following stray Cu(II) binding. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 431, n. 1, p. 88-94, 2004.

SZCZEPEK, M. et al. Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. **Nat Biotech**, v. 25, n. 7, p. 786-793, 2007.

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. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 14, n. 5, p. 727-739, 2009.

TAN, J.; ZHU, L.; WANG, B. DNA binding and cleavage activity of quercetin nickel(ii) complex. **Dalton Transactions**, n. 24, p. 4722-4728, 2009.

TEIXEIRA, A. et al. Autocatalytic RNA cleavage in the human [beta]-globin pre-mRNA promotes transcription termination. **Nature**, v. 432, n. 7016, p. 526-530, 2004.

TERRY, C. A. et al. Physiologically relevant concentrations of NaCl and KCl increase DNA photocleavage by an N-substituted 9-aminomethylantracene dye. **Biochemistry**, v. 50, n. 47, p. 10375-10389, 2011.

THOMAS, A. M. et al. Synthesis, crystal structure, and nuclease activity of planar mono-heterocyclic base copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 94, n. 1-2, p. 171-178, 2003.

TJIOE, L. et al. Synthesis, structure, and DNA cleavage properties of copper(II) complexes of 1,4,7-triazacyclononane ligands featuring pairs of guanidine pendants. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 621-635, 2011a.

TJIOE, L. et al. Synthesis, Structure, and DNA Cleavage Properties of Copper(II) Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane Ligands Featuring Pairs of Guanidine Pendants. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 2, p. 621-635, 2010.

TJIOE, L. et al. Phosphodiester Cleavage Properties of Copper(II) Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane Ligands Bearing Single Alkyl Guanidine Pendants. **Inorganic Chemistry**, v. 51, n. 2, p. 939-953, 2011b.

TJIOE, L. et al. Efficient plasmid DNA cleavage by copper(II) complexes of 1,4,7-triazacyclononane ligands featuring xylyl-linked guanidinium groups. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 10, p. 4327-4339, 2011c.

TODD, R. C.; LIPPARD, S. J. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. **Metallomics**, v. 1, n. 4, p. 280-291, 2009.

TRAUGER, J. W.; BAIRD, E. E.; DERVAN, P. B. Recognition of DNA by designed ligands at subnanomolar concentrations. **Nature**, v. 382, n. 6591, p. 559-561, 1996.

TSENG, T.-S. A.; BURSTYN, J. N. Synthesis and DNA cleavage activity of a bifunctional intercalator-linked copper(ii) macrocycle. **Chemical Communications**, n. 46, p. 6209-6211, 2008.

TULLIUS, T. D.; GREENBAUM, J. A. Mapping nucleic acid structure by hydroxyl radical cleavage. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 127-134, 2005.

URBACH, A. R.; WARING, M. J. Visualising DNA: Footprinting and 1-2D Gels. **Molecular BioSystems**, v. 1, n. 4, p. 287-293, 2005.

VAN DYKE, M. W.; DERVAN, P. B. Methidiumpropyl-EDTA.Fe(II) and DNase I footprinting report different small molecule binding site

sizes on DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 11, n. 16, p. 5555-5567, 1983.

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.

VISCHER, E.; CHARGAFF, E. THE SEPARATION AND QUANTITATIVE ESTIMATION OF PURINES AND PYRIMIDINES IN MINUTE AMOUNTS. **Journal of Biological Chemistry**, v. 176, n. 2, p. 703-714, 1948.

WANG, D.; LIPPARD, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 4, p. 307-320, 2005.

WARD, B.; SKOROBOGATY, A.; DABROWIAK, J. C. DNA binding specificity of a series of cationic metalloporphyrin complexes. **Biochemistry**, v. 25, n. 24, p. 7827-7833, 1986.

WARING, M. J. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. **Journal of Molecular Biology**, v. 13, n. 1, p. 269-282, 1965.

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.

WEINTHAL, D. et al. Genome editing in plant cells by zinc finger nucleases. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 6, p. 308-321, 2010.

WESTHEIMER, F. Why nature chose phosphates. **Science**, v. 235, n. 4793, p. 1173-1178, 1987.

WHITE, S. et al. Recognition of the four Watson-Crick base pairs in the DNA minor groove by synthetic ligands. **Nature**, v. 391, n. 6666, p. 468-471, 1998.

WIEBE, J. A.; MOORE, D. E. Oxidation photosensitized by tetracyclines. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 66, n. 2, p. 186-189, 1977.

WILLIS, B.; ARYA, D. P. Major groove recognition of DNA by carbohydrates. **Current Organic Chemistry**, v. 10, n. 6, p. 663-673, 2006.

WILSON, B. et al. Syntheses and DNA photocleavage by mono- and bis-phenothiazinium-piperazinexylene intercalators. **Tetrahedron**, v. 64, n. 16, p. 3429-3436, 2008a.

_____. Synthesis and DNA interactions of a bis-phenothiazinium photosensitizer. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 6, n. 21, p. 4026-4035, 2008b.

WILSON, B. et al. Tunable DNA photocleavage by an acridine-imidazole conjugate. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 18, p. 6159-6173, 2005.

WITZ, G.; STASIAK, A. DNA supercoiling and its role in DNA decatenation and unknotting. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 7, p. 2119-2133, 2010.

WOLFE, A.; SHIMER, G. H.; MEEHAN, T. Polycyclic aromatic hydrocarbons physically intercalate into duplex regions of denatured DNA. **Biochemistry**, v. 26, n. 20, p. 6392-6396, 1987.

XAVIER, F. R. et al. Unsymmetrical FeIIICoII and GaIIICo II complexes as chemical hydrolases: Biomimetic models for purple acid phosphatases (PAPs). **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 16, p. 7905-7921, 2009.

YOUNG, M. A.; JAYARAM, B.; BEVERIDGE, D. L. Intrusion of Counterions into the Spine of Hydration in the Minor Groove of B-DNA: Fractional Occupancy of Electronegative Pockets. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 1, p. 59-69, 1997.

YOUNGQUIST, R. S.; DERVAN, P. B. A synthetic peptide binds 16 base pairs of A,T double helical DNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 109, n. 24, p. 7564-7566, 1987.

ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, n. 44, p. 4565-4579, 2007.

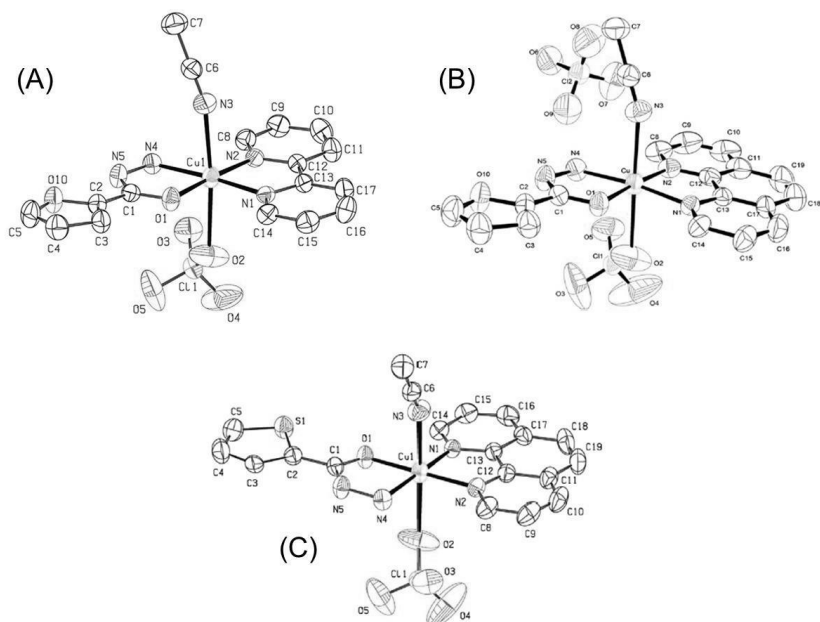
ZEGLIS, B. M. et al. A bulky rhodium complex bound to an adenosine-adenosine DNA mismatch: General architecture of the metalloinsertion binding mode. **Biochemistry**, v. 48, n. 20, p. 4247-4253, 2009.

ZHAO, M. et al. Insights into metalloenzyme microenvironments: Biomimetic metal complexes with a functional second coordination sphere. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 21, p. 8360-8375, 2013.

ZHU, L. N. et al. DNA cleavage activities of tetraazamacrocyclic oxamido nickel(II) complexes. **Polyhedron**, v. 29, n. 1, p. 574-580, 2010.

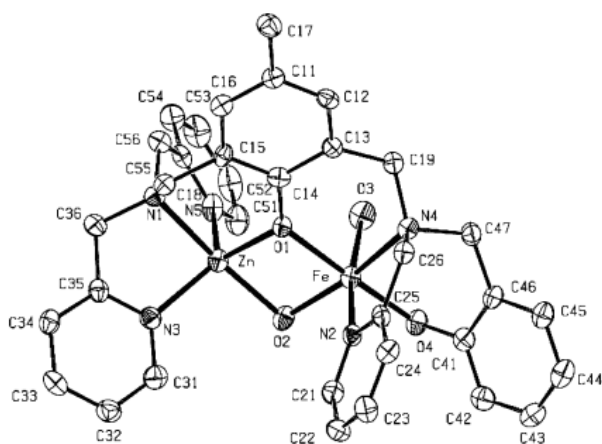
ZIHLIF, M. et al. Effects of DNA minor groove binding agents on global gene expression. **Cancer Genomics and Proteomics**, v. 7, n. 6, p. 323-330, 2010.

APENDICE A



Estrutura determinada por cristalografia de raios-X dos complexos Cu(hyd)(bpy) (A), Cu(hyd)(phen) (B) e Cu(S-hyd)(phen) (C). Adaptado de Silva e colaboradores (2014).

APENDICE B



Estrutura determinada por cristalografia de raios-X do complexo FeZnOH.
Adaptado de Neves e colaboradores (2007).

APENDICE C

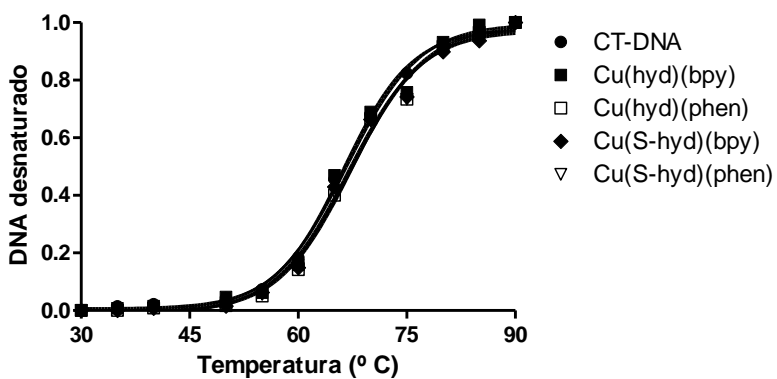


Figura representativa (de três experimentos) da desnaturação térmica de DNA na presença e ausência dos quatro complexos monucleares de Cu(II).

APENDICE D

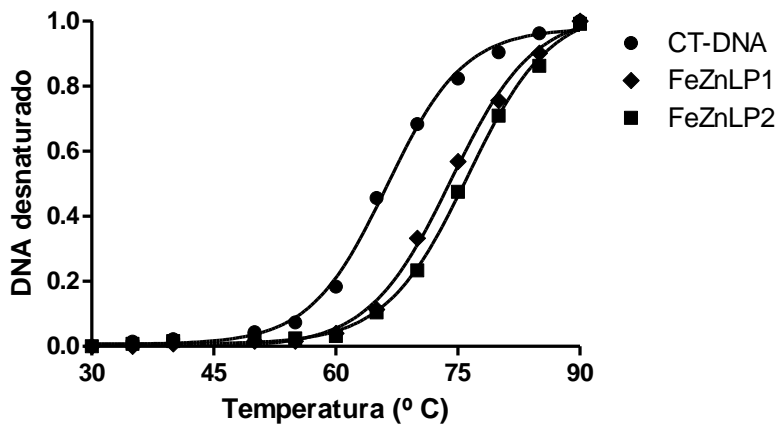


Figura representativa (de três experimentos) da desnaturação térmica de DNA na presença e ausência dos dois complexos binucleares de Fe(III)Zn(II).