

Cristine Saibert

**INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE DNA POR COMPLEXOS
BINUCLEARES DE COBRE (II) COM LIGANTES CONTENDO
O GRUPO TRIAZINA E CADEIAS LATERAIS
FUNCIONALIZADAS**

Dissertação submetida
ao Programa de Pós-graduação
em Química da Universidade
Federal de Santa Catarina para
a obtenção do Grau de Mestre
em Química. Orientador: Prof.
Dr. Hernán Terenzi

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Saibert, Cristine

Interação e clivagem de DNA por complexos binucleares de cobre(II) com ligantes contendo o grupo triazina e cadeias laterais funcionalizadas / Cristine Saibert ; orientador, Hernán Terenzi - Florianópolis, SC, 2015.

96 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas.
Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Clivagem de DNA. 3. Complexos binucleares de cobre (II). 4. Pireno. 5. Eletroforese vertical de alta resolução. I. Terenzi, Hernán . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Cristine Saibert

**INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE DNA POR COMPLEXOS
BINUCLEARES DE COBRE (II) COM LIGANTES CONTENDO
O GRUPO TRIAZINA E CADEIAS LATERAIS
FUNCIONALIZADAS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Química.

Florianópolis, 11 de fevereiro de 2015.

Prof. Hugo Alejandro Gallardo Olmedo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Hernán Terenzi, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Marcus Mandolesi Sá, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Ademir Neves, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rogério Corrêa, Dr.
Universidade do Vale do Itajaí

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, que sempre me incentivaram aos estudos, oferecendo as condições necessárias para que eu chegasse até aqui;

À minha família, que me fornece desde sempre o suporte emocional necessário para a realização dos meus objetivos de vida;

Ao meu orientador, Hernán Terenzi, pela oportunidade de realizar o mestrado em seu laboratório;

Aos meus colegas do CEBIME pelo conhecimento compartilhado e pelos momentos de distração. Um agradecimento especial aos colegas Douglas e Leonardo, pelo auxílio no entendimento de questões termodinâmicas e cinéticas inerentes ao trabalho;

Aos amigos da "Feira do DNA" pelo companheirismo, pelas conversas e brincadeiras, e também pelo suporte na realização dos experimentos. Aqui eu deixo meu agradecimento especial a Tiago Bortolotto, que foi praticamente um co-orientador durante a realização deste trabalho, me auxiliando tanto na realização de experimentos como na compreensão de conceitos teóricos - inicialmente novos para mim - e pela revisão da versão final escrita, entregue à banca;

Aos amigos da vida (Fernanda, Renata, Gustavo, Pedro e todos os outros) pelo apoio, conversas e momentos de festa compartilhados e que amenizaram a tensão do processo;

Ao meu namorado, Vinicius, pelo apoio em todos os momentos;

Aos professores da banca examinadora, por aceitar o convite e também pela disposição e dedicação na leitura do trabalho escrito;

À CAPES, CNPq, UFSC e ao Departamento de Química pelo apoio financeiro e institucional que possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

O estudo de moléculas sintéticas ou biológicas que possam interagir e clivar o DNA de forma específica se faz essencial na busca por novas aplicações biotecnológicas, na descoberta de terapias antitumorais menos invasivas ou no auxílio a um melhor entendimento dos mecanismos de ação do DNA. O presente trabalho teve como objetivo investigar a interação e clivagem de DNA por três complexos binucleares de cobre, cuja síntese foi inspirada no sítio ativo da enzima catecol oxidase: $[\text{Cu}_2(2\text{-X-4,6-bis(di-2-picolilamino)-1,3,5-triazina}]$, onde X= cloro (**1**), butanodiamina (**2**) ou N-metilpirenilbutanodiamina (**3**), de modo a relacionar as alterações estruturais de **2** e **3** a possíveis ganhos na atividade em relação ao complexo **1**. Complexos contendo centros binucleares de cobre são amplamente descritos na literatura como nucleases artificiais eficientes, dessa forma, a atividade catalítica dos complexos foi avaliada. Os complexos apresentaram bons resultados de clivagem de DNA plasmidial, sob condições brandas e tempos de reação moderados. As constantes catalíticas (k_{cat}) apresentadas foram de 0,0611; 0,1526 e 0,1702 h^{-1} para **1**, **2** e **3**, respectivamente, indicando que a adição de butanodiamina e pireno está relacionado a um aumento na atividade dos complexos. Os valores de k_M obtidos corroboram os valores de k_{cat} observados e sugerem um aumento na afinidade DNA/complexo de **1** para **3**, já que os valores decrescem conforme a relação **1** > **2** > **3**. O mecanismo de clivagem parece ser de caráter misto, apesar de apresentar uma forte componente oxidativa, e ensaios com bloqueadores de sulco e de dicroísmo circular indicam que os três complexos têm preferência pelo sulco menor do DNA. Ensaios de clivagem direta de alta resolução, com sondas marcadas com fluoresceína (FAM), forneceram informações sobre o mecanismo de ação dos complexos no DNA e indicam que o complexo **2** é capaz de clivar de forma específica regiões do tipo *hairpin*.

Palavras-chave: complexos binucleares de cobre (II), clivagem de DNA, pireno.

ABSTRACT

The study of synthetic or biological molecules able to interact and cleave DNA in a specific way is essential in the search for new biotechnological applications, discovery of less invasive anti-tumor therapies or to help in the elucidation of the mechanisms of action toward DNA. The present work aimed to investigate the DNA interaction and cleavage by three copper(II) binuclear complexes, whose synthesis was inspired in the active site of the enzyme catechol oxidase: $[\text{Cu}_2(2\text{-X-4,6-bis(di-2-picolyamino)-1,3,5-triazine}]$, where X= chloro (**1**), diaminobutane (**2**) or N-methylpyrenyldiamino butane (**3**), trying to relate structural changes of **2** and **3** with possible activity gains in comparison to complex **1**. Complexes containing a dinuclear center of copper are largely described as efficient synthetic nucleases in literature, thereby, the catalytic activity of the complexes was evaluated. The complexes showed good results for plasmid DNA cleavage under mild conditions and moderate time of reaction. The rate of cleavage reaction (k_{cat}) was 0,0611; 0,1526 e 0,1702 h^{-1} for **1**, **2** e **3**, respectively, indicating that the addition of diaminobutane and pyrene shows activities gains for the complexes. k_M values obtained corroborates k_{cat} values observed and suggests an enhancement of complex/DNA affinities from **1** to **3**, since the values decreases accordingly. The reaction mechanism seems to be have oxidative and hydrolytic features and assays with groove binder and circular dichroism indicate that all the complexes have preference for the minor groove of DNA. Assays of high resolution direct-cleavage with probes 5'-labeled with fluorescein (FAM) provides information about the mechanism of action by the complexes upon DNA and indicated that complex **2** is capable to cleave DNA in the vicinity of a hairpin structure.

Key-words: binuclear copper(II) complexes, DNA cleavage, pyrene.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática da estrutura de nucleotídeos e nucleosídeos.....	24
Figura 2. Representação do pareamento entre as fitas do DNA.....	25
Figura 3. Representação da estrutura tridimensional do DNA.....	26
Figura 4. Representação de um DNA <i>hairpin</i>	28
Figura 5. O complexo Cu(II)-bis-(1,10-fenantrolina), primeiro exemplo de complexo sintético a apresentar atividade de interação com o DNA.....	30
Figura 6. Mecanismo proposto para a hidrólise do substrato modelo 2,4-bis(dinitrofenil)fosfato (2,4-BDNPP), análogo em estrutura ao DNA.....	31
Figura 7. Mecanismo simplificado de quebra das fitas de DNA induzidos por modificação das bases nitrogenadas ou por abstração de hidrogênio da desoxirribose.....	31
Figura 8. Estrutura de uma molécula de pireno.....	33
Figura 9. Estrutura dos complexos [Cu ₂ (2-cloro-4,6-bis(di-2-picolilamino)-1,3,5-triazina)] (Complexo 1), [Cu ₂ (2-butanodiamina-4,6-bis(di-2-picolil-amino)-1,3,5-triazina)] (Complexo 2) e [Cu ₂ (2-N-metilpirenilbutanodiamina-4,6-bis(di-2-picolilamino)-1,3,5-triazina)] (Complexo 3).....	34
Figura 10. Representação esquemática das três formas do DNA plasmidial e sua diferenciação após eletroforese em gel de agarose. Figura extraída do site http://202.204.115.67/jpkch/jpkch/2008/wswx/chapter% 207.htm (acessado em 25/11/2014).....	36

Figura 11. Representação do processo simplificado de obtenção dos géis de alta resolução e foto do gel com suas respectivas bandas de clivagem. Adaptado da figura extraída da referência 51..... 38

Figura 12. Representação de um ensaio feito em uma glove bag, espécie de câmara de polietileno flexível, inflável e com luvas internas que permite a realização de ensaios em ambientes controlados. Figura extraída do site: http://www.coleparmer.com/Product/Glove_Bag_Inflatable_Glove_Chamber_34_5_Equipment_Sleeve_6_pk/EW-04408-38 (acessado em 28/11/2014)..... 45

Figura 13. Cuba para eletroforese vertical de alta resolução. Adaptado da figura extraída do site: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/practicalbiochemistry/ch10s09.html> (acessado em 08/01/2015)..... 47

Figura 14. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 1 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 µM; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 50 µM; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes..... 49

Figura 15. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 2 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 µM; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 50 µM; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes 50

Figura 16. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 3 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 µM; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 50 µM; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média ± desvio padrão de dois experimentos independentes 50

Figura 17. Clivagem de DNA plasmidial pelos complexos 1, 2 e 3 sob diferentes condições de pH. Condições reacionais: [DNA] =

330 ng ~ 25 μ M; [Tampão] = 10 mM - MES (pH 6,0), HEPES (pH 7,0 e 8,0), CHES (pH 9,0); [complexo] = 25 μ M (1) ou 15 μ M (2 e 3); Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas (2 e 3) ou 16 horas (1)..... 52

Figura 18. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 1 na ausência e presença de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 25 μ M; [NaCl] = 0 a 320 mM; Temperatura = 37°C; tempo = 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes 53

Figura 19. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 2 na ausência e presença de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μ M; [NaCl] = 0 a 320 mM; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes 54

Figura 20. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 3 na ausência e presença de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μ M; [NaCl] = 0 a 320 mM; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes 54

Figura 21. Clivagem de DNA plasmidial pelos complexos 1, 2 e 3 na ausência e presença de diferentes bloqueadores dos sulcos de DNA. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 25 μ M (1) ou 15 μ M (2 e 3); [Netropsina] = 50 μ M; [Verde de Metila] = 50 μ M; Temperatura = 37 °C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes..... 56

Figura 22. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 1 na ausência e presença de diferentes inibidores de ERO. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES

pH 7,0; [complexo] = 25 μ M; [KI] = 2,5 mM; [DMSO] = 2 M; [NaN₃] = 2,5 mM; [SOD] = 10 unidades; Temperatura = 37°C; tempo = 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes..... 57

Figura 23. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo **2** na ausência e presença de diferentes inibidores de ERO. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, \sim 25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μ M; [KI] = 2,5 mM; [DMSO] = 2 M; [NaN₃] = 2,5 mM; [SOD] = 10 unidades; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes..... 58

Figura 24. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo **3** na ausência e presença de diferentes inibidores de ERO. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, \sim 25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μ M; [KI] = 2,5 mM; [DMSO] = 2 M; [NaN₃] = 2,5 mM; [SOD] = 10 unidades; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes..... 58

Figura 25. Os hidrogênios da desoxirribose. Figura extraída da Referência 26..... 61

Figura 26. Produtos de clivagem gerados a partir da abstração dos hidrogênios 1 (H-1), 4 (H-4) e 5 (H-5) da desoxirribose..... 62

Figura 27. Clivagem de DNA plasmidial pelos complexos **1, 2 e 3** na ausência e presença de oxigênio. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, \sim 25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 25 μ M (**1**) ou 15 μ M (**2 e 3**); Temperatura = 50°C; tempo = 4 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes..... 62

Figura 28. Gráfico dos valores de k_{obs} em função da concentração. Os valores de k_{obs} foram gerados a partir do coeficiente angular dos gráficos do logaritmo neperiano da fração intacta do DNA plasmidial vs. tempo de reação, após o tratamento do DNA com o complexo **1**, em diferentes concentrações e tempos reacionais. Dentro de cada gráfico estão presentes o k_M e o k_{cat} estimados

para o Complexo 1. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 50 μ M. Temperatura = 37°C; tempo = 0 a 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes..... 64

Figura 29. Gráfico dos valores de k_{obs} em função da concentração - gerado a partir do tratamento dos dados com a Equação de Michaelis-Menten. Os valores de k_{obs} foram gerados a partir do coeficiente angular dos gráficos do logaritmo neperiano da fração intacta do DNA plasmidial vs. tempo de reação, após o tratamento do DNA com o complexo **2**, em diferentes concentrações e tempos reacionais. Dentro de cada gráfico estão presentes o k_M e o k_{cat} estimados para o Complexo 2. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 20 μ M. Temperatura = 37°C; tempo = 0 a 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes..... 65

Figura 30. Gráfico dos valores de k_{obs} em função da concentração - gerado a partir do tratamento dos dados com a Equação de Michaelis-Menten. Os valores de k_{obs} foram gerados a partir do coeficiente angular dos gráficos do logaritmo neperiano da fração intacta do DNA plasmidial vs. tempo de reação, após o tratamento do DNA com o complexo **3**, em diferentes concentrações e tempos reacionais. Dentro de cada gráfico estão presentes o k_M e o k_{cat} estimados para o Complexo 2. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~ 25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 20 μ M. Temperatura = 37°C; tempo = 0 a 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes..... 65

Figura 31. Gráfico dos valores de k_{obs} obtidos em diferentes concentrações - gerado a partir do tratamento dos dados com a Equação de Hill. Os valores de k_{obs} foram gerados a partir do coeficiente angular dos gráficos do logaritmo neperiano da fração intacta do DNA plasmidial vs. tempo de reação, após o tratamento do DNA com o complexo **2**, em diferentes concentrações e tempos reacionais. Dentro de cada gráfico estão presentes o k_M e o k_{cat} estimados para o Complexo 2. Condições reacionais: [DNA] = 330

ng, ~25 μM ; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 20 μM . Temperatura = 37°C; tempo = 0 a 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes..... 66

Figura 32. Gráfico dos valores de k_{obs} obtidos em diferentes concentrações - gerado a partir do tratamento dos dados com a Equação de Hill. Os valores de k_{obs} foram gerados a partir do coeficiente angular dos gráficos do logaritmo neperiano da fração intacta do DNA plasmidial vs. tempo de reação, após o tratamento do DNA com o complexo **3**, em diferentes concentrações e tempos reacionais. Dentro de cada gráfico estão presentes o k_M e o k_{cat} estimados para o Complexo 3. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μM ; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 15 μM . Temperatura = 37°C; tempo = 0 a 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes..... 67

Figura 33. Representação esquemática das sondas fluorescentes utilizadas nos ensaios de clivagem direta de alta resolução..... 70

Figura 34. Clivagem da sonda fluorescente ACTG pelos complexos **1**, **2** e **3**. Condições reacionais: [DNA] = 25 μM ; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μM , tempo = 0 a 48 horas. Um controle na ausência de complexo foi feito, seguindo as mesmas condições reacionais. A última canaleta refere-se marcador Maxam-Gilbert de bases A+G..... 72

Figura 35. Clivagem da sonda fluorescente C1 pelos complexos **1**, **2** e **3**. Condições reacionais: [DNA] = 25 μM ; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μM , tempo = 0 a 48 horas. Um controle na ausência de complexo foi feito, seguindo as mesmas condições reacionais. A última canaleta refere-se ao marcador Maxam-Gilbert de bases A+G..... 73

Figura 36. Clivagem da sonda fluorescente C2 pelos complexos **1**, **2** e **3**. Condições reacionais: [DNA] = 25 μM ; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μM , tempo = 0 a 48 horas. Um controle na ausência de complexo foi feito, seguindo as mesmas

condições reacionais. Marcadores Maxam-Gilbert de bases A+G encontram-se adicionados nas laterais do gel..... 74

Figura 37. Clivagem da sonda fluorescente C3 pelos complexos **1, 2 e 3**. Condições reacionais: [DNA] = 25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μ M, tempo = 0 a 48 horas. Um controle na ausência de complexo foi feito, seguindo as mesmas condições reacionais. A última canaleta refere-se ao marcador Maxam-Gilbert de bases A+G..... 75

Figura 38. Clivagem da sonda fluorescente C4 pelos complexos **1, 2 e 3**. Condições reacionais: [DNA] = 25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μ M, tempo = 0 a 48 horas. Um controle na ausência de complexo foi feito, seguindo as mesmas condições reacionais. A última canaleta refere-se ao marcador Maxam-Gilbert..... 76

Figura 39. Ampliação da região inferior do gel relativo ao ensaio com a sonda ATCG. As bandas duplas apresentadas nesta região se repetem nos ensaios com as demais sondas. As bandas marcadas em azul referem-se aos nucleotídeos 3'-OPO₃..... 76

Figura 40. Espectro de dicroísmo circular de DNA na ausência e presença do complexo **1**. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 75 μ M; Temperatura = 37°C..... 78

Figura 41. Espectro de dicroísmo circular de DNA na ausência e presença do complexo **2**. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 75 μ M; Temperatura = 37°C..... 78

Figura 42. Espectro de dicroísmo circular de DNA na ausência e presença do complexo **3**. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 70 μ M; Temperatura = 37°C..... 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	persulfato de amônio
BLM	Bleomicina
CD	dicroísmo circular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	espécie reativa de oxigênio
FAM	Fluoresceína
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
MG	verde de metila
pb	par(es) de base
mRNA	RNA mensageiro
phen	1,10-fenantrolina
RNA	ácido ribonucleico
SOD	enzima superóxido dismutase
TBE	Tris-borato-EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	O Ácido Desoxirribonucleico.....	24
1.2	Os diferentes tipos de DNA utilizados em ensaios bioquímicos.....	27
1.2.1	<i>Plasmídeos.....</i>	<i>27</i>
1.2.2	<i>CT-DNA.....</i>	<i>27</i>
1.2.3	<i>Oligonucleotídeos.....</i>	<i>27</i>
1.3	As enzimas no processo de hidrólise do DNA.....	29
1.4	Interações entre pequenas moléculas e o DNA.....	29
1.5	Complexos de cobre e sua atuação como nucleases sintéticas.....	32
1.5.1	<i>Pireno e os complexos em estudo.....</i>	<i>32</i>
1.6	Técnicas de análise para clivagem e interação de DNA com pequenas moléculas.....	35
1.6.1	<i>Clivagem direta de DNA plasmidial.....</i>	<i>35</i>
1.6.2	<i>Clivagem direta utilizando sondas fluorescentes.....</i>	<i>37</i>
1.6.3	<i>Dicroísmo Circular.....</i>	<i>38</i>
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	Objetivo Geral.....	39
2.2	Objetivos Específicos.....	39
3	METODOLOGIA.....	41
3.1	Complexos em estudo.....	41
3.2	DNAs utilizados nos ensaios.....	41
3.2.1	<i>Obtenção, transformação e purificação de DNA Plasmidial.....</i>	<i>41</i>
3.2.2	<i>CT-DNA.....</i>	<i>42</i>

3.2.3	<i>Oligonucleotídeos fluorescentes</i>	42
3.3	Clivagem de DNA plasmidial	42
3.3.1	<i>Efeito do pH</i>	43
3.3.2	<i>Efeito da força iônica</i>	43
3.3.3	<i>Efeito dos bloqueadores de sulco</i>	43
3.3.4	<i>Efeito dos inibidores de ERO</i>	44
3.3.5	<i>Ensaio sob atmosfera de Argônio</i>	44
3.3.6	<i>Ensaio cinéticos</i>	45
3.3.7	<i>Ensaio de clivagem direta com sondas fluorescentes de DNA</i>	46
3.3.8	<i>Preparação do gel de ureia/acrilamida e funcionamento do equipamento de eletroforese vertical</i> 47	
3.4	Dicroísmo circular	48
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1	Clivagem de DNA plasmidial	49
4.1.1	<i>Efeito do aumento de concentração dos complexos</i>	49
4.1.2	<i>Efeito do pH</i>	52
4.1.3	<i>Efeito da força iônica</i>	53
4.1.4	<i>Efeito dos bloqueadores de sulco</i>	55
4.1.5	<i>Efeito dos inibidores de ERO</i>	57
4.1.6	<i>Ensaio sob atmosfera de Argônio</i>	62
4.1.7	<i>Ensaio cinéticos</i>	64
4.2	Ensaio de clivagem direta com sondas fluorescentes de DNA	69
4.3	Dicroísmo Circular	77
5	CONCLUSÃO	81
6	PERSPECTIVAS	83
7	REFERÊNCIAS	85

1 INTRODUÇÃO

A estrutura tridimensional do ácido desoxirribonucleico foi resolvida e publicada pelos cientistas Watson e Crick em 1953¹ e, desde então, o DNA tornou-se elemento de estudo de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. Atualmente, estudos de interação com DNA são cada vez mais frequentes, principalmente por este ser o principal alvo das terapias anti-câncer. Além disso, o papel principal do DNA na transcrição, replicação e regulação de genes, faz com que seu estudo seja bastante interessante do ponto de vista biotecnológico.^{2,3}

A descoberta da estrutura do DNA levou à criação de uma nova área de estudos na biologia, chamada biologia molecular. Tal área tem por objetivo estudar a estrutura e função do ácido desoxirribonucleico e seus produtos de expressão, as proteínas. Atualmente, com a ampliação dos campos de estudo e com a ciência cada vez mais interligada, algumas outras subáreas da biologia molecular começam a despertar especial interesse dos pesquisadores.

Nesse contexto, o estudo de interação e clivagem de DNA por pequenas moléculas sintéticas, que iniciou-se em 1979 com o experimento acidental de Sigman,⁴ vem ganhando destaque e abre espaço para a descoberta de novas moléculas capazes de atuar como agentes de clivagem ou recombinação de material genético.⁵⁻⁷ Tais moléculas, em especial complexos metálicos, são importantes pois possibilitam o desenvolvimento de novas aplicações biotecnológicas e a busca por terapias antitumorais mais seletivas (com menos efeitos colaterais), além de auxiliar no entendimento dos mecanismos de ação do DNA. Alguns complexos, ainda, são sintetizados de modo a mimetizar o sítio ativo de enzimas, visando um melhor entendimento dos mecanismos de ação das mesmas e, eventualmente, substituindo o emprego das enzimas biológicas de modo a diminuir o custo de processos nos quais estas são empregadas.

O presente trabalho traz contribuições nesse campo de estudo, buscando investigar os mecanismos de interação e clivagem de DNA por novos complexos contendo centros binucleares de cobre, baseados na estrutura do sítio ativo da enzima catecol oxidase.

1.1 O Ácido Desoxirribonucleico

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um polímero natural cuja estrutura tridimensional consiste de duas cadeias polinucleotídicas helicoidais que encontram-se enroladas em torno de um eixo comum. Um nucleotídeo é uma unidade composta por uma base nitrogenada, uma pentose e um grupo fosfato (Figura 1). No caso do DNA, cada cadeia (ou fita) é composta de unidades repetidas de desoxirribonucleotídeos, pois o açúcar é a desoxirribose, onde o prefixo “desoxi” indica a falta de um átomo de oxigênio na posição 2’ da ribose, o composto original.⁸

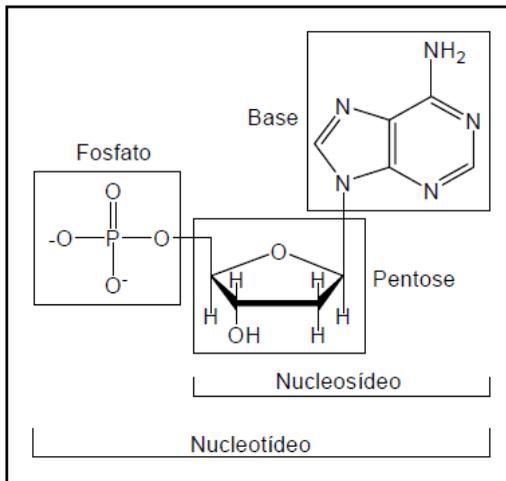


Figura 1. Representação esquemática da estrutura de nucleotídeos e nucleosídeos. Figura extraída da referência 46.

O arcabouço do DNA é formado, então, por desoxirriboses ligadas por fosfatos, de modo que a hidroxila 3’ da desoxirribose de um nucleosídeo (estrutura formada por uma pentose ligada a uma base nitrogenada – Figura 1) é ligada à hidroxila 5’ da pentose do nucleosídeo adjacente por uma ligação fosfodiéster. A parte variável do DNA está nas bases nitrogenadas ligadas ao carbono 1’ do açúcar, que podem ser de quatro tipos: adenina, guanina, citosina e timina; de forma que as duas primeiras são derivados de anéis de purina, enquanto que a citosina e timina são derivados de anéis de pirimidina⁸ (Figura 2).

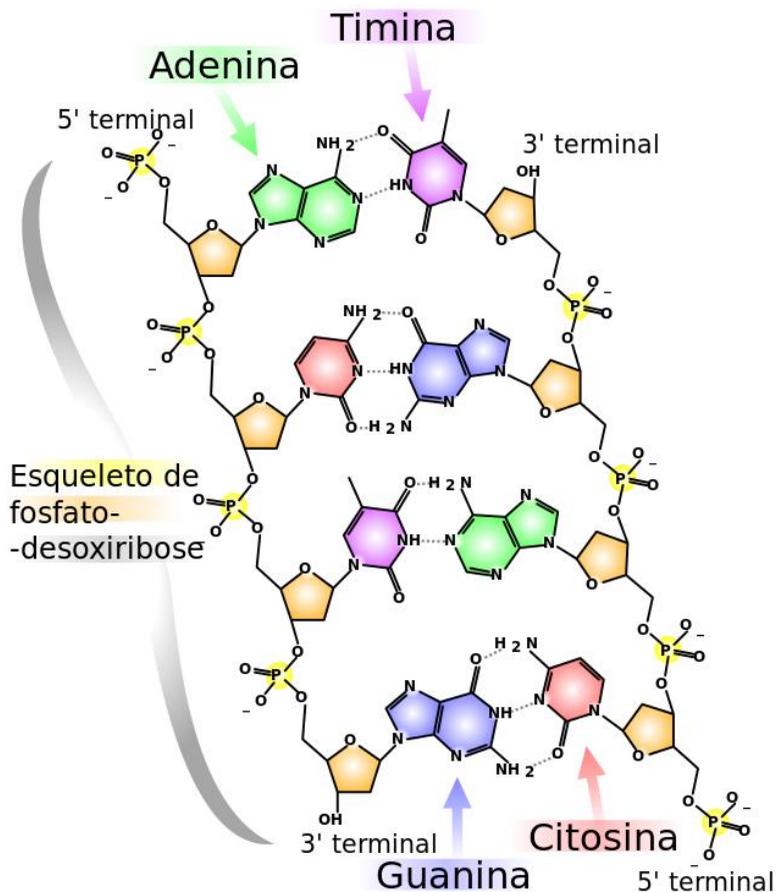


Figura 2. Representação do pareamento entre as fitas do DNA. Figura extraída do site: http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81cido_desoxirribo_nucleico#mediaviewer/File:DNA_chemical_structure_pt.svg (acessado em 24/11/2014).

O arranjo tridimensional do DNA dá-se pelo pareamento das bases nitrogenadas que encontram-se do lado de dentro da hélice, já que são as ligações de hidrogênio existentes entre elas que mantém as cadeias poliméricas unidas. O pareamento dá-se sempre entre uma base purínica e uma base pirimidínica e, devido a características estéricas, segue sempre a relação de pareamento timina-adenina e guanina-citosina.⁸ Especialmente, os planos das bases nitrogenadas encontram-se perpendiculares

à desoxirribose e ao eixo da molécula. Dessa forma, as bases de nucleotídeos adjacentes encontram-se paralelas entre si e se relacionam por empilhamento (*stacking*, em inglês). As unidades de fosfato e desoxirribose encontram-se na parte externa da dupla hélice^{1,8} (Figura 2). O DNA pode se apresentar em várias formas, sendo que a mais conhecida e estudada delas é o B-DNA, forma predominante em condições fisiológicas. Assim, com relação às dimensões do B-DNA podemos observar que, como cada nucleotídeo apresenta em torno de 3,4 Å de comprimento e como o ângulo de distorção entre nucleotídeos adjacentes em uma mesma fita é em torno de 36°, uma volta completa tem cerca de 10 pares de base empilhados ou 34 Å. Já a distância dos átomos de fosfato até o eixo central da molécula é de 10 Å.¹

Vale ressaltar que as fitas de B-DNA giram para a direita e são antiparalelas, ou seja, uma segue o sentido 3'-5' e a outra, o sentido 5'-3'.¹ Outra observação importante é que, devido ao modo como ocorre o pareamento e empilhamento das bases, estruturando a dupla hélice, temos a formação de sulcos (Figura 3) no B-DNA, que são cavidades por onde proteínas e outras moléculas podem interagir mais facilmente com as bases nitrogenadas, já que nessas regiões a repulsão dos grupos fosfato é menor, de modo que as bases apresentam-se mais expostas.⁹ Ainda é importante destacar que outras formas de DNA conhecidas, tais como A-DNA e Z-DNA, apresentam características diferenciadas no que diz respeito à formação de sulcos, helicidade e diâmetro interno da dupla-fita.¹⁰

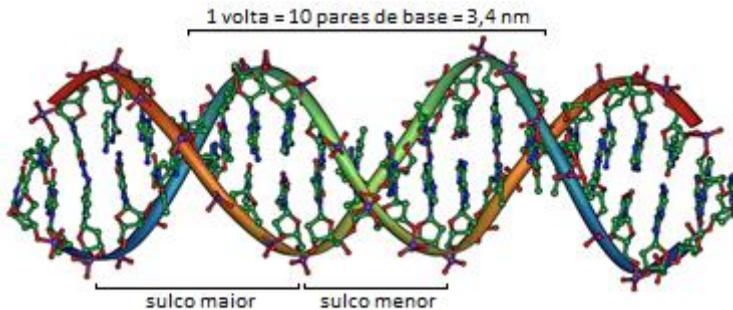


Figura 3. Representação da estrutura tridimensional do DNA. Adaptado da figura original extraída do site: http://pt.wikipedia.org/wiki/%C3%81acidodesoxirribonucleico#mediaviewer/File:DNA_Overview.png (acessado em 24/11/2014).

1.2 Os diferentes tipos de DNA utilizados em ensaios bioquímicos

1.2.1 Plasmídeos

O DNA plasmidial, também conhecido como plasmídeo, é uma molécula circular de DNA dupla-fita extracromossomal encontrada em muitas bactérias e também em alguns organismos eucarióticos unicelulares como leveduras e outros fungos.⁹ Com alguns milhares de pares de bases (pb) e replicação independente do cromossomo, o DNA plasmidial carrega genes que são capazes de conferir, ao organismo, resistência a toxinas e antibióticos presentes no ambiente. Os plasmídeos são facilmente extraídos intactos de bactérias e podem ser geneticamente modificados, e clonados, através de técnicas de biologia molecular.⁹ O plasmídeo é usualmente utilizado em ensaios de clivagem de DNA pois sua conformação oferece um modelo de fácil interpretação para a avaliação das quebras que uma molécula pode induzir ao ácido nucleico.

1.2.2 CT-DNA

O DNA de timo de bezerro ou CT-DNA (do inglês, *Calf Thymus Deoxyribonucleic Acid*) é linear e constitui-se de uma mistura heterogênea de diferentes fragmentos de DNA genômico dupla-fita. Em virtude de suas propriedades bioquímicas e físico-químicas bem definidas, o CT-DNA é a molécula de DNA mais utilizada em estudos de interação complexo-DNA.

1.2.3 Oligonucleotídeos

Em alguns ensaios nos quais é importante saber a sequência de bases do DNA, a substituição dos plasmídeos ou CT-DNA por oligonucleotídeos se faz necessário. Tais oligonucleotídeos são pequenos fragmentos de DNA, contendo algumas dezenas de pares de bases, que atuam como sondas e permitem a avaliação de possíveis sítios de especificidade dos complexos por determinadas regiões ou sequência de bases do DNA. Os oligonucleotídeos podem apresentar-se como cadeias simples, passíveis de complementação, bem como é possível

obter estruturas do tipo *hairpin*, nas quais regiões nas fitas pareadas encontram-se não-pareadas, ou seja, como fitas simples, num desenho que se assemelha a um 'grampo de cabelo' (*hairpin*, do inglês – Figura 4).

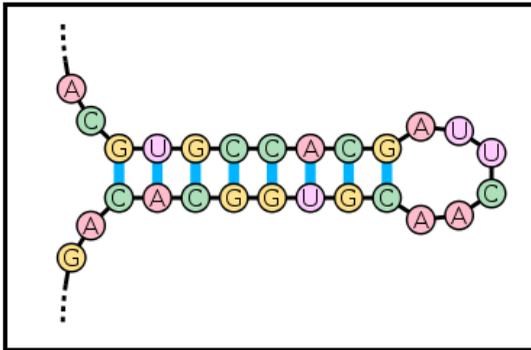


Figura 4. Representação de um DNA *hairpin*. Figura extraída do site: http://pt.wikipedia.org/wiki/Hairpin_loop#mediaviewer/File:Stem-loop.svg (acessado em 25/11/2014).

O estudo com oligonucleotídeos do tipo *hairpin* é de especial interesse pois essas estruturas são amplamente encontradas em sistemas biológicos, principalmente nas estruturas secundárias de RNAs, onde são elementos predominantes.^{11,12} Nesse contexto, tais estruturas atuam como sítios de nucleação para o “dobramento” de RNAs (formação de estrutura secundária) e como sinalizadores no reconhecimento de proteínas, além de estarem envolvidos na localização de mRNA, na encapsidação e empacotamento retroviral e na regulação da degradação de mRNA.¹³ Alguns exemplos de estruturas estáveis de DNA-*hairpin* também encontram-se descritos na literatura e sugerem um papel funcional de estruturas cruciformes na regulação e expressão de gene, além de possíveis interações entre DNA-*hairpins* e fatores necessários para a replicação viral, uma vez que DNA simples-fita está presente durante vários estágios do ciclo de vida viral de fagos filamentosos.^{14,15} Do ponto de vista metodológico o uso de *hairpins* também se faz interessante, pois possibilita a obtenção de uma dupla-hélice a partir de uma única fita de DNA, de modo a permitir a análise de mudanças ocorridas em ambos os lados da hélice de uma só vez.

1.3 As enzimas no processo de hidrólise do DNA

As ligações fosfato-oxigênio existentes entre o fosfato e a pentose que compõem o esqueleto das fitas de DNA são extremamente estáveis, uma vez que as cargas negativas oriundas dos grupos fosfatos acabam afastando potenciais nucleófilos, evitando a hidrólise da ligação fosfodiéster.^{8,9} A natureza, entretanto, buscou formas de possibilitar a clivagem dessas ligações, criando enzimas capazes de minimizar essa repulsão. Essas enzimas, que são capazes de clivar a ligação fosfodiéster em poucos segundos, são chamadas de nucleases.⁹

As nucleases possuem constantes de aceleração na faixa de 10^{12} a 10^{16} vezes em relação à hidrólise espontânea do DNA^{16,17} e possuem importância fundamental nos processos biológicos. Além disso, são de grande utilidade em processos bioquímicos e biotecnológicos por apresentarem um amplo espectro de aplicações, como no desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, e sua utilização em técnicas de sequenciamento de DNA, e em técnicas de mapeamento genético e de cromossomos humanos.¹⁸⁻²⁰

A busca pela compreensão dos mecanismos de atuação das enzimas, em especial das nucleases, de forma a entender como elas de fato funcionam - e o que leva ao aumento significativo da velocidade das reações das quais estas participam - leva muitos pesquisadores a desenvolver modelos funcionais mais simples das mesmas, visando o estudo mais detalhado das funções catalíticas desses catalisadores biológicos. Nesse sentido, o desenvolvimento de nucleases sintéticas capazes de mimetizar o sítio ativo das enzimas pode contribuir para o entendimento dos mecanismos de ação e possibilitar a criação de novos catalisadores sintéticos, que podem vir a substituir as enzimas naturais em processos biotecnológicos.¹⁸

1.4 Interações entre pequenas moléculas e o DNA

O [Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina)] (Figura 5) é considerado o primeiro exemplo de complexo sintético a apresentar atividade de interação com o DNA. A síntese acidental do complexo, em um experimento que visava comprovar que a DNA polimerase I de *Escherichia coli* era uma metaloenzima dependente de Zn(II), foi

o marco inicial do estudo da interação entre pequenas moléculas sintéticas e o DNA.⁴

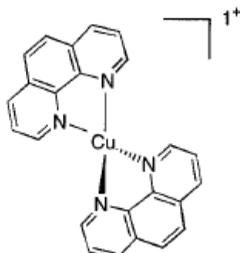


Figura 5. O complexo Cu(I)-bis-(1,10-fenantrolina), primeiro exemplo de complexo sintético a apresentar atividade de interação e clivagem com o DNA. Figura extraída da referência 26.

Hoje em dia, muitas são as metalonucleases sintéticas estudadas e os diversos trabalhos publicados na área apresentam grande variedade de centros metálicos e de ligantes orgânicos. Os metais de transição e os lantanídeos ganham destaque nesse contexto, apresentando diversos tipos de interação com o DNA.^{5,6,21,22} Nesse sentido, algumas das interações possíveis entre o DNA e pequenas moléculas sintéticas são: intercalação entre os pares de base do ácido nucléico, ligação e posterior acomodação nos sulcos maior ou menor do DNA, ligação covalente com as bases nitrogenadas e/ou à pentose, entre outros.

Muitos dos complexos sintéticos estudados e publicados, além de interagir com o DNA, são também capazes de clivá-lo por meio de diferentes mecanismos e condições reacionais.²³⁻²⁷ Nesse contexto, complexos que clivam o DNA via mecanismo hidrolítico (Figura 6), gerando produtos 3'-OH²⁸⁻³⁰ como ocorre nos processos biológicos, são visados pela sua semelhança com as nucleases reais. Nesse caso, a similaridade com o mecanismo natural de ação das nucleases biológicas faz com que essa classe de metalonucleases sintéticas torne-se interessante para utilização em sistemas vivos.

Já os complexos de metais de transição, especialmente de ferro ou cobre, em seu estado de oxidação reduzido, podem promover a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) via reação de Haber-Weiss ou Fenton, as quais são capazes de oxidar

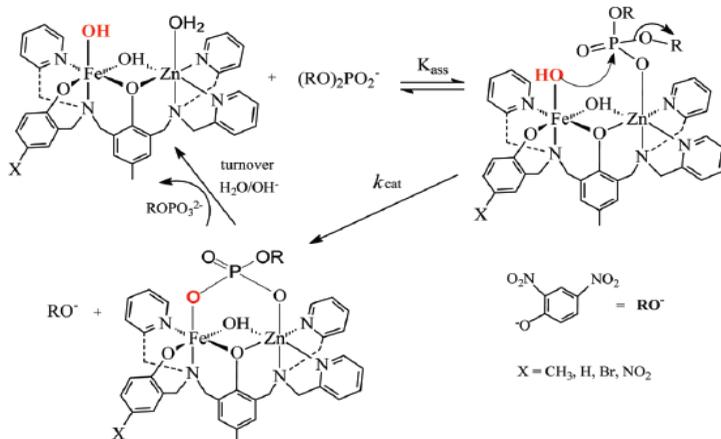


Figura 6. Mecanismo proposto para a hidrólise do substrato modelo 2,4-bis(dinitrofenil)fosfato (2,4-BDPP), análogo em estrutura ao DNA. Figura original extraída da referência 28.

diversas biomoléculas a partir de abstração de um hidrogênio da desoxirribose ou de modificações nas bases nitrogenadas do DNA^{24-26,31} (Figura 7). Tais complexos são descritos na literatura como agentes de clivagem de DNA bastante fortes, sendo que alguns, como derivados de Fe-BLM (onde BLM = bleomicina), são capazes de se ligar ao DNA de modo específico resultando na clivagem seletiva de certos domínios ou sítios do DNA.³²⁻³⁴

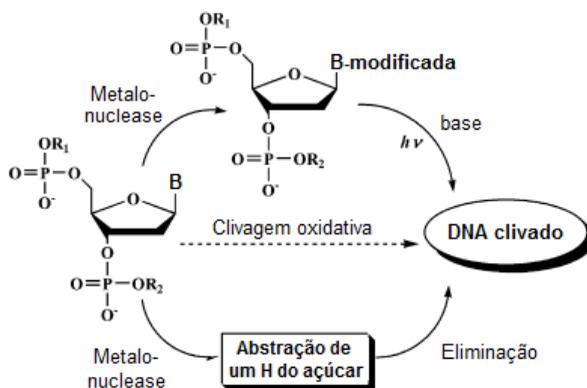


Figura 7. Mecanismo simplificado de quebra das fitas de DNA induzidos por modificação das bases nitrogenadas ou por abstração de hidrogênio da desoxirribose. Adaptado da figura original extraída da referência 24.

1.5 Complexos de cobre e sua atuação como nucleases sintéticas

Após a descoberta de Sigman, em 1979, que evidenciou a atividade do complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ (onde phen = 1,10-fenantrolina) como nuclease, muitos estudos têm sido feitos buscando o desenvolvimento de novos complexos sintéticos que possuam atividade de clivagem do DNA. Apesar dos avanços na área, a busca por complexos que possuam taxas de clivagem cada vez maiores continua sendo um desafio.

Nesse contexto, os complexos de Cu(II) destacam-se por apresentar altas constantes catalíticas, atuando preferencialmente por mecanismos oxidativos. Os complexos binucleares de Cu(II), entretanto, são ainda mais visados em estudos, pois a sinergia dos núcleos, a qual mimetiza o sítio ativo de muitas enzimas biológicas, acaba por conferir à essa classe especial de sintéticos uma atividade catalítica superior à de seus similares mononucleares.^{27,35-40} Pode-se observar, por exemplo, um aumento de 50 vezes na velocidade da reação de hidrólise de monoésteres de fosfato quando duas unidades de bis(benzimidazolil)cobre(II) ligadas por um grupo 2-fenoxi-1,3-xilil em ponte foram usadas, em comparação ao monômero correspondente.⁴¹

1.5.1 Pireno e os complexos em estudo

Além da participação do sítio ativo no mecanismo de catálise, sabe-se que as demais regiões de aminoácidos presentes na estrutura tridimensional das enzimas também auxiliam no processo de assimilar o substrato e realizar as devidas mudanças químicas no mesmo. Da mesma forma, atualmente, estuda-se a possibilidade de sintetizar complexos não apenas visando o seu sítio ativo, mas também suas interações secundárias, de modo a contribuir para o aumento da atividade catalítica dos modelos miméticos.⁴² Nesse contexto, a adição de moléculas planares, como antraceno e pireno, à estrutura básica dos complexos pode ser utilizada como uma estratégia para facilitar a ancoragem da molécula sintética ao DNA, de forma a aumentar a sua interação com o mesmo.

O pireno (Figura 8) é um hidrocarboneto aromático policíclico cujas propriedades físico-químicas estão relacionadas ao sistema das ligações duplas conjugadas, sua aromaticidade e ao número de anéis. Sua planaridade se faz interessante no contexto de associação ao DNA, uma vez que estuda-se a possibilidade e efetividade de intercalação dessa molécula entre as bases nitrogenadas do DNA.⁴³⁻⁴⁵ Tal interação, do tipo π -stacking, é tida como uma possível forma de auxílio na ancoragem do complexo ao ácido nucléico, de modo a aumentar sua eficiência catalítica.

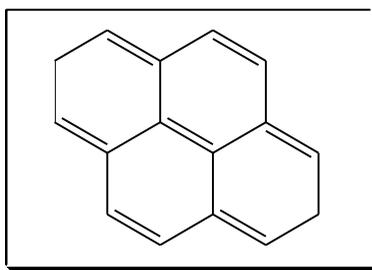


Figura 8. Estrutura de uma molécula de pireno

No presente trabalho, o estudo de três complexos binucleares de cobre, sendo que um deles possui uma molécula de pireno ancorada, visa esclarecer e analisar a real eficiência do pireno como facilitador das interações entre molécula sintética e DNA. Os complexos, apresentados na Figura 9, possuem o mesmo “desenho de sítio ativo”, diferindo apenas na presença de um átomo de cloro (complexo **1**), um extensor 1,4-butanodiamina (complexo **2**) ou de um grupo N-metilpirenilbutanodiamina (complexo **3**), como substituinte no grupo triazínico central. A busca por uma relação estrutura-atividade, visando o entendimento das interações dos diferentes complexos com DNA, é o principal objetivo dessa dissertação.

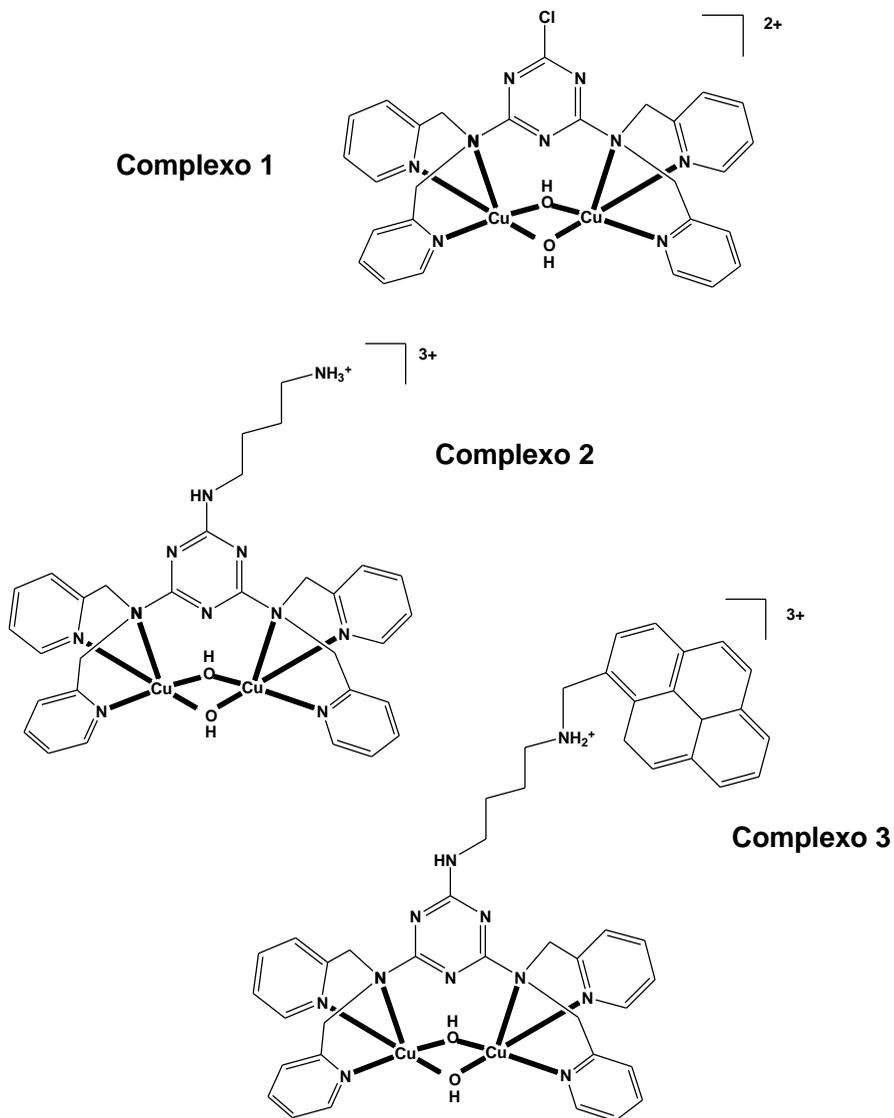


Figura 9. Estrutura dos complexos $[\text{Cu}_2(2\text{-cloro-4,6-bis(di-2-picolilamino)-1,3,5-triazina}]$ (Complexo 1), $[\text{Cu}_2(2\text{-butanodiamina-4,6-bis(di-2-picolilamino)-1,3,5-triazina}]$ (Complexo 2) e $[\text{Cu}_2(2\text{-N-metilpirenilbutanodiamina-4,6-bis(di-2-picolilamino)-1,3,5-triazina}]$ (Complexo 3).

1.6 Técnicas de análise para clivagem e interação de DNA com pequenas moléculas

1.6.1 Clivagem direta de DNA plasmidial

As análises mais comuns para a avaliação do potencial de clivagem de pequenas moléculas sintéticas quando em contato com o DNA se faz a partir de reações envolvendo DNA plasmidial, tampão de reação - cuja função é manter o pH do meio reacional constante - e o complexo em estudo. Devido às suas características conformacionais, o plasmídeo é o substrato comumente utilizado nos ensaios de clivagem direta de DNA.

O DNA plasmidial encontra-se naturalmente sob uma forma altamente tensionada, dita superenovelada (Forma I, FI) (Figura 10). Ao sofrer uma quebra-simples em apenas uma das fitas, há o afrouxamento desta estrutura e o plasmídeo assume uma conformação do tipo circular aberta (Forma II, FII). Caso ocorra uma segunda quebra próxima à primeira, mas na fita oposta, o DNA plasmidial sofre a conversão para sua forma linear (Forma III, FIII). Estas três conformações do plasmídeo são topologicamente distintas e possuem mobilidades eletroforéticas diferentes. Assim, quando uma amostra de DNA plasmidial previamente tratada com um agente de interesse (um complexo, por exemplo) é submetida à eletroforese em gel de agarose, pode-se separar cada uma de suas formas (Figura 10) e, pela proporção de cada uma, determinar a presença e extensão das quebras induzidas ao DNA.^{46,47}

Com pequenas alterações nesse ensaio básico de clivagem, é possível investigar mais a fundo como o complexo interage com o DNA. Nesse caso, ensaios com bloqueadores de sulco (Metodologia 3.3.3.) podem fornecer informações importantes sobre a preferência de ligação da molécula sintética pelo sulco maior ou menor do DNA. Além disso, ensaios com sequestradores de espécies reativas de oxigênio (Metodologia 3.3.4.) ou sob atmosfera de argônio (Metodologia 3.3.5.) são importantes para se avaliar se o complexo cliva o DNA via mecanismo hidrolítico ou oxidativo. A adição de sal (NaCl - Metodologia 3.3.2.) também se faz importante na determinação da relevância da participação das interações eletrostáticas entre complexo e DNA no processo de interação e clivagem.³⁶

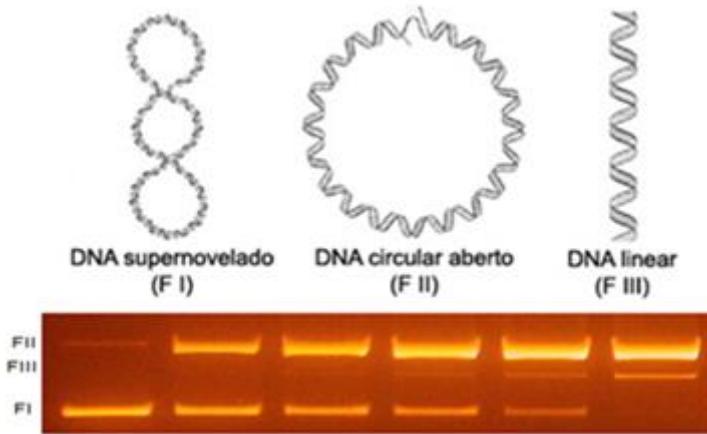


Figura 10. Representação esquemática das três formas do DNA plasmidial e sua diferenciação após eletroforese em gel de agarose. Figura extraída do site <http://202.204.115.67/jpkch/jpkch/2008/wswx/chapter%207.htm> (acessado em 25/11/2014).

A avaliação do perfil cinético do complexo em estudo, entretanto, pode ser considerado o principal ensaio a ser realizado utilizando a metodologia descrita acima, sendo muito importante para a determinação da atividade do complexo. Nesse caso, o tratamento do plasmídeo com a molécula sintética em diferentes concentrações e tempos reacionais possibilita a obtenção de dados passíveis de tratamento pela equação de Michaelis-Menten. Assim, considerando o sistema exposto em Metodologia 3.3.6., onde o catalisador (complexo) encontra-se em excesso se comparado à concentração de substrato (DNA), o perfil cinético do processo de clivagem de DNA é considerado como de pseudo-primeira-ordem e a obtenção das constantes de clivagem (k_{obs}) para cada concentração pode ser calculada a partir do gráfico do logaritmo neperiano (\ln) da forma intacta do DNA (F I) em função do tempo.²⁷ A constante de Michaelis-Menten (k_M) pode ser igualmente obtida a partir do gráfico de k_{obs} x concentração de complexo.

1.6.2 Clivagem direta utilizando sondas fluorescentes

Uma importante ferramenta de análise, que vem cada vez mais sendo usada na investigação da interação e clivagem de DNA por pequenas moléculas sintéticas, são os géis de alta resolução. Através desta técnica é possível analisar a clivagem direta de oligonucleotídeos na presença de moléculas sintéticas, de forma a evidenciar se o complexo apresenta especificidade de clivagem por alguma região do DNA ou ainda auxiliar em um maior entendimento do mecanismo pelo qual uma molécula sintética cliva o DNA.⁴⁸⁻⁵⁰

No ensaio, utiliza-se geralmente um pequeno fragmento de DNA dupla-fita marcado em uma das fitas (sonda), o qual sofre a ação de uma molécula sintética. Ao final da reação, a degradação do oligonucleotídeo pelo complexo em estudo leva à formação de fragmentos com diferentes sequências de nucleotídeos e, conseqüentemente, com diferentes massas, que são então separados por eletroforese vertical em gel desnaturante de ureia/acrilamida⁵¹ (Figura 11). Caso a molécula apresente alguma especificidade de clivagem por alguma sequência de bases ou região específica da sonda, o escaneamento do gel irá revelar bandas mais intensas em determinadas regiões. Se o complexo em estudo não apresentar especificidade ou não for ativo o suficiente para clivar a sonda, as bandas da mesma aparecerão todas com a mesma intensidade no gel.

Historicamente, a marcação da fita de DNA é feita pela adição de um grupo fosfato marcado com fósforo 32 (³²P – marcação radioativa). Tal técnica é ainda hoje muito empregada, uma vez que oferece alta sensibilidade, podendo ser feita com apenas alguns femtomoles da sonda.^{49,50} No presente trabalho, entretanto, empregamos uma sonda de DNA marcada com um fluoróforo (molécula capaz de emitir fluorescência) a fim de substituir o uso de radioisótopos.^{52,53} O fluoróforo escolhido para a marcação das sondas foi a fluoresceína (FAM) e, após a corrida, o gel foi revelado em um scanner de fluorescência, ao contrário dos géis marcados radioativamente, cuja revelação requer muito mais etapas e cuidados por causa da radioatividade.⁵⁴

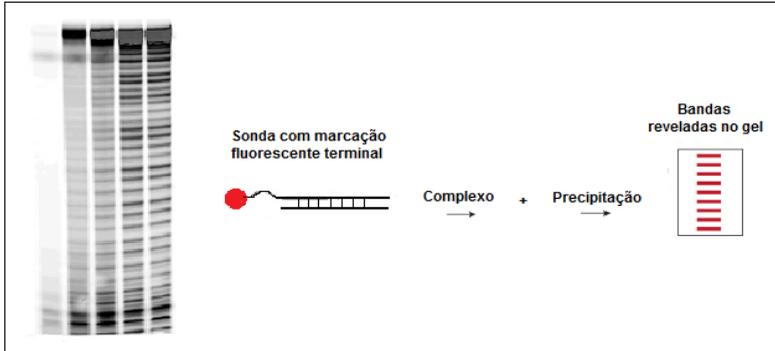


Figura 11. Representação do processo simplificado de obtenção dos géis de alta resolução e foto do gel com suas respectivas bandas de clivagem. Adaptado da figura extraída da referência 51.

1.6.3 Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (do inglês, *circular dichroism* ou *CD*) é um método espectroscópico capaz de mensurar a diferença de absorção de luz circularmente polarizada em diferentes comprimentos de onda por moléculas opticamente ativas em solução. Assim, como o CT-DNA é opticamente ativo, seu espectro de CD apresenta duas bandas características: uma banda positiva em 276 nm, que possui relação com o empilhamento de bases (interações do tipo π -stacking), e uma banda negativa em 248 nm, que tem relação com a helicidade orientada para a direita do B-DNA.⁵⁵

Mudanças oriundas do tratamento de CT-DNA com determinadas moléculas podem inferir em mudanças em seu espectro de absorção, fornecendo importantes dados sobre o tipo de interação complexo-DNA. Dessa forma, um aumento na banda positiva, por exemplo, pode indicar um maior empilhamento de bases e, portanto, indicar que a molécula interage com o DNA via intercalação entre as bases nitrogenadas. Outros comportamentos, entretanto, podem evidenciar a preferência de interação do complexo com o DNA via aproximação pelos sulcos e/ou interações eletrostáticas, entre outros.^{56,57}

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a interação e clivagem de DNA por três diferentes complexos metálicos de cobre (II), de forma a investigar a influência das respectivas modificações na atividade dos mesmos.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a clivagem de DNA plasmidial pelos complexos **1**, **2** e **3** em diferentes condições de reação, verificando a influência de fatores como: pH, concentração do complexo, tampão, tempo de reação e força iônica;
- Determinar como ocorre a interação complexo-DNA a partir da análise de ensaios com bloqueadores de sulco e de dicroísmo circular;
- Determinar o mecanismo pelo qual os complexos clivam o DNA (oxidativo ou hidrolítico) através da análise da atividade dos complexos em reações contendo sequestradores de espécies reativas de oxigênio, bem como realizando reações sob atmosfera de argônio;
- Determinar os parâmetros cinéticos das reações de clivagem de DNA plasmidial pelos complexos;
- Investigar se os complexos apresentam especificidade por regiões ou sequências específicas de pares de base do DNA, utilizando técnicas de eletroforese vertical em gel de alta resolução.

3 METODOLOGIA

Todos os reagentes utilizados nos ensaios com DNA possuem grau de biologia molecular e suas soluções foram preparadas em água Milli-Q (resistividade a 25 °C de, no máximo, 18,2 MΩ.cm, Teor de Carbono Orgânico Total < 10 ppb) obtida pelo sistema Milli-Q Simplicity (Millipore, USA). Nos casos onde há necessidade do uso de solventes orgânicos, como acetonitrila, os reagentes utilizados possuem grau analítico para espectroscopia UV-Vis.

3.1 Complexos em estudo

Os complexos utilizados no presente trabalho foram sintetizados pelo aluno de mestrado em Química, Marcos Paulo da Silva, sob orientação do Prof. Dr. Ademir Neves, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC), do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).⁵⁸

Vale ressaltar que o complexo **1** já possui estrutura resolvida e encontra-se descrito na literatura,⁵⁹ enquanto que os complexos **2** e **3** são inéditos. A realização dos experimentos, entretanto, foi feita em paralelo, visando obter uma condição padrão de estudo, para posterior comparação da atividade relativa aos complexos e suas respectivas modificações.

3.2 DNAs utilizados nos ensaios

3.2.1 Obtenção, transformação e purificação de DNA Plasmidial

O substrato utilizado nos ensaios de clivagem de DNA, por análise via eletroforese em gel de agarose, foi o plasmídeo pBSK-II superenovelado de dupla-fita (Stratagene, USA), com 2961 pb.

Devido à necessidade de grandes quantidades de DNA, o plasmídeo pBSK II foi inserido em células de *Escherichia coli* DH5- α competentes, utilizando-se o protocolo proposto por Ausubel e colaboradores.⁶⁰ Após a multiplicação celular, a cultura bacteriana foi centrifugada e o DNA foi purificado segundo os procedimentos do kit de extração e purificação de DNA plasmidial HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit (Qiagen). A concentração do DNA plasmidial

extraído foi quantificada por espectrofotometria UV-Vis ($A_{260} = 1,0 = 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de DNA) e a integridade do plasmídeo foi verificada por eletroforese em gel de agarose.

3.2.2 CT-DNA

Nos ensaios de dicroísmo circular o DNA plasmidial foi substituído por CT-DNA tipo XV, obtido comercialmente (Sigma, USA).

3.2.3 Oligonucleotídeos fluorescentes

Nos ensaios de clivagem direta de DNA, por análise via eletroforese vertical em gel de ureia/acrilamida, foram utilizadas sondas com marcação fluorescente, obtidas comercialmente (IDT).

3.3 Clivagem de DNA plasmidial

Em um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL foram adicionados 2 μL de DNA plasmidial ($165 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 2 μL de tampão HEPES (100 mM), 11 μL de água Mili-Q autoclavada e 5 μL do complexo em estudo. A mistura foi então agitada e permaneceu sob aquecimento constante em um equipamento de termobloco (Bioer, MB-102) a 37°C . Inicialmente variou-se o tempo de reação (4 até 16 h) e a concentração do complexo (2,5 a 50 μM) a fim de se determinar as melhores condições de clivagem. Um controle também foi preparado substituindo o complexo por acetonitrila (solvente).

Ao final do tempo de reação, foi adicionado à mistura reacional 5 μL de tampão de corrida 6x concentrado (EDTA 0,25 M, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01% - pH 8,0), de modo a finalizar a reação. Em seguida as amostras foram mantidas a 4°C para, posteriormente, serem submetidas à eletroforese em gel de agarose (1%) contendo brometo de etídio ($0,3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) por 1h e 40min a 90 V em tampão TBE 0,5x (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM - 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 foram quantificadas por densitometria, utilizando o software KODAK

Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health, USA). Vale destacar que a porcentagem de Forma I quantificada teve seu valor corrigido, de modo a compensar a menor capacidade que o brometo de etídio tem de se ligar ao DNA plasmidial superenovelado, quando em comparação às Formas II e III.⁶¹ A porcentagem verificada para as Formas II e III também foram corrigidas proporcionalmente.

3.3.1 Efeito do pH

As reações foram preparadas conforme descrito no item 3.3., porém com alteração do tampão/pH para as diferentes amostras. Os tampões testados foram MES pH 6,0; HEPES pH 7,0 e pH 8,0 e CHES pH 9,0. Controles com os diferentes tampões na ausência de complexo também foram feitos. A mistura reacional ficou sob aquecimento constante por 16 h (complexo **1**) e 8 h (complexos **2** e **3**) a 37°C no termobloco. As reações foram interrompidas pela adição do tampão de corrida e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, conforme descrito anteriormente.

3.3.2 Efeito da força iônica

As reações foram preparadas conforme descrito no item 3.3, porém substituindo 4 µL de água por 4 µL de NaCl em concentrações que variaram de 0 a 320 mM. Controles na ausência de complexo também foram feitos. A mistura reacional ficou sob aquecimento constante por 16 h (complexo **1**) e 8 h (complexos **2** e **3**) a 37°C no termobloco. As reações foram interrompidas pela adição do tampão de corrida e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose.

3.3.3 Efeito dos bloqueadores de sulco

As misturas reacionais foram preparadas conforme descrito no item 3.3, porém substituindo 4 µL de água por 4 µL dos bloqueadores de sulco (netropsina e verde de metila (MG - do inglês, *Methyl Green*). As amostras contendo os bloqueadores de sulco ficaram 30 minutos em repouso antes da adição dos complexos. Nesse ensaio, para cada complexo, foram feitas três

reações: um controle só com complexo (sem bloqueadores de sulco), uma reação contendo netropsina e uma reação contendo MG. Um controle sem complexo e sem bloqueadores de sulco também foi feito. A concentração final dos complexos em solução variou de 10 μM (complexos **2** e **3**) a 25 μM (complexo **1**) e a mistura reacional ficou sob aquecimento constante por 16 h (complexo **1**) e 8 h (complexos **2** e **3**) a 37°C no termobloco. As reações foram interrompidas pela adição do tampão de corrida e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose.

3.3.4 Efeito dos inibidores de ERO

As misturas reacionais foram preparadas conforme descrito no item 3.3, porém substituindo 4 μL de água por 4 μL de diferentes inibidores de ERO (KI - 2,5 mM; DMSO - 2 M; NaN_3 - 2,5 mM e SOD - 10 unidades). Nesse ensaio, para cada complexo, foram feitas seis reações, das quais duas tratavam-se de controles (um na ausência de complexo e outro contendo o complexo, mas sem adição de inibidores) e as demais eram reações na presença dos diferentes inibidores. A concentração final dos complexos em solução variou de 10 μM (complexos **2** e **3**) a 25 μM (complexo **1**) e a mistura reacional ficou sob aquecimento constante por 16 h (complexo **1**) e 8 h (complexos **2** e **3**) a 37°C no termobloco. As reações foram interrompidas pela adição do tampão de corrida e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose.

3.3.5 Ensaio sob atmosfera de Argônio

Para a realização deste ensaio, utilizou-se uma glove bag (Figura 12), a fim de se obter um ambiente livre de oxigênio. O aparato foi submetido ao vácuo e inflado com argônio por várias vezes e todos os procedimentos experimentais foram realizados no interior desse sistema.

As misturas reacionais foram preparadas conforme descrito no item 3.3 e a concentração final dos complexos em solução variou de 15 μM (complexos **2** e **3**) a 25 μM (complexo **1**). Nesse ensaio, um controle contendo solução de Fe/EDTA (1mM/ 2mM - 1 μL) e DTT (10mM - 1 μL), em substituição ao complexo, foi realizado a fim de garantir uma condição livre de oxigênio dentro da glove bag. Um controle na ausência de complexo também foi

preparado. As reações ficaram sob aquecimento constante dentro de um dessecador a vácuo por 4 h a 50°C (estufa). Após, as reações foram interrompidas pela adição do tampão de corrida e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose. O procedimento, que inclui a preparação dos dois controles e das três amostras (uma para cada complexo), foi realizado em triplicata, a fim de garantir a veracidade dos dados obtidos.



Figura 12. Representação de um ensaio feito em uma glove bag, espécie de câmara de polietileno flexível, inflável e com luvas internas que permite a realização de ensaios em ambientes controlados. Figura extraída do site: http://www.coleparmer.com/Product/Glove_Bag_Inflatable_Glove_Chamber_34_5_Equipment_Sleeve_6_pk/EW-04408-38 (acessado em 28/11/2014).

3.3.6 Ensaios cinéticos

Em um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL foram adicionados 14 μL de DNA ($165 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 14 μL de tampão HEPES (100 mM), 77 μL de água Mili-Q e 35 μL do complexo em estudo. Após, a mistura reacional foi agitada e aliqüotada para seis *ependorfs* separados, cada qual contendo 20 μM de reação, que permaneceram sob aquecimento constante em um equipamento de termobloco, a 37°C. O procedimento foi repetido para diferentes concentrações finais dos complexos em solução (2,5; 5; 10; 15; 20; 25 e 50 μM) e para cada ensaio variou-se o tempo de reação de 0 a 16 h, com

reações sendo retiradas do aquecimento em 0, 1, 2, 4, 8 e 16 h. A cada ponto, um *eppendorf* era retirado do termobloco e tinha sua reação interrompida pela adição do tampão de corrida. Ao final as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose.

3.3.7 Ensaios de clivagem direta com sondas fluorescentes de DNA

Em um tubo tipo *eppendorf* de 1,5 mL foram adicionados 8 μL de DNA fluorescente ($25 \text{ pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 8 μL de tampão HEPES - $\text{pH} = 7,0$ (100 mM), 44 μL de água Mili-Q autoclavada e 20 μL do complexo em estudo, na concentração final (em solução) de 15 μM . A mistura reacional foi agitada e alíquotada para sete *eppendorfs* separados que ficaram sob aquecimento constante em um equipamento de termobloco, a 37°C . A cada 8 h um tubo era retirado do aquecimento e tinha sua reação interrompida pela adição de 1 μL de glicogênio ($20 \text{ mg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 1 μL de acetato de sódio (0,3 M) e 36 μL de etanol 100% (gelado). O tempo de reação variou de 0 a 48 h. Um controle na ausência de complexo foi preparado, de forma que a mistura reacional com acetonitrila teve o mesmo tratamento descrito para os complexos, com pontos sendo tirados a cada 8 h.

Após a adição de etanol, a mistura reacional permaneceu no freezer, a -20°C , até ter seu DNA precipitado por centrifugação a $16100 \times g$ (*Eppendorf Centrifuge* – 5415 R). Para favorecer a precipitação, a centrífuga foi mantida a 4°C durante o processo. Em seguida, o excesso de reagentes no tubo de *eppendorf* foi retirado, o *pellet* de DNA foi lavado com 50 μL de etanol 70% e, novamente, realizou-se a centrifugação dos tubos. Após, o etanol em excesso foi retirado e os *pellets* de DNA foram secos em um dessecador a vácuo (*Eppendorf Concentrator Plus*). Finalmente, o DNA precipitado foi ressuscitado em 5 μL de tampão de corrida (formamida 80%, NaOH 0,01 M, azul de bromofenol 0,025 % e EDTA 0,006 M) e as amostras seguiram para aplicação no gel de ureia/acrilamida.

3.3.8 Preparação do gel de ureia/acrilamida e funcionamento do equipamento de eletroforese vertical

O gel foi preparado pela adição de 42,0 g de ureia em um béquer contendo 40 mL de acrilamida/poliacrilamida (19:1) e 10 mL de TBE 10x. A mistura ficou sob agitação até que toda a ureia fosse dissolvida (aproximadamente 1 h). Após, o conteúdo do béquer foi avolumado para 100 mL com água Mili-Q.

No momento da aplicação do gel, foram adicionados 600 μ L de APS (persulfato de amônio, na sigla em inglês) e 60 μ L de TEMED (tetrametiletilenodiamina) para dar início à polimerização. Após, o conteúdo do béquer foi transferido para uma seringa de 100 mL para ser adicionado às placas de vidro. A inserção do pente que possibilita a formação dos poços foi feita imediatamente após a aplicação do gel e o sistema ficou em repouso por 1 h e 30 min.

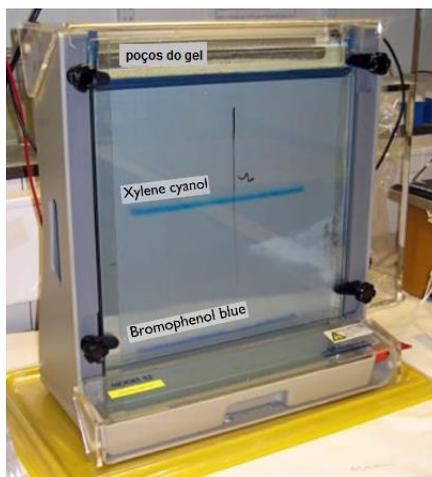


Figura 13. Cuba para eletroforese vertical de alta resolução. Adaptado da figura extraída do site: <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/practicalbiochemistry/ch10s09.html> (acessado em 08/01/2015).

Finalizada a polimerização do gel, as placas de vidro foram afixadas à cuba para eletroforese vertical de alta resolução (Figura 13), onde ficaram em contato com o tampão (TBE 1x) por 1 h a 50 W, a fim de equilibrar a temperatura de corrida (em torno de 50°C). Antes da aplicação, as amostras foram aquecidas a 95°C para

favorecer a desnaturação da sonda. As amostras foram então aplicadas aos poços do gel e a corrida durou cerca de 2h e 20min, à potência de 50 W. Marcadores do tipo Maxam-Gilbert⁶² foram aplicados ao gel a fim de facilitar a análise da sequência de bases presentes na sonda.

3.4 Dicroísmo circular

Em uma cubeta de vidro com 2 milímetros de caminho óptico foram adicionados 90 μL de CT-DNA (880 μM), 40 μL de tampão HEPES – pH = 7,0 (100 mM) e 270 μL de água Mili-Q autoclavada. A cubeta foi então colocada em um espectropolarímetro de CD, modelo J-815 (Jasco, USA), onde a varredura foi realizada em um intervalo de comprimento de onda (λ) que variou de 200 a 400 nm à temperatura constante de 37°C. O procedimento foi repetido após a adição de sucessivas alíquotas de complexo visando analisar o sistema na razão de 0,1 até 0,7 [complexo]/[DNA], de forma que a cada adição obteve-se uma varredura. Um controle sem a adição de CT-DNA foi realizado nas mesmas condições descritas acima, de modo a investigar se os complexos apresentavam bandas de absorção na região em que foram feitas as leituras.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Clivagem de DNA plasmidial

4.1.1 Efeito do aumento de concentração dos complexos

O ensaio inicial realizado com os complexos visou determinar a influência do aumento da concentração na atividade de clivagem de DNA pelos mesmos. Testes iniciais indicaram que os complexos não eram ativos em concentrações superiores a 100 μM , assim, as figuras abaixo apresentam gráficos da clivagem de DNA plasmidial pelos respectivos complexos, variando a concentração de 2,5 a 50 μM .

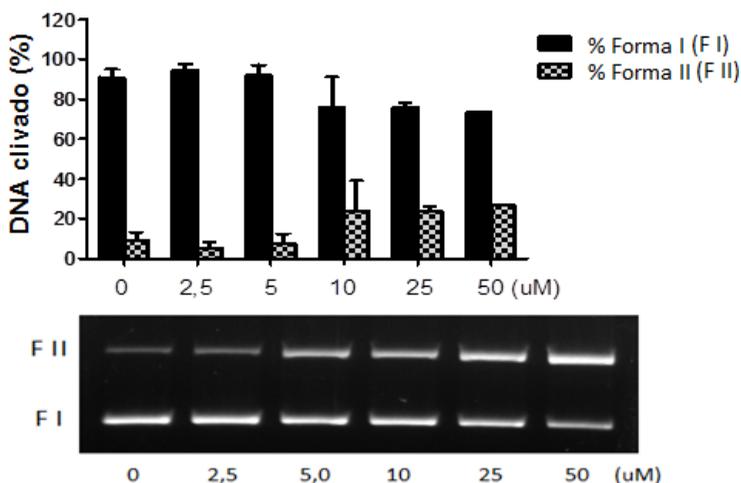


Figura 14. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 1 em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, $\sim 25 \mu\text{M}$; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 50 μM ; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

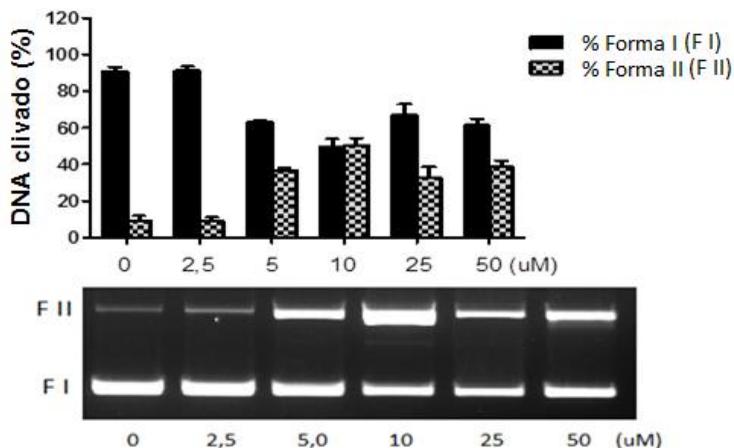


Figura 15. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo **2** em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 50 μ M; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

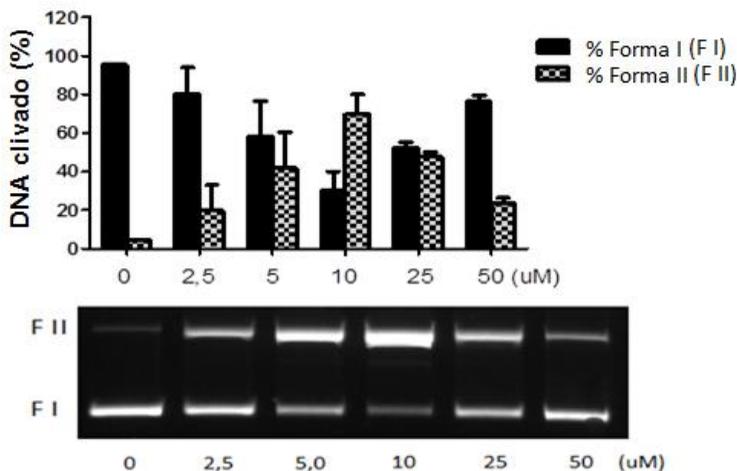


Figura 16. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo **3** em diferentes concentrações. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 50 μ M; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

Com base nos gráficos obtidos, é possível perceber que a concentração ótima de atividade dos complexos **2** e **3** é em torno de 10 μM . Para esses complexos a concentração de 25 μM apresentou queda de atividade, que se repetiu em maior proporção na concentração de 50 μM . Vale ressaltar que, salvo alguns poucos experimentos, de modo geral não houve precipitação das amostras mais concentradas nos poços dos géis, fato que poderia ter contribuído para a diminuição da atividade. Dessa forma a queda de atividade refere-se a um comportamento característico dos complexos e pode estar relacionada à geração de dímeros em solução.^{63,64} Esse tipo de comportamento repete-se para o complexo **1** porém, neste caso, as concentrações de 25 e 50 μM apresentaram clivagens semelhantes, evidenciando uma constante na atividade do complexo a partir de 25 μM .

A clivagem de DNA plasmidial observada para os controles, contendo apenas acetonitrila (0 μM de complexo), variou de 5% a 10% (Figuras 14, 15 e 16). Já os ensaios realizados na presença dos complexos aumentaram nitidamente a formação de Forma II do plasmídeo, indicando um ganho gradativo na atividade com o aumento da concentração. A análise dos diferentes gráficos também evidencia uma maior atividade dos complexos **2** e **3**, quando em comparação com o complexo **1**. Assim, enquanto para o complexo **1**, menos ativo, a formação de Forma II chegou a cerca de 30% em concentrações de 25 e 50 μM ; para os complexos **2** e **3**, com apenas 10 μM tivemos a formação de cerca de 50 e 75%, respectivamente, de plasmídeo na sua Forma II. Descontando a porcentagem de DNA clivado presente no controle, podemos atribuir um ganho de atividade de cerca de 20, 40 e 70%, para os complexos **1**, **2** e **3**, respectivamente.

Tais observações sugerem que os complexos seguem a ordem de atividade **3** > **2** > **1**. Assim, é possível assumir que as modificações no grupo triazínico central (adição de 1,4-butanodiamina e sua modificação com pireno) levam a um aumento na atividade dos complexos **2** e **3**, de forma que o complexo modificado com pireno parece possuir maior atividade - possivelmente pois a presença da molécula planar auxilia na ancoragem do complexo ao DNA. A obtenção das constantes catalíticas a partir de ensaios cinéticos, todavia, é necessária para confirmar tal ordem de atividade.

4.1.2 Efeito do pH

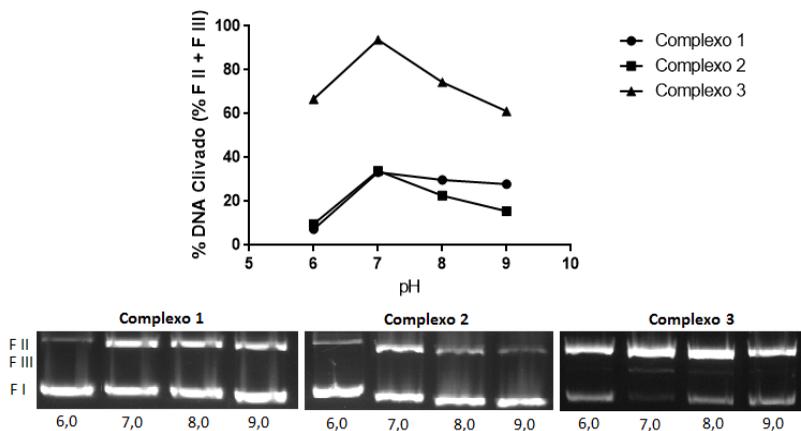


Figura 17. Clivagem de DNA plasmidial pelos complexos **1**, **2** e **3** sob diferentes condições de pH. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM - MES (pH 6,0), HEPES (pH 7,0 e 8,0), CHES (pH 9,0); [complexo] = 25 μ M (**1**) ou 15 μ M (**2** e **3**); Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas (**2** e **3**) e 16 h (**1**).

Após a realização dos testes iniciais de concentração, experimentos em diferentes pHs (6,0 a 9,0) foram feitos a fim de se determinar o pH ótimo reacional. Todos os complexos apresentaram perfil de atividade pH-dependente, indicando uma atividade máxima em pH = 7,0 (Figura 17). Tal resultado concorda com o observado inicialmente nos ensaios de atividade dos complexos como catecolase e indicam que a espécie ativa, que atua na clivagem de DNA em solução, é a que possui apenas uma ponte μ -hidroxo, predominante em pH 7,0.⁵⁸ O perfil de atividade (pH-dependente) apresentado pelos complexos pode indicar que a clivagem de DNA ocorre a partir de um mecanismo hidrolítico.^{65-68.}

A alteração do tampão de reação para Tris-HCl (pH 7,4) não alterou de forma significativa a atividade apresentada pelos complexos (dados não mostrados), sendo assim, todos os demais experimentos foram realizados em tampão HEPES, pH 7,0.

4.1.3 Efeito da força iônica

As interações eletrostáticas podem ser um dos mecanismos pelo qual a interação entre pequenas moléculas carregadas e o DNA ocorre. Sabendo que os complexos em estudo apresentam cargas positivas e considerando que os grupos fosfatos encontram-se carregados negativamente nas condições de reação (pH 7,0), podemos sugerir que as interações eletrostáticas entre os complexos e o DNA possam contribuir de alguma forma com a ligação e consequente clivagem de DNA pelos complexos.

Pela análise dos gráficos (Figuras 18, 19 e 20) é visível que a atividade dos complexos cai gradativamente com o aumento da força iônica do meio (aumento da concentração de NaCl). Tal diminuição pode indicar uma maior dificuldade dos complexos se ligarem ao DNA, uma vez que a adição de íons Na^+ acaba por neutralizar as cargas negativas dos grupos fosfato, de forma a tornar a estrutura do ácido nucléico mais rígida, dificultando a ligação dos complexos à cadeia. O mesmo efeito pode ser observado para outros complexos na literatura.^{57,69-73}

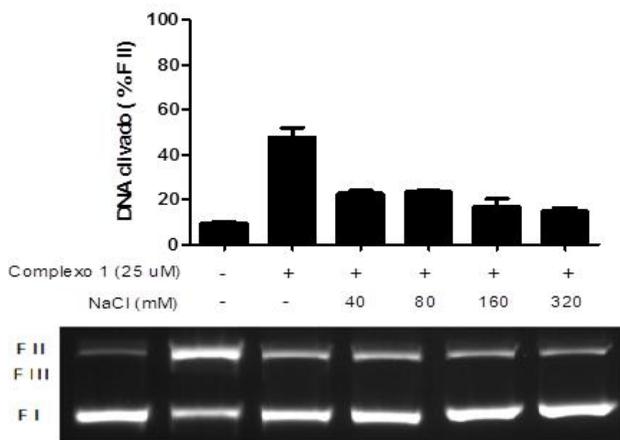


Figura 18. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 1 na ausência e presença de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μM ; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 25 μM ; [NaCl] = 0 a 320 mM; Temperatura = 37°C; tempo = 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

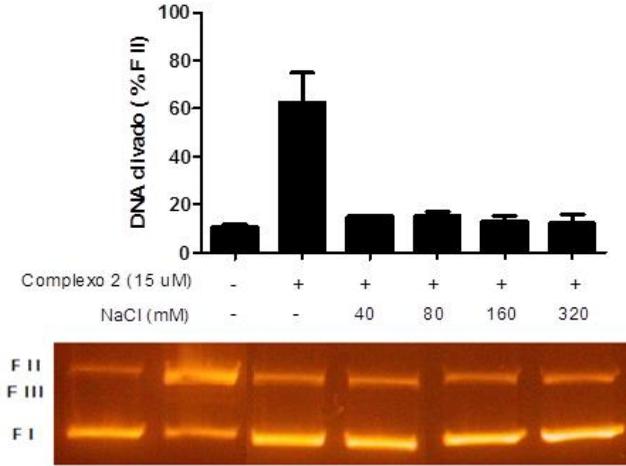


Figura 19. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 2 na ausência e presença de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μ M; [NaCl] = 0 a 320 mM; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

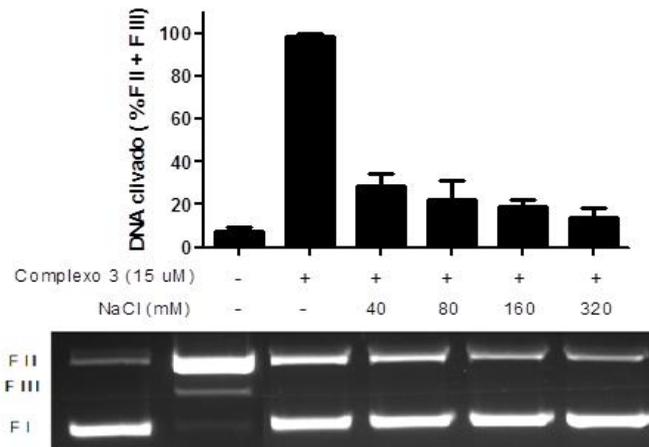


Figura 20. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 3 na ausência e presença de diferentes concentrações de NaCl. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μ M; [NaCl] = 0 a 320 mM; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

Ainda é possível notar que para o complexo **2**, a partir de 40 mM de NaCl, a porcentagem de Forma II gerada se iguala à apresentada pelo controle. Tal fato evidencia que **2** interage fortemente com o DNA por meio de atrações eletrostáticas, possivelmente por apresentar uma maior carga positiva devido ao grupo NH₂ da butanodiamina, que encontra-se protonado em pH 7,0.⁵⁸

4.1.4 Efeito dos bloqueadores de sulco

A forma B do DNA apresenta sulcos em sua superfície, os quais permitem a aproximação e acomodação de moléculas em seu interior. O sulco maior do DNA possui 11,7 Å de largura e 8,8 Å de profundidade, permitindo à moléculas biológicas, como as proteínas, uma maior aproximação e contato com as bases nitrogenadas, que encontram-se no interior na dupla-hélice.⁹ Já o sulco menor tem apenas 5,7 Å de largura e 7,5 Å de profundidade e é o preferido por algumas moléculas sintéticas, que devido à características estéricas e de tamanho, acomodam-se melhor nessa pequena cavidade do ácido nucléico.⁷⁴⁻⁷⁸

Nesse contexto, ensaios com a presença de moléculas que se ligam especificamente a cada um dos sulcos do DNA foram feitos, a fim de determinar se os complexos em estudo apresentam alguma preferência nesse sentido. Assim, a netropsina foi utilizada como bloqueador do sulco menor,^{79,80} enquanto que o verde de metila foi utilizado como bloqueador do sulco maior.⁸¹ Para garantir a interação entre os bloqueadores e os respectivos sulcos no DNA, as amostras incubadas com netropsina e verde de metila ficaram em repouso por 30 minutos antes da adição dos complexos.

As informações apresentadas no gráfico (Figura 21) apontam para uma preferência dos três complexos pelo sulco menor do DNA, uma vez que os ensaios contendo netropsina apresentaram cerca de 10, 20 e 30 % menos DNA clivado, respectivamente, para os complexos **1**, **2** e **3**, que os ensaios na ausência do bloqueador de sulco. Os ensaios com verde de metila não apresentaram mudanças significativas na porcentagem de DNA clivado pelos complexos.

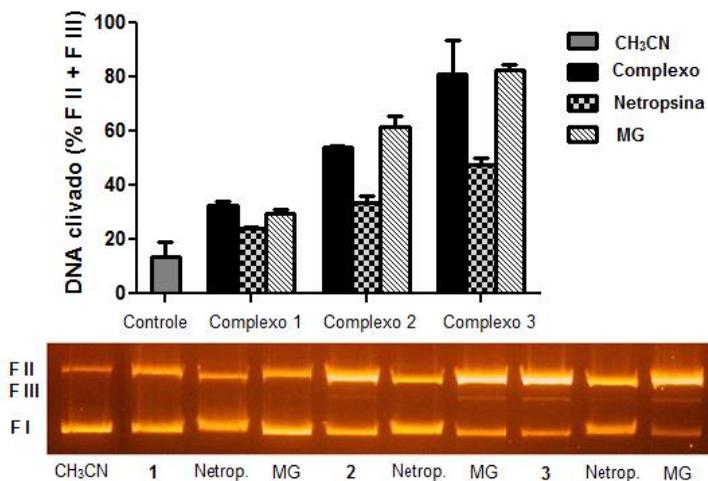


Figura 21. Clivagem de DNA plasmidial pelos complexos 1, 2 e 3 na ausência e presença de diferentes bloqueadores dos sulcos de DNA. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 25 μ M (1) ou 15 μ M (2 e 3); [Netropsina] = 50 μ M; [Verde de Metila] = 50 μ M; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas (2 e 3) ou 16 horas (1). Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

Os ensaios com inibidores de sulco e de variação da força iônica apontam para um mecanismo de interação complexo-DNA que compreende a ligação ao sulco menor e a participação das cargas positivas apresentadas pelos complexos, especialmente 2 e 3, e das cargas negativas dos grupos fosfatos presentes no esqueleto do DNA. Tal comportamento assemelha-se ao apresentado por aminas biogênicas, tal como a putrescina (1,4-butanodiamina), as quais são capazes de se ligar ao DNA pelo sulco menor através da interação do grupo NH_3^+ com o oxigênio das bases nitrogenadas ou com grupos fosfatos presentes no meio.⁸²⁻⁸⁴ Como o complexo 2 apresenta em sua estrutura uma molécula de 1,4-butanodiamina, e essa modificação aparentemente altera a atividade do complexo (em relação ao complexo 1) é possível supor que o complexo 2 se liga ao DNA através do grupo positivamente carregado NH_3^+ , tal como ocorre na molécula de 1,4-butanodiamina livre. Tal hipótese corrobora os

resultados de força iônica, que apresentam uma forte dependência da interação entre cargas na ligação do complexo **2** ao DNA.

4.1.5 Efeito dos inibidores de ERO

Os ensaios com inibidores de espécies reativas de oxigênio são necessários pois, diferentemente das enzimas, que apenas clivam o DNA de forma hidrolítica, alguns complexos são capazes de clivar o DNA por meio da geração de radicais e outras moléculas reativas contendo oxigênio. Complexos de cobre e ferro são amplamente descritos na literatura como oxidativos,^{24,25} dessa forma, o estudo do mecanismo de ação dos complexos é necessário para se buscar um melhor entendimento de como ocorre a interação e consequente clivagem de DNA por intermédio deles.

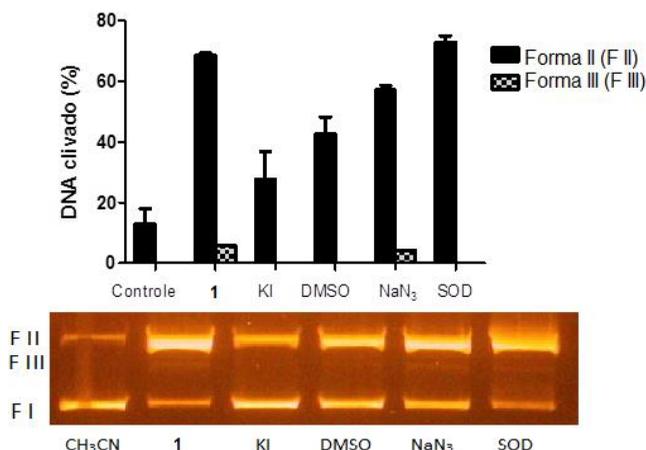


Figura 22. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo **1** na ausência e presença de diferentes inibidores de ERO. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 25 μ M; [KI] = 2,5 mM; [DMSO] = 2 M; [NaN₃] = 2,5 mM; [SOD] = 10 unidades; Temperatura = 37°C; tempo = 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

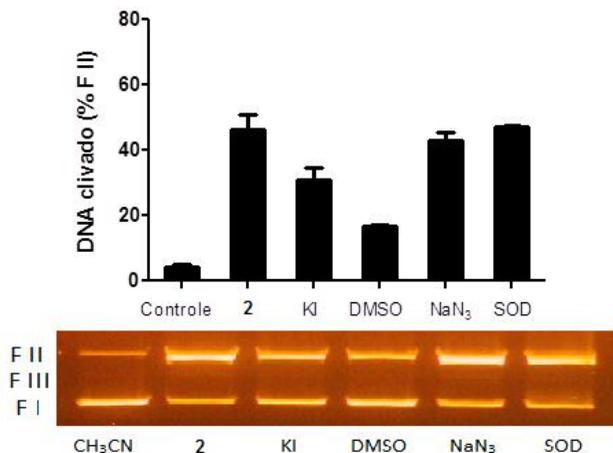


Figura 23. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 2 na ausência e presença de diferentes inibidores de ERO. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μ M; [KI] = 2,5 mM; [DMSO] = 2 M; [NaN₃] = 2,5 mM; [SOD] = 10 unidades; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

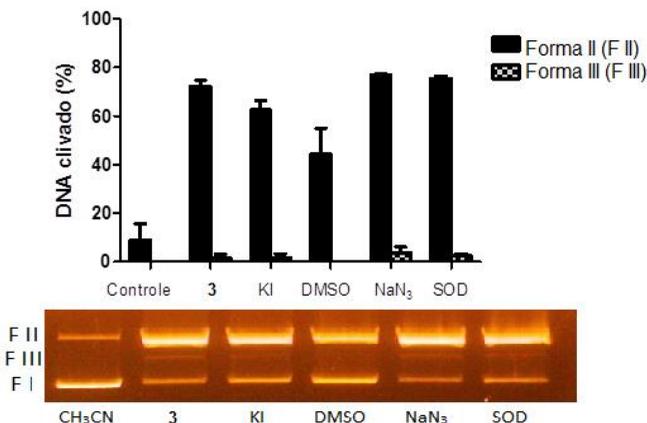
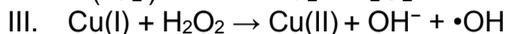
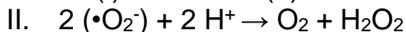
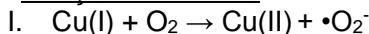


Figura 24. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 3 na ausência e presença de diferentes inibidores de ERO. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μ M; [KI] = 2,5 mM; [DMSO] = 2 M; [NaN₃] = 2,5 mM; [SOD] = 10 unidades; Temperatura = 37°C; tempo = 8 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

Dos quatro sequestradores de ERO utilizados nesse estudo, dois reagem com espécies radiculares, são eles: DMSO (dimetilssulfóxido), sequestrador de radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$) e a enzima superóxido dismutase (SOD), sequestrador do ânion radical superóxido ($\bullet\text{O}_2^-$). Já o NaN_3 (azida sódica) atua como sequestrador de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), forma excitada do oxigênio molecular, enquanto que o KI atua na decomposição de peróxidos (ROOH).³⁶ A análise dos dados obtidos (Figuras 22, 23 e 24) nos permite visualizar que os inibidores que mais atuaram na redução da atividade dos complexos foram KI e DMSO. A queda de atividade dos complexos nas reações contendo tais inibidores indica que há a participação de peróxidos e radicais hidroxila nos mecanismos de clivagem do DNA pelos complexos. No caso do complexo **1** o efeito de redução da atividade é mais evidente e se estende também à azida sódica, indicando que a espécie reativa oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) provavelmente também está presente no processo de clivagem do DNA.

A geração de ERO por metais de transição como o Cu(II) pode se dar por meio de diversas reações. Na presença de um agente redutor, como ascorbato ou DTT, e um agente oxidante, como H_2O_2 , a principal via utilizada por complexos de Cu(II) na clivagem oxidativa do DNA é uma reação tipo-Fenton (reação III), onde o metal é primeiramente reduzido e reage com peróxido de hidrogênio gerando radicais hidroxila ($\bullet\text{OH}$).⁸⁵ Já na presença somente de um agente redutor, outras reações estão envolvidas no processo. Neste caso, o metal reduzido pode reagir com o oxigênio molecular gerando radicais superóxido (reação I), que rapidamente dismutam a peróxido de hidrogênio (reação II), os quais participam na geração de $\bullet\text{OH}$ (reação III). Tal sequência de reações é conhecida como Reação de Fenton.³¹

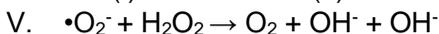
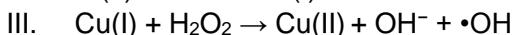
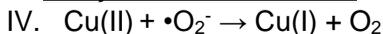
- Reação de Fenton:



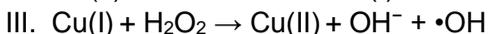
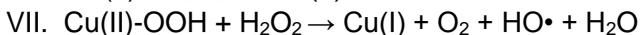
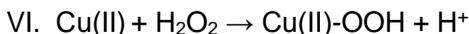
Outras reações podem ocorrer em paralelo, como a Reação de Haber-Weiss,³¹ onde o metal em seu estado oxidado reage com espécies superóxidos geradas primeiramente, levando à redução do centro metálico e à liberação de oxigênio molecular (reação IV). Após, a reação entre Cu(I) e peróxido leva à formação

de Cu(II) e de íons e radicais hidroxila (reação III). Por fim, as espécies radicalares de superóxido remanescentes reagem com o peróxido para gerar mais uma vez oxigênio molecular e íons hidroxila (reação V).

- Reação de Haber-Weiss:



O Cu(II) pode gerar ERO na presença somente de H₂O₂ ainda por outro mecanismo,⁸⁶ a partir da reação entre Cu(II) e H₂O₂, gerando uma espécie tipo metal-peróxido (reação VI). Este por sua vez reage com outra molécula de H₂O₂ formando um equivalente de Cu(I) e o radical HO• (reação VII). Em condições de excesso de peróxido, o Cu(I) pode reagir com o oxidante, gerando novamente radicais hidroxila (reação III).



No caso dos complexos em estudo a adição de um agente redutor e/ou oxidante não foi necessária pois os complexos apresentaram atividade mesmo na ausência de qualquer correagente. Na literatura, não são muitos os complexos que apresentam tal propriedade.^{36,73,87-93} Nesse contexto, o trabalho de Oliveira e colaboradores demonstra que o complexo Cu(II)₂-BMXD (onde “BMXD” é o ligante 3,6,9,17,20,23-hexaazatriciclo [23.3.1.1^{11,15}]-triacenta-1(29),11(30),12,14,25,27-hexano) sofre redução pelo próprio DNA em solução, sendo capaz de clivar o DNA a partir da geração de ERO, possivelmente pelas reações I, II e III.⁹¹

Os dados obtidos até aqui apontam para um mecanismo de clivagem de DNA pelos complexos semelhante ao do complexo [Cu(phen)₂]²⁺, reportado por Sigman em 1979. Assim, pode-se propor que os centros metálicos de Cu(II) são reduzidos *in situ* a Cu(I), se ligando ao sulco menor do DNA e combinando-se com oxigênio molecular para gerar espécies oxidantes que atuam sobre a deoxirribose²⁶ ou sobre as bases nitrogenadas²⁵ induzindo

quebras às fitas do ácido nucléico. Nesse contexto, um ataque preferencial aos hidrogênios da desoxirribose, principalmente aos H-1, H-4 e H-5 (Figura 25) faz-se um mecanismo bastante provável. A posição do H-1 é de difícil acesso para a maioria das moléculas, pois este encontra-se localizado no interior do sulco menor do DNA. Para moléculas que se ligam preferencialmente ao sulco menor, entretanto, a posição torna-se um alvo fácil, uma vez que os radicais hidroxila são gerados no interior do sulco, de forma a ficarem orientados para H-1.^{24,26} Os hidrogênios H-4 e o H-5 também são possíveis alvos das ERO geradas no interior do sulco menor. Nesse contexto, complexos como Fe-BLMs são capazes de clivar o DNA a partir da geração de espécies metal-oxo reativas (*RMOS*, sigla em inglês) como $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-OOH}$ ou $\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$, que atacam o H-4 do açúcar, após ligação do complexo ao sulco menor do DNA.^{24,94} O mecanismo simplificado de quebra das fitas a partir do ataque de EROs à H-1, H-4 e H-5 encontram-se expostos na Figura 26. A geração de radicais hidroxila também possibilita a clivagem de DNA a partir da ação sobre as bases nitrogenadas do DNA, uma vez que sabe-se que se radicais hidroxila forem gerados próximos ao DNA e a este estiver afixado um metal poderão ocorrer modificações nas bases nitrogenadas levando à mutação do ácido nucleico.³¹

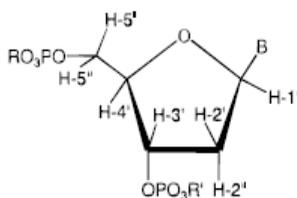


Figura 25. Os hidrogênios da desoxirribose. Figura extraída da Referência 26.

A partir da observação dos gráficos expostos nas Figuras 22, 23 e 24 é possível perceber que a atividade dos complexos na presença de KI e DMSO não diminui completamente, de forma que podemos constatar que a ausência de espécies como peróxidos e radicais hidroxila ainda permite aos complexos alcançar uma clivagem de cerca de 40 a 60% (dependendo do complexo). Tal observação nos remete à possibilidade de os complexos apresentarem um mecanismo misto, onde além da componente

oxidativa, haja também uma componente hidrolítica no processo de clivagem do DNA,⁹⁵ o que justificaria também os dados obtidos nos ensaios de pH.

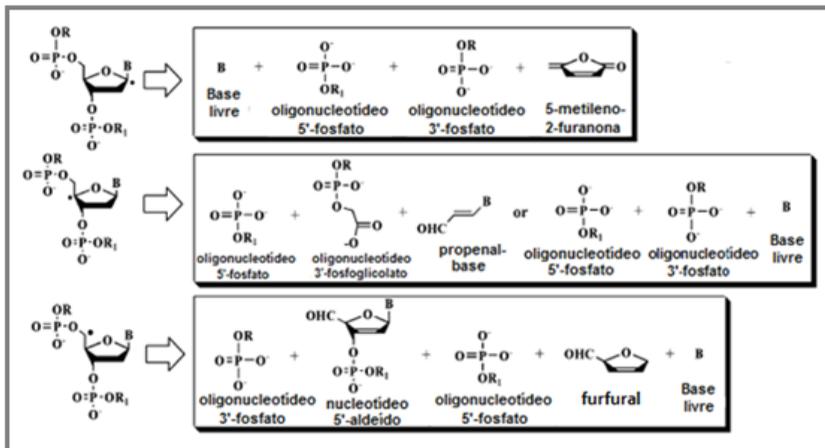


Figura 26. Produtos de clivagem gerados a partir da abstração dos hidrogênios 1 (H-1), 4 (H-4) e 5 (H-5) da desoxirribose. Figura extraída da referência 24.

4.1.6 Ensaio sob atmosfera de Argônio

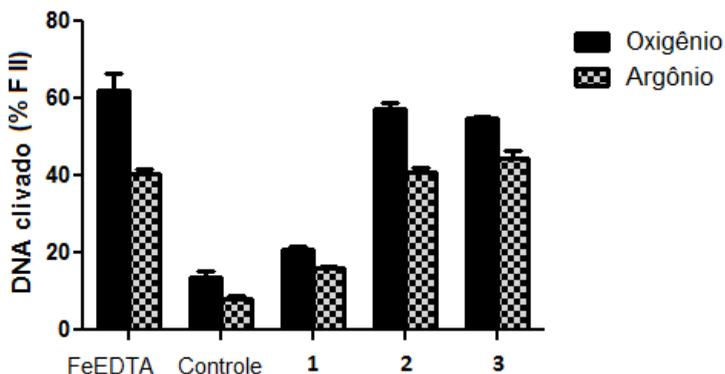


Figura 27. Clivagem de DNA plasmidial pelos complexos 1, 2 e 3 na ausência e presença de oxigênio. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 25 μ M (1) ou 15 μ M (2 e 3); Temperatura = 50°C; tempo = 4 horas. Resultados

expressos como média \pm desvio padrão de dois experimentos independentes.

Os ensaios sob atmosfera de argônio (Figura 27) confirmam os resultados obtidos nos ensaios com inibidores de ERO. Os complexos apresentam menor atividade quando a reação é feita na ausência de oxigênio, indicando que a presença de oxigênio, de fato, potencializa a atividade dos complexos, possivelmente pela geração de espécies reativas de oxigênio tais quais peróxidos e radicais hidroxila, como indicado nos ensaios com os inibidores KI e DMSO.

A atividade dos complexos na ausência e presença de oxigênio, entretanto, não mostrou-se tão contrastante. Mesmo na ausência de oxigênio os complexos apresentaram uma atividade moderada, com cerca de 15% (complexo **1**) e 40% (complexos **2** e **3**) de Forma II, após 4 horas de reação. Vale ressaltar que a condição de maior atividade dos complexos se faz em 16 horas (complexo **1**) ou 8 horas (complexos **2** e **3**), de forma que a baixa atividade apresentada, principalmente pelo complexo **1**, está relacionada à redução do tempo de reação. A condição de 4 horas é necessária pois o dessecador em que as amostras ficam no ensaio sob atmosfera de argônio segura o vácuo (necessário para que as amostras não tenham contato com oxigênio) somente por esse período de tempo, de modo que reações mais longas acarretariam em condições experimentais impróprias.

Com base nos dados e considerações expostas acima, pode-se concluir que os complexos atuam sobre o DNA com uma forte componente oxidativa, a partir da geração de radicais hidroxila ou através da formação de peróxidos, mesmo na ausência de um correagente (reduzidor). A baixa diferença de atividade entre os ensaios na ausência e presença de oxigênio, porém, impossibilita descartar uma componente hidrolítica no mecanismo de clivagem de DNA pelos complexos, de forma que outros experimentos seriam necessários para descartar tal hipótese. Outro mecanismo possível, tendo em vista os resultados apresentados, seria assumir que os complexos apresentam mecanismo oxidativo mesmo na ausência de oxigênio, tal como ocorre com a Fe-bleomicina.²⁶ Os resultados obtidos nos ensaios de pH, entretanto, fomentam a presença da componente hidrolítica. Neste contexto, a realização de ensaios com T4-ligase ou na presença de batocuproína (molécula capaz de quelar Cu(I))

poderiam evidenciar com maior clareza o mecanismo de ação dos complexos sobre o plasmídeo.³⁶

4.1.7 Ensaios cinéticos

Os ensaios cinéticos foram realizados a partir do tratamento do plasmídeo com os complexos em concentrações distintas sendo que, para cada concentração, o tempo de reação variou de 0 a 16 horas (Metodologia 3.3.6). A partir desses ensaios foram feitos gráficos do logaritmo neperiano da porcentagem de DNA intacto ($\ln \% \text{ Forma I}$) em função do tempo de reação (em horas), de forma que o coeficiente angular dos gráficos obtidos nos forneceu as constantes observadas de clivagem de DNA (k_{obs}) para diferentes concentrações de complexo. Após, um gráfico com os valores de k_{obs} em função da sua respectiva concentração nos forneceu o perfil cinético característico de cada um dos complexos em estudo.²⁷

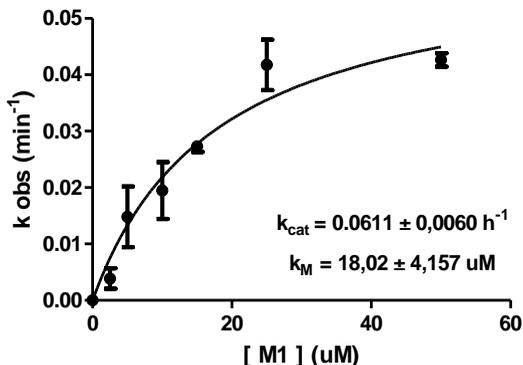


Figura 28. Gráfico dos valores de k_{obs} em função da concentração. Os valores de k_{obs} foram gerados a partir do coeficiente angular dos gráficos do logaritmo neperiano da fração intacta do DNA plasmidial vs. tempo de reação, após o tratamento do DNA com o complexo 1, em diferentes concentrações e tempos reacionais. Dentro de cada gráfico estão presentes o k_M e o k_{cat} estimados para o complexo 1. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μM ; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 50 μM . Temperatura = 37°C; tempo = 0 a 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes.

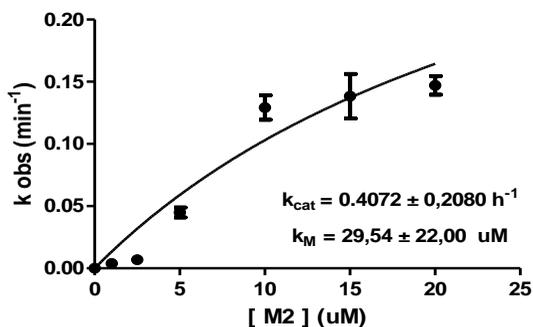


Figura 29. Gráfico dos valores de k_{obs} em função da concentração - gerado a partir do tratamento dos dados com a Equação de Michaelis-Menten. Os valores de k_{obs} foram gerados a partir do coeficiente angular dos gráficos do logaritmo neperiano da fração intacta do DNA plasmidial vs. tempo de reação, após o tratamento do DNA com o complexo 2, em diferentes concentrações e tempos reacionais. Dentro de cada gráfico estão presentes o k_M e o k_{cat} estimados para o complexo 2. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 20 μ M. Temperatura = 37°C; tempo = 0 a 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes.

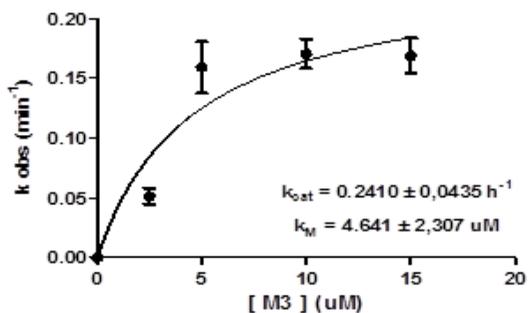


Figura 30. Gráfico dos valores de k_{obs} em função da concentração - gerado a partir do tratamento dos dados com a Equação de Michaelis-Menten. Os valores de k_{obs} foram gerados a partir do coeficiente angular dos gráficos do logaritmo neperiano da fração intacta do DNA plasmidial vs. tempo de reação, após o tratamento do DNA com o complexo 3, em diferentes concentrações e tempos reacionais. Dentro de cada gráfico estão presentes o k_M e o k_{cat} estimados para o complexo 3. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 20 μ M. Temperatura = 37°C; tempo = 0 a 16 horas.

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

Os gráficos de k_{obs} vs. concentração (dos complexos) foram obtidos a partir do tratamento dos dados com a equação de Michaelis-Menten, usualmente utilizada em ensaios de atividade enzima-substrato, e admitindo-se uma condição de pseudo-primeira ordem, uma vez que há excesso de complexo em relação ao substrato (DNA). Assim, assumindo que o DNA é o substrato e que o complexo comporta-se como uma enzima, foi possível extrair do gráfico hiperbólico apresentado pelos complexos as constantes de velocidade (k_{cat}) e de Michaelis-Menten (k_M) associadas a atividade de cada um deles. Um ponto deve ser considerado nesse contexto: ensaios com enzimas reais geralmente são realizados de forma que a concentração do catalisador é constante e varia-se a concentração de substrato, já nos ensaios com DNA é a concentração de ácido nucleico (substrato) que fica constante, variando-se a concentração de complexo. Assim, o perfil obtido caracteriza-se como de pseudo-Michaelis-Menten⁹⁶ e as constantes calculadas a partir dos gráficos devem ser comparadas apenas com complexos que sigam as mesmas especificações experimentais, uma vez que tal abordagem leva a valores diferentes daqueles obtidos a partir do tratamento experimental clássico que visa manter a concentração do agente catalítico constante.²⁷

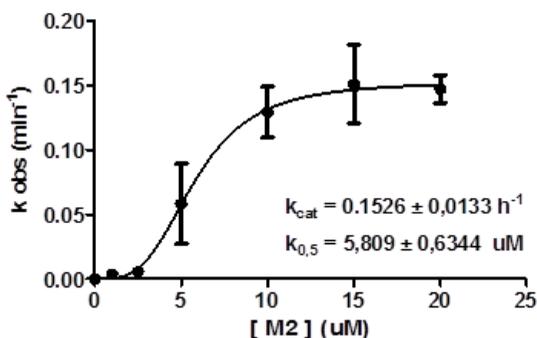


Figura 31. Gráfico dos valores de k_{obs} obtidos em diferentes concentrações - gerado a partir do tratamento dos dados com a Equação de Hill. Os valores de k_{obs} foram gerados a partir do coeficiente angular dos gráficos do logaritmo neperiano da fração intacta do DNA plasmidial vs. tempo de reação, após o tratamento do DNA com o complexo 2, em

diferentes concentrações e tempos reacionais. Dentro de cada gráfico estão presentes o k_M e o k_{cat} estimados para o Complexo 2. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μM ; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 20 μM . Temperatura = 37°C; tempo = 0 a 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes.

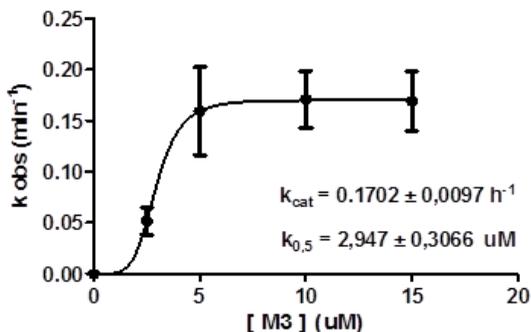


Figura 32. Gráfico dos valores de k_{obs} obtidos em diferentes concentrações - gerado a partir do tratamento dos dados com a Equação de Hill. Os valores de k_{obs} foram gerados a partir do coeficiente angular dos gráficos do logaritmo neperiano da fração intacta do DNA plasmidial vs. tempo de reação, após o tratamento do DNA com o complexo 3, em diferentes concentrações e tempos reacionais. Dentro de cada gráfico estão presentes o k_M e o k_{cat} estimados para o Complexo 3. Condições reacionais: [DNA] = 330 ng, ~25 μM ; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 2,5 a 15 μM . Temperatura = 37°C; tempo = 0 a 16 horas. Resultados expressos como média \pm desvio padrão de quatro experimentos independentes.

A utilização da equação de Michaelis-Menten para o tratamento dos dados obtidos nos forneceu uma curva com R^2 superior a 0,9, indicando um grau aceitável de confiabilidade dos dados obtidos, apenas para o complexo 1 (Figura 28). Já para os complexos 2 e 3 (Figuras 29 e 30) os valores de R^2 ficaram em torno de 0,8 e 0,6, respectivamente, indicando que os dados obtidos não se adequam ao perfil hiperbólico, o que pode indicar que tais complexos apresentam um mecanismo diferente de catálise do DNA. Assim, tendo em vista que a observação dos pontos expostos nos gráficos de 2 e 3 direcionava para uma curva de perfil sigmoide, utilizou-se a equação de Hill, usualmente utilizada no tratamento dos dados obtidos em ensaios de atividade de enzimas alostéricas,⁹⁷ no tratamento dos dados cinéticos

obtidos para os complexos (Figuras 31 e 32). Nesse contexto, os valores de R^2 observados para os complexos **2** e **3** subiram para 0,9 e 0,8, respectivamente, indicando que a equação utilizada era mais adequada ao tratamento dos dados.

$$\frac{v}{v_{\text{máx}}} = \frac{[S]^n}{(k_{0,5})^n + [S]^n}$$

Equação 1. A equação de Hill

Na equação de Hill o termo $(k_{0,5})^n$ deriva matematicamente da constante apresentada originalmente para a equação.⁹⁷ Tal termo nos oferece uma constante que representa a concentração necessária para se alcançar o valor da metade da velocidade máxima, tal como o k_M da equação de Michaelis-Menten.⁹⁰ Assim, a equação de Hill nos fornece um gráfico de perfil sigmoidal, cuja interpretação é semelhante ao gráfico obtido pela equação de Michaelis-Menten.

A Equação 1 apresenta ainda uma terceira variável além de $k_{0,5}$ e $v_{\text{máx}}$. O índice “n” nos indica a capacidade de cooperatividade de uma enzima, de forma que se $n = 1$ não há alosteria e/ou cooperatividade.⁹⁷ Neste caso, os valores obtidos através das equações de Hill e Michaelis-Menten serão os mesmos já que, matematicamente, o que difere as duas equações é justamente o índice “n” e qualquer número elevado a 1 (um) se mantém igual. Caso n seja maior que 1 diz-se que há cooperatividade positiva, ou seja, a ligação de uma ou mais moléculas iniciais aumenta a afinidade da enzima pelos substratos que se ligarão em seguida. Já se n é menor que 1, a cooperatividade é negativa, de forma que a ligação de uma molécula inicial diminui a afinidade da enzima por novos substratos.⁹⁸ Assim, as enzimas ditas alostéricas são aquelas cuja ligação de uma molécula inicial de substrato altera a conformação e, conseqüentemente, a afinidade do sistema por novas moléculas. Um sítio alostérico seria uma região da enzima à qual uma molécula inicial se liga, alterando a conformação da mesma. Já a cooperatividade seria uma conseqüência da alosteria, indicando se a interação afeta positivamente ou negativamente a afinidade da enzima pela molécula alvo.⁹⁸

No caso de ensaios com DNA, podemos perceber que a atividade do complexo **1** aumenta gradualmente de acordo com o aumento da quantidade de moléculas, até que todos os sítios de ligação complexo-DNA estejam saturados, de forma que a velocidade da reação estaciona num patamar máximo. Já para os complexos **2** e **3**, podemos sugerir que as moléculas de complexo que se ligam inicialmente ao DNA alteram a conformação do ácido nucléico, de forma que a afinidade do DNA pelas próximas moléculas aumenta, evidenciando o ganho rápido de atividade apresentado pelo perfil sigmoidal. Ambos os complexos apresentaram $n > 1$, o que indica cooperatividade positiva, concordando com os dados de $k_{0,5}/k_M$, uma vez que os complexos **2** e **3** apresentam baixos valores de $k_{0,5}$, indicando uma rápida saturação dos sítios de interação DNA-complexo, apesar do aumento na constante de velocidade k_{cat} ($V_{máx}$) quando comparados ao complexo **1**.

Os valores de k_{cat} obtidos para os complexos (**1**, pelo tratamento dos dados via Equação de Michaelis-Menten; **2** e **3** pelo tratamento dos dados utilizando a Equação de Hill) apresentam-se de acordo com os valores apresentados na literatura para complexos de cobre⁹⁹⁻¹⁰² e resultam em um aumento de 1,7 a $4,7 \times 10^6$ vezes na velocidade de clivagem das ligações fosfodiéster em comparação à reação não-catalisada.

4.2 Ensaios de clivagem direta com sondas fluorescentes de DNA

Os ensaios de clivagem direta em gel de alta resolução apresentaram resultados interessantes quanto à especificidade de clivagem dos complexos. Analisando inicialmente o gel relativo à sonda ATCG, verificou-se que o complexo **2** parece clivar o DNA preferencialmente na região próxima ao *hairpin*, o que fica evidenciado pelas bandas mais intensas, destacadas na Figura 34. Os complexos **1** e **3**, entretanto, apresentaram padrão de clivagem semelhante ao do controle. É importante ressaltar que o tempo de reação é bastante longo nos ensaios de clivagem direta, de forma que o controle com acetonitrila se faz necessário para distinguir regiões frágeis, e suscetíveis à clivagem espontânea, de regiões relativas aos cortes atribuídos à ação dos complexos.

Devido aos resultados obtidos com a sonda ATCG, outras sondas foram sintetizadas visando o melhor entendimento da

especificidade evidenciada pelo complexo **2** nos ensaios iniciais (Figura 33). Assim, a sonda C1 apresenta uma região não-pareada localizada mais ao centro do oligonucleotídeo, enquanto que as sondas C2 e C3 apresentam alterações no tamanho do *hairpin* e no tipo de base pirimidínica que o compõe, respectivamente. Já a sonda C4 foi sintetizada como uma dupla-fita de sequência idêntica à sonda ATCG, visando descartar a possibilidade de o complexo apresentar preferência apenas pela sequência de bases da região e não pela estrutura do *hairpin* em si. Vale ressaltar que a sonda C4 é a única com marcação fluorescente na extremidade 3' já que as bandas mais intensas observadas no gel da sonda ATCG apresentaram-se no início do *hairpin*, na região mais próxima à extremidade 3'.

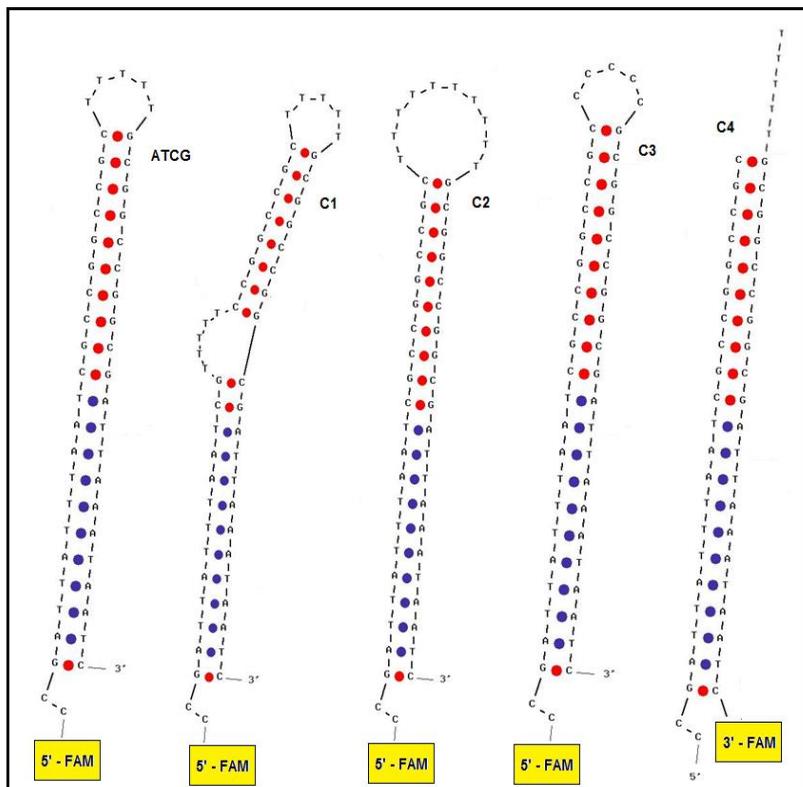


Figura 33. Representação esquemática das sondas fluorescentes utilizadas nos ensaios de clivagem direta de alta resolução.

A análise dos géis obtidos nos ensaios com as diferentes sondas evidenciou a preferência do complexo **2** por regiões do tipo *hairpin* composto por bases “timina”. O gel relativo ao ensaio com a sonda C3 (Figura 37), onde as bases timina foram substituídas por citosina, evidencia tal preferência, uma vez que a região de clivagem observada para a sonda ATCG (Figura 34) não se repete para C3. O tamanho do *hairpin* também altera a clivagem das sondas pelo complexo **2**. Em um *hairpin* de cinco bases (sonda ATCG) o complexo parece atuar nos dois extremos da região não-pareada, já para um *hairpin* maior (10 bases – C2, Figura 36) apenas a região mais próxima à extremidade 3' apresentou bandas de clivagem mais intensas. O ensaio com a sonda C4 (Figura 38) confirma que a especificidade do complexo está ligada à presença do *hairpin*, uma vez que nenhum padrão de corte foi evidenciado no gel relativo à clivagem da sonda sem tal estrutura. A sonda C1 apresentou padrão de clivagem semelhante à sonda ATCG na região do *hairpin*, porém, a segunda região não-pareada adicionada em C1 não apresentou os mesmos padrões de corte (Figura 35). Dessa forma, pode-se concluir que o complexo **2** têm preferência por clivar *hairpins*, mas a preferência não estende-se à outras regiões não-pareadas.

A preferência apresentada pelo complexo **2** parece ter relação com a carga positiva presente no grupo NH_3^+ da butanodiamina ancorada ao grupo triazínico central. Estudos de interação entre a molécula 1,4-butanodiamina e o DNA apontam para uma preferência de ligação do grupo NH_3^+ em relação ao oxigênio da base nitrogenada “timina” e a grupos fosfatos presentes no sulco menor. Como no complexo **2** a amina protonada apresenta-se livre, tal como na molécula original, pode-se propor que a especificidade de ligação e clivagem em regiões com *hairpin* compostos por bases timina se dê por meio de mecanismo semelhante.⁸²

Além da especificidade apresentada pelo complexo **2**, outras observações interessantes também puderam ser extraídas dos géis analisados. Primeiramente, é interessante notar que o complexo **3**, o mais ativo nos ensaios com plasmídeo, não demonstrou a mesma atividade nos ensaios com as sondas. Vale ressaltar, porém, que a atividade do complexo **2** restringe-se a uma quebra específica, em uma região do tipo *hairpin*, não encontrada em plasmídeos. Nas demais regiões da sonda os três

complexos não apresentaram clivagem, mesmo após 48 horas de reação.

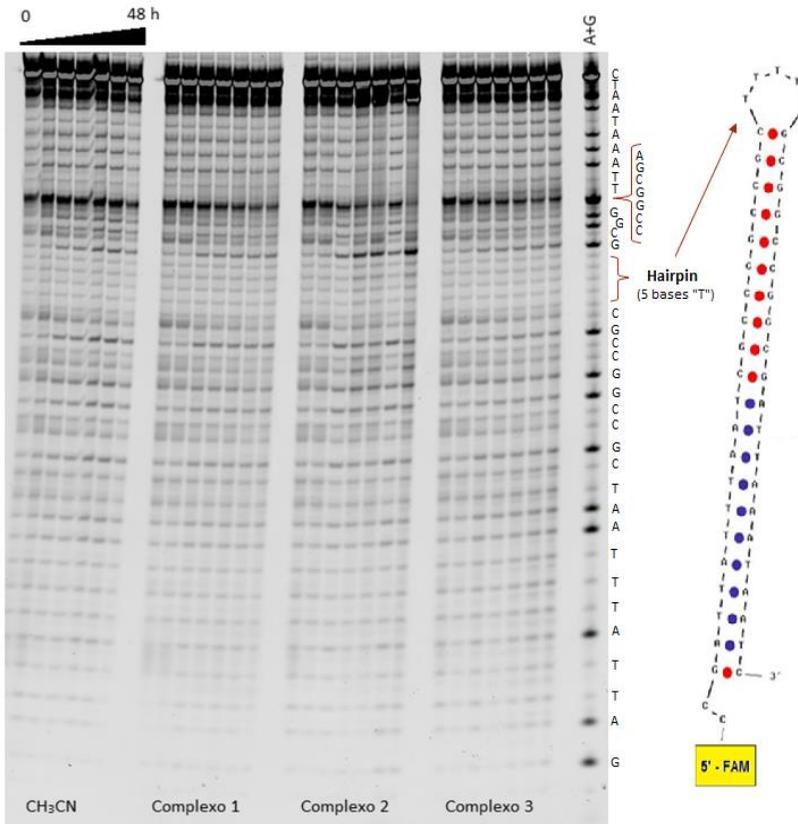


Figura 34. Clivagem da sonda fluorescente ATCG pelos complexos 1, 2 e 3. Condições reacionais: [DNA] = 25 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 15 μ M, tempo = 0 a 48 horas. Um controle na ausência de complexo foi feito, seguindo as mesmas condições reacionais. A última canaleta refere-se marcador Maxam-Gilbert de bases A+G.

A segunda observação diz respeito à região inferior dos géis. Analisando com atenção é possível perceber que as bandas de clivagem apresentam-se duplas nessa região, evidenciando que dois produtos estão sendo formados na clivagem das sondas

referem-se aos nucleotídeos 3'-fosfato, já as bandas em vermelho referem-se possivelmente aos nucleotídeos com terminação 3'-fosfoglicolato.

4.3 Dicroísmo Circular

A espectroscopia de dicroísmo circular é uma técnica útil para a visualização de alterações na estrutura secundária do DNA, visto que as bandas em 275 nm (positiva) e 248 nm (negativa), associadas ao empilhamento das bases nitrogenadas e à helicidade direita da forma B do DNA, respectivamente, são bastante sensíveis à interação do ácido nucleico com pequenas moléculas, podendo fornecer informações importantes à respeito do mecanismo de interação complexo-DNA.

Os resultados dos ensaios com os complexos **1**, **2** e **3** encontram-se expostos nas Figuras 40, 41 e 42, respectivamente. A adição de concentrações crescentes do complexo **1** à amostra de CT-DNA na razão [complexo]/[DNA] de 0,1 a 0,7 resultou na diminuição da intensidade das bandas características em 275 e 248 nm. Na banda positiva observou-se ainda um deslocamento batocrômico de 275 para 282 nm. A banda em 248 nm não apresentou alterações significativas quanto ao deslocamento, embora sua intensidade tenha diminuído com a adição do complexo.

A titulação de CT-DNA com o complexo **2** na razão [complexo]/[DNA] de 0,1 a 0,7 forneceu resultados semelhantes ao observado para o complexo **1**, com diminuição na intensidade de ambas as bandas e com deslocamento batocrômico de 275 para 281 nm para a banda positiva. Para o complexo **2**, porém, houve um pequeno deslocamento na banda negativa do espectro. Nesse caso, o controle apresentou um pico de 243 nm, enquanto que a última titulação apresentou maior absorbância em 247 nm.

A titulação de CT-DNA com o complexo **3**, nas mesmas condições já citadas para os complexos **1** e **2**, apresentou um menor deslocamento da banda positiva, de 275 para 279 nm. Já o deslocamento da banda negativa foi de 243 para 247 nm e a diminuição de ambas as bandas repetiu-se. Com os dados obtidos podemos afirmar que os complexos em estudo afetam a estrutura secundária do DNA.

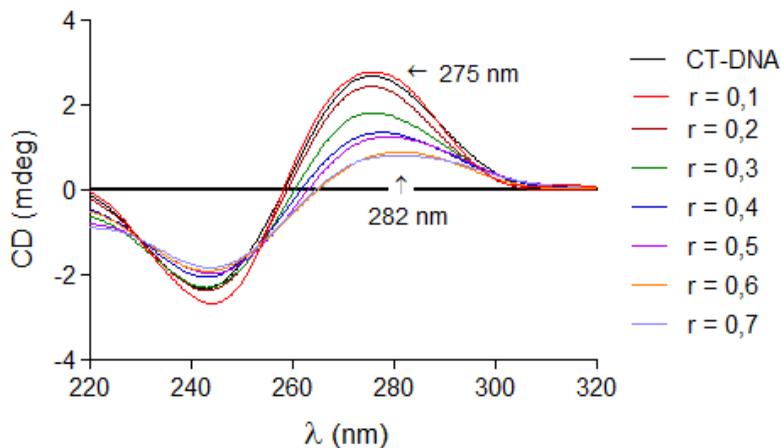


Figura 40. Espectro de dicroísmo circular de DNA na ausência e presença do complexo **1**. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 75 μ M; Temperatura = 37°C.

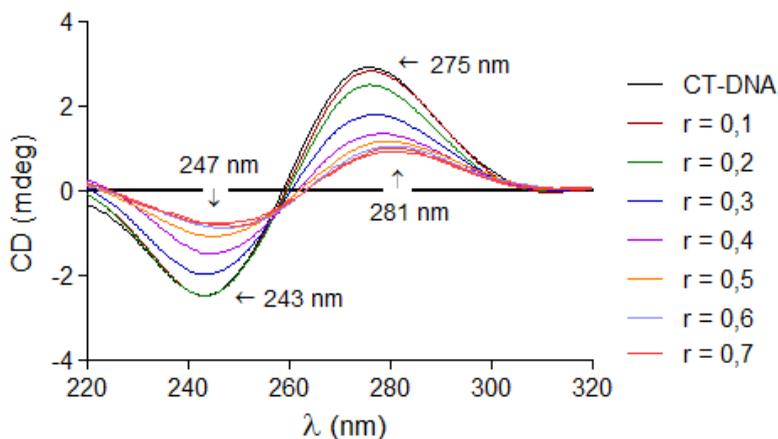


Figura 41. Espectro de dicroísmo circular de DNA na ausência e presença do complexo **2**. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μ M; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 75 μ M; Temperatura = 37°C.

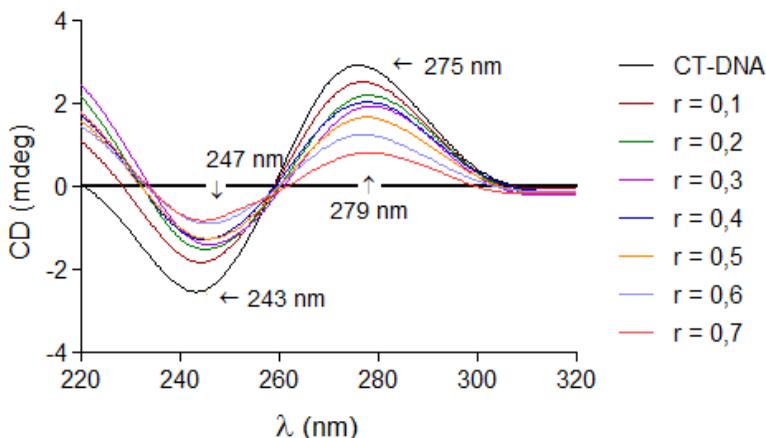


Figura 42. Espectro de dicroísmo circular de DNA na ausência e presença do complexo **3**. Condições reacionais: [CT-DNA] = 200 μM ; [Tampão] = 10 mM de HEPES pH 7,0; [complexo] = 0 a 70 μM ; Temperatura = 37°C.

A diminuição da intensidade da banda negativa do DNA indica perda da helicidade direita e, juntamente com a diminuição da intensidade da banda positiva, sugere que a interação com os complexos está induzindo uma modificação estrutural tipo Z-DNA ao B-DNA.^{103,56} A diminuição da intensidade da banda positiva e os deslocamentos para comprimentos de onda maiores indicam ainda que pode estar havendo um relaxamento da dupla hélice do DNA, o que leva à perda de sua helicidade.¹⁰⁴ Tal comportamento é típico de complexos que se ligam ao sulco do DNA e pode ocorrer também quando a interação DNA-complexo se faz por interações eletrostáticas.^{105,106} Nesse sentido, os dados obtidos por CD corroboram as observações feitas nos ensaios com bloqueadores de sulco e de aumento da força iônica, fornecendo evidências de que os complexos parecem interagir inicialmente com o DNA via sulco menor e a partir de interações eletrostáticas.

A observação dos espectros obtidos para os complexos **1**, **2** e **3** permite avaliar que a diminuição das bandas em 248 e 275 nm é mais evidente para os complexos **2** e **3**, indicando que tais complexos apresentam maior interação com DNA. É possível perceber ainda uma maior diminuição da banda positiva pelo complexo **3**, indicando que a sequência de atividade apresentada

nos ensaios cinéticos se repete nos dados obtidos por CD. Assim, temos que o complexo **3**, mais ativo nos ensaios cinéticos, também é o que mais altera a estrutura secundária do CT-DNA, de forma que a reatividade dos complexos, bem como sua capacidade interagir com o DNA, segue a ordem **3 > 2 > 1**.

Uma importante observação a ser feita é que em nenhum dos espectros há o aumento na intensidade da banda positiva, o que poderia indicar a intercalação de estruturas planares, relativas aos ligantes dos complexos, entre as bases do DNA.^{55,57} Nem mesmo o complexo **3**, que contém uma molécula de pireno ancorada em sua estrutura, parece apresentar um perfil de CD referente à intercalação. Sendo assim, é possível sugerir que o complexo **3** não ancora ao DNA por intercalação, mas sim via aproximação pelo sulco menor, tal como **1** e **2**.

5 CONCLUSÃO

Os complexos se mostraram capazes de clivar DNA plasmidial em condições brandas de pH e temperatura, em concentrações na escala de micromolar e em tempos moderados de reação. Os parâmetros cinéticos indicam um aumento na afinidade DNA-complexo de **1** para **3** e as constantes catalíticas calculadas evidenciam um aumento de $4,7 \times 10^6$ vezes na velocidade da reação de clivagem do DNA pelo complexo **3**, o mais ativo, quando comparado à clivagem espontânea. Os ensaios cinéticos também demonstraram uma diferença no mecanismo de ação do complexo **1** para os complexos **2** e **3**, verificado pelos diferentes perfis cinéticos apresentados pelos mesmos.

Nesse sentido, em colaboração com os dados obtidos por CD, é plausível propor que a atividade dos complexos **2** e **3** está relacionada à alteração na conformação do DNA, iniciada após a interação dos complexo com o ácido nucleico via interações eletrostáticas e por ligação aos sulcos. Assim, inicialmente, a atividade destes complexos é baixa, conforme verificado nos ensaios cinéticos, porém à medida que alterações na estrutura secundária do DNA são observadas, os complexos passam a atuar de forma efetiva sobre o mesmo, alcançando as altas constantes catalíticas apresentadas. A ligação dos complexos ao DNA parece alterar a estrutura secundária do B-DNA, de acordo com os resultados obtidos nos ensaios de dicroísmo circular, de forma que quanto maior a alteração na estrutura do ácido nucleico maior a afinidade e consequente atividade dos complexos sobre o DNA.

Um mecanismo possível de ação dos complexos sobre o DNA parece iniciar com a acomodação no sulco menor, a partir de interações entre as cargas do complexo e do DNA, seguido da redução do Cu(II) a Cu(I) *in situ*, possivelmente por ação do próprio DNA. Após, a reação entre Cu(I) e oxigênio leva à geração de um intermediário superóxido que rapidamente reage com H⁺ do meio para dar origem a peróxido de hidrogênio, o qual pode reagir com Cu(I), gerando radicais hidroxila, ou com Cu(II), gerando espécies do tipo metal-peróxido, que posteriormente também levam à geração de radicais hidroxila, conforme as reações expostas na seção 4.1.5. No caso do complexo **1**, a espécie reativa oxigênio-

singlete ($^1\text{O}_2$) também parece atuar no processo de clivagem do DNA.

Géis de alta resolução indicam que o complexo **2** apresenta especificidade de clivagem por *hairpins* cuja região não-pareada é composta de bases pirimidínicas do tipo “timina”, em concordância com trabalhos da literatura que evidenciam a ligação do grupo NH_3^+ da 1,4-butanodiamina ao oxigênio da timina, como forma de interação da molécula com o DNA via sulco menor. Os géis de eletroforese vertical também auxiliaram no entendimento do mecanismo de clivagem do DNA pelos complexos, já que as bandas duplas, típicas de complexos que clivam DNA via mecanismo oxidativo, possivelmente referem-se à formação do subproduto de clivagem 3'-fosfoglicolato, indicando que a etapa inicial no mecanismo de clivagem de DNA pelos complexos é a abstração do H-4 da desoxirribose, tal como descrito para a molécula Fe(II)-bleomicina.²⁶

A realização de ensaios na ausência de oxigênio e na presença dos sequestradores de radicais hidroxila (DMSO) e de peróxidos (KI), entretanto, não inibiu completamente a atividade dos complexos de forma que não é possível descartar a possibilidade de os complexos apresentarem um mecanismo misto de clivagem de DNA. Vale ressaltar que os resultados obtidos nos ensaios de pH fomentam essa hipótese, uma vez que o perfil pH-pendente apresentado pelos complexos é característico de clivagem via mecanismo hidrolítico.

6 PERSPECTIVAS

- Determinar os sítios pelos quais os complexos clivam DNA por meio da técnica de MALDI-TOF-MS (do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization with Time of Flight Mass Spectrometry*) e comparar com os dados obtidos nos ensaios de clivagem direta em gel de alta resolução.
- Determinar os sítios de ligação dos complexos com o DNA por ensaios de *footprinting*.
- Determinar a constante intrínseca de ligação complexo-DNA (K_b) por meio de titulação espectrofotométrica UV-Vis, para posterior comparação com dados obtidos por ITC.
- Determinar os parâmetros termodinâmicos da interação entre os complexos e o DNA por meio de calorimetria de titulação isotérmica (do inglês, ITC - *Isothermal Titration Calorimetry*).
- Determinar os parâmetros cinéticos da interação entre os complexos e o DNA por ressonância plasmônica de superfície (do inglês, SPR - *Surface Plasmon Resonance*).
- Realizar ensaios na presença de batocuproína e T4-ligase, de modo a esclarecer o mecanismo pelo qual os complexos clivam DNA.
- Verificar por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (do inglês, LC-MS - *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) produtos de oxidação do DNA gerados pelo tratamento com os complexos.

7 REFERÊNCIAS

1. 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.
2. AINALEM, M. L. et al. DNA compaction induced by a cationic polymer or surfactant impact gene expression and DNA degradation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, 2014.
3. HAN, D. et al. Nucleic acid based logical systems. **Chemistry - A European Journal**, v. 20, n. 20, p. 5866-5873, 2014.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. MJOS, K. D.; ORVIG, C. Metallodrugs in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 8, p. 4540-4563, 2014.
8. BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
9. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry** 3^a ed., New York: Worth Publishers. 2000.
10. DICKERSON, R. E. et al. The anatomy of A-, B-, and Z-DNA. **Science**, v. 216, n. 4545, p. 475-485, 1982.
11. PUGLISI, J. D.; WYATT, J. R.; TINOCO JR, I. Solution conformation of an RNA hairpin loop. **Biochemistry**, v. 29, n. 17, p. 4215-4226, 1990.

12. WOESE, C. R.; WINKER, S.; GUTELL, R. R. Architecture of ribosomal RNA: Constraints on the sequence of "tetra-loops". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 21, p. 8467-8471, 1990.

13. VARANI, G. Exceptionally stable nucleic acid hairpins. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 24, p. 379-404, 1995.

14. LILLEY, D. M. The inverted repeat as a recognizable structural feature in supercoiled DNA molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 11, p. 6468-6472, 1980.

15. VAN BELKUM, A. et al. Biochemical and biophysical studies on the folding of the core region of the origin of replication of bacteriophage M13. **Nucleic Acids Research**, v. 18, n. 16, p. 4703-4710, 1990.

16. KRÄMER, R. Bioinorganic models for the catalytic cooperation of metal ions and functional groups in nuclease and peptidase enzymes. **Coordination Chemistry Reviews**, v.182, n.1, p.243-261, 1999.

17. SIGMAN, D. S.; MAZUMDER, A.; PERRIN, D. M. Chemical nucleases. **Chemical Reviews**, v. 93, n.6, p.2295-2316, 1993.

18. BASHKIN, J. K. Hydrolysis of phosphates, esters and related substrates by models of biological catalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 3, n. 6, p. 752-758, 1999.

19. MISHRA, N. **Nucleases: Molecular Biology and Applications**, Wiley Publisher, 2002. p. 344

20. MUTH, G. W.; HENNELLY, S. P.; HILL, W. E. Using a targeted chemical nuclease to elucidate conformational changes in the E. coli 30S ribosomal subunit. **Biochemistry**, v. 39, n. 14, p. 4068-4074, 2000.

21. ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallointercalators and metalloinsertors. **Chemical Communications**, n. 44, p. 4565-4579, 2007.

22. DERVAN, P. B. Molecular recognition of DNA by small molecules. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 2215-2235, 2001.
23. LIU, C. et al. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 248, n. 1-2, p. 147-168, 2004.
24. JIANG, Q. et al. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, n. 15-16, p. 1951-1972, 2007.
25. BURROWS, C. J.; MULLER, J. G. Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1109-1151, 1998.
26. 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.
27. 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.
28. PERALTA, R. A. et al. Electronic structure and spectro-structural correlations of Fe(III)Zn(II) biomimetics for purple acid phosphatases: Relevance to DNA cleavage and cytotoxic activity. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 24, p. 11421-11438, 2010.
29. MANCIN, F. et al. Artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, n. 20, p. 2540-2548, 2005.
30. 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.

31. FERREIRA, A. L.; MATSUBARA, L. S. Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
32. BURGER, R. M. Cleavage of nucleic acids by bleomycin. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1153-1169, 1998.
33. NEIDIG, M. L.; SOLOMON, E. I. Structure-function correlations in oxygen activating non-heme iron enzymes. **Chemical Communications**, n. 47, p. 5843-5863, 2005.
34. CLAUSSEN, C. A.; LONG, E. C. Nucleic acid recognition by metal complexes of bleomycin. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2797-2816, 1999.
35. DONG, X. et al. Promotive effect of the platinum moiety on the DNA cleavage activity of copper-based artificial nucleases. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 5, p. 2541-2549, 2010.
36. 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.
37. RAJARAJESWARI, C. et al. Copper(II) complexes with 2NO and 3N donor ligands: Synthesis, structures and chemical nuclease and anticancer activities. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 23, p. 8347-8363, 2013.
38. JIN, Q. M. et al. Synthesis, characterization, DNA binding ability and cytotoxicity of the novel platinum(II), copper(II), cobalt(II) and nickel(II) complexes with 3-(1H-benzo[d]imidazol-2-yl)- β -carboline. **Inorganica Chimica Acta**, v. 421, p. 91-99, 2014.
39. GUBENDRAN, A. et al. Synthesis, characterization, DNA-binding and cleavage studies of polypyridyl copper(II) complexes. **Journal of Molecular Structure**, v. 1075, p. 419-429, 2014.
40. 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. 0, p. 67-76, 2014.

41. WALL, M.; HYNES, R. C.; CHIN, J. Double Lewis acid activation in phosphate diester cleavage. **Angewandte Chemie (International Edition in English)**, v. 32, n. 11, p. 1633-1635, 1993.

42. DE SOUZA, B. et al. The effect of chain size on the modeling of second sphere effects in biomimetic complexes. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 397, p. 76-84, 2015.

43. WU, J. et al. A molecular peptide beacon for the ratiometric sensing of nucleic acids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 4, p. 1958-1961, 2012.

44. YEH, M. Y.; LIN, H. C. Theoretical analysis of the intermolecular interactions in naphthalene diimide and pyrene complexes. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 44, p. 24216-24222, 2014.

45. JIN, B.; HAN, S. W.; LEE, D. J. Behavior in solution and mixing ratio-dependent binding modes of carcinogenic benzo[a]pyrene-7,8-dione to calf thymus DNA. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 35, n. 10, p. 3015-3020, 2014.

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

47. NAVARRO, M., et al. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)₂]BF₄. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, p. 364-369, 2003.

48. 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.

49. 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.

50. KOVACIC, R. T.; WELCH, J. T.; FRANKLIN, S. J. Sequence-selective DNA cleavage by a chimeric metallopeptide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 125, n. 22, p. 6656-6662, 2003.

51. BIALONSKA, D.; SONG, K.; BOLTON, P. H. Complexes of mismatched and complementary DNA with minor groove binders. Structures at nucleotide resolution via an improved hydroxyl radical cleavage methodology. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, n. 1, p. 47-53, 11/27/2011.

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

53. ZHENG, W. J. et al. Determination of DNA cleavage site sequence using fluorescence labeled primer and DNA sequencer. **Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical Journal of Chinese Universities**, v. 28, n. 1, p. 97-99, 2007.

54. 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.

55. UMA MAHESWARI, P.; PALANIANDAVAR, M. DNA binding and cleavage properties of certain tetrammine ruthenium(II) complexes of modified 1,10-phenanthrolines - Effect of hydrogen-bonding on DNA-binding affinity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 2, p. 219-230, 2004.

56. KASHANIAN, S. et al. DNA binding, DNA cleavage and cytotoxicity studies of a new water soluble copper(II) complex: The effect of ligand shape on the mode of binding. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 86, p. 351-359, 2012.

57. 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, 2011.
58. DA SILVA, M. P. Síntese, caracterização e estudos cinéticos de complexos de cobre(II) com ligantes triazínicos como modelos biomiméticos da metalo-enzima catecol oxidase. (2014). 109 p. (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
59. MASSOUD, S. S. et al. DNA Cleavage by Structurally Characterized Dinuclear Copper(II) Complexes Based on Triazine. **European Journal of Inorganic Chemistry**, n. 23, p. 3469-3479, 2011.
60. AUSUBEL, F. M. et al. **Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology**. New York: Wiley.1999.
61. 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.
62. 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.
63. 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, 2012.
64. 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, 2011.
65. XAVIER, F. R. et al. Unsymmetrical Fe(III)Co(II) and Ga(III)Co(II) complexes as chemical hydrolases: Biomimetic

models for purple acid phosphatases (PAPs). **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 16, p. 7905-7921, 2009.

66. 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, 2010.

67. 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, 2010.

68. 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.

69. PAMATONG, F. V.; DETMER, C. A.; BOCARSLY, J. R. Double-Strand Cleavage of DNA by a Monofunctional Transition Metal Cleavage Agent. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 23, p. 5339-5345, 1996.

70. 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.

71. 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.

72. 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.

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

74. RAVICHANDRAN, J. et al. Antioxidant, DNA binding and nuclease activities of heteroleptic copper(II) complexes derived from 2-((2-(piperazin-1-yl)ethylimino)methyl)-4-substituted phenols and diimines. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 785-793, 12/10/2014.
75. SHAHABADI, N.; BAGHERI, S. Spectroscopic and molecular docking studies on the interaction of the drug olanzapine with calf thymus DNA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 136, Part C, n. 0, p. 1454-1459, 2015.
76. 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.
77. GOODSSELL, D. S. Refinement of netropsin bound to DNA: Bias and feedback in electron density map interpretation. **Biochemistry**, v. 34, n. 15, p. 4983-4993, 1995.
78. WEI, Y. et al. Binding to the minor groove of the double-strand, Tau protein prevents DNA damage by peroxidation. **PLoS ONE**, v. 3, n. 7, 2008.
79. LEWIS E. A. et al. Complexity in the binding of minor groove agents: Netropsin has two thermodynamically different DNA binding modes at a single site. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 22, p. 9649-9658, 2011.
80. UYTTERHOEVEN, K.; SPONER, J.; VAN MEERVELT, L. Two 1:1 binding modes for distamycin in the minor groove of d(GGCCAATTGG). **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 12, p. 2868-2877, 2002.
81. TUIITE, E. et al. Effects of minor and major groove-binding drugs and intercalators on the DNA association of minor groove-binding proteins RecA and deoxyribonuclease I detected by flow

linear dichroism. **European Journal of Biochemistry**, v. 243, n. 1-2, p. 482-492, 1997.

82. OUAMEUR, A. A.; TAJMIR-RIAHI, 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.

83. 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

84. RUIZ-CHICA, J. et al. Raman spectroscopy study of the interaction between biogenic polyamines and an alternating AT oligodeoxyribonucleotide. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression**, v. 1628, n. 1, p. 11-21, 2003.

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

86. 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.

87. 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.

88. 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.

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

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

92. 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.
93. 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.
94. CHEN, J.; STUBBE, J. Bleomycins: Towards better therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 2, p. 102-112, 2005.
95. 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, 2010.
96. MOLINA, R. et al. Visualizing phosphodiester-bond hydrolysis by an endonuclease. **Nature Structural and Molecular Biology**, 2014.
97. SEGEL, I. H. **Enzyme Kinetics - Behavior and Analysis of Rapid Equilibrium and Steady-State Enzyme Systems**. Wiley Classics Library, 1993.
98. COOK, P. F.; CLELAND, W. W. **Enzyme Kinetics and Mechanism**. London and New York: Garland Science, 2007.
99. 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.
100. REDDY, P. R. et al. Synthesis, structure, DNA binding and cleavage properties of ternary amino acid Schiff base-phen/bipy Cu(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 105, n. 12, p. 1603-1612, 2011.
101. CHEN, M. et al. Synthesis, characterization and potent DNA-cleaving activity of copper(II)-complexed berberine carboxylate.

Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 22, n. 23, p. 7056-7059, 2012.

102. AN, Y. et al. Cleavage of double-strand DNA by linear and triangular trinuclear copper complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 10, p. 1586-1593, 2006.

103. CHEN, Z.; et al. Comparison of DNA binding and cleavage abilities between mono and trinuclear copper(II) complexes of benzimidazole derivatives. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 11, p. 1392-1396, 2008.

104. HE, J.; et al. Phosphodiester hydrolysis and specific DNA binding and cleavage promoted by guanidinium-functionalized zinc complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 851–858, 2009.

105. DHAR, S.; NETHAJI, M.; CHAKRAVARTY, A. R. Effect of charge transfer bands on the photo-induced DNA cleavage activity of [1-(2-thiazolylazo)-2-naphtholato]copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 3, p. 805-812, 2005.

106. KUMAR, P. et al. DNA binding, nuclease activity and cytotoxicity studies of Cu(II) complexes of tridentate ligands. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 25, p. 7573-7581, 2012.