

Vanessa Almeida de Oliveira

**INTERAÇÃO DE METALOPORFIRINAS COM DNA:  
MECANISMO CATALÍTICO DA FOTOCLIVAGEM**

Tese de doutorado submetida ao  
Programa de Pós-graduação em  
Bioquímica da Universidade Federal  
de Santa Catarina para a obtenção do  
Título de Doutora em Bioquímica.  
Orientador: Prof. Dr. Hernán Terenzi

Florianópolis  
2017

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

Oliveira, Vanessa Almeida de  
Interação de metaloporfirinas com DNA: mecanismo catalítico da fotoclivagem / Vanessa Almeida de Oliveira ; orientador, Hernán Terenzi, 2017.  
151 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Metaloporfirinas artificiais.  
3. Nucleases artificiais. 4. Fotoclivagem de DNA.  
5. Terapia fotodinâmica. I. Terenzi, Hernán. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. III. Título.

Vanessa Almeida de Oliveira

**INTERAÇÃO DE METALOPORFIRINAS COM DNA:  
MECANISMO CATALÍTICO DA FOTOCLIVAGEM**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutora em Bioquímica” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 12 de Dezembro de 2017.

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza.  
Coordenadora da Pós-Graduação em Bioquímica.

**Banca Examinadora:**

---

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

---

Prof. Dr. Carlos Peres Silva  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Ademir Neves  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Elene Cristina Pereira Maia  
Universidade Federal de Minas Gerais



Dedico este trabalho a todos os participantes e simpatizantes dos movimentos em prol da ciência que buscam demonstrar aos nossos governantes e população que o investimento em pesquisa científica é essencial para o desenvolvimento intelectual e tecnológico.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais pelo amor, dedicação e incentivo.

A minha irmã Andressa por sempre me incentivar e não me deixar desistir de tudo por mais difícil que fossem os caminhos desta vida.

Ao meu noivo Clei pelo amor, pela paciência, compreensão e por cozinhar e lavar toda a louça enquanto eu estudava e escrevia os artigos e a tese.

Ao grupo CEBIME pela troca de experiências, pesares e alegrias deste mundo da academia.

Ao orientador prof. Dr. Hernán Terenzi pelos ensinamentos e pela oportunidade de realizar o doutorado em seu laboratório.

À mestre Bruna Auras e ao prof. Dr. Bernardo Iglesias pela colaboração em ceder as porfirinas para os ensaios de interação com DNA.

Aos professores participantes da banca de defesa pelo tempo dedicado à leitura e a disposição em avaliar este trabalho.

À UFSC por nos proporcionar técnicas de última geração e troca de conhecimentos com pessoas excelentes e profissionais de alto nível.

Às agências de fomento, CAPES e CNPq pelos recursos investidos no laboratório que permitiram a realização desta tese.

A todos que colaboraram para a elaboração desta tese.



*“The radium is more than a hundred thousand times dearer than gold. But we must not forget that when radium was discovered no one knew that it would prove useful in hospitals. The work was one of pure science. And this is a proof that scientific work must not be considered from the point of view of the direct usefulness of it. It must be done for itself, for the beauty of science, and then there is always the chance that a scientific discovery may become like the radium a benefit for humanity.*

...

*There is always a vast field left to experimentation and I hope that we may have some beautiful progress in the following years. It is my earnest desire that some of you should carry on this scientific work and keep for your ambition the determination to make a permanent contribution to science.”*

(Discurso de Marie Curie em 14 de maio de 1921 na Vassar College sob o título “*The Discovery of Radium*”)



## RESUMO

Reações de clivagem endonucleolítica do DNA têm sido alvo de intensa pesquisa para modelos de reatividade de drogas antitumorais. Nucleases associadas a cofatores metálicos apresentam alta afinidade pela dupla fita de DNA sendo capazes de interagir de modo específico acelerando a reação de hidrólise da ligação fosfodiéster. O desenvolvimento de drogas fotossensibilizadoras para terapia fotodinâmica no tratamento de câncer (TFD) tem recebido destaque na pesquisa de nucleases com efeito antitumoral, devido sua ação localizada e efeitos colaterais reduzidos comparados aos tratamentos tradicionais. Neste sentido metaloporfirinas biomiméticas às naturais têm sido propostas como potenciais metalonucleases para uso em terapia fotodinâmica devido sua capacidade em gerar oxigênio singlete após fotoativação. No presente trabalho foi analisada a interação do DNA com Zn(II)-porfirinas com ligante derivado do 1,4,7-triazacilononano (TACN) e ainda com Zn(II)-porfirinas catiônicas com compostos de coordenação de platina(II). Os ensaios de interação de DNA com as porfirinas foram realizados por métodos espectroscópicos (ultravioleta visível, desnaturação térmica e dicroísmo circular) e a avaliação da atividade catalítica por visualização dos produtos de clivagem (fragmentos) por eletroforese em gel de agarose e/ou gel de poliacrilamida. De modo geral todas as porfirinas estudadas interagiram com o DNA e apresentaram atividade catalítica quando expostas à luz visível (fotoclivagem) através de mecanismos mistos sem dependência do oxigênio molecular, fato este interessante para supressão de tumores hipóxicos. As Pt(II)-porfirinas foram as mais ativas como nucleases e os resultados sugerem que a interação com o DNA aconteça por interação externa e paralela ao eixo da dupla hélice através da formação de um aduto porfirina-DNA estabilizado pelas interações eletrostáticas entre o complexo e os grupos fosfatos de forma a induzir clivagens oxidativas em nucleotídeos da mesma fita. Devido à alta habilidade em gerar oxigênio singlete e fotoclivar o DNA as TACN-porfirinas e Pt(II)-porfirinas podem ser consideradas potenciais candidatas a fotossensibilizadoras para uso em terapia fotodinâmica.

**Palavras-chave:** Metalonucleases artificiais. Porfirinas. Fotossensibilizadores. Terapia fotodinâmica no câncer.



## ABSTRACT

Endonucleolytic DNA cleavage has been the focus of research for reactivity antitumoral therapeutics' models. Nucleases associated to metal ions demonstrated high affinity to DNA in a specific way improving the hydrolysis of DNA phosphodiester bond. The research of nucleases with antitumor activity lead to the development of photosensitizer drugs for Photodynamic Therapy (PDT). PDT is a less invasive treatment with fewer side effects compared with traditional systemic cancer treatments. In this way biomimetic metalloporphyrins has been proposed as potential metalonucleases to act as photosensitizer in PDT due the porphyrins ability in photogenerate singlet oxygen. In this work the DNA interaction with Zn(II)-porphyrin with 1,4,7-triazacyclononyl derivative substituent and cationic Zn(II)-porphyrin with platinum(II) coordination compounds was availed. Interaction studies were performed by spectroscopic methods (ultraviolet-visible, DNA melting and circular dichroism). The catalytic activity was verified by visualization of cleavage products via polyacrylamide and agarose electrophoresis. These porphyrins showed interaction with DNA and catalytic activity after exposure to visible light (photocleavage). The photocleavage occurred via a mixed mechanism not dependent of molecular oxygen. This mechanism is interesting for treatment of hypoxic tumors. The Pt(II)-porphyrins were more efficient as catalytic demonstrating the ability to interact parallel and externally to DNA through the formation of a porphyrin-DNA adduct stabilized by electrostatic forces between the complex and phosphate groups. This interaction induces oxidative cleavages to DNA backbone. Due the high ability for singlet oxygen generation and DNA photocleavage the triaza and platinum(II) porphyrins are potential candidates as photosensitizer to PDT.

**Keywords:** Artificial metalonucleases. Porphyrins. Photosensitizer. Photodynamic therapy in cancer.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Modelo do B-DNA 3D proposto por Watson e Crick (1953)	30
Figura 2 - Hidrólise das ligações fosfodiéster do DNA.....	35
Figura 3 - Mecanismo de interação cisplatina-DNA.....	38
Figura 4 - Estrutura da <i>meso</i> -tetrakis(4- <i>N</i> -metilpiridina)porfirina H <sub>2</sub> -TMPyP4.....	42
Figura 5 - Estrutura das porfirinas <i>meso</i> -mono-[(4-4,7-diisopropil-1,4,7-triazaciclonoanil)]-tri(fenil)]porfirina (porfirina 4) e seu respectivo complexo de zinco(II) (porfirina 5).....	50
Figura 6 – Representação do padrão de migração do DNA plasmidial em gel e agarose 1%.....	53
Figura 7 – Análise dos fragmentos de clivagem promovidos pelas TACN-porfirinas.....	55
Figura 8 - Representação gráfica dos fragmentos de clivagem.....	56
Figura 9 - Efeito dos ligantes de sulco e da força iônica nas reações de clivagem de DNA plasmidial.....	59
Figura 10 – Representação gráfica do efeito dos ligantes de sulco e da força iônica nas reações de clivagem de DNA plasmidial.....	60
Figura 11 – Reações de clivagem na presença de sequestradores de EROs.....	62
Figura 12 - Representação gráfica das reações de clivagem na presença de EROs.....	63
Figura 13 - Representação das porfirinas <i>meso</i> -tetra(4-piridil)porfirina-tetrakis-[cloro(2,2´bipiridina)]platina(II), denominadas como H <sub>2</sub> PtPor (base livre - esquerda) e ZnPtPor (direita).....	73
Figura 14 – Espectro de dicroísmo circular das titulações de porfirinas em CT-DNA.....	82
Figura 15 - Espectro de dicroísmo circular induzido das titulações de porfirinas em CT-DNA.....	84
Figura 16 – Espectro de CD da titulação das porfirinas em tampão.....	85
Figura 17 – Espectro da titulação de acetonitrila em CT-DNA.....	85
Figura 18 – Curva de desnaturação térmica de CT-DNA na ausência e presença das porfirinas.....	87
Figura 19 – Clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas.....	88
Figura 20 – Clivagem de DNA-plasmidial na presença da precursora 4-TPyP.....	88
Figura 21 – Clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas e curva de concentração de LiClO <sub>4</sub> .....	89

Figura 22 - Clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas e ligantes de sulco.....	91
Figura 23 – Representação gráfica da clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas e ligantes de sulco. ....	92
Figura 24 - Clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas e sequestradores de EROs.....	94
Figura 25 - Clivagem de DNA-plasmidial na presença de sequestradores de EROs e concentrações crescentes de H <sub>2</sub> PtPor.....	95
Figura 26 - Clivagem de DNA-plasmidial na presença de sequestradores de EROs e concentrações crescentes de ZnPtPor.....	96
Figura 27 - Clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas e NaN <sub>3</sub> .....	97
Figura 28 - Clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas e TEMPO.....	98
Figura 29 - Clivagem de DNA-plasmidial em atmosfera de argônio....	98
Figura 30 – Representação gráfica da clivagem de DNA-plasmidial em atmosfera de argônio.....	99
Figura 31 – Oligonucleotídeo ATCG-FAM no formato <i>hairpin</i> . ....	100
Figura 32 – Oligonucleotídeo ATCG-FAM no formato <i>hairpin</i> com marcação dos sítios de clivagem oxidativa (3'PG) observados no gel de poliacrilamida. ....	101
Figura 33 – Hélice da porção pareada do oligonucleotídeo ATCG-FAM com marcação dos sítios de clivagem oxidativa (3'PG) observados no gel de poliacrilamida. ....	101
Figura 34 – Clivagem direta do oligonucleotídeo ATCG-FAM na presença da H <sub>2</sub> PtPor (1 μM), netropsina e piperidina. ....	102
Figura 35 - Clivagem direta do oligonucleotídeo ATCG-FAM na presença da H <sub>2</sub> PtPor (5 μM), netropsina e piperidina. ....	103
Figura 36 - Clivagem direta do oligonucleotídeo ATCG-FAM na presença da ZnPtPor (1 e 5 μM), netropsina e piperidina. ....	104
Figura 37 - Clivagem direta do oligonucleotídeo ATCG-FAM na presença da H <sub>2</sub> PtPor e ZnPtPor (1, 5 e 10 μM).....	105
Figura 38 - Clivagem direta do oligonucleotídeo ATCG-FAM na presença da H <sub>2</sub> PtPor e ZnPtPor (1, 5 e 10 μM) e netropsina. ....	106
Figura 39 - <i>Footprinting</i> com o oligonucleotídeo ATCG-FAM na presença da H <sub>2</sub> PtPor e ZnPtPor (1, 5 e 10 μM) e netropsina. ....	108

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Titulações realizadas para as análises de dicroísmo circular. .....	84
---	----



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1D – uma dimensão  
 $^1\text{O}_2$  – oxigênio singlete  
3'-OH – extremidade 3' hidroxila  
3'-OPO<sub>3</sub> –extremidade 3' fosfato  
3'-PG – extremidade 3' fosfoglicolato  
3D – três dimensões  
6-FAM - 6-carboxifluoresceína  
A - adenina  
APS - persulfato de amônio  
Ar - argônio  
AT – adenina e timina  
ATCG – oligonucleotídeo com 49 mer utilizado na metodologia deste trabalho  
B-DNA – ácido desoxirribonucleico da forma B  
BE – brometo de etídio  
Bipy/bpy – 2,2'bipiridina  
C – citosina  
CD – dicroísmo circular (*circular dichroism*)  
CEBIME – Centro de Biologia Molecular Estrutural  
CG – citosina e guanina  
CH<sub>3</sub>CN – acetonitrila  
cis-DDP – cis-diaminodichloroplatina (II)  
ClO<sub>4</sub><sup>-</sup> - íon perclorato  
cm – centímetro  
CT-DNA – ácido desoxirribonucleico de timo de bezerro (*calf thymus* DNA)  
Ctrl – controle  
DH5 $\alpha$  – linhagem de células competentes de *Escherichia coli*  
DMSO – dimetilsulfóxido  
DNA – ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)  
Dr. – doutor  
Dra. - doutora  
DTT - ditioneitol  
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)  
EROs – espécies reativas de oxigênio  
FAM – fluoresceína  
FI – DNA plasmidial na forma superenovelado  
Fig. - figura

FII – DNA plasmidial na forma circular relaxado  
FIII – DNA plasmidial na forma linear  
FS - fotossensibilizador  
g - grama  
G – guanina  
h – hora  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
H<sub>2</sub>PtPor – *meso*-tetra(4-piridil)porfirina-tetrakis-  
[cloro(2,2' bipiridina)]platina(II)  
HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)  
I – força iônica  
ICD – dicroísmo circular induzido  
K<sub>b</sub> – constante de ligação (*binding constant*)  
kb – kilobase  
kDa – kiloDalton  
KI – iodeto de potássio  
LABINC - Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia  
LB – tampão de carregamento (*loading buffer*)  
LiClO<sub>4</sub> - Perclorato de lítio  
M - molar  
M.Sc. – *Master of Science*  
m/v – massa/volume  
mer – do grego *meros* (parte) refere-se ao tamanho/quantidade de nucleotídeos do oligonucleotídeo  
mg - miligrama  
MG – verde de metila (*methyl green*)  
Min - minuto  
mL - mililitro  
mM - milimolar  
mm- milímetro  
mol - mol  
MS – espectrometria de massas (*mass spectrometry*)  
MS/MS – espectrometria de massas em tandem  
NaN<sub>3</sub> – azida de sódio  
NaOH – hidróxido de sódio  
Net - netropsina  
ng - nanograma  
nm - nanômetro  
O<sub>2</sub> – oxigênio molecular  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - radical superóxido

OH<sup>·</sup> - radical hidroxila  
Ox – oxigênio  
PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida  
(*Polyacrylamide gel electrophoresis*)  
pb – par de base  
pBSK II – plasmídeo *Bluescript SK II*  
pH - potencial hidrogeniônico  
pmol - picomol  
Pt – platina  
r - razão  
RNA – ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)  
RPM – rotações por minuto  
SPR - Ressonância plasmônica de superfície (surface plasmon resonance)  
T - timina  
TACN - 1,4,7-triazacilononano  
TBE - tris/borato/EDTA  
t-BuOH – terc-butanol  
TEMED – tetrametiletilenodiamina  
TEMPO - 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidina-1-oxil  
TFD – terapia fotodinâmica  
T<sub>m</sub> – temperatura de denaturação (*melting*)  
TPP – 5,10,15,20-tetra(fenil)porfirina – TPP  
Tris – tris(hidroximetil)aminometano  
Tris-HCl – hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano  
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina  
UFSM – Universidade Federal de Santa Maria  
USA - Estados Unidos da América (United States of America)  
UV - ultravioleta  
UV-Vis – ultravioleta visível  
V – volts  
v/v – volume/volume  
W - watts  
ZnNH<sub>2</sub>TPP - *meso*-mono-(4-aminofenil)porfirina zinco(II)  
ZnPtPor – *meso*-tetra(4-piridil)porfirina-tetrakis-  
[cloro(2,2'-bipiridina)]platina(II) zinco(II)  
µg – micrograma  
µL - microlitro  
µM – micromolar



## LISTA DE SÍMBOLOS

® - marca registrada

™ - marca registrada (*trademark*)

$\alpha$  - alfa

$\lambda$  - gama

$\beta$  - beta

°C - grau Celsius

$\varepsilon$  - coeficiente de extinção molar

$\mu$  - micro

$\pi$  - pi



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b><i>CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO</i></b> .....	<b>29</b>
<b>1.1</b>	<b>ESTRUTURA DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO – DNA</b> .....	<b>29</b>
1.1.1	Modos de interação.....	33
<b>1.2</b>	<b>DESENVOLVIMENTO DE METALONUCLEASES</b> ..	<b>34</b>
1.2.1	Platina.....	37
1.2.2	Zinco.....	38
<b>1.3</b>	<b>TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) E AS METALOPORFIRINAS</b> .....	<b>39</b>
<b>1.4</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>
<b>2</b>	<b><i>CAPÍTULO II – INTERAÇÃO E FOTOCLIVAGEM DE DNA COM A PORFIRINA MESO-MONO-[4-(1,4,7-TRIAZACICLONONANIL)]-TRI(FENIL)] E SEU RESPECTIVO COMPLEXO DE ZINCO(II)</i></b> .....	<b>49</b>
<b>2.1</b>	<b>CONTEXTUALIZAÇÃO</b> .....	<b>49</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>50</b>
2.2.1	Objetivos específicos.....	51
<b>2.3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>51</b>
2.3.1	Materiais.....	51
2.3.2	Síntese e caracterização dos complexos .....	51
2.3.3	Ensaio de clivagem de DNA.....	51
2.3.4	Eletroforese e quantificação do DNA clivado .....	52
2.3.5	Influência dos ligantes de sulco e força iônica na clivagem do DNA pelas porfirinas .....	53
2.3.6	Mecanismo catalítico.....	53
<b>2.4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
2.4.1	Fotoclivagem de DNA.....	54

2.4.2	Estudo da influência dos ligantes de sulco e da força iônica nas reações de clivagem de DNA.....	56
2.4.3	Mecanismo de clivagem do DNA (sequestradores de EROs).....	61
<b>2.5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO III – INTERAÇÃO E FOTOCLIVAGEM DE DNA COM MESO-TETRA(4-PIRIDIL)PORFIRINA-TETRAKIS-[CLORO(2,2'BIPIRIDINA)]PLATINA(II).....</b>	<b>71</b>
<b>3.1</b>	<b>CONTEXTUALIZAÇÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>3.2</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>73</b>
3.2.1	Objetivos específicos.....	73
<b>3.3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>74</b>
3.3.1	Materiais.....	74
3.3.2	Síntese e caracterização dos complexos.....	74
3.3.3	Ensaio de interação das porfirinas com DNA de timo de bezerro ( <i>calf thymus</i> DNA – CT-DNA).....	74
3.3.3.1	Estudos estruturais com difração de raios X.....	74
3.3.3.2	Ensaio de desnaturação térmica.....	75
3.3.4	Ensaio de interação das porfirinas com plasmídeo pBSK II.....	75
3.3.4.1	Ensaio de clivagem de DNA plasmidial.....	75
3.3.4.2	Efeito da força iônica na interação porfirina-DNA	76
3.3.4.3	Ligantes de sulco do DNA e a interação porfirina-DNA.....	76
3.3.4.4	Mecanismo catalítico da interação porfirina-DNA	76
<b>3.3.4.4.1</b>	<b><i>Reações na presença de sequestradores de EROs.....</i></b>	<b>77</b>
<b>3.3.4.4.2</b>	<b><i>Reações na presença de TEMPO.....</i></b>	<b>77</b>
<b>3.3.4.4.3</b>	<b><i>Reações em atmosfera de argônio.....</i></b>	<b>77</b>
3.3.4.5	Eletroforese em gel de agarose 1 % e quantificação do DNA clivado.....	78

3.3.5	Ensaio de interação das porfirinas com oligonucleotídeo fluorescente	78
3.3.5.1	Anelamento do oligonucleotídeo.....	78
3.3.5.2	Reações de clivagem direta .....	79
3.3.5.3	Reações de clivagem direta com piperidina .....	79
3.3.5.4	Reações de <i>footprinting</i> .....	80
3.3.5.5	Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 16%	80
<b>3.4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
3.4.1	Ensaio de dicroísmo circular.....	81
3.4.2	Análises de desnaturação térmica do CT-DNA.....	86
3.4.3	Estudos de fotoclivagem do DNA plasmidial .....	87
3.4.4	Efeito da força iônica na clivagem do DNA.....	89
3.4.5	Mecanismo de interação porfirina-DNA .....	90
3.4.6	Investigação do mecanismo catalítico .....	93
3.4.7	Clivagem direta e <i>footprinting</i> .....	99
<b>3.5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>109</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>111</b>
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>119</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>121</b>
	<b>APÊNDICE A – Artigo publicado referente ao capítulo II .....</b>	<b>123</b>
	<b>APÊNDICE B – Artigo publicado referente ao capítulo III .....</b>	<b>141</b>



# 1 CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO

## 1.1 ESTRUTURA DO ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO – DNA

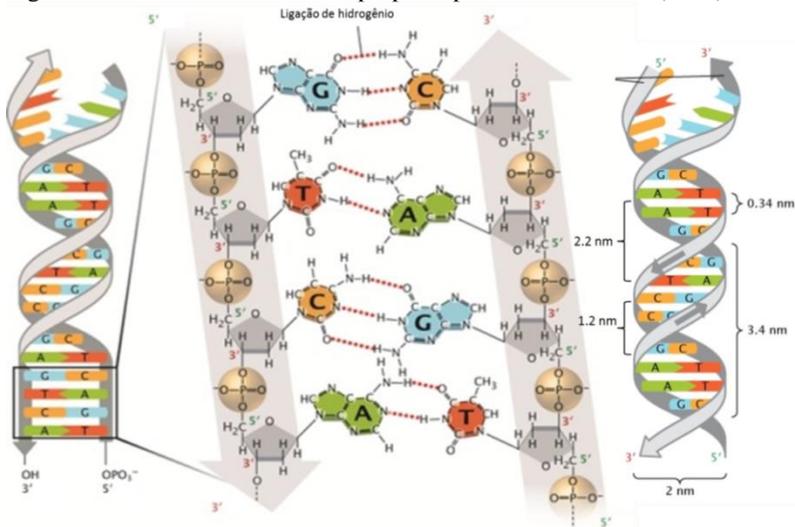
Os ácidos nucleicos são biopolímeros formados a partir de unidades compostas por uma base nitrogenada, uma pentose e um fosfato. As bases são compostos aromáticos heterocíclicos que contém nitrogênio e são comumente divididas entre purinas (adenina e guanina) e pirimidinas (citosina, timina e uracila). Os compostos formados por uma base e uma pentose são denominados nucleosídeos. Quando há pelo menos um fosfato ligado ao grupo hidroxila da pentose do nucleosídeo a unidade passa a se chamar nucleotídeo, que é a unidade básica dos ácidos nucleicos. Na maioria dos seres vivos o fosfato está posicionado no C5' da pentose. Os ácidos nucleicos são classificados em ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). A diferença entre eles é a pentose, sendo a 2-desoxirribose no DNA e a ribose no RNA, e ainda uma diferença na composição das bases: A, C e G são bases presentes em ambos, porém a timina está presente somente no DNA e a uracila no RNA (KOOL, 2001; MARMUR; DOTY, 1962; WATSON; CRICK, 1953).

A formação da fita de DNA ocorre quando um grupo 3' hidroxila da pentose de um nucleosídeo forma uma ligação fosfodiéster com o 5' fosfato de um nucleotídeo, deslocando um pirofosfato. Termodinamicamente, a força motriz da reação é a clivagem da ligação fraca entre os fosfatos acoplada à formação de uma ligação fosfodiéster forte e a entropia da liberação do pirofosfato. Espontaneamente esta reação é excessivamente lenta, mas a velocidade da reação pode ser aumentada centenas de vezes por segundo quando na presença da enzima DNA polimerase. Isso acontece porque a enzima diminui a energia de ativação da reação em muitas quilocalorias por mol (KOOL, 2001). As ligações fosfodiéster conferem estabilidade ao DNA, sendo que a hidrólise espontânea dessas ligações tem meia vida de 30 milhões de anos (SILVERMAN, 2010).

Na década de 40 estabeleceu-se que o DNA é um repositório de informações genéticas promovendo o armazenamento, processamento e regulação dessa informação (LIPFERT et al., 2014; SILVERMAN, 2016). Na década de 50, Watson e Crick, auxiliados por pesquisas de Wilkins e Franklin, postularam a estrutura secundária do DNA, conhecida como o modelo de dupla hélice, revolucionando os conhecimentos químicos e biológicos referentes a esta biomolécula (WATSON; CRICK, 1953). Desde lá, muito se avançou na

compreensão do DNA e sua importância biológica, como por exemplo, o sequenciamento genômico que permitiu a constatação de similaridades e discrepâncias dos genes entre espécies (SILVERMAN, 2010). No modelo de Watson e Crick (1953) o DNA consiste em uma dupla hélice formada por duas fitas conectadas de forma antiparalela por ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas, de forma que adenina se ligue à timina por duas ligações e citosina à guanina por três ligações de hidrogênio. Dizem-se antiparalelas, pois a extremidade 5' de uma fita se liga à extremidade 3' da fita oposta, e vice e versa conforme demonstrado na Figura 1. *In vitro*, o DNA pode se apresentar em simples fita, sem sua fita complementar, ou dupla fita. Já na natureza há o interesse biológico em manter a integridade genética e por isso a ocorrência da dupla fita é o mais comum, pois é considerada uma estrutura mais rígida do que a fita única (KOOL, 2001).

Figura 1 – Modelo do B-DNA 3D proposto por Watson e Crick (1953)



Fonte: adaptado de PRAY (2008)

Em solução aquosa a estrutura do DNA dupla hélice é governada pelo complexo equilíbrio de forças não covalentes: as forças estabilizadoras como as ligações de hidrogênio de Watson-Crick e o empilhamento das bases nitrogenadas, e ainda as forças destabilizadoras como as interações eletrostáticas de repulsão entre os grupos fosfato intrafita ou entre fitas. Há também o efeito estérico entre

as bases pareadas. Todas essas interações tornam a dupla hélice entalpicamente muito favorável (ligações de hidrogênio e empilhamento de bases) e entropicamente desfavorável (restrições entrópicas na formação da dupla hélice) (GARCÍA-RAMOS et al., 2013; KOOL, 2001). O empilhamento de bases e as ligações de hidrogênio são as interações que estabilizam todas as hélices do DNA. Mesmo uma simples fita, não pareada, pode formar uma hélice se as bases nitrogenadas de seus nucleotídeos estiverem eficientemente empilhadas (KOOL, 1997). Dados experimentais demonstraram que cada empilhamento de base ou ligação de hidrogênio contribui para a estabilidade da estrutura de DNA em  $\sim 1$  kcal/mol por par de base (KOOL, 1997). As ligações de hidrogênio e empilhamento entre bases também são ligações não covalente fracas, facilmente rompidas com ação do calor, porém ambas são complementares, pois uma estabiliza a outra e se uma é prejudicada a outra também será, como se pode observar na adição de agente desnaturante ou na presença de calor. O empilhamento das bases facilita a formação das ligações de hidrogênio entre o par, e a formação dessas ligações impede a torção das bases e facilita o empilhamento delas (MARMUR; DOTY, 1962).

As ligações de hidrogênio são interações entre um próton ácido e um ótimo doador de elétron e são fundamentais na estabilização da dupla hélice (KOOL, 1997). Estudos mostram que moléculas de DNA com maior quantidade de CG tem uma maior temperatura de desnaturação térmica ( $T_m$  - *melting*) do que as moléculas com maior composição de AT. Isso se deve ao fato de CG formar três ligações de hidrogênio entre o par e AT somente duas, sendo estas últimas mais vulneráveis à ruptura. As ligações de hidrogênio possuem baixa energia e podem ser desfeitas e refeitas facilmente. Para impedir que elas sejam refeitas e ocorra a renaturação do DNA agentes desnaturantes como ureia ou formamida podem ser acrescentados à solução para que o DNA permaneça desnaturado, mesmo em temperaturas que permitam sua renaturação. Esta estratégia é utilizada para desnaturar DNA de amostras que serão submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (DOTY, 2003; MARMUR; DOTY, 1962).

As bases nitrogenadas são planares e estão empilhadas de forma que ocorra contato direto com sistema  $\pi$  ( $\pi$ ) elétron das bases vizinhas ( $\pi$ -*stacking*). A geometria de justaposição de duas moléculas aromáticas proporciona um contato direto entre os sistemas  $\pi$ . A referência ao "empilhamento de bases" surge devido ao fato das bases nitrogenadas estarem em contato face-à-face (KOOL, 1997). Interações fracas como as forças de van der Waals, efeitos hidrofóbicos e as interações

eletrostáticas entre os dipolos estabilizam este empilhamento de bases da dupla fita (KOOL, 2001). A distância entre os planos aromáticos no empilhamento é de 3,4 Angstroms (Å), esta disposição das bases aparece na maioria das estruturas de DNA (Fig. 1). De modo geral as purinas se empilham mais fortemente do que as pirimidinas, devido a maior área de superfície e maior polaridade (KOOL, 2001). O empilhamento aromático é fundamental na regulação gênica, pois o reconhecimento entre enzimas e o DNA é regulado pelas interações  $\pi$ -stacking entre os aminoácidos aromáticos e as bases nitrogenadas (MATTA; CASTILLO; BOYD, 2006).

A repulsão eletrostática das cargas negativas dos grupos fosfatos entre as fitas da dupla hélice é uma das interações eletrostáticas mais importantes na formação desta estrutura (KOOL, 1997). A estrutura polianiônica do DNA atrai os íons positivos e repele os íons negativos, promovendo uma acumulação de contra íons próximos à molécula, de modo a reduzir a repulsão eletrostática neutralizando as cargas e impedindo a separação das fitas (LIPFERT et al., 2014). Quando se adiciona sal ao meio os íons positivos formam nuvens eletrônicas em volta das cargas negativas do fosfato protegendo da repulsão, pois as cargas são neutralizadas, a estrutura é estabilizada e diminui a solubilidade das bases aumentando as interações hidrofóbicas. Na ausência do sal o oposto ocorre demonstrando a importância da força iônica na estabilização da dupla hélice (MARMUR; DOTY, 1962).

A conformação das pentoses juntamente com o empilhamento das bases determina a geometria da hélice, o número de resíduos por volta e o espaço entre os pares de bases (MATTA; CASTILLO; BOYD, 2006). O DNA pode adotar uma série de conformações, porém a predominante é a dupla hélice à direita, denominada B-DNA, mas dependendo da hidratação dos sulcos e da força iônica do meio outras estruturas de DNA podem ser formadas como A-DNA e Z-DNA (DUCHEMIN et al., 2017; GARCÍA-RAMOS et al., 2013). A conformação da pentose determina o tipo de estrutura de DNA: quando C3' está acima do eixo da molécula as hidroxilas 5' e 3' ficam mais próximas entre si aproximando os grupos fosfatos e reduzindo a distância entre nucleotídeos característica do A-DNA, as bases ficam longe do eixo da dupla hélice resultando em uma hélice mais aberta. Quando o C2' da pentose está acima do plano as bases ficam alinhadas próximas ao eixo da dupla hélice, característico do B-DNA com torção à direita (MATTA; CASTILLO; BOYD, 2006).

No B-DNA a torção à direita forma sulcos, sendo o sulco maior de 22 Å e o menor de 12 Å entre as fitas sucessivas. Apesar das bases

nitrogenadas estarem dispostas na parte interna da dupla hélice de DNA elas são reconhecidas e acessadas pelas enzimas através desses sulcos. Dessa forma os sulcos são ótimos sítios de interação do DNA com pequenas moléculas e grupos quirais do tipo biperidinas (DUCHEMIN et al., 2017).

### 1.1.1 Modos de interação

A estrutura do DNA oferece uma gama de potenciais sítios de ligação para pequenas moléculas, proteínas e compostos de coordenação. Essas moléculas podem interagir com o DNA de modo irreversível (por interações covalentes ou de coordenação) ou reversível (interações eletrostáticas, ligações aos sulcos e intercalação) (GARCÍA-RAMOS et al., 2013; SHAHABADI; KASHANIAN; FATAHI, 2011). As ligações covalentes são irreversíveis e resultam na troca de bases nitrogenadas, com *crosslinking* inter e intra-fita e/ou alquilação das bases. As ligações não covalentes são interações reversíveis onde a molécula interage com o DNA por intercalação, interações eletrostáticas e/ou afinidade por sulcos promovendo mudanças conformacionais na estrutura do DNA, rompimento das ligações fosfodiéster e inibição das interações entre DNA-proteína (ALEKSIC; KAPETANOVIĆ, 2014). As interações não covalentes de DNA com pequenas moléculas fornecem o mecanismo básico de ação de muitos agentes terapêuticos incluindo compostos antivirais, antimicrobianos e antitumorais (HOFSTADLER; GRIFFEY, 2001). A estabilidade da interação do DNA com outras moléculas nas ligações não covalentes depende do modo de reconhecimento entre cada componente que pode ocorrer através de forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio, van der Waals e interações hidrofóbicas (ALEKSIC; KAPETANOVIĆ, 2014; PAGES et al, 2015). As interações eletrostáticas entre cátions e a estrutura negativa do DNA podem ocorrer na superfície externa da hélice, normalmente através dos sulcos do DNA pelo acesso facilitado às bases e simultaneamente aos grupos fosfatos (GARCÍA-RAMOS et al., 2013). Os sulcos permitem a interação direta com as bases que ficam localizadas na parte central do eixo da dupla hélice, principalmente o sulco maior que é a preferência de acesso por várias proteínas ligantes de DNA (SANGEETHA GOWDA et al., 2014). A intercalação ocorre quando há a inserção de sistemas planares policíclicos aromáticos entre pares de bases do DNA (HERNÁNDEZ-GIL et al., 2013; KOOL, 1997). Essa interação é estabilizada pelas nuvens  $\pi$  entre o complexo e as bases e pode ocorrer em ambos os sulcos do DNA. A intercalação

umenta o espaçamento entre as bases adjacentes, resultando na distorção da hélice e interferindo na replicação e transcrição por impedir a ação das topoisomerasas, principalmente nas células com alta taxa de proliferação como as cancerígenas (GARCÍA-RAMOS et al., 2013; SANGEETHA GOWDA et al., 2014).

## 1.2 DESENVOLVIMENTO DE METALONUCLEASES

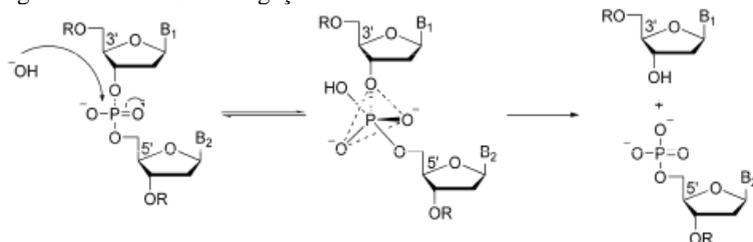
Sob condições fisiológicas as ligações fosfodiéster que formam a fita de DNA são estáveis hidroliticamente apresentando meia vida de  $10^6$  anos. Enzimas que aceleram essa reação e promovem a cisão do DNA são denominadas nucleases (COWAN, 2001; JIN; COWAN, 2005; SILVERMAN, 2010). A clivagem do DNA é essencial para os processos de reparo da replicação e também na desinserção de DNA viral e normalmente são promovidos por endonucleases, como as topoisomerasas e as enzimas de restrição. Dessa forma, terapêuticos em que o alvo seja o DNA também precisam promover a clivagem para induzir processos de morte celular, como a apoptose (SANGEETHA GOWDA et al., 2014). O desenvolvimento de análogos de riboenzimas e pequenas moléculas que sejam capazes de clivar as ligações fosfodiéster no DNA de forma sítio-específica tem sido uma área de intenso estudo devido ao grande potencial em aplicações biotecnológicas e terapêuticas como no câncer e doenças virais (ALEKSIC; KAPETANOVIĆ, 2014; COWAN, 2001; DUCHEMIN et al., 2017; HERNÁNDEZ-GIL et al, 2013; PAGES et al, 2015; SILVERMAN, 2010; SILVESTRI; BRODBELT, 2013; SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000).

A hidrólise biomimética das ligações fosfodiéster do DNA promovida por nucleases tem grande importância biológica, especialmente as reações intermediadas por íons metálicos (DUCHEMIN et al., 2017; PAGES et al, 2015; SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000). A interação dos íons metálicos é de suma importância para a química dos ácidos nucleicos, visto que na maioria das vezes o íon metálico é a interface entre o DNA e a enzima (LIPPERT, 1992). Nucleases associadas a cofatores metálicos podem se unir extensamente ao oligonucleotídeo e acelerar a reação de hidrólise da ligação fosfodiéster, como, por exemplo, as riboenzimas que podem utilizar íons metálicos divalentes como cofatores para catálise (COPELAND et al., 2002; SILVERMAN, 2010).

A compreensão estrutural e do mecanismo catalítico de metalonucleases naturais serve de modelo para o desenvolvimento de

nucleases artificiais com a incorporação de íons metálicos para aumento de sua capacidade catalítica (GYURCSIK; CZENE, 2011; SANGEETHA GOWDA et al., 2014). A interação entre as cargas negativas dos grupos fosfato reprimem a aproximação de nucleófilos de pequenas moléculas, repressão esta que é diminuída na presença de metais de transição devido à ligação de primeira esfera entre o metal e o éster do fosfato, permitindo que a nuclease metálica se una extensamente ao DNA. A capacidade hidrolítica dessas pequenas moléculas pode ser incrementada com a inserção de grupos funcionais, como quelatos ou compostos de coordenação (COPELAND et al., 2002; SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000). As propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos complexos metálicos os fazem ótimas matrizes para aplicações biológicas, visto que a neutralização por cofatores metálicos é um dos mecanismos mais utilizados pelas enzimas naturais (COWAN, 2001; SANGEETHA GOWDA et al., 2014; WEIDMANN; KOMOR; BARTON, 2013). Os íons metálicos têm diversas funções como promover a ligação e reconhecimento do substrato, ativação eletrostática, geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) para ataque nucleofílico, compensação de cargas e estabilização do estado de transição do fosfato pentacoordenado (GYURCSIK; CZENE, 2011; LIPPERT, 1992). Normalmente a hidrólise é facilitada pela presença de íons metálicos que atuam como ácidos de Lewis. O ataque nucleofílico ao grupo fosfato promove a formação de um intermediário pentacoordenado que é estabilizado pelo catalizador e irá promover a clivagem da ligação fosfodiéster resultando na cisão da fita (Fig. 2) (SANGEETHA GOWDA et al., 2014).

Figura 2 - Hidrólise das ligações fosfodiéster do DNA.



Fonte: SANGEETHA GOUDA et al., 2014.

Desde a descoberta da cisplatina como agente antitumoral a interação dos complexos metálicos com o DNA tem sido alvo de intensa pesquisa para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos

(SANGEETHA GOWDA et al., 2014). Metalocomplexos com capacidade de simular atividade de nuclease podem promover a reação em 14 ordens de magnitude e essa função é acentuada quando são associados a agentes bimetalícos, quando há grupos funcionais positivamente carregados e/ou quando os ligantes se conjugam ao DNA através dos sulcos ou como intercaladores (HERNÁNDEZ-GIL et al., 2013; LIPPERT, 1992; JIN; COWAN, 2006).

A reatividade eletroquímica e fotoquímica dos metalocomplexos possibilita que eles interajam com DNA de diversas formas e promovam a clivagem da dupla fita. Alguns complexos metálicos podem apresentar atividade catalítica via mecanismo oxidativo o que aumenta sua potencialidade como agentes antitumorais (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000). A clivagem oxidativa ocorre pelo ataque à pentose e às bases e é mediada por espécies reativas de oxigênio (EROs) que além de promover a clivagem podem causar efeitos citotóxicos (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000). O mecanismo de clivagem oxidativa do DNA baseia-se em processos de transferência de elétrons nas espécies envolvidas e nos alvos. As EROs podem ser geradas através da redução sequencial do oxigênio molecular originando ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila (OH), sendo este último extremamente reativo provocando danos ao DNA pela adição de pontes duplas às bases ou por subtrair átomos de hidrogênio da pentose. Ainda há o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) responsável pela clivagem oxidativa de DNA através de transferência de energia (JIANG et al., 2007; SANGEETHA GOWDA et al., 2014). A presença de metais com capacidade redox possibilita a formação de radicais hidroxila através de reações do tipo Fenton e Haber-Weiss que promove a clivagem do DNA por um mecanismo dependente do metal. O ataque oxidativo das espécies metálicas em alto estado de oxidação e/ou ataque das EROs à pentose promovem a clivagem do DNA (BARTON; RAPHAEL, 1984; FLEISHER et al., 1986; HERNÁNDEZ-GIL et al., 2013; LIPPERT, 1992; KOMOR; BARTON, 2013). Esse mecanismo é vantajoso para drogas anticâncer, pois a maioria dos agentes antitumorais só interage com o DNA na presença de oxigênio e íons metálicos, além de possuírem, em sua maioria uma porção glicosilada que aumenta a eficiência da clivagem por favorecer o reconhecimento entre a droga e o DNA (LIPPERT, 1992; SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000).

Com o objetivo de aumentar o reconhecimento pelo DNA, as metalonucleases podem estar associadas a ligantes sítio-específico de DNA, como ligantes de sulco maior ou menor. A multinuclearidade dos complexos também podem aumentar a eficiência e seletividade devido à

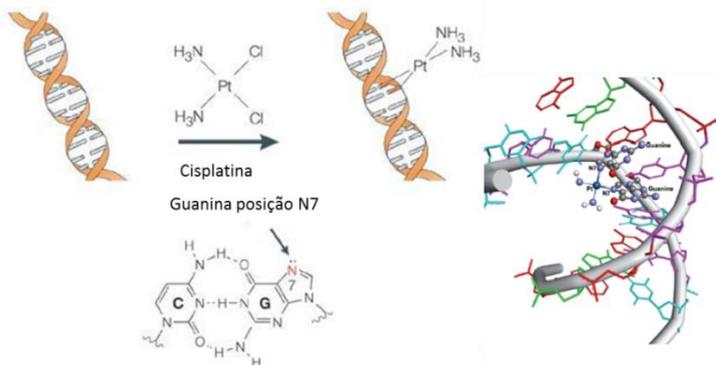
cooperatividade positiva e formação de espécies ativas. Metalonucleases carregadas positivamente têm maior afinidade pelo DNA polianiónico e maior eficiência de clivagem. A planaridade do complexo também potencializa a clivagem seja pela possibilidade em intercalar com as bases do DNA ou por aumentar a afinidade ao DNA por  $\pi$ -stacking e ainda por possibilitar a fotoclivagem sob radiação de fonte luminosa no comprimento de onda específico do ligante (JIANG et al., 2007).

### 1.2.1 Platina

Vários metais de transição têm sido empregados na química medicinal, dentre eles os complexos de platina que têm demonstrado interação com a molécula de DNA de vários modos como intercalação e ligação por sulco através de ligações não covalentes. Porém a primeira droga anticancerígena com platina que teve eficácia comprovada para uso clínico foi a cisplatina, que interage com o DNA de forma covalente (PAGES et al., 2015).

A descoberta da cis-Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (cisplatina, cis-diaminodicloroplatina(II) - cis-DDP) como antitumoral na década de 60 foi uma revolução no tratamento do câncer. As formas biológicas ativas originadas pela troca dos ligantes por moléculas de água cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl(OH<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> e cis-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(OH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>]<sup>2+</sup> se ligam covalentemente ao DNA formando *crosslinks* intrafita entre duas guaninas adjacentes na posição N7, que é mais acessível pelo sulco maior (Fig. 3). Os adutos formados pela combinação da platina e DNA são reconhecidos pelas proteínas celulares, inibem processos como a transcrição e replicação e induzem a apoptose. A cisplatina tem ampla distribuição sistêmica, não seletiva ou direcionada, tendo suas formas ativas processadas em células de rápida proliferação, sejam elas sadias ou não, fato que causa danos às células saudáveis podendo levar a graves quadros de neurotoxicidade e nefrotoxicidade (LI et al., 2013; LIPPERT, 1992).

Figura 3 - Mecanismo de interação cisplatina-DNA.



Fonte: adaptado de GARCÍA-RAMOS et al., 2013 e SANGEETHA GOUDA et al., 2014.

Após a cisplatina, diversos compostos de coordenação com platina foram propostos e testados para uso em quimioterapia. Estes compostos demonstravam muito mais atividade do que os compostos orgânicos. Os compostos de coordenação com platina apresentam neutralidade, formam quadrado plano quando com Pt(II) e octaedro (Pt(IV)), dentre outras propriedades (LIPPERT, 1992).

### 1.2.2 Zinco

O íon zinco(II) é o sítio ativo metálico de muitas enzimas e a compreensão da sua função catalítica é de grande interesse para aplicação em modelos farmacológicos. A maioria das enzimas com zinco são hidrolíticas e diversos análogos dessas enzimas têm sido estudados (KATSOULAKOU et al., 2002). O zinco é essencial para o crescimento, desenvolvimento e diferenciação de todos os tipos de vida. É o segundo metal traço mais abundante no corpo humano e está presente em mais de 300 metaloenzimas de diferentes espécies como cofator de diversas funções biológicas. Por conter o orbital  $d^{10}$  o Zn(II) não participa de reações redox mas atua como um catalizador eletrofílico em várias enzimas como ácido de Lewis (aceptor de um par de elétrons). Por essa razão o Zn(II) é um íon estável em meios biológicos o que o torna um excelente cofator para reações que requerem um íon estável para atuar como catalizador ácido-base de Lewis. As metaloenzimas com Zn(II) podem assumir diversas geometrias de coordenação (McCALL; HUANG; FIERKE, 2000).

O Zn(II) catalítico localiza-se no sítio ativo da enzima e interage diretamente com o substrato. Normalmente está coordenado a três resíduos de aminoácidos (na ordem de preferência: histidina, glutamato, aspartato e cisteína) e uma molécula de solvente para completar a esfera de coordenação tetraédrica. Também pode ocorrer a coordenação de primeira esfera quando ocorre ligação com quatro aminoácidos (McCALL; HUANG; FIERKE, 2000).

No desenvolvimento de biomiméticos compostos de coordenação de Zn(II) têm demonstrado capacidade de promover a hidrólise do DNA e Zn(II)porfirinas demonstraram habilidade em produzir oxigênio singlete sob irradiação de luz promovendo a oxidação do DNA (LIPPERT, 1992).

### 1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) E AS METALOPORFIRINAS

Nos últimos anos a pesquisa para desenvolvimento de metalocomplexos com ação anticâncer foi intensificada devido aos excelentes resultados apresentados na clínica (JIANG et al., 2007; KOMOR; BARTON, 2013; LIPPERT, 1992; PAGES et al, 2015). O DNA é o alvo das metalodrogas anticâncer e por isso a interação entre o DNA e estes complexos tem sido amplamente estudada. Alguns metalocomplexos atuam como nucleases químicas oxidativas na presença de agentes redutores produzindo EROs através da redução do centro metálico. A fotoativação destes complexos podem causar danos ao DNA devido à geração de oxigênio singlete e por isso fazem parte de uma grande área de interesse de desenvolvimento de drogas capazes de fotoclivar o DNA para uso em terapia fotodinâmica (TFD) (GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2013).

Terapias menos agressivas e mais seletivas como a TFD apresentam vantagens em relação à diminuição da toxicidade e efeitos colaterais. A TFD é uma alternativa aos tratamentos conservadores e tem sido amplamente utilizada nos tratamentos de lesões dermatológicas e tumores acessíveis por endoscopia (LI et al., 2013; ETHIRAJAN et al, 2011). A terapia fotodinâmica é um tratamento minimamente invasivo que tem como objetivo induzir a morte celular através da fotoirradiação local em área pré-tratada com uma droga fotossensibilizadora (FS) (GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2013; STERNBERG; DOLPHIN; BRÜCKNER, 1998). O estresse oxidativo promovido pelo fotossensibilizador desencadeia a morte da célula cancerígena devido aos danos irreversíveis promovidos pela geração de EROs,

principalmente o oxigênio singlete (BŘÍZA et al., 2012). Após o ganho de energia por irradiação do FS ele retorna ao seu estado fundamental transferindo energia para o oxigênio molecular triplete para produzir oxigênio singlete, altamente reativo e citotóxico (ETHIRAJAN et al., 2011). O oxigênio singlete causa danos oxidativos a diversas biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e membranas lipídicas (GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2013). O FS é ativado somente na presença da luz em um comprimento de onda específico e não deve ser ativo no escuro, fato que reduz os efeitos colaterais (JOYCE et al., 2010). Um FS ideal deve ter a habilidade de gerar oxigênio singlete, ter espectros de absorção nas bandas satélites (Q-band), alta solubilidade em solventes injetáveis, ausência de toxicidade no escuro e o mínimo de efeitos adversos (ETHIRAJAN et al., 2011).

Os primeiros agentes fotossensibilizadores aprovados para uso eram compostos orgânicos capazes de gerar oxigênio triplete ( $^3\text{O}_2$ ) para produção de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) altamente reativo com o objetivo de promover a morte celular e a ativação do sistema imune (através da fotoativação entre 600-850 nm). Com o passar dos anos inúmeros complexos inorgânicos foram investigados para uso em TFD, dentre eles as metaloporfirinas que são capazes de gerar oxigênio singlete citotóxico após excitação com luz visível (LI et al., 2013; LIPPERT, 1992; JOYCE et al., 2010).

Grandes sistemas aromáticos têm demonstrado alta afinidade ao DNA e capacidade antitumoral e catalítica por fotoclivagem (KOOL, 1997; SANGEETHA GOWDA et al., 2014). Há diversos complexos com sistemas aromáticos capazes de fotoclivar o DNA, dentre eles as metaloporfirinas (LIPPERT, 1992). As porfirinas têm sido introduzidas no desenvolvimento de metalonucleases e demonstraram aumentar a eficiência e seletividade da clivagem (JIANG et al., 2007). As porfirinas possuem capacidade de absorção de luz visível, um extenso sistema  $\pi$  (22 elétrons  $\pi$ ) e alta estabilidade. Sua estrutura de macrociclo tetrapirrólico apresenta intensa absorção na região de 400 nm (banda Soret) e bandas satélites entre 600-800 nm (Q-band). A inserção de substituintes periféricos e/ou íon metálico no macrociclo podem interferir no espectro de absorção (CHANDRA et al., 2000). O tamanho da molécula, sua planaridade, as propriedades eletrônicas e a capacidade em coordenar com diferentes íons metálicos fazem das porfirinas base ideal para a síntese de sistemas moleculares miméticos de enzimas (CHANDRA et al., 2000; ETHIRAJAN et al., 2011).

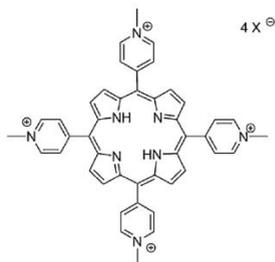
As metaloporfirinas têm importante função em sistemas catalíticos e podem ser utilizadas em vários campos da ciência, desde o

desenvolvimento de novos catalizadores quanto na medicina para atuar como FS para tratamento de tumores (BARRAGÁN et al., 2004; PRATVIEL, 2016). As porfirinas são alvo de investigação para TFD devido à planaridade de sua estrutura, suas propriedades fotofísicas e extraordinária afinidade e seletividade por membranas de células tumorais (SWAVEY; TRAN, 2013; JANA et al., 2016). Na TFD a porfirina fotossensibilizadora é excitada em um comprimento de onda ideal e EROs, como oxigênio singlete e superóxidos, são gerados por reações do tipo II e I, respectivamente, levando a célula à apoptose (XU et al., 2015). Após a absorção de luz o FS no seu estado fundamental singlete é transformado para um estado eletronicamente excitado, o triplete, que pode participar de processos de transferência de elétrons com um substrato biológico promovendo a geração de espécies radiculares (Tipo I). Estas espécies ao interagir com oxigênio molecular dão origem às EROs, como o superóxido. Já no mecanismo Tipo II há a conversão do oxigênio no estado triplete para o estado singlete de vida curta (1-3  $\mu$ s), mas altamente reativo. No estado fundamental o oxigênio possui os dois últimos orbitais preenchidos com um elétron cada, constituindo dois orbitais  $\pi$  degenerados, ou seja, com elétrons desemparelhados e com spins paralelos formando um bi-radical, por isso o oxigênio neste estado é denominado triplete. No estado triplete estes orbitais apresentam a mesma energia e oxigênio apresenta momento spin magnético permanente que é característico de moléculas paramagnéticas. Já quando o oxigênio triplete ganha energia ocorre a inversão do spin de um dos elétrons, gerando um espécie excitada e altamente reativa, o oxigênio singlete (ETHIRAJAN et al., 2011; RIBEIRO et al., 2007; SANGEETHA GOWDA et al., 2014).

A literatura relata resultados importantes de drogas baseadas em porfirinas utilizadas como fotossensibilizadores para TFD em câncer, como o Photofrin® e algumas drogas de segunda geração que já são utilizados na clínica de TFD em complemento a tratamentos tradicionais (ETHIRAJAN et al., 2011; STERNBERG; DOLPHIN; BRÜCKNER, 1998). Dentre as metaloporfirinas, as catiônicas são de grande interesse para TFD, pois favorecem a intercalação com o DNA devido às interações eletrostáticas com os grupos fosfatos dos sulcos e as interações de  $\pi$ -stacking com as bases nitrogenadas. Essas porfirinas também interagem com as cargas negativas das membranas plasmáticas, mitocondrial, lisossômica e do retículo endoplasmático facilitando sua permeação e acumulação para posterior geração de EROs por fotoestimulação (ALEKSIC; KAPETANOVIĆ, 2014; BARRAGÁN et al., 2004; GIREK; SLIWA, 2015; MCCORMICK et al., 2014; JANA et

al., 2016; PAGES et al, 2015). A porfirina catiônica *meso*-tetrakis(4-*N*-metilpiridina)porfirina ( $H_2$ -TMPyP4) é um grande exemplo de porfirina com alta afinidade pelo DNA e geradora de oxigênio singlete que tem seu uso clínico como FS em TFD (Fig. 4) (GIREK; SLIWA, 2015; PRATVIEL, 2016).

Figura 4 - Estrutura da *meso*-tetrakis(4-*N*-metilpiridina)porfirina  $H_2$ -TMPyP4.



Fonte: PRATVIEL, 2016.

## 1.4 JUSTIFICATIVA

A compreensão da interação de metalocomplexos com DNA se faz necessária para o desenvolvimento de novas nucleases. Metalocomplexos de Zn(II) mimetizam o sítio ativo de diversas enzimas e podem ter sua interação ao DNA e ação catalítica intensificada quando associados a ligantes como os derivados da amina cíclica 1,4,7-triazaciclono-nano (TACN), ou, a compostos de coordenação com metais de transição, como a Pt(II). As propriedades dos íons metálicos associadas à planaridade, estabilidade e absorção de luz das porfirinas podem gerar metaloporfirinas com amplo uso nas ciências. Neste trabalho, foi avaliada a interação do DNA com metaloporfirinas de Zinco(II) com substituintes derivados do 1,4,7-triazaciclono-nano e metaloporfirinas catiônicas de Zinco(II) com compostos de coordenação de Platina(II) a fim de investigar sua capacidade catalítica em fotoclivar o DNA. Também foram estudadas as interações sítio-específicas da formação do complexo porfirina-DNA através de técnicas espectroscópicas e de eletroforese.

## REFERÊNCIAS

- ALEKSIĆ, M. M.; KAPETANOVIĆ, V.. An Overview of the Optical and Electrochemical Methods for Detection of DNA – Drug Interactions. **Acta Chimica Slovenica**, v. 61, p. 555–573, 2014.
- BARRAGÁN, E.; GORDILLO, B.; VARGAS, G.; VELAZCO, L.. The role of cobalt, copper, nickel, and zinc in the DNA replication inhibitory activity of p-aminophenyl triphenylporphyrin, **Applied Organometallic Chemistry**, v. 18, p. 311–317, 2004.
- BARTON, J.K.; RAPHAEL, A.R.. Photoactivated Stereospecific Cleavage of Double-Helical DNA by Cobalt(III) Complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 106, n. 8, 1984.
- BŘÍZA, T.; KRÁLOVÁ, J.; CÍGLER, P.; KEJÍK, Z.; POUČKOVÁ, P.; VAŠEK, P.; MOSEROVÁ, I.; MARTÁSEK, P.; KRÁL, V.. Combination of two chromophores: Synthesis and PDT application of porphyrin–pentamethinium conjugate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22 (1), p. 82–84, 2012.
- CHANDRA, R.; TIWARI, M.; KAUR, P.; SHARMA, M.; JAIN, R.; DASS, S.. Metalloporphyrins - applications and clinical significance. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 15, p. 183–199, 2000.
- COPELAND, K.D.; FITZSIMONS, M.P.; HOUSER, R.P.; BARTON, J.K.. DNA Hydrolysis and Oxidative Cleavage by Metal-Binding Peptides Tethered to Rhodium Intercalators. **Biochemistry**, v. 41, n. 1, 2002.
- COWAN, J.A.. Chemical nucleases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, p. 634–642, 2001.
- DOTY, P.. DNA and RNA forty years ago. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 21(3), 2003.
- DUCHEMIN, N.; HEATH-APOSTOLOPOULOS, I.; SMIETANA, M.; ARSENIYADIS, S.. A decade of DNA-hybrid catalysis: from innovation to comprehension. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 15, p. 7072–7087, 2017.

ETHIRAJAN, M.; CHEN, Y.; JOSHI, P.; PANDEY, R. K.. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 40, 340–362, 2011.

FLEISHER, M.B.; WATERMAN, K.C.; TURRO, N.J., BARTON, J.K.. Light-Induced Cleavage of DNA by Metal Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 25, n. 20, 1986.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J.L.; HERNÁNDEZ-GIL, J.; MARTÍNEZ-RUIZ, A.; CASTIÑEIRAS, A.; LIU-GONZÁLEZ, M.; PALLARDÓ, F.V.; BORRÁS, J.; PIÑA, G.A.. DNA binding, nuclease activity, DNA photocleavage and cytotoxic properties of Cu(II) complexes of N-substituted sulfonamides. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 121, p. 167–178, 2013.

GARCÍA-RAMOS, J.C.; GALINDO-MURILLO, R.; CORTÉS-GUZMÁN, F.; RUIZ-AZUARA, L.. Metal-based Drug-DNA Interactions. **The Journal of the Mexican Chemical Society**, v.57(3), p. 245-259, 2013.

GIREK, B.; SLIWA, W.. Hybrids of cationic porphyrins with nanocarbons. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 82 (3), p. 283–300, 2015.

GYURCSIK, B.; CZENE, A.. Towards artificial metallonucleases for gene therapy: recent advances and new perspectives. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3(15), p. 1935–1966, 2011

HERNÁNDEZ-GIL, J.; FERRER, S.; CABEDO, N.; LÓPEZ-GRESA, M.P.; CASTIÑEIRAS, A.; LLORET, F.. Two copper complexes from two novel naphthalene-sulfonyl-triazole ligands: Different nuclearity and different DNA binding and cleavage capabilities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 125, p. 50–63, 2013.

HOFSTADLER, S.A.; GRIFFEY, R.H.. Analysis of noncovalent complexes of DNA and RNA by mass spectrometry. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 2, 2001.

JANA, A.; MCKENZIE, L.; WRAGG, A. B.; ISHIDA, M.; HILL, J. P.; WEINSTEIN, J. A.; BAGGALEY. E.; WARD, M. D.. Porphyrin/Platinum(II) C<sup>^</sup>N<sup>^</sup>N Acetylide Complexes: Synthesis,

Photophysical Properties, and Singlet Oxygen Generation. **Chemistry A European Journal**, v. 22, p. 4164 – 4174, 2016.

JIANG, Q.; XIAO, N.; SHI, P.; ZHU, Y.; GUO, Z.. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, p. 1951–1972, 2007.

JIN, Y; COWAN, J.A.. DNA Cleavage by Copper-ATCUN Complexes. Factors Influencing Cleavage Mechanism and Linearization of dsDNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 8408-8415, 2005.

JIN, Y; COWAN, J.A.. Targeted Cleavage of HIV Rev Response Element RNA by Metallopeptide complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 2, p. 410-411, 2006.

JOYCE, L.E.; AGUIRRE, J.D.; ANGELES-BOZA, A.M.; CHOUAI, A.; FU, P.L.K.; DUNBAR, K.R.; TURRO, C.. Photophysical Properties, DNA Photocleavage, and Photocytotoxicity of a Series of Dppn Dirhodium(II,II) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 49, p. 5371–5376, 2010.

JOYNER, J.C.; COWAN, J.A.. Target-directed catalytic metallodrugs. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 465-485, 2013.

KATSOULAKOU, E.; LALIOTI, N.; RAPTOPOULOU, C.P.; TERZIS, A.; MANESSI-ZOUPA, E.; PERLEPES, S.P.. Insights into the role of zinc(II) sites in hydrolytic enzymes: study of the  $Zn^{II}/X/(py)_2CO$  ( $X=Cl^-$ ,  $N_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$ ;  $(py)_2CO$  = di-2-pyridyl ketone) reaction systems. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 5, p. 719–723, 2002.

KOMOR, A.C.. BARTON, J.K.. The path for metal complexes to a DNA target. **Chemical Communications**, v.49, p. 3617-3630, 2013.  
KOOL, E. T.. Hydrogen bonding, base stacking, and steric effects in DNA replication. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 30, p. 1-22, 2001.

KOOL, E.T.. Preorganization of DNA: Design Principles for Improving Nucleic Acid Recognition by Synthetic Oligonucleotides. **Chemical Reviews**, v. 97(5), p. 1473–1488, 1997.

LI, Z.; BURYA, S.J.; TURRO, C.; DUNBAR, K.R.. Photochemistry and DNA photocleavage by a new unsupported dirhodium(II,II) complex. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, v. 371: 20120128, 2013.

LIPFERT, J.; DONIACH, S.; DAS, R.; HERSCHLAG, D.. Understanding Nucleic Acid–Ion Interactions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 83, p. 813–841, 2014.

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

MARMUR, J; DOTY, P. . Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. **Journal of Molecular Biology**, v. 5, p. 109-118, 1962.

MATTA, C.F.; CASTILLO, N.; BOYD, R.J.. Extended Weak Bonding Interactions in DNA:  $\delta$ -Stacking (Base-Base), Base-Backbone, and Backbone-Backbone Interactions. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 563-578, 2006.

McCALL, K.A.; HUANG, C-C.; FIERKE, C.A.. Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. **The Journal of nutrition**, v. 130, p. 1437S-1446S, 2000.

MCCORMICK, B. P. P.; PANSA, M. F.; SANABRIA, L. N. M.; CARVALHO, C. M. B.; FAUSTINO, M. A. F.; NEVES, M. G. P. M. S.; CAVALEIRO, J. A. S.; VITTAR, N. B. R.; RIVAROLA, V. A.. Cationic porphyrin derivatives for application in photodynamic therapy of cancer. **Laser Physics**, v. 24 (4), p.1-8 (045603), 2014.

PAGES, B. J.; ANG, D. L.; WRIGHT, E. P.; ALDRICH-WRIGHT, J. R.. Metal complex interactions with DNA. **Dalton Transactions**, v. 44, p. 3505–3526, 2015.

PRATVIEL, G. Porphyrins in complex with DNA: Modes of interaction and oxidation reactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 308, p. 460-477, 2016.

PRAY, L.. Discovery of DNA structure and function: Watson and Crick. **Nature Education**, v. 1(1):100, 2008.

RIBEIRO, J.N.; JORGE, R.A.; DA SILVA, A.R.; FLORES, A.V.; RONCHI, L.M.; TEDESCO, A.C.. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Eclética Química**, v. 32 (1), p. 7-14, 2007.

SANGEETHA GOWDA, K.R.; MATHEW, B.B.; SUDHAMANI, C.N.; BHOJYA NAIK, H.S.. Mechanism of DNA Binding and Cleavage. **Biomedicine and Biotechnology**, v.2 (1), p. 1-9, 2014.

SHAHABADI, N.; KASHANIAN, S.; FATAHI, A.. Identification of Binding Mode of a Platinum (II) Complex, (DIP), and Calf Thymus DNA. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, p. 1-7, 2011.

SILVERMAN, S.K.. Catalytic DNA: Scope, Applications and Biochemistry of Deoxyribozymes. **Trends in Biochemical Sciences**, v.41(7), p.595-609, 2016

SILVERMAN, S.K.. DNA as a Versatile Chemical Component for Catalysis, Encoding, and Stereocontrol. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v 49(40), p. 7180–7201, 2010.

SILVESTRI, C.; BRODBELT, J.S.. Tandem mass spectrometry for characterization of covalent adducts of DNA with anticancer therapeutics. **Mass spectrometry Reviews**, v. 32, p. 247-266, 2013.

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 (37), p. 8814-8824, 2000.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRÜCKNER, C.. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 54, p. 4151-4202, 1998.

SWAVEY, S.; TRAN, M.. Porphyrin and Phthalocyanine Photosensitizers as PDT Agents: A New Modality for the Treatment of Melanoma. **Recent Advances in the Biology, Therapy and**

**Management of Melanoma, Dr. Lester Davids (Ed.), InTech**, p. 253-282, 2013.

WATSON, J.D.; CRICK, F.H.C..Molecular structure of nucleic acids. **Nature**, v.171, p. 737-738, 1953.

WEIDMANN, A.G.; KOMOR, A.C.; BARTON, J.K.. Targeted Chemotherapy with Metal Complexes, **Comments on Inorganic Chemistry: A Journal of Critical Discussion of the Current Literature**, v. 34(3-4), p. 114-123, 2014.

XU, Z.B; YU, F-Q.; WU, F.; ZHANG, H.; WANG, K.; ZHANG, X-L.. Synthesis, DNA photocleavage, singlet oxygen photogeneration and two photon absorption properties of ruthenium-phenanthroline porphyrins. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 19, p. 1-7, 2015.

## 2 CAPÍTULO II – INTERAÇÃO E FOTOCLIVAGEM DE DNA COM A PORFIRINA MESO-MONO-[4-(1,4,7-TRIAZACICLONONANIL)]-TRI(FENIL) E SEU RESPECTIVO COMPLEXO DE ZINCO(II)

### 2.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

O desenvolvimento de metalocomplexos de baixa massa molecular capazes de mimetizar as funções de nucleases e fosfatases naturais é uma área de ampla pesquisa, visto sua vasta aplicação biotecnológica e médica (HERNÁNDEZ-GIL et al, 2013; JIN; COWAN, 2005; TJIOE et al, 2012; WAN et al, 2006). Diversos estudos têm associado a amina cíclica 1,4,7-triazaciclono-nano (TACN) para síntese de complexos metálicos (TJIOE et al, 2012). Desde sua síntese em 1972 a TACN tem demonstrado sua importância na estabilização de estruturas inorgânicas como complexos de metais de transição (PERALTA et al, 2005). Este ligante é amplamente utilizado como mimético de enzimas devido sua capacidade de hidrolisar as ligações fosfodiéster do DNA (CHITRAPRIYA et al., 2014; WAN et al., 2006; QIAN et al, 2010). Da mesma forma, as porfirinas e seus derivados tem recebido especial atenção para o desenvolvimento de drogas e para uso como fotossensibilizadores para tratamento antitumoral por terapia fotodinâmica (TFD) (XU et al., 2015). Com base na eficiência desses dois grupos, TACN e porfirinas, porfirinas com substituintes triaza foram sintetizadas para investigar sua habilidade em fotoclivar o DNA e atuar como novos agentes fotossensibilizadores para uso em TFD (AURAS et al, 2016).

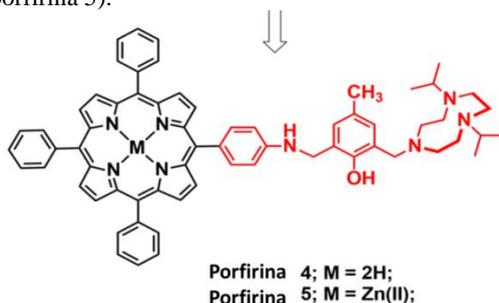
A TACN-porfirina base livre 5-(3-[(4,7-diisopropil-1,4,7-triazaciclono-nano-1-il)metil]-2-hidroxil-5-metilbenzamino)-10,15,20-tri(fenil), denominada Porfirina 4 e seu correspondente complexo de Zinco(II), denominado Porfirina 5 foram sintetizados como miméticos de nucleases no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia - LABINC- UFSC pelo Prof. Dr. Bernardo A. Iglesias – Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM e por Bruna L. Auras, M.Sc. conforme apresentado por AURAS e colaboradores (2016) (Fig.5).

Em colaboração com o LABINC- UFSC foram realizados estudos preliminares de interação das porfirinas 4 e 5 com o DNA de timo de bezerro (*calf-thymus* DNA ou CT-DNA) por espectroscopia na região de ultravioleta visível (UV-Vis) e emissão de fluorescência através de ensaios de titulação de CT-DNA nas porfirinas. Os resultados sugerem

que a interação das TACN-porfirinas ocorre por meio de interações do tipo  $\pi$ -stacking (empilhamento) possivelmente por uma inserção parcial do grupo fenil ou 4-aminofenil entre bases nitrogenadas adjacentes e também por interações secundárias de hidrogênio com os grupos fosfatos do DNA. Para a porfirina com Zinco(II) há indicativo de que o íon metálico também interaja com os grupos fosfato do DNA através de interações eletrostáticas (ARAKI et al., 2000). Ainda demonstrou-se que as TACN-porfirinas sobre irradiação de luz visível são excelentes geradoras de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) - espécie excitada do oxigênio molecular extremamente reativa que apresenta dois elétrons emparelhados (ETHIRAJAN et al., 2011).

As evidências apresentadas nos ensaios preliminares impulsionaram a realização de mais estudos de interação e ensaios de fotoclivagem de DNA para investigação da atividade catalítica destas TACN-porfirinas e sua utilização como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica. Estes ensaios foram realizados no Centro de Biologia Molecular Estrutural – CEBIME – UFSC e serão apresentados neste capítulo.

Figura 5 - Estrutura das porfirinas *meso*-mono-[(4-4,7-diisopropil-1,4,7-triazacilononanil)]-tri(fenil)]porfirina (porfirina 4) e seu respectivo complexo de zinco(II) (porfirina 5).



Fonte: adaptada de AURAS et al., (2016).

## 2.2 OBJETIVO

Estudar as interações das porfirinas 4 e 5 com DNA e demonstrar a habilidade destes complexos em fotoclivar o DNA após fotoirradiação com luz visível.

### 2.2.1 Objetivos específicos

Investigar a atividade catalítica dessas porfirinas através de ensaios de clivagem de DNA plasmidial com visualização dos fragmentos em gel de agarose 1% com coloração de brometo de etídio.

Avaliar a influência da força iônica na interação porfirina-DNA através de ensaio de clivagem de DNA plasmidial na presença de perclorato de lítio ( $\text{LiClO}_4$ ).

Verificar o modo de interação porfirina-DNA através de ensaio de clivagem de DNA plasmidial na presença de ligantes de sulco maior e menor de DNA.

Analisar a influência das espécies reativas de oxigênio (EROs) no mecanismo catalítico das porfirinas através de ensaio de clivagem de DNA plasmidial na presença de sequestradores de EROs.

## 2.3 METODOLOGIA

### 2.3.1 Materiais

O plasmídeo *Bluescript* SK II (pBSK II, 2961 pares de base - pb) foi adquirido da Stratagene (USA) e o kit de purificação *HiSpeed Plasmid Purification* da QIAGEN. A agarose foi obtida da Invitrogen™ e a acetonitrila grau HPLC da TediaBrasil. O DNA de timo de bezerro (*Calf Thymus* DNA - CT-DNA, 8-15 quilobase - kb), netropsina, verde de metila, Tris-HCl e água grau reagente para biologia molecular foram adquiridos da Sigma-Aldrich®. Todos os outros reagentes utilizados são de grau analítico.

### 2.3.2 Síntese e caracterização dos complexos

A rota sintética e caracterização dos complexos estudados no presente trabalho foram realizadas pelo Prof. Dr. Bernardo A. Iglesias – Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM e Bruna L. Auras, M.Sc. – Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina conforme descrito por AURAS e colaboradores (2016).

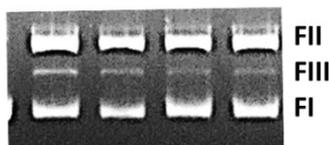
### 2.3.3 Ensaios de clivagem de DNA

O plasmídeo pBSK II foi replicado em bactérias competentes DH5 $\alpha$  transformadas e purificado usando o protocolo do Kit de purificação *HiSpeed Plasmid* da QIAGEN. As concentrações do pBSK II foram determinadas, em termos de pares de base por litro, por espectrofotometria de UV-Vis (ultravioleta visível) aplicando o coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) de 13200 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para leitura no comprimento de onda de 260 nm. As reações padrão para clivagem de DNA foram preparadas com 330 ng/poço (~25  $\mu$ M pb) de DNA plasmidial superenovelado em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v) à temperatura de 37 °C. As concentrações finais dos compostos nos experimentos foram: 35  $\mu$ M para a precursora 5,10,15,20-tetra(fenil)porfirina - TPP e 250  $\mu$ M para *meso*-mono-(4-aminofenil)porfirina de zinco(II) - ZnNH<sub>2</sub>TPP, porfirina 4 e porfirina 5. Os controles ocorreram na ausência de porfirinas. As reações foram incubadas a 37 °C durante o período de 24 horas na ausência de luz ou durante 90 minutos na presença de luz proveniente de uma lâmpada incandescente de tungstênio de 100 W de potência (fotoclivagem) (AURAS et al., 2016). As reações foram interrompidas com o *loading buffer* – LB (azul de bromofenol, glicerol 50 % e 0,5 M EDTA) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %.

### 2.3.4 Eletroforese e quantificação do DNA clivado

As reações de clivagem de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1 %) contendo brometo de etídio (BE 0,3  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) em tampão TBE 0,5 x durante 100 minutos à voltagem fixa de 90 V. Os géis foram revelados em luz UV (KODAK Gel Logic 200 Imaging System). As formas de DNA superenovelado (FI), circular relaxado (FII) e linear (FIII) foram calculadas com base na intensidade de banda de cada canaleta através de análise densitométrica utilizando o software Kodak 1D 3.6 Gel Logic (Kodak). A intensidade das bandas do DNA superenovelado foi corrigida por um fator de 1,47 (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000; JIN et al., 2007) devido à diferente afinidade de ligação do brometo de etídio à FI em comparação às formas II e III (SHUBSDA; GOODISMAN; DABROWIAK, 1997). As formas apresentam migração diferente no gel, conforme demonstrado na Figura 6.

Figura 6 – Representação do padrão de migração do DNA plasmidial em gel e agarose 1%.



Fonte: acervo da autora.

### 2.3.5 Influência dos ligantes de sulco e força iônica na clivagem do DNA pelas porfirinas

Ensaio com ligantes de sulco menor e maior foram realizados com a adição de netropsina ou verde de metila (50  $\mu\text{M}$  concentração final) à reação padrão. As reações foram pré-incubadas durante 30 minutos a 37 °C na ausência de luz antes da adição das porfirinas.

A influência da força iônica sobre a clivagem de DNA pelos complexos foi investigada pela adição de  $\text{LiClO}_4$  (100 mM concentração final) à reação padrão para pré-incubação durante 30 minutos a 37 °C na ausência de luz antes da adição das porfirinas. Após a prévia incubação todas as amostras – com ligantes de sulco ou  $\text{LiClO}_4$  – foram mantidas a 37 °C durante 90 minutos com exposição à luz visível (100 W). As reações foram interrompidas com LB e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %.

### 2.3.6 Mecanismo catalítico

Para investigar a importância das espécies reativas de oxigênio (EROs) no mecanismo catalítico das porfirinas foram realizadas reações na presença de sequestradores de espécies superóxido (KI 8 mM), radicais hidroxila (DMSO e *t*-BuOH 0,8 mM) e oxigênio singlete ( $\text{NaN}_3$  8 mM) (XU et al., 2010). As reações foram incubadas a 37°C durante 90 minutos com exposição à luz visível, interrompidas com LB e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %.

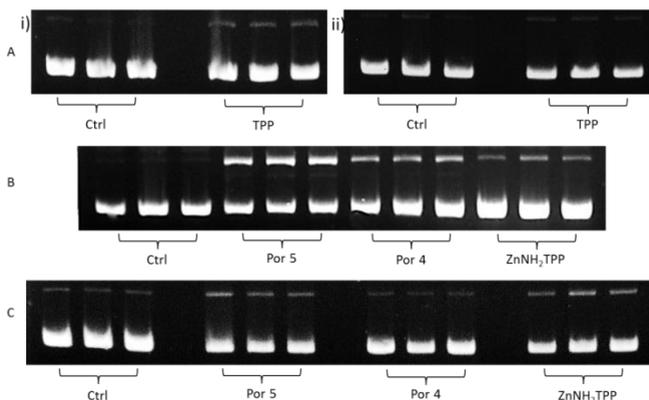
## 2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados descritos a seguir foram publicados na revista *Photochemical & Photobiological Sciences* da *The Royal Society of Chemistry* – artigo aceito em 20 de março de 2016 conforme APÊNDICE A.

### 2.4.1 Fotoclivagem de DNA

Neste trabalho avaliou-se a capacidade das TACN-porfirinas em fotoclivar o DNA plasmidial quando expostas à luz visível. Primeiramente as reações de clivagem de DNA plasmidial na presença das porfirinas foram incubadas durante 24 horas na ausência de luz e depois submetidas à eletroforese em gel de agarose. Da mesma forma reações de clivagem com as porfirinas foram submetidas à incubação durante 90 minutos com fotoirradiação de luz visível, conforme demonstrado na Figura 7. Nas reações incubadas na ausência de luz (escuro) a porcentagem de clivagem não foi maior do que a apresentada na amostra controle, inferindo que nenhuma das porfirinas estudadas apresentou atividade no escuro (Fig. 8). Contudo nas reações fotoirradiadas com luz visível foi verificado a atividade de clivagem dessas porfirinas, inclusive promovendo o aparecimento de DNA na forma linear (FIII). Além das porfirinas 4 e 5 foram realizados ensaios com as porfirinas precursoras TPP e  $ZnNH_2TPP$  que apresentaram menor atividade que seus derivados. Os resultados demonstraram que a capacidade em fotoclivar o DNA obedeceu a ordem decrescente porfirina5 > porfirina4 >  $ZnNH_2TPP$  > TPP (para porcentagem de clivagem de DNA) e que a adição das unidades de 1,4,7-triazacilonanil influenciou expressivamente na atividade de fotoclivagem das porfirinas evidenciando a possibilidade das TACN-porfirinas serem utilizadas como fotossensibilizadoras em TFD.

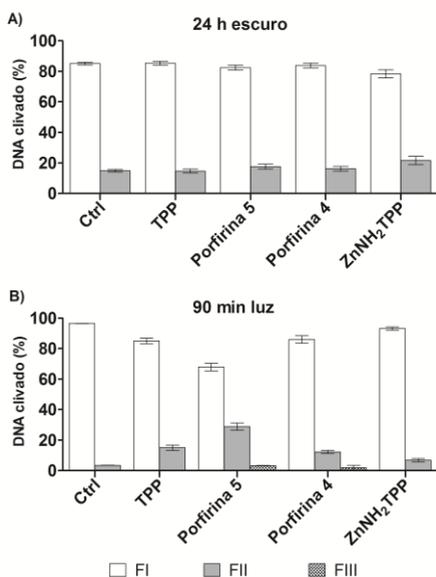
Figura 7 – Análise dos fragmentos de clivagem promovidos pelas TACN-porfirinas.



Reações padrão: DNA plasmidial (~25  $\mu\text{M}$  pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v). Porfirinas: TPP (35  $\mu\text{M}$ ),  $\text{ZnNH}_2\text{TPP}$  (250  $\mu\text{M}$ ), base livre 4 (Por 4 - 250  $\mu\text{M}$ ) e  $\text{Zn(II)}$ -porfirina 5 (Por 5 - 250  $\mu\text{M}$ ). Ctrl – controle sem complexo. A-ii e C): as reações foram incubadas durante 24 horas a 37°C no escuro. A-i e B): as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com fotoirradiação de luz visível.

Fonte: acervo da autora e publicada por AURAS e colaboradores (2016).

Figura 8 - Representação gráfica dos fragmentos de clivagem



Análise quantitativa dos fragmentos de clivagem promovidos pelas porfirinas (quantificação das bandas observadas no gel da Figura 7). Reações padrão: DNA plasmidial (~25  $\mu$ M pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v). Porphirinas: TPP (35  $\mu$ M), ZnNH<sub>2</sub>TPP (250  $\mu$ M), base livre 4 (Por 4 - 250  $\mu$ M) e Zn(II)-porfirina 5 (Por 5 - 250  $\mu$ M). Ctrl – controle sem complexo. A) as reações foram incubadas durante 24 horas a 37°C no escuro. B) as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com fotoirradiação de luz visível. Os dados representados referem-se a média e desvio padrão.

Fonte: adaptada de AURAS e colaboradores (2016).

#### 2.4.2 Estudo da influência dos ligantes de sulco e da força iônica nas reações de clivagem de DNA

Ensaio com ligantes de sulco de DNA dupla fita auxiliam na elucidação do mecanismo de interação de pequenas moléculas com o DNA (KIM; NORBÉN, 1993). Neste trabalho foram utilizados ligantes de sulco como bloqueadores para investigar se as TACN-porphirinas interagem com a dupla fita via sulco menor ou maior. Para esse objetivo utilizou-se a netropsina como bloqueador de sulco menor e o verde de metila (MG – *methyl green*) como bloqueador de sulco maior em reações de fotoclivagem de DNA com porfirinas.

A netropsina é um oligopeptídeo com dois anéis *n*-metilpirrol amplamente conhecido como ligante de sulco menor de DNA dupla fita (VAN DYKE; HERTZBERG; DERVAN, 1982). A netropsina possui uma conformação arqueada com potencial eletrostático positivo – devido aos hidrocarbonetos aromáticos planares não fusionados - fato este que a atrai para o potencial eletronegativo do sulco menor da dupla fita por intermédio de interações eletrostáticas. As ligações de hidrogênio entre as amidas desse antibiótico e seu potencial em ser acceptor substituinte das ligações de hidrogênio nos pares A e T definem a especificidade da ligação da netropsina, uma vez que o grupo amino N-2 da guanina normalmente bloqueia a interação com esta droga por impedimento estérico e pelo alargamento do sulco menor promovendo a diminuição do potencial eletronegativo (KIM; NORBÉN, 1993; VAN DIKE; HERTSBERG; DERVAN, 1982; ZHAO et al., 2014). Já o verde de metila é amplamente conhecido como ligante específico de sulco maior de DNA dupla hélice (KIM; NORBÉN, 1993). O verde de metila é composto por três anéis de anilina com diferentes graus de metilação e possui duas cargas positivas que conferem sua forte ligação ao sulco maior do DNA. O MG é um fluoróforo altamente eficiente para emissão na região do vermelho, próxima ao infravermelho e é fotoestável (PRIETO et al., 2015). O MG tem preferência de ligação pela forma natural do DNA (não desnaturada) ligando-se na razão estequiométrica de 1 molécula para 13 nucleotídeos - aproximadamente dois terços de uma volta de hélice do DNA dupla fita na conformação B-DNA - prevenindo a fotodimerização das pirimidinas em um intervalo de 20 pares de base (KREY; HAHN, 1975). A formação do complexo MG-DNA não ocorre por intercalação, mas sim predominantemente por interações eletrostáticas com a dupla hélice na conformação B. O MG se liga ao DNA predominantemente por interações iônicas em que o íon amônio quaternário do MG está diretamente envolvido na interação do corante com os grupos fosfatos do DNA (KREY; HAHN, 1975).

Para realizar o bloqueio dos sulcos do DNA as reações foram pré-incubadas com os ligantes netropsina ou verde de metila antecipadamente à adição das porfirinas. As amostras pré-tratadas com netropsina apresentaram um aumento expressivo na atividade de clivagem de DNA na presença de todas as porfirinas. As Figuras 9 e 10 evidenciam o surgimento do DNA linear nas reações com as porfirinas 5 e 4 e juntamente com o surgimento da forma circular em todas as reações: de 31 a 75 % para a metaloporfirina de Zn(II) (Porfirina 5), de 18 a 62 % para a porfirina base livre (Porfirina 4) e de 7 a 58 % para a precursora com Zn(II) ( $ZnNH_2TPP$ ). Por outro lado, a prévia adição de

verde de metila às reações promoveu um pequeno aumento na atividade de clivagem da porfirina 4 e  $ZnNH_2TPP$  e uma grande redução na atividade da porfirina 5 de 31 para 13 % de forma circular.

A ampliação da atividade de clivagem de DNA em amostras pré-incubadas com ligantes de sulco menor é indicativo de que o complexo em questão tem uma maior afinidade pelo sulco maior (VAN DYKE; HERTZBERG; DERVAN, 1982), no entanto os resultados aqui apresentados demonstram uma ligeira diminuição da atividade nas amostras pré-tratadas com o verde de metila, apesar do aumento grandioso de clivagem de DNA promovido pelas porfirinas na presença de netropsina. Dados da literatura apontam que a associação de complexos com atividade de hidrólise das ligações fosfodiéster do DNA (hidrolíticos) a ligantes de DNA, sejam eles intercalantes, ligantes de sulco menor ou grupos positivamente carregados, promove uma maior afinidade do complexo pelo ácido nucleico (MANCIN; SCRIMIN; TECILLA, 2002). A nova orientação desse conjugado (complexo-ligante-DNA) dentro do sulco menor seria o responsável pela maior reatividade do complexo ao DNA devido ao fato das bases nitrogenadas irem de encontro ao sulco menor enquanto o íon metálico seria direcionado à interação com as ligações fosfodiéster do DNA. O ligante de sulco menor distamicina A combinado a outras drogas origina heterodímeros com alta capacidade em modular o sítio de alquilação dos resíduos de guanina nas sequências de DNA ricas em CG promovendo uma eficiente alquilação de G-N3 via uma ligação cooperativa (HIRAKI; OIKAWA; KAWANISHI, 2002; KURODA; TANAKA, 1994; SIGIURA et al., 1990; SUGIYAMA et al., 1996; YAMAMOTO; SUGIYAMA; KAWANISHI, 1993).

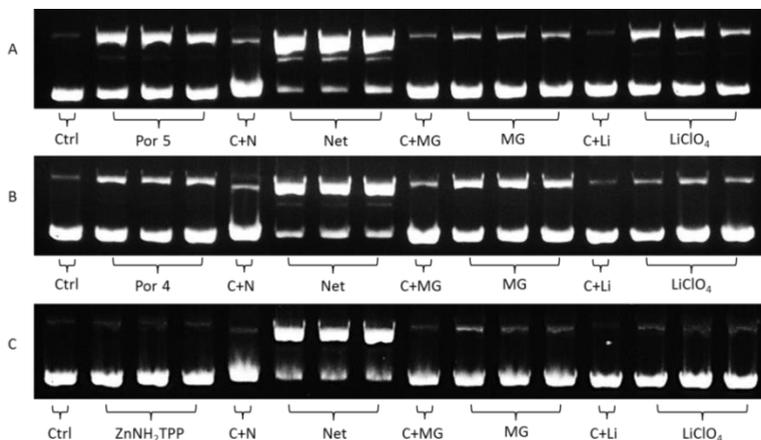
Os resultados aqui apresentados sugerem que o bloqueio dos sulcos maiores do DNA não interfere diretamente na atividade das TACN-porfirinas, porém quando estas porfirinas se associam à netropsina formam um conjugado que assume uma nova conformação espacial frente ao DNA de modo a promover uma nova especificidade de ligação possibilitando interações em regiões ricas em CG.

Na continuidade dos estudos de interação das TACN-porfirinas com DNA foram realizados testes para avaliar a influência da força iônica do meio (solução) na interação DNA-porfirina (Fig.9 e 10). Nestes ensaios as cargas negativas dos grupos fosfatos do DNA são neutralizadas com a adição de perclorato de lítio ( $LiClO_4$ ) às reações sem porfirinas. Após o tempo de incubação as porfirinas são adicionadas e as reações incubadas à luz (KURODA; TANAKA, 1994; SUGIURA

et al., 1990; SUGIYAMA et al., 1996; YAMAMOTO; SUGIYAMA; KAWANISHI, 1993).

Os resultados demonstram alguma influência da força iônica nas interações das TACN-porfirinas com DNA visto que a alteração mais proeminente foi a diminuição de 33 % do aparecimento da forma circular nas reações tratadas com a porfirina 5. Esse efeito demonstra que a neutralização das cargas da dupla fita não impediu a aproximação e atividade catalítica das porfirinas sugerindo que as forças eletrostáticas não são as interações predominantes nessa interação.

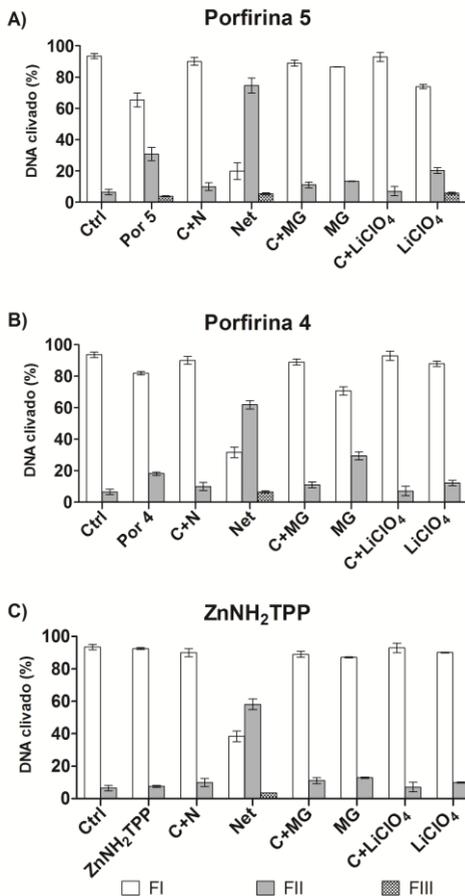
Figura 9 - Efeito dos ligantes de sulco e da força iônica nas reações de clivagem de DNA plasmidial.



Reações padrão: DNA plasmidial (~25 $\mu$ M pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25% v/v). Porfirinas: a) Zn(II)-porfirina 5 (Por 5 – 250  $\mu$ M), b) base livre 4 (Por 4 - 250  $\mu$ M) e c) ZnNH<sub>2</sub>TPP (250  $\mu$ M). Ctrl ou C – controle sem complexo; C + MG - controle + verde de metila (MG) 50  $\mu$ M; C + N - controle + netropsina (Net) 50  $\mu$ M; C + Li - controle + LiClO<sub>4</sub> 100 mM. Todas as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com fotoirradiação de luz visível.

Fonte: acervo da autora e publicada por AURAS e colaboradores (2016).

Figura 10 – Representação gráfica do efeito dos ligantes de sulco e da força iônica nas reações de clivagem de DNA plasmidial.



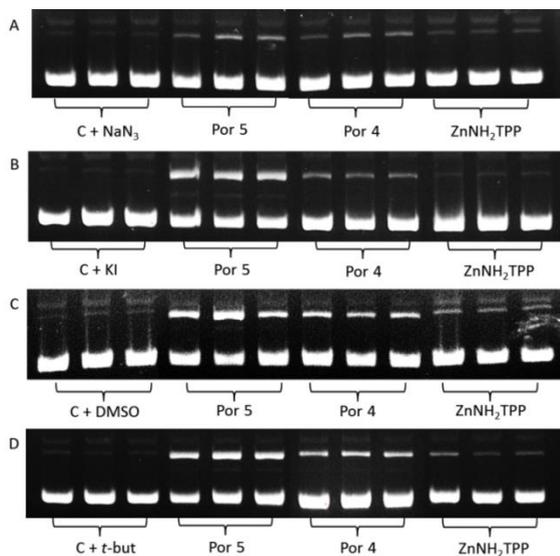
As reações padrão foram incubadas na presença de ligantes de sulco ou perclorato de lítio (LiClO<sub>4</sub>). Reações padrão: DNA plasmidial (~25 μM pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25% v/v). Porfirinas: a) Zn(II)-porfirim 5 (Por 5 – 250 μM), b) base livre 4 (Por 4 - 250 μM) e c) ZnNH<sub>2</sub>TPP (250 μM). Ctrl ou C – controle sem complexo; C + MG - controle + verde de metila 50 μM; C + N - controle + netropsina (Net) 50 μM ; C + Li - controle + LiClO<sub>4</sub> 100 mM. Todas as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com fotoirradiação de luz visível. Os dados representados referem-se a média e desvio padrão.

Fonte: adaptada de AURAS e colaboradores (2016).

### 2.4.3 Mecanismo de clivagem do DNA (sequestradores de EROs)

As TACN-porfirinas demonstraram uma alta capacidade em gerar oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), uma das espécies reativas de oxigênio (EROs) (SUN et al., 2017). As espécies reativas de oxigênio têm origem na redução sequencial do oxigênio molecular e ocasionalmente estão envolvidas em danos ao DNA através de um mecanismo oxidativo (JAIN; TULLIUS, 2008; JIANG et al, 2007; SHCHERBAKOVA et al., 2006; SUN et al., 2017). Ensaios na presença de sequestradores de EROs foram realizados para avaliar se as EROs têm papel fundamental na fotoclivagem de DNA promovida pelas TACN-porfirinas. Nesses estudos verifica-se se o sequestro das EROs implica na redução da atividade de clivagem de DNA das TACN-porfirinas. Nas análises foi verificado que apenas a azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ), sequestradora de oxigênio singlete, foi capaz de inibir, de forma isolada, a formação de DNA circular nas amostras tratadas com a porfirina 5. Essa insensibilidade à presença de sequestradores de EROs em reações de clivagem é um indicativo de reação hidrolítica (MANCIN; SCRIMIN; TECILLA, 2012). Como demonstrado na Figura 11 a clivagem do DNA pela porfirina 4 e  $\text{ZnNH}_2\text{TPP}$  não é dependente de reações intermediadas por EROs sugerindo que o mecanismo catalítico das interações com essas porfirinas não ocorre por uma via oxidativa (MANCIN et al, 2005; WAN et al, 2006; XU et al, 2010). Entretanto observa-se, de forma isolada, uma inibição da formação de DNA circular na presença do sequestrador de oxigênio singlete (azida de sódio) nas reações com a porfirina 5 (Fig. 12), demonstrando que este radical gerado na presença desta porfirina participa do mecanismo catalítico de fotoclivagem do DNA (MANCIN et al., 2005; OIKAMA et al, 1995; WAN et al., 2006).

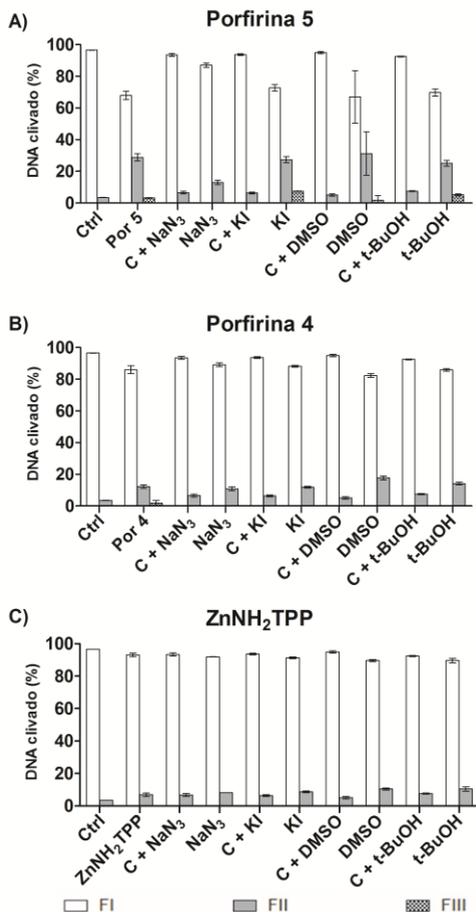
Figura 11 – Reações de clivagem na presença de sequestradores de EROs.



Porfirinas (250  $\mu\text{M}$ ): porfirina 5 (Por 5), porfirina 4 (Por 4) e  $\text{ZnNH}_2\text{TPP}$ . Controles: (C)  $\text{NaN}_3$ , KI, DMSO e *t*-BuOH: C+ $\text{NaN}_3$ , C+KI, C+DMSO e C+*t*-BuOH (*t*-but)). Reações padrão: DNA plasmidial ( $\sim 25 \mu\text{M}$  pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v). Adição dos sequestradores de EROs: a)  $\text{NaN}_3$  (8 mM), b) KI (8 mM), c) DMSO (0,8 mM) e d) *t*-BuOH (0,8 mM). Todas as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com fotoirradiação de luz visível.

Fonte: acervo da autora e publicada por AURAS e colaboradores (2016).

Figura 12 - Representação gráfica das reações de clivagem na presença de EROs.



Porfirinas (250  $\mu$ M): porfirimina 5 (Por 5), porfirimina 4 (Por 4) e ZnNH<sub>2</sub>TPP. Controles: (C) NaN<sub>3</sub>, KI, DMSO e *t*-BuOH: C+NaN<sub>3</sub>, C+KI, C+DMSO e C+*t*-BuOH (*t*-but)). Reações padrão: DNA plasmidial (~25  $\mu$ M pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v). Adição dos sequestradores de EROs: a) NaN<sub>3</sub> (8 mM), b) KI (8 mM), c) DMSO (0,8 mM) e d) *t*-BuOH (0,8 mM). Todas as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com fotoirradiação de luz visível. Os dados representados referem-se a média e desvio padrão.

Fonte: adaptada de AURAS e colaboradores (2016).

## 2.5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi avaliada a habilidade das TACN-porfirinas em interagir e fotoclivar o DNA. Pode-se constatar que a adição do metal Zinco(II) ao macrociclo da porfirina triaza aumentou sua atividade catalítica, em relação à base livre, nos estudos de fotoclivagem do DNA devido à interação axial entre o Zn(II) com os grupos fosfatos do DNA. A neutralização das cargas do DNA promovida nos ensaios de força iônica diminuiu a atividade da porfirina 5 sugerindo que as interações eletrostáticas entre a porfirina 5 e as cargas negativas dos grupos fosfatos do DNA facilitam a interação de ambas estruturas demonstrando ser um fator fundamental, mas não predominante, para a hidrólise do DNA. Os outros complexos parecem não ser afetados por esse tipo de fenômeno assumindo que a carga positiva conferida pelo íon metálico coopera para a interação com as cargas negativas dos grupos fosfatos, como sugerido nos estudos espectroscópicos previamente realizados a este trabalho (AURAS et al., 2016; RAMAN et al., 2010).

Além disso, a porfirina 5 demonstrou uma diminuição na clivagem de DNA na presença do sequestrador de oxigênio singlete ( $\text{NaN}_3$ ) enquanto as outras porfirinas não foram afetadas. Estes resultados sugerem que o oxigênio singlete pode ser o elemento chave para o mecanismo de clivagem desta porfirina (LU et al., 2012). Entretanto, é difícil especular o modo como essa porfirina coordena com a cadeia de ligações fosfodiéster do DNA sendo que o mecanismo não está totalmente elucidado. A habilidade da porfirina 5 em gerar oxigênio singlete após fotoirradiação com luz visível faz deste complexo um promissor fotossensibilizador para terapia fotodinâmica (SWEIGERT et al., 2012; WANG et al., 2013).

## REFERÊNCIAS

- ARAKI, K.; SILVA, C. A.; TOMA, H. E.; CATALANI, L. H.; MEDEIROS, M. H. G.; Di MASCIO, P.. Zinc tetra-ruthenated porphyrin binding and photoinduced oxidation of calf- thymus DNA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.78, p. 269–273, 2000.
- AURAS, B. L.; OLIVEIRA, V. A.; TERENCEZI, H.; NEVES, A.; IGLESIAS, B. A. meso-Mono-[4-(1,4,7-triazacyclononanyl)]-tri(phenyl)]porphyrin and the respective zinc(II)-complex: complete characterization and biomolecules binding abilities. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 15, p. 564-579, 2016.
- CHITRAPRIYA, N.; WANG, W.; JANG, Y.J.; KIM, S.K.; KIM, J.H.. Ligand Effect and Cooperative Role of Metal Ions on the DNA Cleavage Efficiency of Mono and Binuclear Cu(II) Macrocyclic Ligands Complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 140, p. 153–159, 2014.
- ETHIRAJAN, M.; CHEN, Y.; JOSHI, P.; PANDEY, R. K.. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 40, 340–362, 2011.
- HERNÁNDEZ-GIL, J.; FERRER, S.; CABEDO, N.; LÓPEZ-GRESA, M.P.; CASTIÑEIRAS, A.; LLORET, F.. Two copper complexes from two novel naphthalene-sulfonyl-triazole ligands: Different nuclearity and different DNA binding and cleavage capabilities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 125, p. 50–63, 2013.
- HIRAKU, Y.; OIKAWA, S.; KAWANISHI, S. Distamycin A, a minor groove binder, changes enediyne-induced DNA cleavage sites and enhances apoptosis. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 2 (1), p. 95-96, 2002.
- JAIN, S. S.; TULLIUS, T. D.. Footprinting protein–DNA complexes using the hydroxyl radical. **Nature Protocols**, v. 3, p. 1092 – 1100, 2008.
- JIANG, Q.; XIAO, N.; SHI, P.; ZHU, Y; GUO, Z. Design of artificial metallo-nucleases with oxidative mechanism. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, p. 1951–1972, 2007.

JIN, Y.; LEWIS, M. A.; GOKHALE, N. H.; LONG, E. C.; COWAN, J. A.. 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, p. 8353-8361, 2007.

JIN, Y.; COWAN, J.A.. DNA Cleavage by Copper-ATCUN Complexes. Factors Influencing Cleavage Mechanism and Linearization of dsDNA. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 8408-8415, 2005.

KIM, S.K., NORDÉN, B. Methyl green. A DNA major-groove binding drug. **FEBS Letters**, v. 315(1), p. 61-64, 1993.

KREY, A. K.; HAHN, F. E. Studies on the Methyl Green-DNA complex and Its dissociation by drugs. **Biochemistry**, v. 14 (23), 1975.

KURODA, R.; TANAKA, H. DNA-Porphyrin Interactions probed by Induced CD Spectroscopy. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 1575-1576, 1994.

LU, J.; PAN, W.; HE, R.; JIN, S.; LIAO, X.; WU, B.; ZHAO, P.; GUO, H. DNA-binding and photocleavage studies of metallofluorescein-porphyrin complexes of zinc(II) and copper(II). **Transition Metal Chemistry**, v. 37, p. 497-503, 2012.

MANCIN, F.; SCRIMIN, P.; TECILLA, P. Progress in artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, v. 48, p. 5545-5559, 2012.

MANCIN, F.; SCRIMIN, P.; TECILLA, P.; TONELLATO, U. Artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, v. 20, p. 2540-2548, 2005.

OIKAMA, S.; KURASAKI, M.; KOJIMA, Y.; KAWANISHI, S. Oxidative and Nonoxidative Mechanisms of Site-Specific DNA Cleavage Induced by Copper-Containing Metallothioneins. **Biochemistry**, v. 34, p. 8763-8770, 1995.

PERALTA, R.A.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A.J.; CASELLATO, A.; DOS ANJOS, A.; GREATTI, A.; XAVIER, F.R.; SZPOGANICZ, B.. First-Transition-Metal Complexes Containing the Ligands 6-Amino-6-methylperhydro-1,4-diazepine (AAZ) and a New Functionalized Derivative: Can AAZ Act as a Mimetic Ligand for 1,4,7-Triazacyclononane? **Inorganic Chemistry Communication**, v.44, p.7690-7692, 2005.

PRIETO, D.; APARICIO, G.; MACHADO, M.; ZOLESSI, F.R. Application of the DNA-Specific Stain Methyl Green in the Fluorescent Labeling of Embryos. **J. Vis. Exp.**, v.99, e52769, 2015.

QIAN, J.; MA, X.; TIAN, J.; GU, W.; SHANG, J.; LIU, X.; YAN, S.. Hydrolytic cleavage of double-strand DNA by the water-soluble dicobalt(III) complexes of 1,4,7-Triazacyclononane-N-acetate. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 104, p. 993–999, 2010.

RAMAN, N.; JEYAMURUGAN, R.; SAKTHIVEL, A.; MITU, L. Novel metal-based pharmacologically dynamic agents of transition metal(II) complexes: Designing, synthesis, structural elucidation, DNA binding and photo-induced DNA cleavage activity. **Spectrochimica Acta, Part A**, v. 75, p. 88–97, 2010.

SHCHERBAKOVA, I.; MITRA, S.; BEER, R. H.; BRENOWITZ, M.. Fast Fenton footprinting: a laboratory-based method for the time-resolved analysis of DNA, RNA and proteins. **Nucleic Acids Research**, v.34 (6), e48, p.1-9, 2006

SHUBSDA, M. F.; GOODISMAN, J.; DABROWIAK, J. C.. Quantitation of ethidium-stained closed circular DNA in agarose gels. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 34, p.73 –79, 1997.

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, p. 8814-8824, 2000.

SUGIURA, Y.; SHIRAKI, T.; KONISHI, M.; OKI, T. DNA intercalation and cleavage of an antitumor antibiotic dynemicin that contains anthracycline and enediyne cores. **Proceedings of the National**

**Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87(10), p. 3831–3835, 1990.

SUGIYAMA, H.; LIAN, C.; ISOMURA, M.; SAITO, I.; WANG, A. H.-J. Distamycin A modulates the sequence specificity of DNA alkylation by duocarmycin A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93(25), p. 14405–14410, 1996.

SUN, Y.; MA, R.; WANG, S.; LI, G.; SHENG, Y.; RUI, H.; ZHANG, J.; XU, J.; JIANG, D.. New cofactors and inhibitors for a DNA-cleaving DNase: superoxide anion and hydrogen peroxide mediated an oxidative cleavage process. **Scientific Reports**, v. 7 (378), 2017.

SWEIGERT, Z.; XU, Y.; HONG, Y.; SWAVEY, S. Nickel, copper, and zinc centered ruthenium-substituted porphyrins: effect of transition metals on photoinduced DNA cleavage and photoinduced melanoma cell toxicity. **Dalton Transactions.**, v. 41, p. 5201-5208, 2012.

TJIOE, L.; JOSHI, T.; FORSYTH, C.M.; MUBARAKI, B.; MURRAY, K.S.; BRUGGER, J.; GRAHAM, B.; SPICCIA, L. Phosphodiester Cleavage Properties of Copper(II) Complexes of 1,4,7-Triazacyclononane Ligands Bearing Single Alkyl Guanidine Pendants. **Inorganic Chemistry**, v. 51, p. 939–953, 2012.

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**, v. 79, p. 5470-5474, 1982.

WAN, S.-H.; LIANG, F.; XIONG, X.-Q.; YANG, L.; WU, X.-J.; WANG, P.; ZHOU, X.; WU, C.-T. DNA hydrolysis promoted by 1,7-dimethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.16, p. 2804-2806, 2006.

WANG, K.; JIN, Q.; ZHANG, X.; SONG, S.-H. Synthesis, DNA Photocleavage and Singlet Oxygen Measurement of Cationic Bisporphyrins. **The Journal of the Korean Chemical Society**, v. 57, p. 246-251, 2013.

XU, W.; YANG, X.; YANG, L.; JIA, Z.; WEI, L.; LIU F.; LU, G.. Synthesis and DNA cleavage activity of triazacrown-anthraquinone conjugates. **New Journal of Chemistry**, v. 34, p. 2654-2661, 2010.

XU, Z.B; YU, F-Q.; WU, F.; ZHANG, H.; WANG, K.; ZHANG, X-L.. Synthesis, DNA photocleavage, singlet oxygen photogeneration and two photon absorption properties of ruthenium-phenanthroline porphyrins. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 19, p. 1-7, 2015.

YAMAMOTO, K.; SUGIYAMA, H.; KAWANISHI, S.. Concerted DNA recognition and novel site-specific alkylation by duocarmycin A with distamycin A. **Biochemistry**, v. 32 (4), p. 1059-1066, 1993.

ZHAO, P.; LU, J.-Z.; HE, J.; CHEN, W.-H.; CHEN, P.-P.; CHEN, D.-W.; BIN, Q.-Y. Synthesis, DNA-Binding, and Photocleavage Properties of a Series of Porphyrin-Daunomycin Hybrids. **Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids**, v. 33, p. 597-614, 2014.



### 3 CAPÍTULO III – INTERAÇÃO E FOTOCLIVAGEM DE DNA COM MESO-TETRA(4-PIRIDIL)PORFIRINA-TETRAKIS-[CLORO(2,2'BIPIRIDINA)]PLATINA(II)

#### 3.1 CONTEXTUALIZAÇÃO

A hidrólise das ligações fosfodiéster da fita do DNA realizada por nucleases tem grande importância biológica, especialmente as reações intermediadas por íons metálicos. (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000). Os íons metálicos interagem com o éster do fosfato diminuindo a repressão que as cargas negativas dos grupos fosfato exercem sobre a aproximação de nucleófilos de pequenas moléculas, incrementando assim a capacidade hidrolítica dessas pequenas moléculas (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000). Novos catalizadores, como os complexos com metais de transição, têm sido empregados na química medicinal, dentre eles os complexos de platina que tem demonstrado interação com a molécula de DNA de diversos modos como intercalação e ligação por sulco através de ligações não covalentes (DUCHEMIN et al., 2017; PAGES et al., 2015; SHAHABADI; KASHANIAN; FATAHI, 2011). Os metais de transição como a Pt(II) intercedem a oxidação do DNA tanto na ausência quanto na presença de agentes oxidantes ou redutores, através do ataque à pentose ou às bases nitrogenadas do DNA (JIANG et al., 2007). A cisplatina foi a primeira droga anticancerígena com platina que teve eficácia comprovada no uso clínico. Ela interage com o DNA de forma covalente promovendo o crosslinking intra-fita e consequente apoptose (LIPPERT, 1992).

Há grande interesse pelos metalocomplexos com metais de transição multinucleares devido aos efeitos cooperativos entre os centros metálicos e ainda pelos carregados positivamente, pois apresentam maior afinidade pelo DNA polianiónico e tem demonstrado muito mais eficiência na promoção da clivagem do DNA (JIANG et al., 2007). Nesse sentido metaloporfirinas carregadas positivamente tem sido propostas como potenciais metalonucleases para uso em terapia fotodinâmica (ETHIRAJAN et al, 2011; NAUE et al , 2009; PRATVIEL, 2016; SITERs et al., 2015).

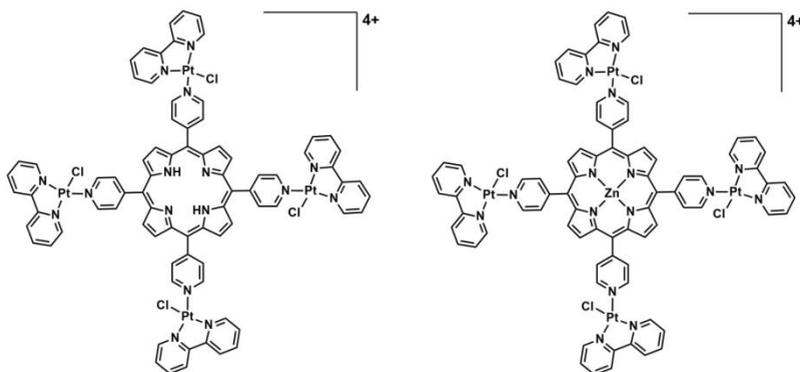
Em consideração às propriedades químicas e fotofísicas das porfirinas e aos excelentes resultados demonstrados por NAUE e colegas (2009) acerca da interação de porfirinas funcionalizadas com  $[Pt(bpy)Cl]^+$  com biomoléculas foi proposta a síntese de porfirinas *meso*-tetra(4-piridil)porfirina-tetrakis-[cloro(2,2' bipyridina)]platina(II) (Fig. 13). A síntese e caracterização dos compostos foram realizadas no

Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia - LABINC- UFSC conforme descrito por OLIVEIRA e colaboradores (2017).

Em colaboração com o LABINC-UFSC foram realizados estudos preliminares de interação das Pt(II)-porfirinas base-livre - H<sub>2</sub>PtPor, e seu complexo de Zn(II) -ZnPtPor com o DNA por técnicas espectroscópicas de UV-Vis e emissão de fluorescência. A hipocromicidade da banda Soret observada por UV-Vis sugere que estas porfirinas interagem com o DNA de uma forma não clássica ou por interações secundárias (ligações de hidrogênio e interações de  $\pi$ -stacking) envolvendo o *N*-doador ou a inserção parcial do anel piridil entre os pares de bases adjacentes do DNA (KUMAR et al., 2012; LIU et al., 2002; LU et al., 1996;), já o baixo deslocamento batocrômico poderia indicar uma intercalação fraca ao sistema  $\pi$  ( $\pi$ ) da dupla fita (DALATABADI, 2011; NAUE et al., 2009;). As constantes intrínsecas de ligação ( $K_b$ ) para estas porfirinas com os compostos de coordenação na posição *para* demonstraram uma ligação mais fraca ao DNA se comparadas as *meta* substituídas de NAUE e colegas (2009) analisadas por ressonância plasmônica de superfície (*surface plasmon resonance* – SPR). Os resultados sugerem que há formação de um aduto porfirina-DNA estabilizado pelas interações eletrostáticas entre a porfirina e os grupos fosfato do DNA, indicando uma interação de modo não intercalativa (LIPSCOMB et al., 1996). Os estudos de emissão de fluorescência corroboraram a hipótese de uma interação não intercalativa para estas porfirinas e, ainda, que ocorre uma interação entre os grupos fosfato do DNA e o íon Zn(II) da ZnPtPor por inserção desta porfirina no sulco maior ou menor. Estudos anteriores a este demonstraram que a posição de coordenação do Zn(II) no macrociclo da porfirina pode promover a interação com o DNA por coordenação ou interações eletrostáticas com os grupos fosfato do DNA (ARAKI et al., 2000; ZHAO et al., 2010).

Estes resultados preliminares demonstraram que as Pt(II)-porfirinas apresentaram fotoestabilidade e grande habilidade em gerar oxigênio singlete quando expostas à luz visível e por isso novos estudos de interação e ensaios de fotoclivagem de DNA foram realizados para a investigação da sua atividade catalítica e possível utilização como fotossensibilizadores em TFD. Estes ensaios foram realizados no Centro de Biologia Molecular Estrutural – CEBIME – UFSC e serão apresentados neste capítulo.

Figura 13 - Representação das porfirinas *meso*-tetra(4-piridil)porfirina-tetrakis-[cloro(2,2'bipiridina)]platina(II), denominadas como H<sub>2</sub>PtPor (base livre - esquerda) e ZnPtPor (direita).



Fonte: acervo da autora.

## 3.2 OBJETIVO

Estudar as interações das porfirinas *meso*-tetra(4-piridil)porfirina-tetrakis-[cloro(2,2'bipiridina)]platina(II), H<sub>2</sub>PtPor e ZnPtPor com DNA e demonstrar a habilidade destes complexos em fotoclivar o DNA após fotoirradiação com luz visível.

### 3.2.1 Objetivos específicos

Estudar a interação das porfirinas de platina (II) com o DNA através de ensaios em espectropolarímetro de dicroísmo circular (CD).

Avaliar a estabilidade térmica do DNA após interação/ligação das Pt(II)-porfirinas através de ensaio de desnaturação térmica de CT-DNA por espectroscopia de UV-Vis.

Investigar a atividade catalítica dessas porfirinas através de ensaios de clivagem de DNA plasmidial com visualização dos fragmentos em gel de agarose 1 % com coloração de brometo de etídio.

Avaliar a influência da força iônica na interação porfirina-DNA através de ensaio de clivagem de DNA plasmidial na presença de concentrações crescentes de perclorato de lítio (LiClO<sub>4</sub>).

Verificar o modo de interação porfirina-DNA através de ensaio de clivagem de DNA plasmidial na presença de ligantes de sulco maior e menor de DNA.

Analisar a influência das espécies reativas de oxigênio (EROs) no mecanismo catalítico das porfirinas através de ensaio de clivagem de DNA plasmidial na presença de sequestradores de EROs.

Delinear os sítios de clivagem de DNA através de ensaios de clivagem direta e *footprinting* com visualização em gel de poliacrilamida 16 % de DNA marcado com fluorescência.

### 3.3 METODOLOGIA

#### 3.3.1 Materiais

O plasmídeo *Bluescript SK II* (pBSK II, 2961 pares de base - pb) foi adquirido da Stratagene (USA) e o kit de purificação *HiSpeed Plasmid Purification* da QIAGEN. A agarose foi obtida da Invitrogen™ e a acetonitrila grau HPLC da TediaBrasil. O DNA de timo de bezerro (*Calf Thymus* DNA - CT-DNA, 8-15 kb - quilobase), netropsina, verde de metila, Tris-HCl e água grau reagente para biologia molecular foi adquirida da Sigma-Aldrich®. O oligonucleotídeo do tipo *hairpin* com 6-carboxifluoresceína (6-FAM) na extremidade 5', denominado ATCG-FAM:

(FAM-

5'CCGATTATTTAATCGCCGGCCGCTTTTTGCGGCCGCGGCGATTAATAATC 3') foi sintetizado pela Síntese Biotecnologia. Todos os outros reagentes utilizados são de grau analítico.

#### 3.3.2 Síntese e caracterização dos complexos

Os complexos utilizados neste trabalho foram sintetizados e caracterizados pelo Prof. Dr. Bernardo A. Iglesias – Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria - UFSM e Bruna L. Auras, M.Sc. – Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina conforme descrito por OLIVEIRA e colaboradores (2017).

#### 3.3.3 Ensaios de interação das porfirinas com DNA de timo de bezerro (*calf thymus* DNA – CT-DNA)

##### 3.3.3.1 Estudos estruturais com dicroísmo circular

Os espectros de Dicroísmo Circular (CD) foram obtidos no espectropolarímetro de Dicroísmo Circular da marca Jasco J-815 (com acessório de termostato Peltier PFD-425S) utilizando uma cubeta de quartzo de 2,0 mm de caminho óptico à temperatura de 37 °C. As leituras foram realizadas entre 520-220 nm com intervalo de comprimento de onda de 1,00 nm e resolução de 0,5 nm à velocidade de varredura de 100 nm.min<sup>-1</sup> resultando em 601 pontos. A concentração inicial de DNA de timo de bezerro (*Calf Thymus* DNA - CT-DNA) era de 200 µM (pb) e os espectros foram registrados na ausência e presença dos complexos. Reação controle: CT-DNA (200 µM pb) em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e 2 % (v/v) de acetonitrila. As porfirinas (500 µM) foram tituladas na cubeta de quartzo até a precipitação da solução.

### 3.3.3.2 Ensaios de desnaturação térmica

Os dados de desnaturação térmica foram coletados no Espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro UV/Visível (The Amersham Biosciences/GE Healthcare) utilizando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. As reações foram incubadas a 30 °C por 10 minutos e depois submetidas a uma rampa de aquecimento de 30 a 90 °C com acréscimo de 1 °C min<sup>-1</sup>. As absorbâncias foram obtidas no comprimento de onda de 260 nm. Reações: CT-DNA (200 µM pb) em solução desnaturante (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 mM e Na<sub>2</sub>EDTA 0,25 mM) (PODDUTOORI; PODDUTOORI; MAIYA, 2006). As reações realizadas na presença de porfirinas seguiram a razão [porfirina]/[CT-DNA]= r =0,02.

## 3.3.4 Ensaios de interação das porfirinas com plasmídeo pBSK II

### 3.3.4.1 Ensaios de clivagem de DNA plasmidial

O plasmídeo pBSK II foi replicado em bactérias competentes DH5α transformadas e purificado utilizando o protocolo do Kit de purificação *HiSpeed Plasmid* da QIAGEN. As concentrações do pBSK II foram determinadas, em termos de pares de base por litro, por espectrofotometria aplicando o coeficiente de extinção molar de 13200 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para as leituras realizadas no comprimento de onda de 260 nm. As reações padrão para clivagem de DNA foram preparadas com 330 ng/poço (~25

$\mu\text{M}$  pb) de DNA plasmidial superenovelado em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v) à temperatura de 37 °C. As concentrações finais dos compostos nos experimentos variaram de 3,0  $\mu\text{M}$  para 4-TPyP (solubilidade máxima) e 0-5,0  $\mu\text{M}$  para as porfirinas H<sub>2</sub>PtPor e ZnPtPor. Os controles ocorreram na ausência de porfirinas. As reações foram incubadas a 37 °C durante 24 horas na ausência de luz ou por 90 minutos na presença de luz proveniente de uma lâmpada incandescente de tungstênio de 100 W de potência (fotoclivagem) (AURAS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). As reações foram interrompidas com o *loading buffer* – LB (azul de bromofenol, glicerol 50 % e 0,5 M EDTA) e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %.

#### 3.3.4.2 Efeito da força iônica na interação porfirina-DNA

A influência da força iônica na interação e clivagem de DNA pelos complexos foi investigada através da variação da concentração em solução do sal perclorato de lítio (LiClO<sub>4</sub>) na reação padrão. As amostras com LiClO<sub>4</sub> em diferentes concentrações (0 – 100 mM – concentração final) foram pré-incubadas por 30 minutos a 37 °C na ausência de luz. Após esse período os complexos foram adicionados (4  $\mu\text{M}$  concentração final) e as reações mantidas a 37 °C durante 90 minutos com exposição à luz visível. As reações foram interrompidas com LB e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %.

#### 3.3.4.3 Ligantes de sulco do DNA e a interação porfirina-DNA

Reações de clivagem com as porfirinas foram realizadas na presença de ligantes de sulco netropsina ou verde de metila. As reações com diferentes concentrações de ligantes de sulcos (0 - 50  $\mu\text{M}$  – concentração final) foram previamente incubadas durante 30 minutos a 37 °C na ausência de luz. Após este período os complexos foram adicionados (4  $\mu\text{M}$  - concentração final) e as reações mantidas a 37 °C durante 90 minutos com exposição à luz visível. As reações foram interrompidas com LB e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %.

#### 3.3.4.4 Mecanismo catalítico da interação porfirina-DNA

### 3.3.4.4.1 Reações na presença de sequestradores de EROs

Reações de clivagem foram realizadas na presença de sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs). Para investigar a importância das EROs no mecanismo catalítico das Pt(II)-porfirinas foram realizadas reações na presença de sequestradores de espécies superóxido  $O_2^-$  (KI 8 mM), radicais hidroxila  $OH^\bullet$  (dimetilsulfóxido - DMSO e terc-Butanol - *t*-BuOH, ambos 0,8 mM) e oxigênio singlete  $^1O_2$  ( $NaN_3$  8 mM) (XU et al., 2010). As reações foram incubadas a 37 °C durante 90 minutos sob luz visível, interrompidas com LB e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %.

### 3.3.4.4.2 Reações na presença de TEMPO

Reações de clivagem com as porfirinas foram realizadas na presença de TEMPO. As reações padrão foram preparadas na presença das porfirinas  $H_2PtPor$  e  $ZnPtPor$  (1  $\mu M$ ) e do sequestrador de radicais centrados em carbono 2,2,6,6-tetrametil-1-piperidina-1-oxil (TEMPO 0,5 mM) (OLIVEIRA et al., 2017). Os controles ocorreram na ausência das porfirinas. O controle com TEMPO também foi utilizado. Todas as reações foram incubadas a 37 °C durante 90 minutos com exposição à luz visível. As reações foram interrompidas com LB e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %.

### 3.3.4.4.3 Reações em atmosfera de argônio

Reações de clivagem com as porfirinas também foram realizadas na ausência de oxigênio. As reações foram preparadas no interior de uma *glove bag* com retirada a vácuo do ar com oxigênio e substituição por gás argônio. Todas as soluções utilizadas dentro da *glove bag* foram borbulhadas com gás argônio antes de iniciar o preparo das reações. As reações foram realizadas com DNA plasmidial superenovelado (~25  $\mu M$  pb) em solução tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v). As porfirinas  $H_2PtPor$  e  $ZnPtPor$  foram adicionadas para concentração final de 1  $\mu M$ . Os controles ocorreram na ausência das porfirinas. O controle com Fe(II)EDTA (100  $\mu M$ ) na presença do agente redutor 1,4 – ditiotreitól (DTT – 10 mM) foi utilizado como controle positivo para clivagem oxidativa e comprovação da

ausência de oxigênio no sistema da *glove bag*. Em paralelo foram procedidas reações na presença de oxigênio, externas à *glove bag*, para fins de comparação. Todas as reações foram incubadas a 37 °C durante 90 minutos com exposição à luz visível (fotoclivagem) (OLIVEIRA et al., 2017). As reações foram interrompidas com LB e submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 %.

#### 3.3.4.5 Eletroforese em gel de agarose 1 % e quantificação do DNA clivado

Todas as reações de clivagem de DNA plasmidial foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1 %) contendo brometo de etídio (BE 0,3 µg/mL) em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 0,5 x durante 100 minutos à voltagem fixa de 90 V. Os géis foram revelados com exposição à luz UV (KODAK Gel Logic 200 Imaging System). As formas de DNA superenovelado (FI), circular relaxado (FII) e linear (FIII) foram calculadas com base na intensidade de banda de cada canaleta através de análise densitométrica no software Kodak 1D 3.6 Gel Logic. A intensidade das bandas do DNA supernovelado foi corrigida por um fator de 1,47 (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000; JIN et al., 2007) devido à diferente afinidade de ligação desta forma ao brometo de etídio em comparação às formas II e III (SHUBSDA; GOODISMAN; DABROWIAK, 1997).

### 3.3.5 Ensaios de interação das porfirinas com oligonucleotídeo fluorescente

#### 3.3.5.1 Anelamento do oligonucleotídeo

O oligonucleotídeo ATCG-FAM utilizado neste estudo é do tipo *hairpin* marcado com FAM na extremidade 5': uma fita única de 49 nucleotídeos (~15 kDa) com uma região autocomplementar de 42 nucleotídeos (21 pb) e uma região não pareada de 5 timinas para formação do *loop*.

Previamente às reações o oligonucleotídeo ATCG-FAM do tipo *hairpin* tamponado em Tris-HCl (10 mM pH 7,4) foi aquecido durante 5 minutos à temperatura de 95 °C para desnaturação das ligações de hidrogênio entre as bases nitrogenadas e posteriormente resfriado lentamente durante 1 hora em temperatura ambiente para maior eficiência de anelamento do DNA (renaturação) (MARMUR; DOTY,

1961). Após a renaturação do oligonucleotídeo foram realizadas as reações descritas a seguir.

### 3.3.5.2 Reações de clivagem direta

Reações padrão com oligonucleotídeo ATCG-FAM (25 pmol) em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v) foram realizadas na presença das porfirinas H<sub>2</sub>PtPor e ZnPtPor nas concentrações de 1, 5 e 10 µM totalizando um volume de reação de 10 µL. Da mesma forma as reações padrão também foram realizadas na presença do ligante de sulco menor netropsina para verificar a possível ampliação da atividade catalítica das porfirinas: as reações foram pré-incubadas com netropsina (10 ou 25 µM) por 30 minutos a 37 °C no escuro antes da adição das porfirinas nas concentrações supracitadas.

Todas as reações anteriores foram expostas à luz visível nos tempos de 0, 15, 30, 60 e 90 minutos, interrompidas com a adição de 1 µL de acetato de sódio (0,3 M pH 5,2), 1 µL de glicogênio (20 mg mL<sup>-1</sup>) e 36 µL de etanol 100 % e armazenadas durante 2 horas em freezer - 80 °C para precipitação da reação. Em seguida as reações foram centrifugadas a 16000 x g durante 35 minutos, os sobrenadantes descartados, os sedimentados lavados com 50 µL de etanol 70 %, centrifugados novamente por 15 minutos e secos em centrifugador a vácuo (*Speed vac* 5301 Eppendorf). Os sedimentados secos foram ressuspensos em 2,5 µL de tampão formamida (80 % v/v formamida, NaOH 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0, 0,05 % azul de bromofenol e água para completar 1 mL de solução) e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 16 %.

### 3.3.5.3 Reações de clivagem direta com piperidina

As reações foram preparadas conforme descrito no item anterior “Reações de clivagem direta”, porém após a secagem os sedimentados foram ressuspensos com 4 µL de piperidina 10 %, misturados em vórtex durante 2 minutos, centrifugados rapidamente para ficarem no fundo do tubo e aquecidos a 90 °C durante 30 minutos. Após esse tempo as amostras foram centrifugadas rapidamente, resfriadas durante 10 minutos em gelo e secas em *Speed vac* de 30 a 60 minutos. Durante este tempo de secagem as amostras foram lavadas com 30 µL de água ultrapura duas vezes. Após secagem completa os sedimentados foram ressuspensos em 2,5 µL de tampão formamida e submetidos à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 16 %.

### 3.3.5.4 Reações de *footprinting*

O protocolo para as reações de *footprinting* foi adaptado de Swapan e Tullius (2008), Joyner, Reichfield e Cowan (2011), Joyner, Keuper e Cowan (2013). As reações foram preparadas da mesma forma descrita acima para clivagem direta, porém as reações não foram incubadas na presença de luz. As reações com netropsina foram pré-incubadas por 30 minutos a 37 °C no escuro antes da adição das porfirinas. A partir de 10 minutos do preparo de todas as reações adicionou-se o Fe(II)-EDTA e os agentes redutores da seguinte forma: foram pipetados na parede de cada tubo de reação 1 µL de ácido ascórbico (10 mM em Tris-HCl 10 mM, pH 7,4), 1 µL de Fe(II)-EDTA (1 mM) e 1 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,6 %) de modo que as gotas não se tocassem para não iniciar a reação de Fenton prematuramente. Após o depósito da última gota todas as outras foram misturadas rapidamente e imediatamente adicionadas à reação para incubação de 4 minutos no escuro à temperatura ambiente. Em seguida cada reação foi interrompida com a adição de 1 µL de tiouréia (100 mM), precipitada conforme protocolo descrito no item 3.3.5.2 para clivagem direta e submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 16 %.

### 3.3.5.5 Eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 16%

As placas de vidro para montagem do gel foram previamente lavadas com detergente neutro e água corrente, limpas com etanol e isopropanol e recobertas com Repel-Silane ES e clorofórmio (1:1 v/v) nas faces que entrariam em contato direto com o gel – para evitar a aderência do gel ao vidro. Quatro minutos após a aplicação do Repel-silane ES as placas foram sobrepostas (com as faces recobertas voltadas para o lado interno) com espaçadores de 1 mm nas laterais e vedadas as laterais e parte inferior com fita adesiva para evitar o vazamento do gel não polimerizado.

A solução para o gel de poliacrilamida 16 % (40 mL de acrilamida:bis-acrilamida 40 % 19:1, 10 mL de tampão TBE 10 X, 42,06 g uréia - 7 M) foi preparada e submetida à agitação até a completa diluição da uréia e em seguida adicionou-se água ultrapura até completar o volume de 100 mL. Para promover a polimerização do gel foram adicionados à solução 500 µL de persulfato de amônio 10 % (APS – m/v) e 50 µL tetrametiletilenodiamina (TEMED) e a solução foi imediatamente aplicada entre as placas de vidro para descanso na

posição horizontal por aproximadamente 1 hora até a completa polimerização do gel. Após esse período as placas com o gel polimerizado foram encaixadas na cuba vertical e o gel foi submetido a uma “pré-corrída” em tampão TBE 1 X à potência constante de 50 W (~1600- 1700 V) até atingir temperatura entre 45 e 55 °C para estabilização e aquecimento do gel a fim de evitar a renaturação do DNA na aplicação das amostras (DOTY, 2003).

As reações de clivagem direta, com ou sem piperidina, e as reações de *footprinting* ressuspendidas em tampão formamida foram aquecidas por 3 minutos a 95 °C para desnaturação completa de pareamentos inespecíficos do DNA e linearização do oligonucleotídeo. As amostras foram imediatamente aplicadas no gel para corrida eletroforética de 02h15min à potência constante de 50 W em tampão TBE 1 X. Também foram aplicadas no gel a sonda ATCG intacta (sem tratamento) para visualização da qualidade da sonda e ainda a ATCG submetida ao tratamento químico de depuração, conforme protocolo proposto por Maxam e Gilbert (1977), como marcador de sequência específico para adenina e guanina (purinas). Após a corrida o gel foi revelado em *scanner* de fluorescência Typhoon™ FLA 9000 (Fuji Film) e analisado no software MultiGauge (Fuji Film).

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

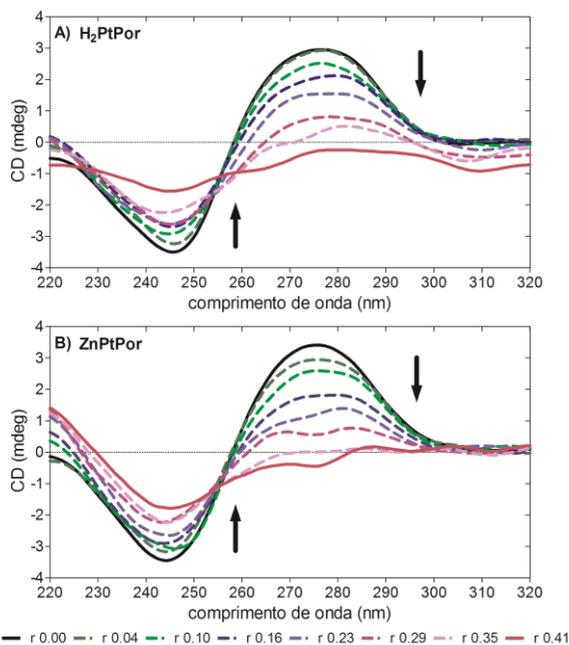
Os resultados descritos a seguir, com exceção dos géis de clivagem direta e *footprinting*, foram publicados na revista *Dalton Transactions* da *The Royal Society of Chemistry* - artigo aceito em 25 de dezembro de 2016 conforme APÊNDICE B.

#### 3.4.1 Ensaios de dicroísmo circular

A espectroscopia de dicroísmo circular (CD) mensura a absorvância diferencial entre a luz circularmente polarizada à esquerda e à direita de moléculas que tenham unidade opticamente ativas. Essa técnica tem sido amplamente utilizada em estudos de mudanças conformacionais de macromoléculas e em ensaios de interação destas com pequenas moléculas (RODGER, 2010). Neste trabalho, o dicroísmo circular foi aplicado como técnica para a determinação de mudanças conformacionais do DNA induzidas pelas porfirinas H<sub>2</sub>PtPor e ZnPtPor. As interações entre complexos metálicos e o DNA podem afetar a estrutura eletrônica e as características eletrônicas do espectro de ambas as moléculas (RODGER, 2010). Neste trabalho, foram realizadas

titulações de volumes crescentes dos metalocomplexos ao CT-DNA tamponado e observou-se que a adição de  $H_2PtPor$  ou  $ZnPtPor$  promoveu modificações no espectro do B-DNA (dupla fita com helicidade à direita). O espectro de CD característico de um CT-DNA apresenta duas bandas: uma banda negativa em 245 nm relativa à helicidade à direita do DNA forma B e uma banda positiva em 275 nm referente ao empilhamento das bases nitrogenadas (SHAHABADI; KASHANIAN; FATAHI, 2011). Nos experimentos realizados, conforme demonstrado na Figura 14, houve um decréscimo significativo das bandas negativas e positivas e um sinuoso deslocamento batocrômico (*red shift* – deslocamento para região do vermelho), na presença de ambas as porfirinas sugerindo uma interação entre as bases nitrogenadas do CT-DNA e os anéis aromáticos dos complexos (SHAHABADI; KASHANIAN; FATAHI, 2011).

Figura 14 – Espectro de dicroísmo circular das titulações de porfirinas em CT-DNA.



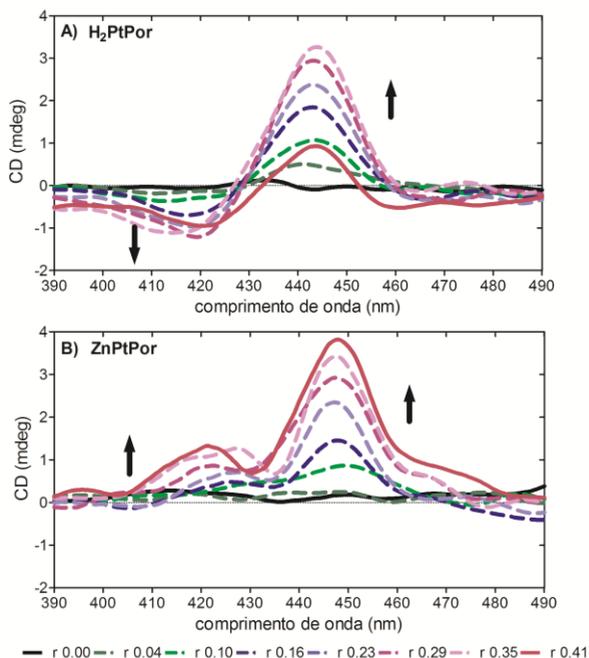
Reação inicial: CT-DNA (200  $\mu$ M pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (2 % v/v). Titulação de volumes crescentes das porfirinas

a)  $H_2PtPor$  e b)  $ZnPtPor$  nas razões estequiométricas ( $r=[\text{porfirina}]/[\text{DNA}]$ ) de 0,00; 0,04; 0,10; 0,16; 0,23; 0,29; 0,35 e 0,41, respectivamente.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

As interações entre porfirinas e DNA podem gerar espectros de dicroísmo circular induzido (ICD) refletindo uma mudança na geometria da droga, como uma torção quiral ao longo dos cromóforos das porfirinas ou uma combinação das transições eletrônicas da droga e do DNA, como as mudanças conformacionais da forma B para forma Z ou ainda uma transição de um DNA dupla fita para simples fita (BALAZ et al., 2007; RODGER, 2010). Nestes ensaios foi verificado o aparecimento de bandas de ICD entre 443-420 nm para adição de  $H_2PtPor$  e 448-420 nm para adição de  $ZnPtPor$  (Fig. 15). Interações do tipo externas ou por sulco (regiões AT) estão associadas ao aumento de uma banda positiva de ICD, como observado para as duas porfirinas, enquanto o aumento de uma banda de ICD negativa, observada para  $H_2PtPor$ , pode estar relacionada a fenômenos de intercalação em regiões CG (FIEL; JENKINS; ALDERFER, 1990; RODGER, 2010). Os resultados sugerem que estas Pt(II)-porfirinas se aproximam da dupla fita de DNA através de ligações externas e ao mesmo tempo paralelamente ao eixo das bases nitrogenadas, no caso da porfirina base-livre  $H_2PtPor$ . A Tabela 1 apresenta as concentrações de CT-DNA, porfirinas e acetonitrila em cada titulação. As titulações controles para verificar o efeito de diluição do DNA e efeito das porfirinas em tampão estão apresentadas nas Figuras 16 e 17.

Figura 15 - Espectro de dicroísmo circular induzido das titulações de porfirinas em CT-DNA.



Reação inicial: CT-DNA (200  $\mu\text{M}$  pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (2 % v/v). Titulação de volumes crescentes das porfirinas a)  $\text{H}_2\text{PtPor}$  e b)  $\text{ZnPtPor}$  nas razões estequiométricas ( $r = [\text{porfirina}]/[\text{DNA}]$ ) de 0,00; 0,04; 0,10; 0,16; 0,23; 0,29; 0,35 e 0,41, respectivamente.

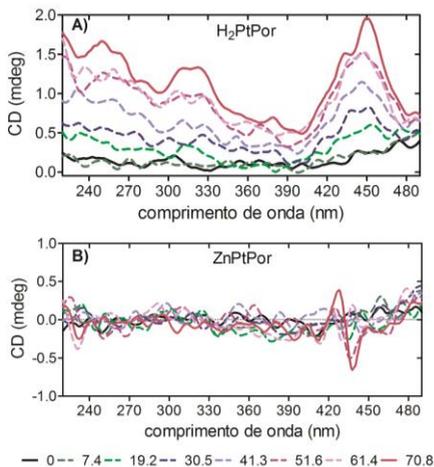
Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

Tabela 1 - Titulações realizadas para as análises de dicroísmo circular.

Titulação [ $\mu\text{L}$ ]	% $\text{CH}_3\text{CN}$	[Complexo] ( $\mu\text{M}$ )	[CT-DNA] ( $\mu\text{M}$ )	r [complexo]/[CT-DNA]
0	2 %	0,00	200,00	0,00
6	3,5 %	7,39	197,04	0,04
16	6 %	19,23	192,31	0,10
26	8,5 %	30,52	187,79	0,16
36	11 %	41,28	183,49	0,23
46	13,5 %	51,57	179,37	0,29
56	16 %	61,40	175,44	0,35
66	18,5 %	70,82	171,67	0,41

Reação inicial: CT-DNA (200  $\mu\text{M}$  bp) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (2 % v/v).

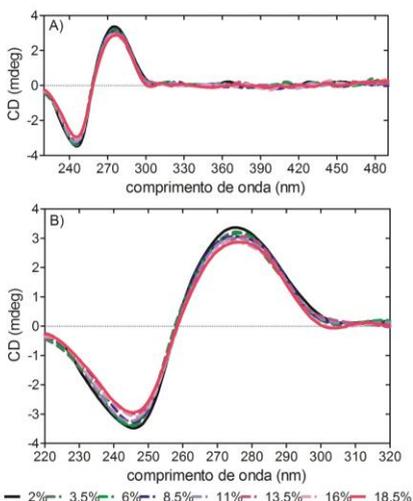
Figura 16 – Espectro de CD da titulação das porfirinas em tampão.



Reação inicial: solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (2 % v/v). A titulação com volumes crescentes dos complexos em tampão está demonstrada na tabela 1.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

Figura 17 – Espectro da titulação de acetonitrila em CT-DNA.



Reação inicial: CT-DNA (200  $\mu$ M bp) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (2 % v/v). A titulação com volumes crescentes de acetonitrila em CT-DNA está demonstrada na Tabela 1.

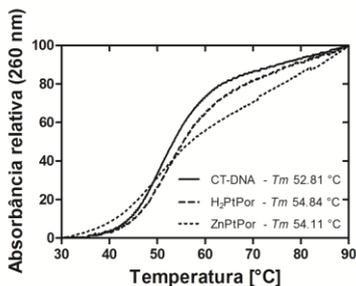
Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

### 3.4.2 Análises de desnaturação térmica do CT-DNA

Ensaio de desnaturação térmica (*melting*) do DNA dupla fita são utilizados no estudo da interação entre pequenas moléculas e DNA através da determinação da estabilidade da estrutura secundária do DNA. Os dados de desnaturação térmica refletem a transição da estrutura dupla fita para a simples fita das moléculas de DNA submetidas a uma “rampa” lenta de aquecimento (BELOZEROVA; LEVICKY, 2012; GUÉDIN; MERGNY; LACROIX, 2010; MERGNY; LACROIX, 2004). A intensidade da interação com o DNA pode alterar a estabilidade da dupla hélice e conseqüentemente sua temperatura de desnaturação (*melting temperature* –  $T_m$ ), como acontece na interação com agentes intercalantes que se ligam covalentemente ao DNA promovendo maior estabilidade à estrutura e aumentando significativamente sua  $T_m$  pelo atraso na desnaturação (BALAZ et al., 2007; PODDUTOORI; PODDUTOORI; MAIYA, 2006;).  $T_m$  ou temperatura de transição refere-se à temperatura de equilíbrio na qual 50 % da amostra está preservada na forma de dupla hélice e 50 % está na forma de simples fita e é dependente da composição do DNA: quanto maior a porcentagem de bases C e G maior será a  $T_m$  devido à maior quantidade de ligações de hidrogênio que contribuem para a estabilização da estrutura do DNA favorecendo as interações de empilhamento dos pares de base C e G com as bases adjacentes (BALAZ et al., 2007; DOTY, 2003; MARMUR; DOTY, 1962; SHAHABADI; KASHANIAN; FATAHI, 2011).

Os experimentos de desnaturação térmica de CT-DNA foram realizados na ausência e presença das porfirinas  $H_2PtPor$  e  $ZnPtPor$  seguindo a razão estequiométrica de  $r = 0,02$  ( $[porfirina]/[CT-DNA]$ ) conforme demonstrado na Figura 18. A porfirina base-livre apresentou um aumento de  $2,03^\circ C$  enquanto a de  $Zn(II)$  aumentou em  $1,3^\circ C$  a temperatura de desnaturação em relação à  $T_m$  do controle de CT-DNA. Os resultados demonstraram que a interação com as  $Pt(II)$ -porfirinas promoveu uma maior estabilidade da dupla fita à desnaturação térmica, porém a variação dos  $T_m$  não foi muito grande sugerindo que as cargas positivas dessas porfirinas colaboraram com a neutralização da estrutura polianiónica do DNA diminuindo a repulsão entre fitas e aumentando a estabilidade da dupla hélice (AROUNAGUIRI et al., 2000; BALAZ et al., 2007; MARMUR; DOTY, 1962).

Figura 18 – Curva de desnaturação térmica de CT-DNA na ausência e presença das porfirinas.



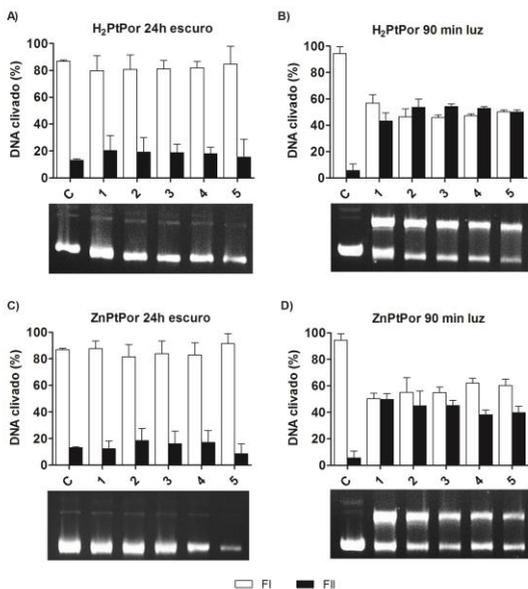
Reação inicial: CT-DNA (200  $\mu$ M pb) em solução desnaturante (1,5 mM  $Na_2HPO_4$ , 0,5 mM  $NaH_2PO_4$  e 0,25 mM  $Na_2EDTA$ ) na presença e ausência dos complexos de platina(II) ( $H_2PtPor$  e  $ZnPtPor$ ) na razão estequiométrica de 0,02 ( $r=[\text{porfirina}]/[\text{DNA}]$ ). O  $T_m$  foi estimado utilizando a aproximação sigmoideal de Boltzman.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

### 3.4.3 Estudos de fotoclivagem do DNA plasmidial

Ensaio de clivagem de DNA plasmidial superenovelado foram realizados para visualização e quantificação relativa dos fragmentos de clivagem provenientes da interação porfirinas-DNA. Em relação ao grupo controle não houve evidência de clivagem na presença das Pt(II)-porfirinas ( $H_2PtPor$  e  $ZnPtPor$ ) após incubação por 24 horas no escuro. Devido ao fato das porfirinas possuírem propriedades fotofísicas de absorção da luz foram realizados ensaios de fotoclivagem - com as reações incubadas na presença de luz visível - com o intuito de induzir atividade catalítica dessas porfirinas e, de fato, foi possível observar o aumento dos fragmentos de DNA após a fotoirradiação (Fig. 19). Não foi possível a visualização das amostras com porfirinas em concentrações acima de 5  $\mu$ M possivelmente devido à inibição competitiva das porfirinas com o brometo de etídio impossibilitando que este intercalasse com o DNA e emitisse a fluorescência (LEPECQ; PAOLETTI, 1967; NAFISI et al., 2007; SHUBSDA; GOODISMAN; DABROWIAK, 1997). O precursor 4-TPyP também foi investigado (Fig. 20), mas não apresentou atividade de clivagem no escuro e baixa atividade sob radiação de luz visível, indicando que a inserção dos compostos de coordenação Pt(II)-bpy foi essencial para a promoção da atividade de clivagem de DNA por Pt(II)-porfirinas.

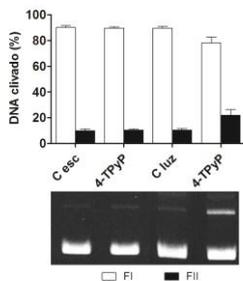
Figura 19 – Clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas.



Reações padrão: DNA plasmidial (~25 μM pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25% v/v). Curvas de concentração dos complexos (1-5 μM) de H<sub>2</sub>PtPor (A e B) e ZnPtPor (C e D). Figura: a) Ctrl – controle sem complexo. Escuro (A e C): todas as reações foram incubadas durante 24 horas a 37 °C no escuro. Luz visível (B e D): todas as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com exposição à luz visível. Os dados representados referem-se à média e desvio padrão.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

Figura 20 – Clivagem de DNA-plasmidial na presença da precursora 4-TPyP



Reações padrão: DNA plasmidial (~25 μM pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v) com 4-TPyP (3 μM) a 37 °C. Escuro:

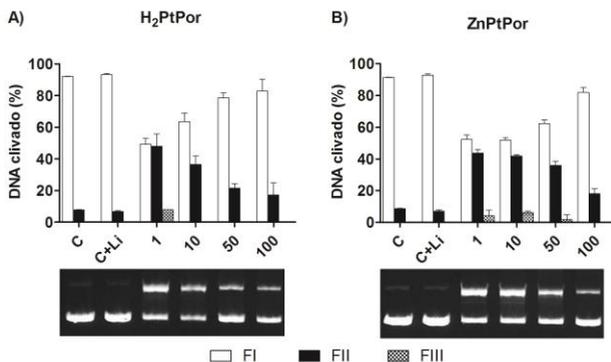
as reações foram incubadas durante 24 horas a 37 °C no escuro. Luz visível: as reações foram incubadas durante 90 minutos com exposição à luz visível. Os dados representados referem-se à média e desvio padrão.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

### 3.4.4 Efeito da força iônica na clivagem do DNA

O efeito da força iônica na interação porfirina-DNA foi avaliado para verificar se a neutralização das cargas negativas do plasmídeo afeta a atividade das porfirinas. Para evitar que a coordenação de íons ao centro metálico iniba a atividade das porfirinas foi utilizado o sal perclorato de lítio, pois o perclorato  $\text{ClO}_4^-$  não interage fortemente com o metal. Quantidades crescentes de perclorato de lítio ( $\text{LiClO}_4$ ) foram adicionadas às reações – curva de concentração. Pode-se observar uma diminuição da atividade de clivagem proporcional ao aumento da concentração do  $\text{LiClO}_4$  na presença de  $\text{H}_2\text{PtPor}$  e um efeito mais atenuado na presença de  $\text{ZnPtPor}$  (Fig. 21). De fato as cargas positivas das Pt(II)-porfirinas parecem ter função fundamental na interação DNA-porfirina através das forças eletrostáticas com a hélice polianiônica do DNA, forças estas importantes nas interações de  $\pi$ -stacking que juntamente com dipolo-dipolo estabilizam a interação eletronicamente (BARRAGÁN et al., 2004; KIM; NORDÉN, 1993; NAFISI et al, 2007).

Figura 21 – Clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas e curva de concentração de  $\text{LiClO}_4$ .



Reações padrão:  $\text{H}_2\text{PtPor}$  (A) e  $\text{ZnPtPor}$  (B) 4  $\mu\text{M}$ , DNA plasmidial (~25  $\mu\text{M}$  pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v). C - Controle sem porfirina e C + Li - controle +  $\text{LiClO}_4$  100 mM. Curva de concentração de  $\text{LiClO}_4$  : 0-100 mM. Todas as reações foram incubadas durante

90 minutos a 37 °C com exposição à luz visível. Os dados representados referem-se à média e desvio padrão.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

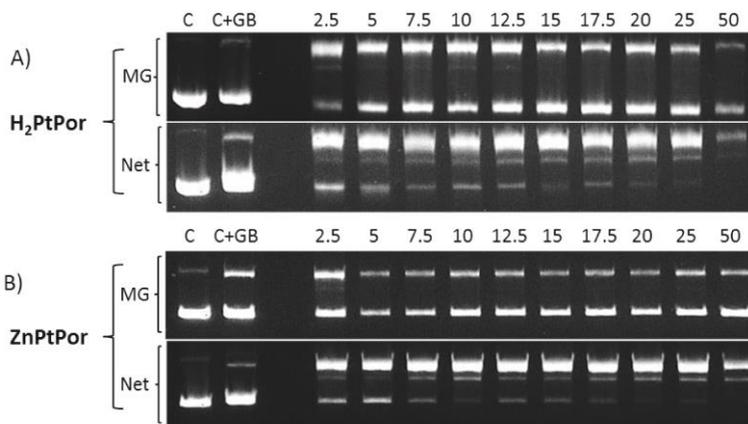
### 3.4.5 Mecanismo de interação porfirina-DNA

A incubação prévia das reações na presença de ligantes de sulco foi realizada para estudar a seletividade de ligação desses complexos aos sulcos do DNA dupla fita. Esses ligantes atuaram com bloqueadores ora do sulco maior, ora do sulco menor para avaliação da atividade de clivagem das Pt(II)-porfirinas. Foram utilizados ligantes clássicos: o verde de metila como bloqueador de sulco maior e a netropsina como de sulco menor.

A prévia incubação com verde de metila promoveu a diminuição do aparecimento de DNA circular após fotoirradiação na presença de todas as Pt(II)-porfirinas. A netropsina é um antibiótico ligante de sulco menor do DNA com alta especificidade pelos pares de bases adenina e timina (LEWIS et al., 2011; KIM; NORDÉN, 1993; VAN DYKE; HERTZBERG; DERVAN, 1982). Ela apresenta grupos positivamente carregados que interagem com as cargas negativas dos grupos fosfatos do DNA, forma ligações de hidrogênio com os aceptores das bases nitrogenadas empilhando nas regiões com A e T e se ligando ao sulco menor em uma conformação curva ou em uma conformação mais linear ligada a uma molécula de água para se ajustar à curvatura do sulco menor (BELOZEROVA; LEVICKY, 2012; LEWIS et al., 2011). A incubação com netropsina proporcionou um grande aumento na atividade de todas as porfirinas, sendo que o aumento na presença da ZnPtPor foi maior que o observado para a base livre H<sub>2</sub>PtPor (Fig. 22 e 23). Esse fenômeno já foi reportado nos estudos com as TACN-porfirinas (triazas - *meso*-mono-[4-(1,4,7-triazacilononil)]-tri(fenil)]porfirina) apresentados no capítulo I desta tese (AURAS et al., 2016).

Os resultados aqui apresentados sugerem que as porfirinas tetraplatinadas interagem com o DNA preferencialmente através do sulco maior (AROUNAGUIRI et al., 2000). Já foi reportado que a inserção do íon Zn(II) no macrociclo da porfirina promove maior interação ao DNA do que o macrociclo livre, sendo que o centro do íon Zn(II) se liga à timina deprotonada e interage com grupos no sulco maior do DNA (SITERS et al., 2015) possivelmente devido à mudança no caráter de acidez de Lewis causada pelas variações nos grupos doadores do macrociclo (BONFÁ et al., 2003; SITERS et al., 2015).

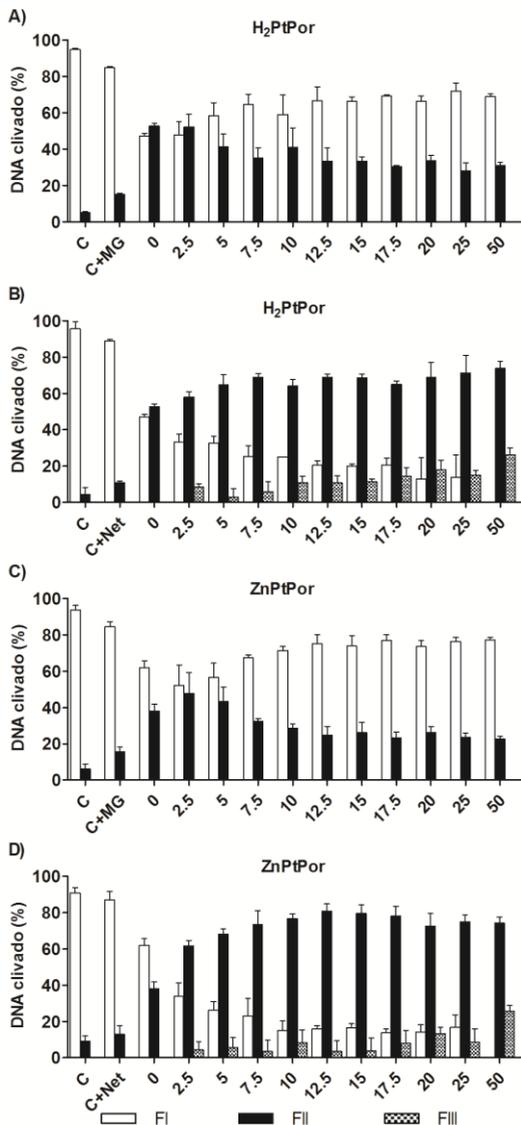
Figura 22 - Clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas e ligantes de sulco.



Reações padrão: DNA plasmidial ( $\sim 25 \mu\text{M}$  pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v) com  $\text{H}_2\text{PtPor}$  (A) ou  $\text{ZnPtPor}$  (B)  $4 \mu\text{M}$  (concentração final). Ligantes de sulco: verde de metila (MG - *methyl green*) e netropsina (NET). C - Controle sem porfirina; C +GB (ligante de sulco - *groove binder*)- controle + ligante de sulco correspondente; C + MG - controle + verde de metila  $50 \mu\text{M}$ ; C + NET - controle + netropsina  $50 \mu\text{M}$ . Curva de concentração dos ligantes de sulco: 2,5 -  $50 \mu\text{M}$ . Todas as reações foram pré-incubadas durante 30 minutos no escuro e posteriormente os complexos foram adicionados e as reações incubadas durante 90 minutos a  $37^\circ\text{C}$  com exposição à luz visível.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

Figura 23 – Representação gráfica da clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas e ligantes de sulco.



Reações padrão: H<sub>2</sub>PtPor (A e B) e ZnPtPor (C e D) 4  $\mu$ M, DNA plasmidial (~25  $\mu$ M pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetoneitrila (25 % v/v). C - Controle sem porfirina e C + MG - controle + verde de metila

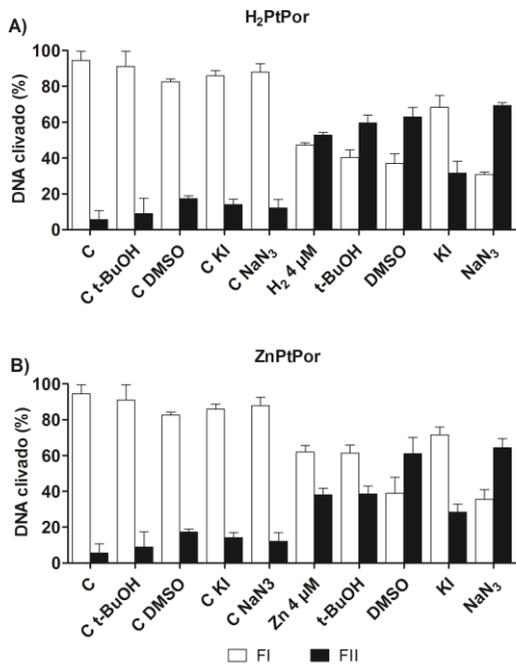
50  $\mu\text{M}$ ; C + NET - controle + netropsina 50  $\mu\text{M}$ . Curva de concentração dos ligantes de sulco: 2,5 - 50  $\mu\text{M}$  de verde de metila ou netropsina. Todas as reações foram pré-incubadas durante 30 minutos no escuro e posteriormente os complexos foram adicionados e as reações incubadas durante 90 minutos a 37 °C com exposição à luz visível. Os dados representados referem-se à média e desvio padrão.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

### 3.4.6 Investigação do mecanismo catalítico

As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão envolvidas em danos oxidativos ao DNA (JIANG et al., 2007) e espécies como o oxigênio singlete e o superóxido participam de uma série de reações como as de Fenton resultando na geração de radicais hidroxila muito reativos que atacam diversas biomoléculas como ácidos nucleicos, proteínas e lipídios (JAIN; TULLIUS, 2008; SHCHERBAKOVA et al., 2006; SUN et al., 2017). Metalocomplexos podem atuar como nucleases oxidativas devido ao fato do íon metálico poder realizar reações do tipo Fenton e promover danos ao DNA através da remoção de um átomo de hidrogênio da desoxirribose (SUN et al., 2017). Para verificar se as EROs estão envolvidas no mecanismo catalítico dessas Pt(II)-porfirinas as reações de clivagem foram realizadas na presença de sequestradores de EROs para verificar se o sequestro dessas espécies impediriam a fragmentação do DNA (KI para superóxido, DMSO e *t*-BuOH para radical hidroxila e  $\text{NaN}_3$  para oxigênio singlete) (XU et al., 2010). Os resultados apresentados nas Figuras 24-26 demonstram que não houve inibição da clivagem do DNA na presença dos sequestradores de oxigênio singlete ou radical hidroxila. No entanto, na presença do sequestrador KI observa-se a redução da atividade de ambas as porfirinas, de forma mais acentuada para a porfirina base livre. Os íons cloretos das Pt(II)-porfirinas são lábeis e substituídos por uma molécula de água quando em solução possibilitando a interação com o KI que, de acordo com a literatura, promove o decaimento da absorção da banda Soret da porfirina e a inibição da fotoclivagem do DNA (ZHU et al., 2016). Para verificar esta informação foram realizadas titulações com KI e o decaimento na absorção da porfirina foi observado, corroborando o apresentado pela literatura e o observado neste trabalho (dados não demonstrados).

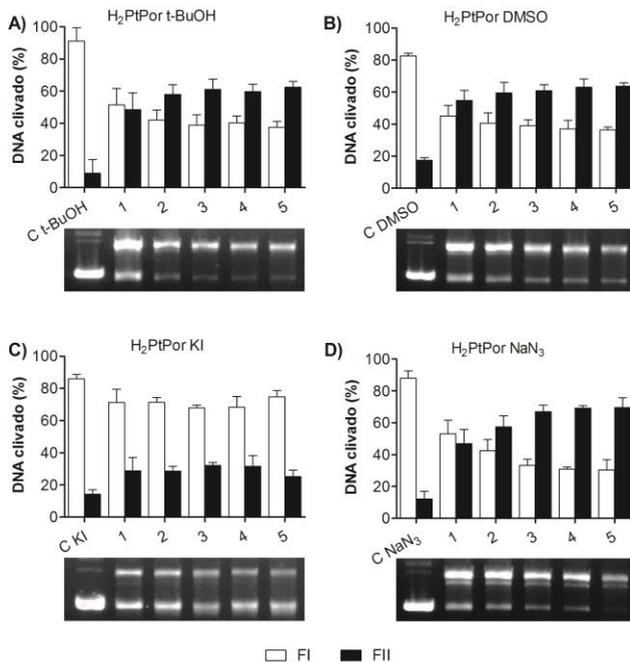
Figura 24 - Clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas e sequestradores de EROs.



Reações padrão: H<sub>2</sub>PtPor (A) e ZnPtPor (B) 4,0 μM, DNA plasmidial (~25 μM pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v). C - Controle sem porfirina e C + sequestrador - controle + sequestrador correspondente. Sequestradores adicionados: t-BuOH e DMSO (0,8 mM), KI (8 mM) e NaN<sub>3</sub> (8 mM). Todas as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com exposição à luz visível. Os dados representados referem-se a média e desvio padrão.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

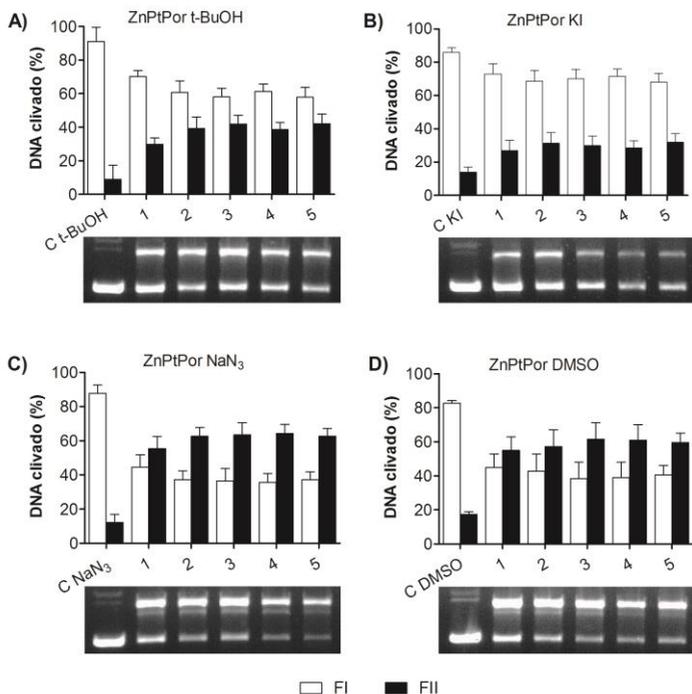
Figura 25 - Clivagem de DNA-plasmidial na presença de sequestradores de EROs e concentrações crescentes de  $H_2PtPor$ .



Reações padrão:  $H_2PtPor$  (1-5  $\mu M$ ), DNA plasmidial (~25  $\mu M$  pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v). C + sequestrador – controle sem porfirina + sequestrador correspondente. Sequestradores adicionados: (A) t-BuOH (0,8 mM), (B) DMSO (0,8 mM), (C) KI (8 mM) e (D)  $NaN_3$  (8 mM). Todas as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com exposição à luz visível. Os dados representados referem-se a média e desvio padrão.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

Figura 26 - Clivagem de DNA-plasmidial na presença de sequestradores de EROs e concentrações crescentes de ZnPtPor.



Reações padrão: H<sub>2</sub>PtPor (1-5  $\mu$ M), DNA plasmidial (~25  $\mu$ M pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v). C + sequestrador – controle sem porfirina + sequestrador correspondente. Sequestradores adicionados: (A) t-BuOH (0,8 mM), (B) KI (8 mM), (C) NaN<sub>3</sub> (8 mM) e (D) DMSO (0,8 mM). Todas as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com exposição à luz visível. Os dados representados referem-se a média e desvio padrão.

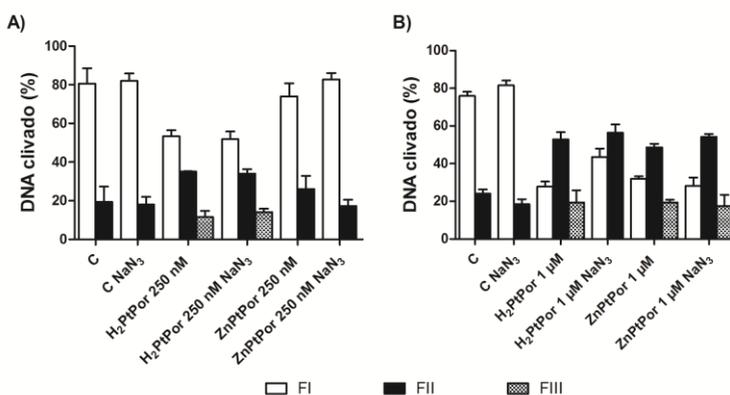
Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

Para facilitar o sequestro dos EROs a concentração das porfirinas foi reduzida para a diminuição da geração de EROs, entretanto, mesmo nestas condições não houve inibição da atividade das porfirinas (Fig. 27). Da mesma forma não foi verificado efeito inibitório na presença de TEMPO, um sequestrador de radicais centrados em carbono (Fig. 28). Na tentativa de compreender o mecanismo catalítico destas porfirinas optou-se por excluir o oxigênio do meio reacional através de ensaio realizado em atmosfera de argônio (Fig. 29 e 30) e foi possível observar

inibição da clivagem de DNA principalmente na presença da porfirina base livre H<sub>2</sub>PtPor.

As Pt(II)-porfirinas são ótimas geradoras de oxigênio singlete e acredita-se que a ávida ligação ao DNA impossibilita que a azida de sódio sequestre o <sup>1</sup>O<sub>2</sub> pois é possível que a geração das EROs ocorram tão rapidamente e muito próxima ao DNA, como já reportado para uma porfirina de Zn(II) ótima geradora de oxigênio singlete (KOVALEVA et al., 2014). A inibição da clivagem observada nos ensaios em atmosfera de argônio demonstra que há participação do oxigênio na clivagem, porém ela também ocorre em sua ausência. Dessa forma os resultados apresentados indicam que a fotoclivagem de DNA pelas Pt(II)-porfirinas segue o mecanismo misto, baseado em vias oxidativas e não oxidativas, sendo que para o complexo de Zn(II) o mecanismo mais provável seja o hidrolítico, como já descrito na literatura para metalocomplexos e enzimas naturais com Zn(II) (MANCIN et al., 2005; KATSOULAKOU et al., 2002; SITERS et al., 2015; XU et al., 2010; WAN et al., 2006). Dentre os compostos investigados para uso como fotossensibilizadores em TFD há grande interesse por complexos com metais de transição que sejam fotoativos e que tenham um mecanismo de ação que não envolva somente uma via oxidativa, mas que também sejam capazes de promover a catálise por via não oxidativa, principalmente para promover a morte celular em tumores hipóxicos, normalmente os mais agressivos (LI et al., 2013; JOYCE et al., 2010).

Figura 27 - Clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas e NaN<sub>3</sub>.

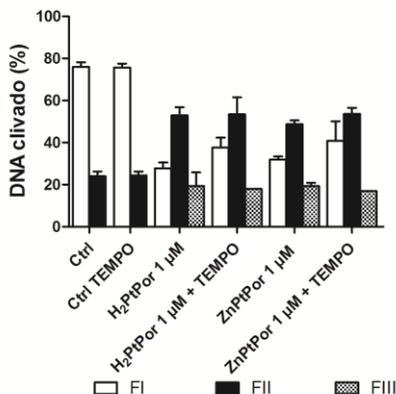


Reações padrão: H<sub>2</sub>PtPor ou ZnPtPor (250 nM (A) e 1 μM (B)), DNA plasmidial (~25 μM pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v). Sequestrador adicionado: NaN<sub>3</sub> (8 mM). C – controle

sem porfirinas. Todas as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com exposição à luz visível. Os dados representados referem-se à média e desvio padrão.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

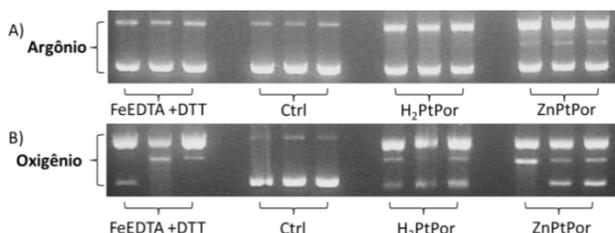
Figura 28 - Clivagem de DNA-plasmidial na presença das porfirinas e TEMPO.



Reações padrão: H<sub>2</sub>PtPor ou ZnPtPor (1 μM), DNA plasmidial (~25 μM pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v). Sequestrador adicionado: TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-1-piperidina-1-oxil) (0,5 mM). Ctrl – controle sem porfirinas. Ctrl + TEMPO – controle + TEMPO (0,5 mM). Todas as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com exposição à luz visível. Os dados representados referem-se à média e desvio padrão.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

Figura 29 - Clivagem de DNA-plasmidial em atmosfera de argônio.

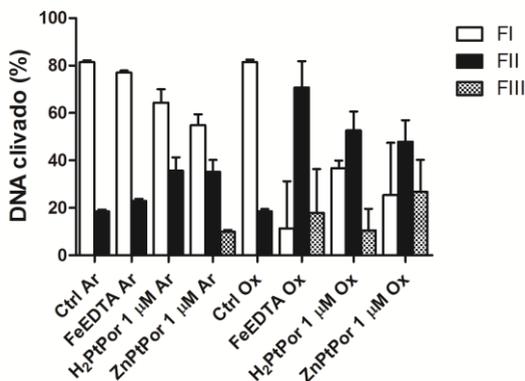


Reações de clivagem de DNA plasmidial e com as porfirinas H<sub>2</sub>PtPor e ZnPtPor (1 μM) foram realizadas na presença de oxigênio e em atmosfera de argônio (Ar). Reações padrão: H<sub>2</sub>PtPor ou ZnPtPor (1 μM), DNA plasmidial (~25 μM pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25% v/v). Ctrl – controle sem porfirinas. FeEDTA – controle + Fe(II)EDTA (100 μM) +

DTT (1,4 – ditioneitol; 10 mM). Todas as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com exposição à luz visível.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

Figura 30 – Representação gráfica da clivagem de DNA-plasmidial em atmosfera de argônio.



Reações padrão: H<sub>2</sub>PtPor ou ZnPtPor (1,0 μM), DNA plasmidial (~25 μM pb) em solução tampão de Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25% v/v). Ctrl – controle sem porfirinas. Ar – argônio. Ox – oxigênio. FeEDTA – controle + Fe(II)EDTA (100 μM) + DTT (1,4 – ditioneitol; 10 mM). Todas as reações foram incubadas durante 90 minutos a 37 °C com exposição à luz visível. Os dados representados referem-se à média e desvio padrão.

Fonte: adaptado de OLIVEIRA e colaboradores (2017).

### 3.4.7 Clivagem direta e *footprinting*

Os fragmentos resultantes da interação do DNA com as Pt(II)-porfirinas foram sequenciados em gel de poliácridamida 16 % para investigar se a clivagem de DNA induzida pelas porfirinas ocorre em sequências específicas. Este método é utilizado para definição dos pontos de clivagem induzidas por nucleases (HENICHART et al., 1997). Reações com as porfirinas e oligonucleotídeo ATCG (49 bases - ~15 kDa) do tipo *hairpin* marcado com FAM na extremidade 5' foram realizadas para localização de pontos de clivagem direta (Fig. 31). Os *hairpins* são formados quando uma fita realiza pareamento com uma porção da mesma fita formando um *loop* na porção não pareada resultando em uma estrutura parecida com um grampo de cabelo (BIKARD et al., 2010).

Figura 31 – Oligonucleotídeo ATCG-FAM no formato *hairpin*.



Fonte: acervo da autora.

As duas porfirinas promoveram o desaparecimento da sonda intacta e o aparecimento de fragmentos proporcionalmente ao tempo de exposição da reação à luz. Os cortes, predominantemente em purinas, deram origem a fragmentos com extremidades 3' fosfato, porém também é possível visualizar clivagens oxidativas com formação de extremidades 3' fosfoglicolato (3'-PG). A clivagem oxidativa do DNA pode gerar diversos tipos de produtos (fragmentos) dependendo da posição em que um próton da pentose é removido, seja em C-1', C-2', C-3', C-4', C-5'. A remoção do próton desencadeia uma série de reações de eliminação resultando em diversos fragmentos, como por exemplo, o fosfoglicolato que é fruto da remoção de um hidrogênio do carbono 4' da desoxirribose na presença de O<sub>2</sub> (PATWARDHAN; COWAN, 2001). Clivagens hidrolíticas geram terminais 3' hidroxila (3'-OH) e 3' fosfato (3'-OPO<sub>3</sub>), os marcadores de Maxam e Gilbert (1977) geram fragmentos 3'-OPO<sub>3</sub> e clivagens oxidativas por Fe(II)EDTA e peróxido de hidrogênio geram terminais 3'-OPO<sub>3</sub> e 3' fosfoglicolato (KOVACIC; WELCH; FRANKLIN, 2003).

Na presença das porfirinas na concentração de 1 μM os cortes ocorreram predominantemente nas posições A7PG, A11, A12, G15, C17PG, G18, G19 e G22 (Fig. 34 e 36). A porfirina de Zn(II) ainda apresentou clivagem em G29. Este padrão de clivagem não se alterou nas amostras com netropsina. Com o aumento da concentração da metaloporfirinas (5 ou 10 μM) a clivagem foi muito mais intensa e predominantemente em A7PG, C17PG e G15, mesmo para as amostras com netropsina (Fig. 35-38). A netropsina apenas intensificou a clivagem promovida pelas porfirinas e apresentou uma corrida caracterizada pelo arrasto perto da localização da sonda intacta e mesmo diminuindo a concentração do antibiótico não foi possível minimizar este efeito.

Nas amostras tratadas com piperidina os pontos de clivagem em A7PG e C17PG desaparecem dando lugar para clivagens mais intensas em G3 e G15 (proporcional ao tempo de exposição anterior ao tratamento com piperidina). Pode-se observar que o mesmo acontece para as amostras com netropsina. O tratamento com a piperidina

normalmente promove a clivagem das ligações fosfodiéster em sítios abásicos resultantes das modificações na base nitrogenada e/ou clivagem da ligação glicosídica. A perda da base desestabiliza a estrutura do DNA e o deixa mais susceptível à clivagem da ligação fosfodiéster no 3'OH do nucleotídeo abásico. Dessa forma os resultados apresentados sugerem que os fragmentos em A7PG e C17PG possivelmente eram sítios abásicos e por isso desapareceram após o tratamento com piperidina promovendo assim o aparecimento de fragmentos de menor massa molecular em G3 e G15 (Fig. 34-36).

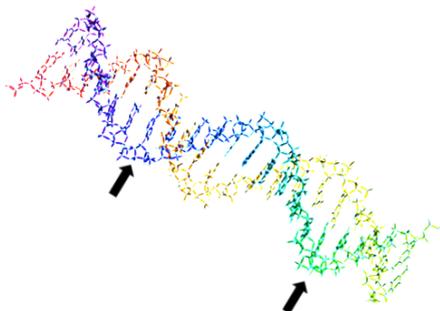
As clivagens oxidativas em A7PG e C17PG ocorreram com diferença de 10 nucleotídeos no mesmo lado da fita antes da formação do *hairpin* (Fig.32). Considerando a estrutura do *hairpin* em dupla hélice provavelmente estes pontos de clivagem estariam na mesma face estando o primeiro ponto no início e o outro no fim de uma volta inteira da simples fita. Estes dados reforçam a indicação de que as Pt(II)-porfirinas interajam externamente e de forma paralela ao eixo da dupla hélice de DNA (Fig. 33).

Figura 32 – Oligonucleotídeo ATCG-FAM no formato *hairpin* com marcação dos sítios de clivagem oxidativa (3'PG) observados no gel de poliacrilamida.



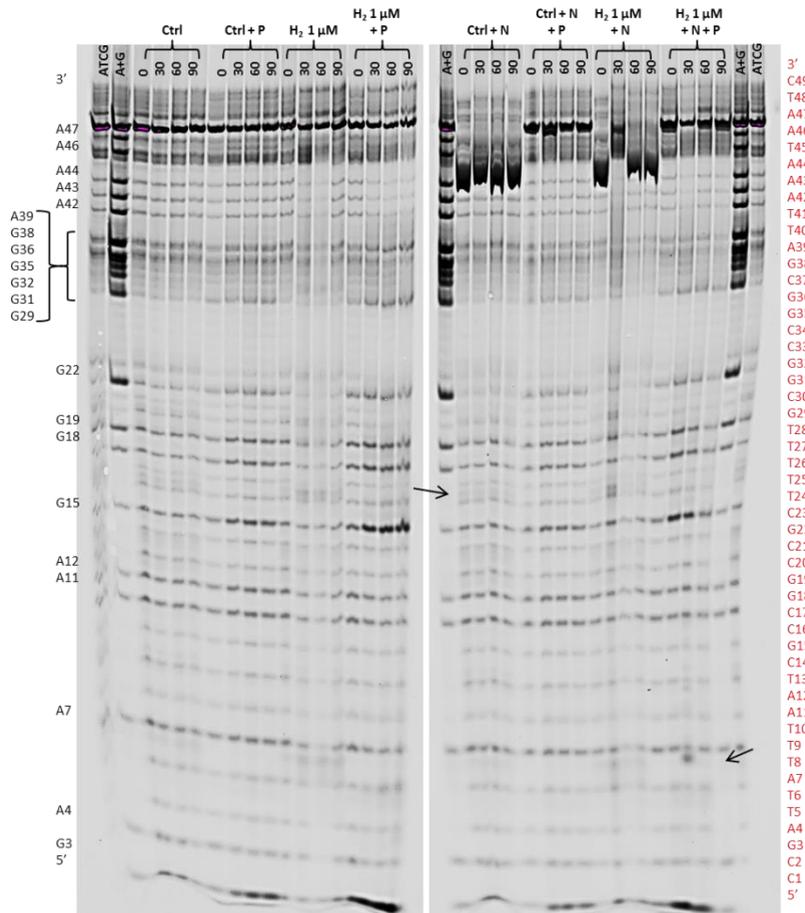
Fonte: acervo da autora.

Figura 33 – Hélice da porção pareada do oligonucleotídeo ATCG-FAM com marcação dos sítios de clivagem oxidativa (3'PG) observados no gel de poliacrilamida.



Fonte: acervo da autora. Estrutura gerada através do software Avogadro (HANWELL et al., 2012).

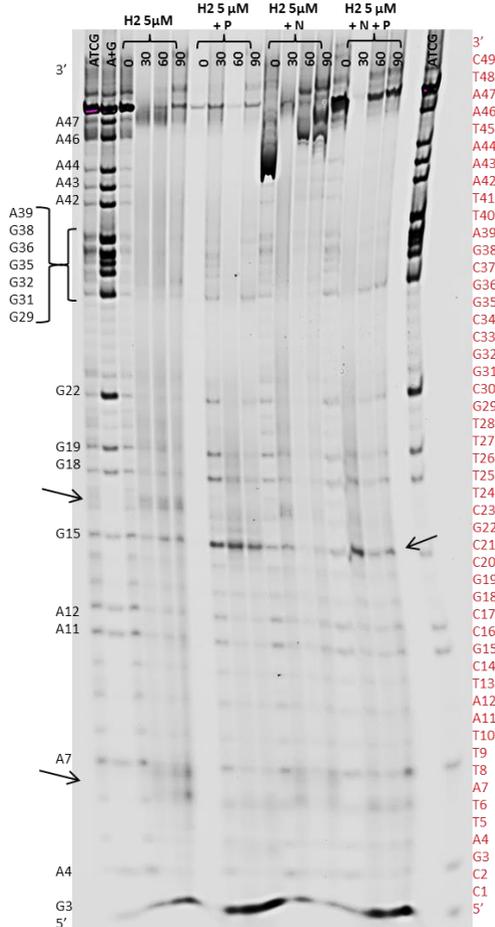
Figura 34 – Clivagem direta do oligonucleotídeo ATCG-FAM na presença da  $H_2PtPor$  (1  $\mu M$ ), netropsina e piperidina.



Reações padrão: oligonucleotídeo ATCG-FAM (25 pmol) em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v) na presença da porfirina  $H_2PtPor$  (1  $\mu M$ ). Reações padrão também foram pré-incubadas com netropsina (10  $\mu M$ ) por 30 minutos a 37 °C no escuro antes da adição da porfirina. ATCG: sonda intacta. A+G: marcador Maxam e Gilbert para purinas. Ctrl: na ausência de porfirina. Todas as reações foram incubadas na presença de luz visível durante 0, 30, 60 e 90 minutos, precipitadas, ressuspensas ou não em piperidina 10 % (P) e posteriormente em tampão formamida. As setas apontam clivagem diferencial em A7PG e C17PG. Imagem representativa.

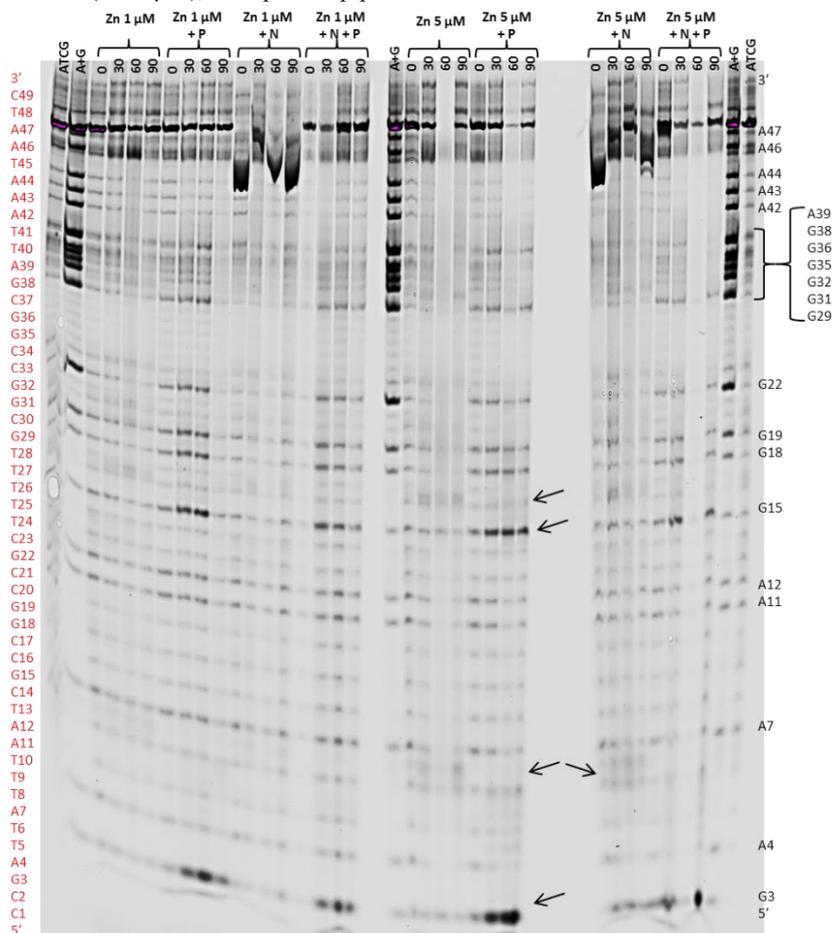
Fonte: acervo da autora.

Figura 35 - Clivagem direta do oligonucleotídeo ATCG-FAM na presença da  $H_2PtPor$  ( $5 \mu M$ ), netropsina e piperidina.



Reações padrão: oligonucleotídeo ATCG-FAM ( $25 \text{ pmol}$ ) em tampão Tris-HCl ( $10 \text{ mM}$ ,  $\text{pH } 7,4$ ) e acetonitrila ( $25 \text{ \% v/v}$ ) na presença da porfirina  $H_2PtPor$  ( $5 \mu M$ ). Reações padrão também foram pré-incubadas com netropsina ( $10 \mu M$ ) por 30 minutos a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  no escuro antes da adição da porfirina. ATCG: sonda intacta. A+G: marcador Maxam e Gilbert para purinas. Todas as reações foram incubadas na presença de luz visível durante 0, 30, 60 e 90 minutos, precipitadas, ressuspendidas ou não em piperidina 10 % (P) e posteriormente em tampão formamida. Imagem representativa. Fonte: acervo da autora.

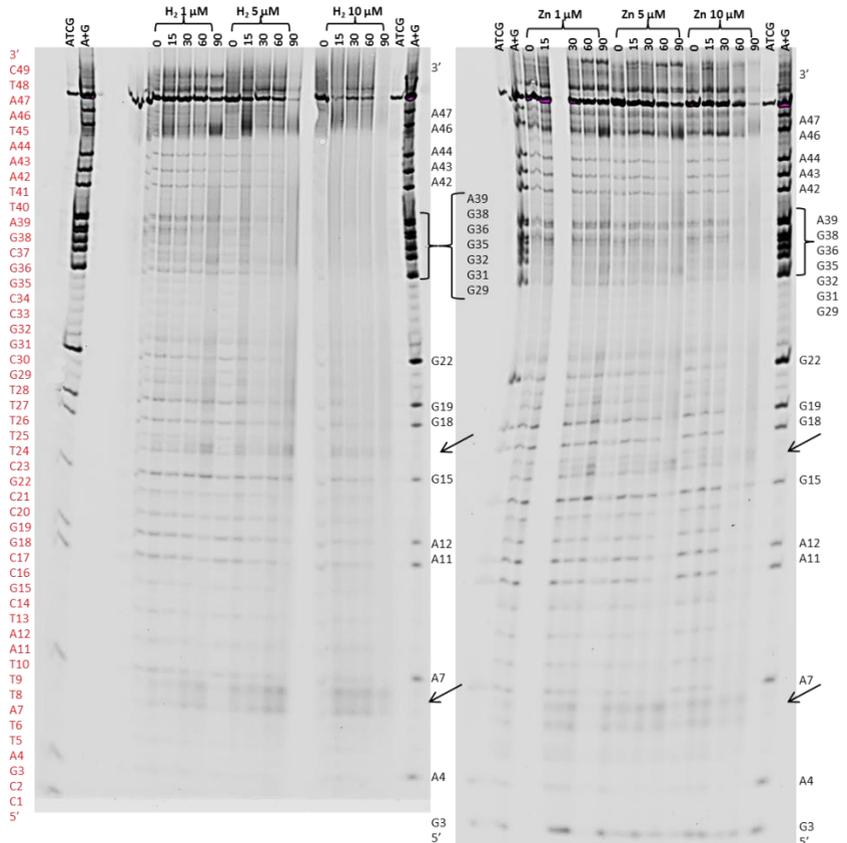
Figura 36 - Clivagem direta do oligonucleotídeo ATCG-FAM na presença da ZnPtPor (1 e 5  $\mu$ M), netropsina e piperidina.



. Reações padrão: oligonucleotídeo ATCG-FAM (25 pmol) em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v) na presença da porfina ZnPtPor (1 e 5  $\mu$ M). Reações padrão também foram pré-incubadas com netropsina (10  $\mu$ M) por 30 minutos a 37 °C no escuro antes da adição da porfina. ATCG: sonda intacta. A+G: marcador Maxam e Gilbert para purinas. Todas as reações foram incubadas na presença de luz visível durante 0, 30, 60 e 90 minutos, precipitadas, ressuspendidas ou não em piperidina 10 % (P) e posteriormente em tampão formamida. Imagem representativa.

Fonte: acervo da autora.

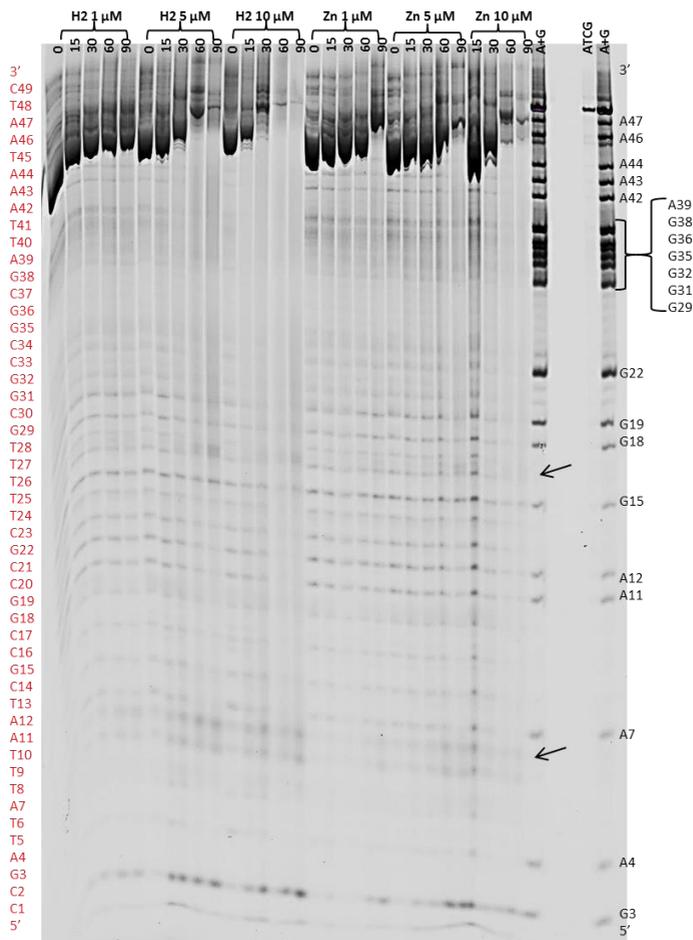
Figura 37 - Clivagem direta do oligonucleotídeo ATCG-FAM na presença da  $H_2PtPor$  e  $ZnPtPor$  (1, 5 e 10  $\mu M$ ).



Reações padrão: oligonucleotídeo ATCG-FAM (25 pmol) em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v) na presença das porfirinas  $H_2PtPor$  e  $ZnPtPor$  (1, 5 e 10  $\mu M$ ). ATCG: sonda intacta. A+G: marcador Maxam e Gilbert para purinas. Todas as reações foram incubadas na presença de luz visível durante 0, 15, 30, 60 e 90 minutos, precipitadas e ressuspensas em tampão formamida. Imagem representativa.

Fonte: acervo da autora.

Figura 38 - Clivagem direta do oligonucleotídeo ATCG-FAM na presença da  $H_2PtPor$  e  $ZnPtPor$  (1, 5 e 10  $\mu M$ ) e netropsina.



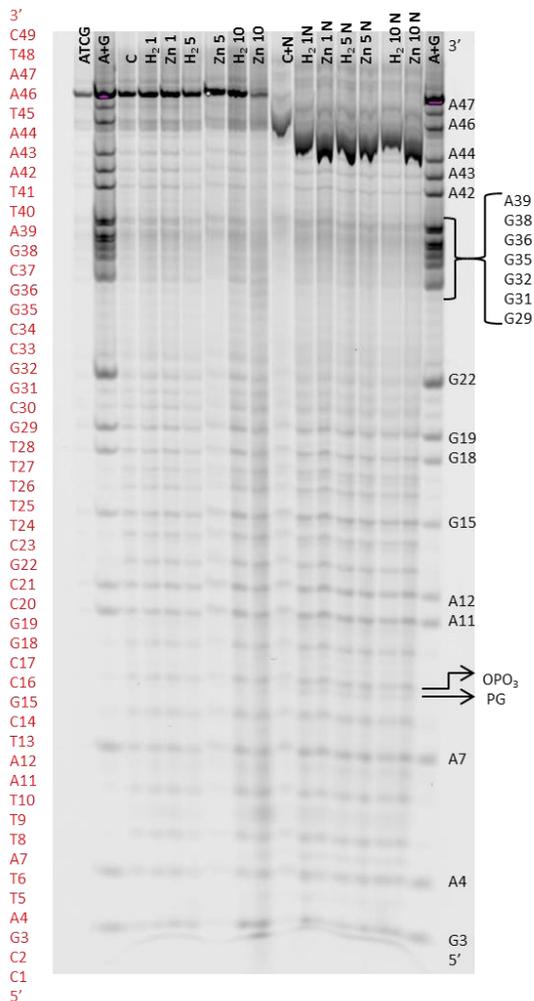
Reações padrão: oligonucleotídeo ATCG-FAM (25 pmol) em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v) na presença das porfirinas  $H_2PtPor$  e  $ZnPtPor$  (1, 5 e 10  $\mu M$ ). Reações padrão também foram pré-incubadas com netropsina (25  $\mu M$ ) por 30 minutos a 37 °C no escuro antes da adição da porfirina. ATCG: sonda intacta. A+G: marcador Maxam e Gilbert para purinas. Todas as reações foram incubadas na presença de luz visível durante 0, 15, 30, 60 e 90 minutos, precipitadas e ressuspensas em tampão formamida. Imagem representativa.

Fonte: acervo da autora.

O *footprinting* é uma técnica amplamente utilizada para delineamento das ligações provenientes da interação entre pequenas moléculas e DNA (JAIN; TULLIUS, 2008; SHCHERBAKOVA et al., 2006). Normalmente as porções de ligação da molécula ao DNA são protegidas do ataque de nucleases químicas ou biológicas, efeito este caracterizado pelo desaparecimento destas bandas em um gel de poliacrilamida. Para a verificação e localização dos sítios de ligação da porfirina-DNA foram realizados ensaios de *footprinting* com Fe(II)EDTA como nuclease química na presença dos reagentes redutores ácido ascórbico e peróxido de hidrogênio para a promoção da reação de Fenton com geração de radicais hidroxila altamente reativos (JAIN; TULLIUS, 2008; SHCHERBAKOVA et al., 2006). Os resultados demonstraram que a presença das metaloporfirinas fragilizaram o oligonucleotídeo deixando-o susceptível ao ataque oxidativo das espécies radicalares geradas pela interação de Fe(II)EDTA na presença dos agentes redutores (reação de Fenton) (Fig. 39). Observa-se que a intensidade da clivagem aumenta na presença da netropsina sugerindo que a porfirina se acopla à netropsina já ligada ao DNA formando um complexo híbrido. A literatura traz que a formação de nucleases artificiais híbridas tem maior potencial como nucleases do que complexos metálicos sozinhos (HENICHART et al., 1997). Quando metalocomplexos são associados a ligantes de DNA (fita complementar, peptídeos, proteínas ou moléculas intercalantes ou ligantes de sulco) formam um híbrido com maior afinidade à estrutura do DNA possibilitando assim maior interação e ação como nuclease.

Os resultados de clivagem direta e *footprinting* demonstraram a capacidade das Pt(II)-porfirinas em fotoclivar o DNA através de um mecanismo oxidativo conforme indicado pela presença de fragmentos com terminais de clivagem oxidativa (3'PG) nos géis de clivagem direta e, ainda, que as interações porfirina-DNA fragilizaram o DNA tornando-o mais susceptível à ação da nuclease química Fe(II)EDTA.

Figura 39 - *Footprinting* com o oligonucleotídeo ATCG-FAM na presença da  $H_2PtPor$  e  $ZnPtPor$  (1, 5 e 10  $\mu M$ ) e netropsina.



Reações padrão: oligonucleotídeo ATCG-FAM (25 pmol) em tampão Tris-HCl (10 mM, pH 7,4) e acetonitrila (25 % v/v) na presença das porfirinas  $H_2PtPor$  e  $ZnPtPor$  (1, 5 e 10  $\mu M$ ). Reações padrão também foram pré-incubadas com netropsina (10  $\mu M$ ) por 30 minutos a 37 °C no escuro antes da adição da porfirina. ATCG: sonda intacta. A+G: marcador Maxam e Gilbert para purinas. C: controle na ausência de porfirina. N: netropsina; C + N: controle com netropsina. Todas as reações foram incubadas com 1  $\mu L$  de ácido ascórbico (10mM em Tris-HCl 10 mM pH 7,4), 1  $\mu L$  de Fe(II)EDTA (1 mM) e 1  $\mu L$

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,6 %) durante 4 minutos no escuro à temperatura ambiente e interrompidas com 1 µL de tiouréia (100 mM). PG: para terminais 3' fosfoglicolato. OPO<sub>3</sub>: terminal 3' OPO<sub>3</sub>. As reações foram precipitadas e ressuspendidas em tampão formamida. Imagem representativa.

Fonte: acervo da autora.

### 3.5 CONCLUSÕES

Os estudos apresentados avaliaram a interação entre o DNA e as *meso*-tetra(4-piridil)porfirina-tetrakis-[cloro(2,2'-bipiridina)]platina(II) base livre, H<sub>2</sub>PtPor, e seu complexo de zinco, ZnPtPor.

Estas porfirinas são fotoativas e apresentaram atividade catalítica quando expostas à luz visível demonstrando habilidade em fotoclivar o DNA na presença ou ausência de oxigênio, sugerindo um mecanismo catalítico misto em que o complexo apresenta capacidade de nuclease oxidativa ou hidrolítica. Complexos com esta habilidade são desejáveis como antitumorais por ter ação também em tumores hipóxicos. A interação com o ligante de sulco menor aumentou a atividade catalítica dessas porfirinas, sugerindo a formação de um complexo híbrido, porém a especificidade de ligação das porfirinas não foi alterada.

Os resultados sugerem que a interação entre as Pt(II)-porfirinas e o DNA aconteça por interação externa através da formação de um aduto porfirina-DNA estabilizado pelas interações eletrostáticas entre o complexo e os grupos fosfatos e que essa interação deixa o DNA mais suscetível ao ataque de EROs.

Devido à alta habilidade em gerar oxigênio singlete e fotoclivar o DNA as Pt(II)-porfirinas podem ser potenciais candidatas a fotossensibilizadoras para uso em terapia fotodinâmica.



## REFERÊNCIAS

ARAKI, K.; SILVA, C. A.; TOMA, H. E.; CATALANI, L. H.; MEDEIROS, M. H. G.; MASCIO, P. D.. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 78, p. 269-273, 2000.

AROUNAGUIRI, S.; EASWARAMOORTHY, D.; ASHOKKUMAR, A.; DATTAGUPTA, A.; BHASKAR, G.. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences (Chemical Sciences)**, v. 112, p. 1-17, 2000..

AURAS, B. L.; OLIVEIRA, V. A.; TERENCEZI, H.; NEVES, A.; IGLESIAS, B. A.. meso-Mono-[4-(1,4,7-triazacyclononyl)]-tri(phenyl)porphyrin and the respective zinc(II)-complex: complete characterization and biomolecules binding abilities. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 15, p. 564-579, 2016.

BALAZ, M.; BITSCH-JENSEN, K.; MAMMAMA, A.; ELLESTAD, G.A.; NAKANISHI, K.; BEROVA, N.. **Pure and Applied Chemistry**, v.79, p. 801–809, 2007.

BARRAGÁN, E.; GORDILLO, B.; VARGAS, G.; VELAZCO, L.. The role of cobalt, copper, nickel, and zinc in the DNA replication inhibitory activity of p-aminophenyl triphenylporphyrin, **Applied Organometallic Chemistry**, v. 18, p. 311–317, 2004.

BELOZEROVA, I.; LEVICKY, R.. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, p. 18667-18676, 2012.

BIKARD, D.; LOOT, C.; BAHAROGLU, Z.; MAZEL, D.. Folded DNA in Action: Hairpin Formation and Biological Functions in Prokaryotes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74(4), p. 570–588, 2010.

BONFÁ, L.; GATOS, M.; MANCIN, F.; TECILLA, P.; TONELLATO, U.. The Ligand Effect on the Hydrolytic Reactivity of Zn(II) Complexes toward Phosphate Diesters. **Inorganic Chemistry**, v. 42 (12), p. 3943-3949, 2003.

DOLATABADI, J. E. N.. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 227-233, 2011.

DOTY, P. 2003 DNA and RNA forty years ago. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 21: 3, 2003.

FIEL, R. J.; JENKINS, B. G.; ALDERFER, J. L.. In *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interaction*, A. Pullman and J. Jortner (eds.), **Published by the Israel Academy of Sciences and Humanities, distributed by Academic Press (N.Y.)**, , p. 385-399, 1990.

GUÉDIN, A.; MERGNY, J-L.; Lacroix, L.. **Methods in Molecular Biology**, v. 613, p. 25-35, 2010.

HANWELL, M.D.; CURTIS, D.E.; LONIE, D.C.; VANDERMEERSCH, T.; ZUREK, E.; HUTCHISON, G.. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4 (17), p. 1-17, 2012.

HENICHART, J-P.; WARING, M.J.; RIOU, J-F.; DENNY, W.A.; BAILLY, C.. Copper-Dependent Oxidative and Topoisomerase II-Mediated DNA Cleavage by a Netropsin/4'-(9-acridinylamino)methanesulfon-m-anisidide Combilexin. **Molecular Pharmacology**, v. 51 (3), p. 448-461, 1997.

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

JIANG , Q.; XIAO, N.; SHI, P.; ZHU, Y.; GUO, Z., **Coordination Chemistry Reviews**, v. 251, p. 1951–1972, 2007.

JIN, Y.; LEWIS ,M. A.; GOKHALE, N. H.; LONG, E. C.; COWAN, J. A.. 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, 8353-8361, 2007.

JOYCE, L.E.; AGUIRRE, J.D.; ANGELES-BOZA, A.M.; CHOUAI, A.; FU, P. K.-L.; DUNBAR, K.R.; TURRO, C.. Photophysical Properties, DNA Photocleavage, and Photocytotoxicity of a Series of Dppn Dirhodium(II,II) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 49, p. 5371–5376, 2010.

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

JOYNER, J.C.; KEUPER, K.D.; COWAN, J.A.. Analysis of RNA cleavage by MALDI-TOF mass spectrometry. **Nucleic Acids Research**. 2013;41(1):e2.

KATSOULAKOU, E.; LALIOTI, N.; RAPTOPOULOU, C.P.; TERZIS, A.; MANESSI-ZOUPA, E.; PERLEPES, S.P.. Insights into the role of zinc(II) sites in hydrolytic enzymes: study of the ZnII/X/(py)<sub>2</sub>CO (X=Cl<sup>-</sup>, N<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; (py)<sub>2</sub>CO □ di-2-pyridyl ketone) reaction systems. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 5, p. 719–723, 2002.

KIM, S.K., NORDÉN, B. Methyl green. A DNA major-groove binding drug. **FEBS Letters**, v. 315(1), p. 61-64, 1993.

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, p. 6656-6662, 2003.

KOVALEVA, O. A.; TSVETKOV, N.B.; MAMAEVA, O.K.; OL'SHEVSKAYA, V.A.; MAKARENKO, A.V.; DEZHENKOVA, L.G.; SEMEIKIN, A.S.; BORISOVA, O.F.; SHTIL, A.A.; SHCHYOLKINA, A.K.; KALUZHNY, D. Preferential DNA photocleavage potency of Zn(II) over Ni(II) derivatives of carboxymethyl tetracationic porphyrin: the role of the mode of binding to DNA. **European Biophysics Journal**, v. 43(10-11) , p. 545-554, 2014.

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

LEWIS, E.A.; MUNDE, M.; WANG, S.;RETTIG, M.; LE, V.;MACHHA, V.; WILSON, D..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 (22), p. 9649–9658, 2011.

LI, Z.; BURYA, S.J.; TURRO, C.; DUNBAR, K.R.. Photochemistry and DNA photocleavage by a new unsupported dirhodium(II,II) complex. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, 371: 20120128, 2013.

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

LIPSCOMB, L. A.; ZHOU, F. X.; PRESNELL, S. R.; WOO, R. J.; PEEK, M. E.; PLASKON, R. R.; WILLIAMS, L. D.. **Biochemistry**, v. 35, p. 2818-2823, 1996.

LIU, J.; ZHANG, T.; LU, T.; QU, L.; ZHOU, H.; ZHANG, Q.; JI, L.. DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 91(1), p. 269-276, 2002.

LU, Q.; REIBENSPIES, J. J.; MARTELL, A. E.; MOTEKAITIS, R. J.. Copper(II) Complexes of the Hexaaza Macrocyclic Ligand 3,6,9,16,19,22-Hexaaza-27,28-dioxatricyclo[22.2.1.111,14]octacos-1(26),11,13,24-tetraene and Their Interaction with Oxalate, Malonate, and Pyrophosphate Anions. **Inorganic Chemistry**, v. 35 (9), p. 2630-2636, 1996.

MANCIN, F.; SCRIMIN, P.; TECILLA, P.; TONELLATO, U. Artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, v. 20, p. 2540-2548, 2005.

MARMUR, J; DOTY, P.. determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. **Journal of Molecular Biology.**, v. 5, p. 109-118, 1962.

MARMUR, J; DOTY, P.. Thermal Renaturarion of deoxyribonucleic acids. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, p. 585-594, 1961.

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

MERGNY, J-L.; LACROIX, L.. Analysis of Thermal Melting Curves. **Oligonucleotides**, v.13 (6), p. 515-537, 2004.

NAFISI, S.; SABOURY, A.A.; KERAMAT, N.; NEAULT, J-F.; TAJMIR-RIAAHI, H-A.. Stability and structural features of DNA intercalation with ethidium bromide, acridine orange and methylene blue. **Journal of Molecular Structure**, v. 827 (1-3), p. 35-43, 2007.

NAUE, J. A.; TOMA, S. H.; BONACIN, J. A.; ARAKI, K.; TOMA, H. E.. Probing the binding of tetraplatinum (pyridyl) porphyrin complexes to DNA by means of surface plasmon resonance. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 182-189, 2009.

OLIVEIRA, V. A.; IGLESIAS, B. A.; AURAS, B. L.; NEVES, A.; TERENCEZI, H.. Photoactive meso-tetra(4-pyridyl)porphyrin-tetrakis-[chloro(2,2'-bipyridine)platinum(II) derivatives recognize and cleave DNA upon irradiation. **Dalton Transactions**, v. 46, p. 1660-1669, 2017.

PATWARDHAN, A.; COWAN, J.A.. Highly specific oxidative damage of double-strand DNA by copper aminoglycosides. **Chemical Communications**, p. 1490-149, 2001.

PODDUTOORI, P.; PODDUTOORI P. K.; MAIYA, B. G.. Nucleobase (A, T, G and C) appended tri-cationic water-soluble porphyrins: Synthesis, characterization, binding and photocleavage studies with DNA. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 10 (1), p. 1-12, 2006.

ROBINSON, D.R.; GRANTE, M.E.. The effects of aqueous salt solutions on the activity coefficients of purine and pyrimidine bases and their relation to the denaturation of deoxyribonucleic acid by salts. **The journal of biological Chemistry**, v. 241 (17), p. 4030-4042, 1966.

RODGER, A.. Circular and linear dichroism of drug-DNA systems. **Methods in Molecular Biology** (Clifton, N.J.), v. 613, p.37-54, 2010.

SHAHABADI, N.; KASHANIAN, S.; FATAHI, A.. Identification of Binding Mode of a Platinum (II) Complex, PtCl<sub>2</sub>(DIP), and Calf Thymus DNA. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 687571, 2011,.

SHCHERBAKOVA, I.; MITRA, S.; BEER, R. H.; BRENOWITZ, M.. Fast Fenton footprinting: a laboratory-based method for the time-

resolved analysis of DNA, RNA and proteins. **Nucleic Acids Research**, v.34 (6), e48, p.1-9, 2006.

SHUBSDA, M. F.; GOODISMAN, J.; DABROWIAK, J. C..  
Quantitation of ethidium-stained closed circular DNA in agarose gels. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 34, p.73–79, 1997.

SHULTZ, D. A.; GWALTNEY, K. P.; LEE, H.. Spin Delocalization in Phenylnitroxide-Substituted Metalloporphyrins. **Journal of Organic Chemistry**, v. 63, p. 769–774, 1998.

SITERS, K. E.; SANDER, S. A.; DEVLIN, J. R.; MORROW, J. R..  
Bifunctional Zn(II) complexes for recognition of non-canonical thymines in DNA bulges and G-quadruplexes **Dalton Transactions**, v. 44 (8), p. 3708-3716, 2015.

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, p. 8814-8824, 2000.

SUN, Y.; MA, R.; WANG, S.; LI, G.; SHENG, Y.; RUI, H.; ZHANG, J.; XU, J.; JIANG, D.. New cofactors and inhibitors for a DNA-cleaving DNazyme: superoxide anion and hydrogen peroxide mediated an oxidative cleavage process. **Scientific Reports**, v. 7 (378), 2017.

VAN DYKE, M. W.; HERTZBERG, R. P.; DERVAN, P. B. (1982). 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(18), p. 5470–5474, 1982.

VINAY KUMAR, B.; BHOJYA NAIK, H.S.; GIRIJA, D.; SHARATH, N.; PRADEEPA, S.M.; JOY HOSKERI, H.; PRABHAKARA, M. C..  
Synthesis, DNA-binding, DNA-photocleavage profiling and antimicrobial activity of novel tetra-aza macrocyclic Ni(II), Co(II) and Cu(II) complexes constrained by thiadiazole. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 94, p. 192-199, 2012.

WAN, S.-H.; LIANG, F.; XIONG, X.-Q.; YANG, L.; WU, X.-J.; WANG, P.; ZHOU, X.; WU, C.-T.. DNA hydrolysis promoted by 1,7-dimethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2804-2806, 2006.

XU, W.; YANG, X.; YANG, L.; JIA, Z.; WEI, L.; LIU F.; LU, G.; Synthesis and DNA cleavage activity of triazacrown-anthraquinone conjugates. **New Journal of Chemistry**, v. 34, p. 2654-2661, 2010.

ZHAO, P.; HUANG, J.-W.; MEI, W.-J.; HE, J.; JI, L.-N.. DNA binding and photocleavage specificities of a group of tricationic metalloporphyrins. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 75 (3), p. 1108–1114, 2010.

ZHU, Li-Na.; Shi, S.; Yang, L.; Zhang, M.; LI, Ke-Ke; ZHANG, Li-Na.. Water soluble cationic porphyrin TMPipEOPPinduced G-quadruplex and double-stranded DNA photocleavage and cell phototoxicity. **RSC Advances**, v. 6, p. 13080-13087, 2016.



#### 4 **CAPÍTULO IV – CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS**

A busca por drogas antitumorais constitui uma preocupação mundial visto que o câncer é a segunda maior causa de morte no mundo, levando à morte cerca de 8,8 milhões de pessoas somente no ano de 2015 e estima-se que esse número aumente até 70 % nas próximas duas décadas (WHO, 2017). Os tratamentos tradicionais ainda proporcionam diversos efeitos colaterais pois são muito agressivos e não atingem somente as células cancerígenas, mas as sadias também. Isso impulsiona estudos para o desenvolvimento de métodos mais locais e menos agressivos a fim de promover maior eficácia no tratamento e melhor qualidade de vida aos pacientes. Nesse âmbito a terapia fotodinâmica já tem sido utilizada em alguns países como coadjuvante aos tratamentos tradicionais e estudos no desenvolvimento de drogas fotossensibilizadoras eficazes é o alvo de diversas pesquisas, tendo em vista que a técnica tem como objetivo a ação local da droga por fotoativação. Diversos complexos têm sido estudados para esse fim, desde complexos orgânicos aos inorgânicos, dentre eles destacam-se as porfirinas (ETHIRAJAN et al., 2011).

As porfirinas são macrociclos terrapirrólicos com capacidade de absorver luz em determinado comprimento de onda e gerar espécies reativas de oxigênio quando fotoativadas na presença de oxigênio molecular. As porfirinas existem na natureza e são responsáveis por intermediar diversos processos bioquímicos através de reações de oxirredução (redox), como a fotossíntese (clorofila – porfirina com magnésio) e transporte de oxigênio sanguíneo (heme – porfirina com ferro). Devido sua importância biológica o desenvolvimento de metaloporfirinas biomiméticas às naturais tem sido uma área de intensa pesquisa (ETHIRAJAN et al., 2011; PRATVIEL, 2016).

Neste trabalho foi estudada a interação do DNA com metaloporfirinas de Zinco(II) com ligante derivado do 1,4,7-triazaciclonoano e metaloporfirinas de Zinco(II) com compostos de coordenação de platina(II) (AURAS et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2017). De modo geral todas as porfirinas estudadas interagiram com o DNA e apresentaram atividade catalítica quando expostas à luz visível (fotoclivagem) por mecanismos mistos sem dependência do oxigênio molecular, fato este interessante para supressão de tumores hipóxicos (LI et al., 2013; JOYCE et al., 2010). As Pt(II)-porfirinas foram as mais ativas como nucleases e por isso estimularam mais estudos de interação com CT-DNA, DNA plasmidial e oligonucleotídeos. Estes estudos,

demonstrados no capítulo III, demonstraram que estas porfirinas interagem externa e paralelamente ao eixo da dupla hélice de forma a induzir clivagens oxidativas em nucleotídeos da mesma fita.

Como perspectivas pretende-se realizar estudos dessas porfirinas com DNA G-quadruplex (G4), estrutura presente nos telômeros. Os telômeros são constituídos pela repetição de um hexanucleotídeo simples fita (TTAGGG)<sub>n</sub> capaz de formar a estrutura G-quadruplex e na maioria das conformações as guaninas formam quartetos com variação das posições 5' e 3' e sua conformação, paralela ou antiparalela, depende das condições das soluções e dos nucleotídeos "flanqueados" (BENIAMINOV et al., 2016). O encurtamento dos telômeros está envolvido em doenças degenerativas e envelhecimento, porém seu alongamento está presente em 90 % dos casos de câncer, onde as telomerasas encontram-se ativas impedindo o encurtamento dos telômeros de cromossomos mutados e consequentemente a morte da célula cancerígena (ARTANDI; DePINHO, 2010; JAFRI et al., 2016). Desta forma, o DNA telomérico é um alvo promissor de pequenas moléculas com ação terapêutica anticâncer (SHAY et al., 2001; JAFRI et al., 2016). Relatos na literatura demonstram que a oxidação dos telômeros inibe a ação das telomerasas e pode vir a ser uma alternativa para o tratamento do câncer (BENIAMINOV et al., 2016). Devido a sua aromaticidade as porfirinas interagem com estruturas G-quadruplex ( $\pi$ -stacking) e possui alta capacidade de oxidar guaninas através da geração de oxigênio singlete (BENIAMINOV et al., 2016). Nesse sentido, estudos das Pt(II)-porfirinas com G-quadruplex são necessários para uma melhor compreensão das interações dessas porfirinas com o DNA telomérico a fim de auxiliar no desenvolvimento de drogas porfirínicas para uso clínico no tratamento do câncer.

## REFERÊNCIAS

- ARTANDI, S.E.; DEPINHO, R.A.. Telomeres and telomerase in cancer. **Carcinogenesis**, v.31(1), p.9–18, 2010.
- BENIAMINOV, A.D.; NOVIKOV, R.A.; MAMAEVA, O.K.; MITKEVICH, V.A.; SMIRNOV, I.P.; LIVSHITS, M.A.; SHCHYOLKINA, A.K.; KALUZHNY, D.N.. Light-induced oxidation of the telomeric G4 DNA in complex with Zn(II) tetracarboxymethyl porphyrin. **Nucleic Acids Research**, v. 44 (21), p. 10031–10041, 2016.
- CHEN, Y.-J.; CHEN, P.-J.; WANG, H.-T.; CHENG, C.-C.. Specific recognition of DNA bulge structure by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.18, p. 609–616, 2004.
- ETHIRAJAN, M.; CHEN, Y.; JOSHI, P.; PANDEY, R. K.. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 40, 340–362, 2011.
- GUT, I.G.. DNA Analysis by MALDI-TOF Mass Spectrometry. **Human mutation**, v.23, p. 437-441, 2004.
- HOFSTADLER, S.A.; GRIFFEY, R.H.. Analysis of noncovalent complexes of DNA and RNA by mass spectrometry. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 2, 2001.
- JAFRI, M.A., ANSARI, S.A.; ALGAHTANI, M.H.; SHAY, J.W.. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase targeted therapies. **Genome Medicine**, v. 8 (69), p. 1-18, 2016.
- JIN, Y; COWAN, J.A.. Targeted Cleavage of HIV Rev Response Element RNA by Metallopeptide complexes. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 2, p. 410-411, 2006.
- JOYCE, L.E.; AGUIRRE, J.D.; ANGELES-BOZA, A.M.; CHOUAI, A.; FU, P. K.-L.; DUNBAR, K.R.; TURRO, C.. Photophysical Properties, DNA Photocleavage, and Photocytotoxicity of a Series of Dppn Dirhodium(II,II) Complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 49, p. 5371–5376, 2010.

JOYNER, J. C.; KEUPER, K. D.; COWAN, J. A.. Analysis of RNA cleavage by MALDI-TOF mass spectrometry. **Nucleic Acids Research**, v. 41(1), p. 1-11, 2013.

LI, Z.; BURYA, S.J.; TURRO, C.; DUNBAR, K.R.. Photochemistry and DNA photocleavage by a new unsupported dirhodium(II,II) complex. **Philosophical Transactions of the Royal Society A**, 371: 20120128, 2013.

OLIVEIRA, V. A.; IGLESIAS, B. A.; AURAS, B. L.; NEVES, A.; TERENCEZI, H.. Photoactive meso-tetra(4-pyridyl)porphyrin-tetrakis-[chloro(2,2'-bipyridine)platinum(II) derivatives recognize and cleave DNA upon irradiation. **Dalton Transactions**, v. 46, p. 1660-1669, 2017.

PRATVIEL, G. Porphyrins in complex with DNA: Modes of interaction and oxidation reactions. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 308, p. 460-477, 2016.

SHAY, J.W.; ZOU, Y.; HIYAMA, E.; WRIGHT, W.E.. Telomerase and Cancer. **Human Molecular Genetics**, v. 10 (7), p. 677-685, 2001.

VEENSTRA, T.D.. Electrospray ionization mass spectrometry in the study of biomolecular non-covalent interactions. **Biophysical Chemistry**, v.79, p. 63-79, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Cancer. **Fact sheet**. Publicado em Fevereiro de 2017. Acesso em 05 de novembro de 2017. Link: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.

# APÊNDICE A – Artigo publicado referente ao capítulo II

## Photochemical & Photobiological Sciences



PAPER

View Article Online  
View Journal | View IssueCite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*,  
2016, 15, 564

Received 14th January 2016

Accepted 20th March 2016

DOI: 10.1039/c6pp00016a

www.rsc.org/pss

### *meso*-Mono-[4-(1,4,7-triazacyclononyl)]-tri(phenyl)porphyrin and the respective zinc(II)-complex: complete characterization and biomolecules binding abilities†

Bruna L. Auras,<sup>a</sup> Vanessa A. Oliveira,<sup>b</sup> Hernán Terenzi,<sup>b</sup> Ademir Neves<sup>a</sup> and Bernardo A. Iglesias<sup>a,b,c</sup>

We aimed to synthesize a new series of triazacyclononyl-porphyrins (**4** and **5**) with the potential ability to bind DNA. For this, the free-base porphyrin **4** and the corresponding Zn(II)-complex **5** were synthesized by the Schiff base formation reaction. The binding ability of the porphyrin derivatives **4** and **5** with DNA from calf-thymus was studied by UV-vis and emission spectroscopy. Detailed analysis of the results suggests that the interaction of these systems most probably occurs through  $\pi$ -stacking and secondary hydrogen interaction surface binding with ct-DNA. Moreover, we also demonstrate the substantial ability of porphyrins **4** and **5** to generate  $^1\text{O}_2$  and to photocleave plasmid DNA after irradiation.

### Introduction

Tetrapyrrole macrocycles are of crucial interest for their potential applications in diverse fields such as biomimetic models for photosynthesis,<sup>1,2</sup> electronic materials,<sup>3</sup> catalysis,<sup>4</sup> and medicine.<sup>5,6</sup> In the past few decades, the synthesis of porphyrin derivatives has emerged as one of the major areas of research due to the success of these molecules for the eradication of malignant cells by photodynamic therapy (PDT) after their selective accumulation in neoplastic tissues.<sup>7–10</sup> In addition, the low dark-toxicity profile, easy removal from the tissue, and efficiency in generating reactive oxygen species by the absorption of photons in the visible or near IR region make them ideal candidates for developing effective photodynamic agents.<sup>11,12</sup> These findings have encouraged researchers to design and synthesize potential targeting anticancer drugs derived from porphyrins.<sup>13</sup> Previously, a large number of these molecules have been synthesized by the coupling of diverse bioactive units, such as carbohydrates,<sup>14</sup> amino acids,<sup>15</sup> steroids,<sup>16</sup> glycosides<sup>17</sup> and N-heterocycles,<sup>18</sup> to the porphyrin periphery.

DNA recognition, binding, cleavage and modification, or cross-linking by small molecules, have attracted extensive interest due to their potential applications in the fields of molecular biology technology and drug development.<sup>19–21</sup> There continues to be great interest in macrocyclic polyamines because of their rich and robust coordination chemistry,<sup>22</sup> resulting in many applications of their complexes as biomimetics, in medicine and in catalysis. In particular, those derived from 1,4,7-triazacyclononane (TACN) constitute a privileged class of ligands for a variety of cations. Transition metal complexes of TACN have found application as sensors,<sup>23</sup> metalloenzyme models<sup>24</sup> as well as hydrolytic agents capable of the non-oxidative cleavage of a range of substrates, including activated esters<sup>25</sup> and DNA.<sup>26,27</sup> Thorough literature search revealed that heterocycles containing an N-donor atom ring system, such as 1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane (cyclam),<sup>28</sup> 1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid (DOTA)<sup>29</sup> and 1,4,7-triazacyclononane (TACN),<sup>30</sup> exhibit a wide spectrum of medical and biomimetic activities, for example, acting as a chelator for image contrast,<sup>31,32</sup> nucleic acid delivery,<sup>33</sup> DNA cleavage<sup>34</sup> or therapeutic agents for cancer.<sup>35,36</sup>

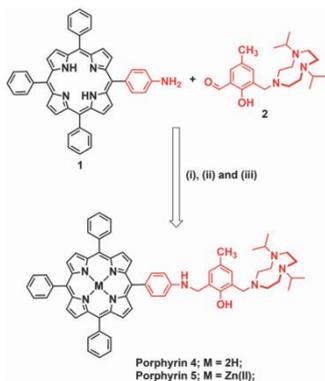
By considering the biological significance of these two classes of molecules, it was contemplated to construct new triazacyclononane-substituted porphyrins combining the porphyrin and TACN moieties, using 2-chloromethyl-4-methyl-6-formylphenol (CmfH) as a spacer, in a single molecular framework. Such hybrid compounds can be a potential candidate of new phototherapeutic agents. In an attempt to obtain more insight into the selectivity and efficiency of DNA

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil. E-mail: ademir.neves@ufsc.br

<sup>b</sup>Centro de Biologia Molecular Estrutural, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: bernardopgg@gmail.com

†Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6pp00016a



**Scheme 1** Step reactions for porphyrins 4 and 5. Reaction conditions: (i)  $\text{La}(\text{OTf})_3$ , toluene, reflux, 10 h; (ii)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ , 25 °C, 15 min; (iii)  $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ , 30 min.

recognition and cleavage by different substituted porphyrins, we selected the 1,4,7-triazaacyclononane group due to its good DNA-interactor aliphatic macrocycle.

Herein, we aimed to synthesize a new series of Cmf-TACN-porphyrins (4 and 5, Scheme 1) with the potential ability to bind DNA. For this, the free-base compound 5-(3-[(4,7-diisopropyl-1,4,7-triazaacyclononan-1-yl)methyl]-2-hydroxy-5-methylbenz-amino)-10,15,20-tri(phenyl)porphyrin 4 and the corresponding zinc(II) complex 5 were synthesized. In this article, TACN-porphyrin hybrid can serve as a nuclease mimic.

The binding ability of the porphyrin derivatives 4 and 5 with DNA from calf-thymus (ct-DNA) was studied by UV-vis and emission spectroscopy. Detailed analysis of the results suggests that the interaction of these systems most probably occurs through  $\pi$ -stacking and secondary hydrogen interaction surface binding with ct-DNA. Additionally, we also demonstrate a great ability of porphyrins 4 and 5 to generate  $^1\text{O}_2$  and to photocleave plasmid DNA after visible light irradiation.

## Results and discussion

### Synthesis of triazaacyclononanyl-substituted porphyrins 4 and 5

The targeted porphyrins 4 and 5 were prepared according to the methodology described by Nath and co-workers.<sup>45</sup> Starting from 5-(4-aminophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin 1, which was obtained by the reduction of 5-(4-nitrophenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin using  $\text{NaBH}_4$  and Pd/C 10% conditions.<sup>46</sup> Firstly, *meso*-mono-(4-aminophenyl)porphyrin 1 was reacted

with the Cmf-TACN 2 compound in the presence of  $\text{La}(\text{OTf})_3$  as a Lewis acid catalyst in dry toluene under reflux to afford the corresponding iminoporphyrin intermediate 3 (*in situ*), which on reduction by  $\text{NaBH}_4$  in a chloroform/methanol mixture at 25 °C produced *meso*-mono-substituted aminoporphyrin 4 ( $\eta = 44\%$ ), in moderate yields. Further, the free-base porphyrin 4 was successfully converted to its zinc(II) complex analogue 5 ( $\eta = 90\%$ ) by using  $\text{Zn}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  as outlined in Scheme 1. The synthetic methodologies are presented in the ESI†

### MS and NMR analysis of porphyrins 4 and 5

Porphyrins 4 and 5 were fully characterized by CHN% elemental analysis, HRMS-ESI-MS,  $^1\text{H}$  NMR, UV-vis, emission spectroscopy, electrochemistry and spectroelectrochemistry. As an example, the ESI-MS mass spectra analysis of free-base porphyrin 4 shows two peaks at  $m/z$  975 and  $m/z$  1007, corresponding to the mono-protonated species  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , followed by the adduct species with methanol in the gas phase  $[\text{M} + \text{H} + \text{MeOH}]^+$ , respectively (Fig. S1, ESI†). When the peak at  $m/z$  975 is monitored and subjected to fragmentation (ESI-MS/MS) two peaks in the ESI(+)-MS/MS mass spectrum can be observed (Fig. S1, ESI†). The first ion peak at  $m/z$  630 can be assigned to a positively charged species generated by the loss of a triazaacyclononanyl group, followed by a second loss peak at  $m/z$  614 which can be assigned to a positively charged radical species porphyrin generated by the loss of  $\text{NH}_2$  in the protonated form ( $\text{NH}_2^+$ ). The ESI-MS spectrum of Zn(II) complex 5 and HRMS-ESI spectra of porphyrins 4 and 5 are presented in the ESI (Fig. S2 and S3, ESI†).

The  $^1\text{H}$  NMR of porphyrin 4 shows the internal proton resonances at high fields ( $-2.76$  ppm), while at low fields the other proton resonances corresponding to the peripheral of the porphyrin are located. The resonances that appear as a duplet and a broad singlet in the 8.80–8.95 ppm range can be attributed to the  $\beta$ -H protons. In the case of the unsubstituted phenyl groups the resonances appear as a multiplet at 7.76 ppm for the *meta*- and *para*-H phenyl ring protons and duplet at 8.22 ppm for the *ortho*-H, respectively. The signals relating to the phenyl ring spacer, between the porphyrin macrocycle and the triazaacyclononanyl moiety, are assigned as duplets at 8.02 ppm for the *meta*-H and 7.10 ppm for the *ortho*-H. On the other hand, the signal resonances around 1.25, 2.95, 3.65, 4.59, 7.00 and 7.96 ppm are attributed to the triazaacyclononanyl unit. The  $^1\text{H}$  NMR of compound 5 shows the disappearance of the resonances at high fields when metallated with the zinc(II) ion, and the same profile was observed for the proton resonances of the free-base porphyrin 4.  $^1\text{H}$  and COSY 2D NMR spectra data of porphyrins are presented in the ESI (Fig. S4–S7, ESI†).

### Electronic absorption and fluorescence analysis

The electronic absorption spectra of the free-base porphyrin 4 and metalloporphyrin 5 in dichloromethane solution consist of an envelope of superimposed absorption bands in the range of 300–800 nm, arising from the characteristic absorption

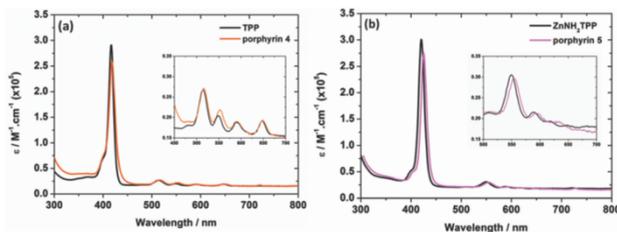


Fig. 1 Electronic absorption spectra of (a) porphyrin 4 and (b) porphyrin 5 in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  at 298 K. Inset shows the Q bands ( $[\text{I}] = 3 \mu\text{M}$ ).

Table 1 Electronic absorption and emission data of porphyrin derivatives in DCM

Porphyrin	$\lambda/\text{nm}$ ( $\epsilon, \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )	Emission <sup>a</sup> ( $\lambda/\text{nm}$ )	$\phi_f^b$
TPP	416 (216,667), 515 (16,662), 550 (9,987), 590 (8,890) and 648 (7,455)	648, 718	0.150
	ZnNH <sub>2</sub> TPP	421 (240,000), 561 (11,346) and 603 (10,045)	604, 652
4	418 (234,422), 516 (16,218), 553 (10,715), 592 (8,128) and 647 (7,943)	652, 720	0.031
	5	425 (266,577), 558 (23,337) and 600 (17,477)	602, 650

<sup>a</sup> Deaerated DCM solution. <sup>b</sup> TPP as a reference standard.

properties of substituted porphyrin (Fig. 1). Unfortunately, the bands resulting from the transitions of the triazacyclononyl moiety are overlaid in the spectrum, due to the strong porphyrin Soret absorption band.

Porphyrins 4 and 5 exhibited characteristic Soret absorption bands at 418 nm ( $\epsilon = 234,422 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) and 425 nm ( $\epsilon = 266,677 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ), respectively. Q-bands are observed at 516 ( $Q_{0(1-0)}$ ), 553 ( $Q_{0(0-0)}$ ), 592 ( $Q_{0(1-0)}$ ) and 647 nm ( $Q_{0(0-0)}$ ) for free-base 4. The corresponding absorption Q-bands for Zn(n)-complex 5 are observed at 558 and 600 nm, respectively (Table 1). In spite of their similarities, it should be noted that the Soret-band is quite narrow for the free-base porphyrin 4, when compared with that of Zn(n) complex 5 (bathochromic shift;  $\Delta\lambda = 8 \text{ nm}$ ). This observation is consistent with a Zn(n) distorted square-planar coordination ion mode into the tetrapyrrole macrocycle. In the case of porphyrin 4, the absence of the metal ion in the porphyrin core could result in lower electronic interactions between the macrocycle core and peripheral groups (Fig. 1).

The spectroscopic experiments show the emission and excitation spectra of porphyrins 4 and 5 in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( $\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$  for free-base and Zn(n) compounds;  $\lambda_{\text{emiss}} = 720 \text{ nm}$  for free-base porphyrins and  $\lambda_{\text{miss}} = 660 \text{ nm}$  for the zinc complexes) and the spectral data are given in Table 1. Both spectra

are shown in Fig. 2 and the emission quantum yield ( $\phi_f$ ) was estimated from the emission and absorption spectra of the reference 5,10,15,20-tetra(phenyl)porphyrin (TPP;  $\phi_f = 0.150$  in DCM) by a comparative method (Table 1).<sup>17</sup> The  $Q_{0(0)}$  and  $Q_{0(1)}$  emission bands of porphyrin derivatives are in the 500–800 nm spectral region. The emission quantum yields of porphyrins 4 and 5, compared to their precursors (TPP and ZnNH<sub>2</sub>TPP, see Fig. 2), are quite smaller and can be attributed to an increase in the intersystem crossing to the triplet excited state or an increase in internal conversion due to the attachment of the triazacyclononyl group in the peripheral macrocycle position. The insertion of the Zn(n) metal ion into the macrocycle resulted in a decrease of the emission intensity and quantum yield. The different values for the quantum yields may be a clue concerning the electronic coupling between the triazacyclononyl unit and the porphyrin ring related to the presence or absence of the Zn(n) metal ion.<sup>18</sup>

#### Cyclic voltammetry and spectroelectrochemical analysis of porphyrins 4 and 5

The cyclic voltammograms of porphyrins 4 and 5 in anhydrous dichloromethane are shown in Fig. 4. Firstly, when analyzing the electrochemical behavior of the CmfT-TACN unit it is possible to observe that the cyclic voltammogram shows an irreversible wave in the 0.0 V to  $-2.00 \text{ V}$  range, which can be attributed to the ligand reduction process containing the phenolate group at  $E_{\text{pc}} = -1.04 \text{ V}$  (Table 2). Moving the potential to a positive region (0.0 V to  $+2.00 \text{ V}$ ), we can observe the presence of one oxidation process at  $E_{\text{pa}} = +1.03 \text{ V}$ , which can be assigned to oxidation of the CmfT-TACN species (Table 2). The cyclic voltammograms of CmfT-TACN at several scan rates are presented in the ESI (Fig. S9, ESI†).

For free-base porphyrin 4, we can see three oxidation processes (irreversible) and two reduction processes (irreversible and quasi-reversible) (Fig. 3A), in the  $-1.50 \text{ V}$  to  $+2.00 \text{ V}$  potential range. In the anodic region, we can observe the existence of three oxidation processes at  $E_{\text{pa}} = +1.060 \text{ V}$ ,  $+1.373 \text{ V}$  and  $+1.605 \text{ V}$  (versus ferrocene/ferrocenium redox pair), respectively. The first process can be attributed to the oxidation of the

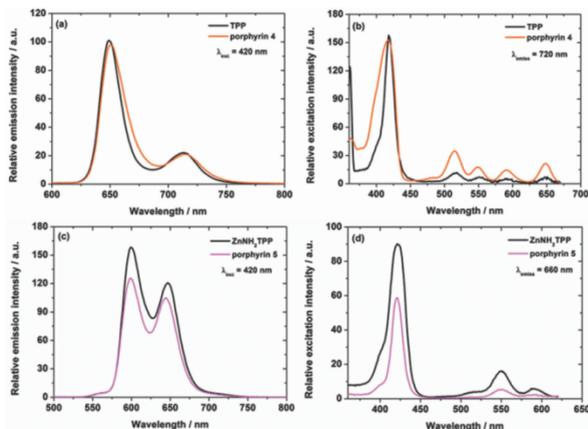


Fig. 2 (a) and (c) Emission ( $\lambda_{\text{exc}} = 420$  nm) spectra of free-base porphyrin 4 and Zn(ii)-complex 5 derivatives. (b) and (d) Excitation ( $\lambda_{\text{emiss}} = 660$  nm) spectra of free-base porphyrin 4 and excitation ( $\lambda_{\text{emiss}} = 720$  nm) of Zn(ii)-porphyrin 5, both in  $N_2$  deaerated dichloromethane solution.

Table 2 Redox potentials data of compounds studied in this work ( $E$  versus  $Fc/Fc^+$  redox couple)

Processes	TPP	CmfT-TACN	4	5
$E_{\text{ox1}}$	+1.204 V <sup>a</sup>	+1.245 V <sup>b</sup>	+1.060 V <sup>b</sup>	+0.863 V <sup>b</sup>
$E_{\text{ox2}}$	+1.426 V <sup>a</sup>	—	+1.373 V <sup>b</sup>	+1.274 V <sup>b</sup>
$E_{\text{ox3}}$	—	—	+1.605 V <sup>b</sup>	+1.650 V <sup>b</sup>
$E_{\text{red1}}$	-0.998 V <sup>a</sup>	-0.522 V <sup>c</sup>	-0.933 V <sup>c</sup>	-0.796 V <sup>c</sup>
$E_{\text{red2}}$	-1.335 V <sup>a</sup>	—	-1.264 V <sup>c</sup>	—

<sup>a</sup>  $E_{1/2} = (E_{\text{pa}} + E_{\text{pc}})/2$ . <sup>b</sup> Anodic peak. <sup>c</sup> Cathodic peak.

CmfT-TACN group, followed by the first and second mono-electronic oxidation of the porphyrin ring, generating species of a  $\pi$ -cation radical and a dication type, respectively (Fig. 3A). Moving to cathodic direction, we observe an irreversible reduction followed by the second quasi-reversible reduction process for porphyrin 4 (Fig. 3A). This first reduction process is observed at  $E_{\text{pc}} = -0.933$  V, and can be assigned to the reduction of the CmfT-TACN group, followed by the first porphyrin reduction process, at  $-1.264$  V, which can be attributed to the formation of a  $\pi$ -radical anion porphyrin species (Fig. 3A).

On the other hand, metalloporphyrin 5 presents three oxidation processes (irreversible) and two reduction processes (irreversible and quasi-reversible) (Fig. 3B), in the  $-1.30$  V to

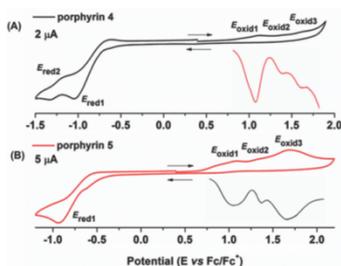


Fig. 3 Cyclic voltammograms of porphyrins (A) free-base 4 (black line) and (B) zinc(c) complex 5 (red line) solution in DCM, 0.1 M TBAPF<sub>6</sub> using glassy carbon electrode, at scan rate 100 mV s<sup>-1</sup>.

+2.30 V potential range. In the anodic potentials, we can observe the existence of three oxidation processes at  $E_{\text{pa}} = +0.863$  V, +1.274 V and +1.650 V, respectively. The first anodic process at  $E_{\text{pa}} = +0.863$  V can be attributed to the oxidation of the CmfT-TACN group, while the processes at  $E_{\text{pa}} = +1.274$  V and  $E_{\text{pa}} = +1.650$  V (versus  $Fc/Fc^+$ ) are assigned to mono-electro-

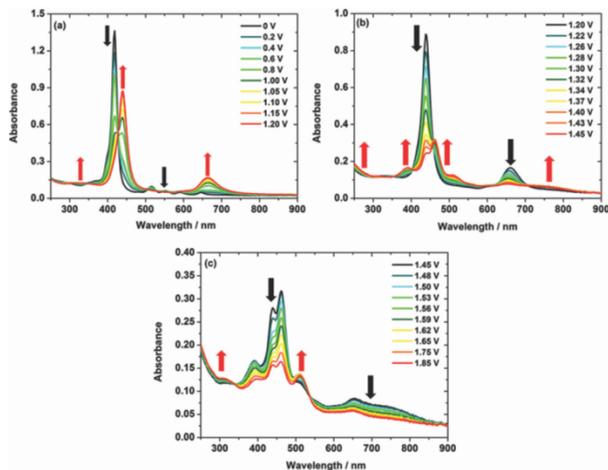


Fig. 4 Spectroelectrochemistry of free-base porphyrin 4 solution in DCM, 0.1 M TBAClO<sub>4</sub>, in the oxidation (a) 0.0 V to +1.20 V, (b) +1.20 V to +1.45 V and (c) +1.45 V to +1.85 V range, respectively.

nic oxidation of the porphyrin ring, generating a  $\pi$ -cation radical and a dication type species, respectively (Fig. 3B). In the cathodic region, only one irreversible reduction wave at  $E_{pc} = -0.796$  V can be observed (Fig. 4b) and this process is assigned to the reduction of the **CmfF-TACN** group in 5. In Table 2 are listed the summary of the redox potentials for the precursor materials and porphyrins 4 and 5. Cyclic voltammograms of porphyrins are presented in the ESI (Fig. S10 and S11†). All the redox processes for porphyrin 4 and metalloporphyrin 5 were analyzed and confirmed by UV-vis spectroelectrochemistry experiments.

Spectroelectrochemical studies were carried out with a  $10^{-4}$ – $10^{-5}$  M range solution of porphyrin 4 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> for the oxidation and reduction processes. The spectroelectrochemistry results are shown in Fig. 4. The oxidation in the 0.0 to +1.20 V range (Fig. 4a) led to the bathochromic shift of the Soret band from 417 to 440 nm and to the appearance of two new bands at 329 and 664 nm, while the Q-bands faded. These spectral changes can be attributed to the mono-electronic oxidation of the porphyrin ring to the  $\pi$ -radical cation species.<sup>49</sup> When the potential was shifted from +1.20 to +1.45 V, the intensity of the Soret and 664 nm bands decreased while there was an increase of absorbance at 461, 512 and 753 nm, indicating the occurrence of the second mono-electronic oxidation of

the porphyrin ring (Fig. 4b). Finally, when the applied potential was increased to 1.85 V, the absorbance at 316 nm, assigned to the possible transitions of the triazacyclononyl-substituted moiety, increased further suggesting the oxidation of the triaza-type unit, following the increased intensity band at 512 nm and decreased intensity spectral band at 753 nm (Fig. 4c).

Moving to the negative potential side, the reduction of the porphyrin 4 in the 0.0 to -1.10 V range (Fig. 5a) and the disappearance of the Soret band was observed at -0.93 V in 417 nm, concomitantly with an increase of the absorbance at 450 nm and the rise of the absorption in the 650–900 nm range. These spectral changes can be attributed to the first mono-electronic reduction of the porphyrin ring, forming the  $\pi$ -radical anion species along with the reduction process of the **CmfF-TACN** unit (Fig. 5a). Finally, when the potential was shifted in the -1.10 V to -1.50 V potential range, spectral changes that can be assigned to the second mono-electronic reduction of the porphyrin ring to the dianion species were observed (Fig. 5b). This was characterized by the disappearance of the bands around 450 and 788 nm, concomitantly with the increase in the absorption at 261 and 595 nm, as shown in Fig. 4e. All the spectroelectrochemical data of metalloporphyrin 5 are presented in the ESI (Fig. S12†).

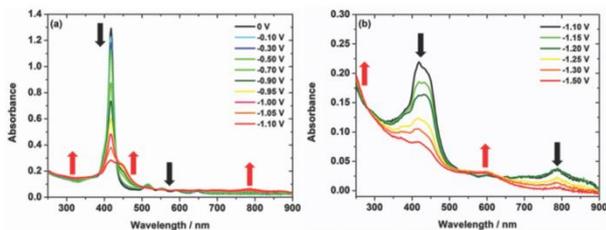


Fig. 5 Spectroelectrochemistry of free-base porphyrin 4 solution in DCM, 0.1 M TBAClO<sub>4</sub>, in the reduction (a) 0.0 V to -1.10 V and (b) -1.10 V to -1.50 V range, respectively.

### Biomolecule interaction assays

The interaction of porphyrins 4 and 5 with nucleic acids were studied by UV-vis and emission fluorescence spectroscopy, since the interaction of the tetrapyrrole macrocycles with DNA and the ability to cleave this biomolecule upon photoactivation provide high potential for their application as photosensitizers in cancer photodynamic therapy.<sup>50,51</sup> It is commonly accepted that porphyrin-type drugs are able to induce cytotoxicity by targeting and inducing damage in DNA.<sup>52</sup> To compare the binding affinity of porphyrins 4 and 5 with the corresponding non-substituted precursors, additional studies with the corresponding porphyrin precursors **TPP** and **ZnNH<sub>2</sub>TPP** were also performed. A series of ct-DNA titrations were carried out using solutions of porphyrins at a constant concentration (3  $\mu$ M in CH<sub>3</sub>CN-tris-HCl buffered mixture solution) with increasing concentrations of DNA (initially solubilized in tris-HCl buffer solution) of low molecular weight from calf thymus (ct-DNA). As an example, Fig. 6 shows the overall changes in the absorp-

tion spectra of porphyrins 4 and 5 with ct-DNA. In the absence of ct-DNA, compound 4 has a higher absorbance of the Soret-band around 418 nm. The UV-vis ct-DNA titration experiments with precursor compounds are presented in the ESI (Fig. S14 and S15†).

A general trend of hypochromism (the decrease in the absorbance of the Soret-band), for all the porphyrins after addition of ct-DNA solutions was observed for all compounds. The observed porphyrin hypochromicity in the UV-vis spectra (Table 3) after addition of solutions with increasing concentrations of ct-DNA increases in the order: **TPP** < **ZnNH<sub>2</sub>TPP** < **4** < **5**. Even though precursor compounds **TPP** and **ZnNH<sub>2</sub>TPP** present a weak potential for secondary H-bonding and/or  $\pi$ -stacking interaction binding with the DNA phosphate or NH groups, porphyrins 4 and 5 demonstrated a higher trend of hypochromicity of the Soret-band absorption. In fact, previous studies have reported that non-cationic porphyrins have activity against carcinogenic DNA replication.<sup>53</sup> The obtained hypochromicity values for precursor porphyrins **TPP** and

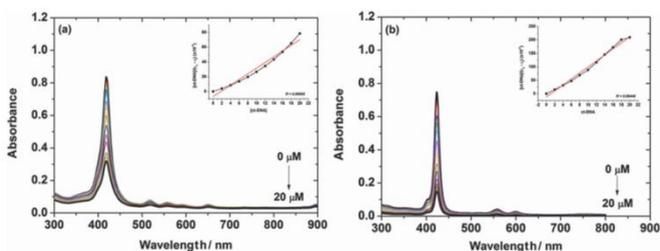


Fig. 6 Electronic UV-vis absorption spectra of (a) free-base porphyrin 4 and (b) zinc(II)-complex 5, both 3  $\mu$ M, with increasing ct-DNA concentrations ranging from 0 to 20  $\mu$ M in CH<sub>3</sub>CN-tris-HCl buffer mixture solution.

**Table 3** Data for the interaction binding properties of porphyrins with ct-DNA

Porphyrin	TPP <sup>a</sup>	ZnNH <sub>2</sub> TPP	4	5
Hypochromicity (H, %) <sup>b</sup>	30.0	33.0	61.9	75.2
Quenching (Q, %) <sup>c</sup>	11.0	32.0	61.1	72.0
K <sub>b</sub> <sup>d</sup> (in M <sup>-1</sup> )	1.51 × 10 <sup>4</sup>	3.60 × 10 <sup>4</sup>	1.11 × 10 <sup>5</sup>	9.30 × 10 <sup>4</sup>

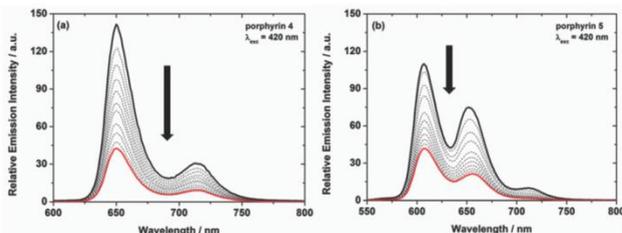
<sup>a</sup> K<sub>b</sub> reference data. <sup>b</sup> H(%) = (Abs<sub>initial</sub> Soret-band - Abs<sub>final</sub> Soret-band) / Abs<sub>initial</sub> Soret-band × 100. <sup>c</sup> Q(%) = (Max. initial emission - Max. final emission) / (Max. initial emission) × 100. <sup>d</sup> Binding constant by UV-vis analysis (K<sub>b</sub>)<sup>55,59,60</sup>

ZnNH<sub>2</sub>TPP (around 30–35%) led us to suppose that these derivatives bind to ct-DNA by H-bonding and/or non-classical stacking modes involving most probably the partial insertion of the phenyl or 4-aminophenyl rings between adjacent base pairs on DNA. The partial interaction into the base pairs of DNA has been described for phosphoramidite-porphyrin types.<sup>54</sup> To further clarify the DNA-binding mode, the intrinsic binding constants of all compounds were calculated as described in the Experimental section and are summarized in Table 3.

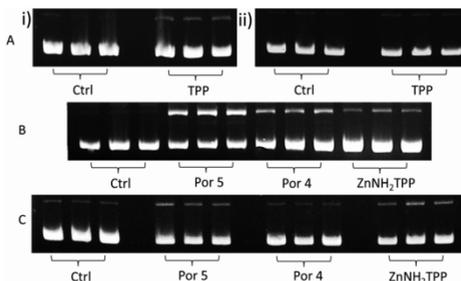
Comparing the intrinsic binding constant (K<sub>b</sub>) of precursors TPP and ZnNH<sub>2</sub>TPP to porphyrin derivatives 4 and 5, we can observe a decreasing sequence order of affinity with ct-DNA: 5 > ZnNH<sub>2</sub>TPP > 4 > TPP. There are no observed evidence or spectral changes for bathochromic shifts for these porphyrins, suggesting that classical intercalation is not occurring in this case.<sup>55</sup> The great hypochromicity observed in the 415–440 nm spectral range (Fig. 6) suggests the formation of a well-defined porphyrin–DNA adduct stabilized by H-bonding and also  $\pi$ -stacking interactions in solution, but also covalent and van der Waals interactions between Zn-TACN-porphyrin 5 moieties and the phosphate groups located on DNA is proposed (Table 3).

The effect of the addition of ct-DNA (in tri-HCl buffered solution) on the porphyrins (CH<sub>3</sub>CN–tris-HCl buffered solution) was also monitored by emission spectroscopy (Fig. 7). Here, the porphyrin solutions were titrated with increasing concentrations of DNA, where the porphyrin derivatives emit between 500 and 800 nm after excitation at 420 nm, and the emission bands remain constant but the intensity decreases (emission quenching, Table 3). The observed emission quenching of the porphyrin derivatives after addition of DNA solutions (Fig. 7) decreases in the order: 5 ≈ 4 > ZnNH<sub>2</sub>TPP > TPP. The largest hypochromicity (without any bathochromic shift) and the observed emission quenching for compound 4 after addition of DNA demonstrate that this compound can be a non-intercalation mode with DNA. Therefore the major mode of interaction between zinc(n)–porphyrin 5 and DNA seems to be a simple electrostatic interactive binding between the Zn(n) ion into the porphyrin and the negative phosphate groups of DNA.

No bathochromic shift was observed for the two compounds 4 and 5, thereby suggesting that these porphyrins do not intercalate into DNA (Fig. 6 and 7). According to the observed differences between porphyrins 4 and 5, some interaction between the phosphate groups of DNA and the Zn(n) centre of compound 5 is expected. The interaction involving phosphate groups on DNA and Zn(n) on complex 5 promotes somehow the insertion of metalloporphyrin 5 into the DNA major and/or minor grooves. Previous studies have reported that the Zn(n) ion in the porphyrin macrocycle can promote the interaction with DNA by electrostatic and/or coordination binding with phosphate groups of DNA.<sup>56</sup> The architecture of the porphyrin derivatives with insertion of the 1,4,7-triazacyclononane group at the *meso* position, has a considerable flexibility as compared with porphyrins containing guanidino-carbonyl groups<sup>57</sup> due to the presence of the triazacyclononanyl-type moiety at the *para* position, which promotes a higher binding constant. The emission ct-DNA titration experiments with precursor compounds are presented in the ESI (Fig. S16 and S17†).



**Fig. 7** Emission spectra of porphyrins 4 and 5 (1–2  $\mu$ M range) with increasing ct-DNA concentrations ranging from 0 to 10  $\mu$ M in CH<sub>3</sub>CN–tris-HCl buffered mixture solution ( $\lambda_{exc}$  = 420 nm).



**Fig. 8** DNA cleavage analysis promoted by the complexes observed by agarose gel electrophoresis. Control (Ctrl), 5,10,15,20-tetra(phenyl)porphyrin (TPP),  $\text{ZnNH}_2\text{TPP}$ , free-base porphyrin 4 (Por 4) and Zn(II)-porphyrin 5 (Por 5). Standard reactions:  $\sim 25 \mu\text{M}$  plasmid DNA,  $10 \text{ mM}$  tris-HCl pH 7.4,  $25\%$   $\text{CH}_2\text{CN}$  (from porphyrin stock solution) and a final concentration of  $35 \mu\text{M}$  for TPP and  $250 \mu\text{M}$  for the other porphyrins. (A-i) and B) All samples were incubated for 90 minutes at  $37^\circ\text{C}$  under visible light. (A-ii and C) All samples were incubated for 24 hours at  $37^\circ\text{C}$  in the dark. All the reactions were performed in triplicate.

#### DNA cleavage and photocleavage analysis

The ability of the porphyrins 4 and 5 to generate singlet oxygen and to interact with DNA prompted us to test their ability to promote photodamage to nucleic acids. To evaluate the potentialities of porphyrin derivatives 4 and 5 to induce DNA strand breaks by a mechanism dependent on their ability to generate ROS, mainly  $^1\text{O}_2$ , their photostability and ability to generate  $^1\text{O}_2$  upon photoexcitation were determined. The photostability of 4 and 5 was studied by monitoring the decrease of the absorbance of their Soret-bands, after different times of visible light irradiation (400–800 nm) delivered by an illumination system at a fluence rate of  $30 \text{ mW cm}^{-2}$ .<sup>61</sup> In DMF/tris-HCl buffered mixture solutions (9 : 1, v/v) of both compounds at  $0.5 \mu\text{M}$  showed good photostability over the investigated irradiation period of 60 min (ESI, Fig. S13 and Table T1†). The ability to generate  $^1\text{O}_2$  by porphyrins 4 and 5 in DMF (1.0 mL) was determined by a chemical method using 9,10-diphenylanthracene (DPA) as the  $^1\text{O}_2$  scavenger.<sup>40</sup> TPP and  $\text{ZnNH}_2\text{TPP}$  derivatives were used as references for 4 and 5, respectively. All compounds at  $0.5 \mu\text{M}$  were able to photo-oxidize DPA at  $50 \mu\text{M}$  (ESI, Fig. S13†). The porphyrins 4 and 5 demonstrated to be potent generators of  $^1\text{O}_2$  and at  $0.50 \mu\text{M}$  these dyes decompose 49% and 52% of DPA, respectively, after 60 min of light irradiation. Both dyes have shown a good ability to photo-oxidize DPA when compared to the corresponding references TPP (30%) and  $\text{ZnNH}_2\text{TPP}$  (42%). The ability of these derivatives to photo-oxidize DPA decreases in the order: porphyrin 5 > porphyrin 4 >  $\text{ZnNH}_2\text{TPP}$  > TPP. The photostability and ability to generate  $^1\text{O}_2$  of 4 and 5 after being exposed to light and oxygen allowed us to envisage them as potential photocleavage agents.

For photocleavage studies, the influence of visible light exposure on plasmid DNA cleavage activity of the different

complexes was investigated, since this is a common feature for porphyrin-based complexes. Interestingly, there were no evident DNA cleavage products after 24 hours of incubation in the dark with any of the complexes. We attempted to increase activity of the complexes by exposure of the reaction media to visible light. In fact, the activity increased substantially with the appearance of linear DNA upon porphyrin 4 and 5 treatment; the  $\text{ZnNH}_2\text{TPP}$  complex was less active in this group. The precursor TPP complex was also used to verify if the modifications in the TPP structure would result in a change on DNA cleavage activities. As observed in Fig. 8 and 9, TPP is the less active complex, indicating that addition of 1,4,7-triazacyclononyl units, linked by NH bridge to the porphyrin, in this case is fundamental to the DNA cleavage activity.<sup>62</sup>

#### Influence of DNA groove binders and ionic strength on the cleavage reaction

The addition of DNA groove binders to the reaction medium in the analysis of DNA-complex interaction helps to elucidate in which manner the complex approaches and interacts with DNA.<sup>63</sup> Netropsin is an oligopeptide with two *n*-methylpyrrole rings and it is a well-known double strand DNA (dsDNA) minor groove binder, which usually generates DNA cleavage-inhibition patterns.<sup>64</sup> This ligand has a positive net charge potential that is attracted by the electronegative potential of the minor groove of the DNA double helix (electrostatic interactions). The hydrogen bonds between amides of antibiotic and the potential H-bond acceptor substituent on the A-T base pairs define the netropsin binding specificity since the N-2 amino group of guanine usually blocks the interaction of this drug.<sup>59,60</sup> The samples previously treated with netropsin, and then, with the porphyrin complexes, demonstrated a

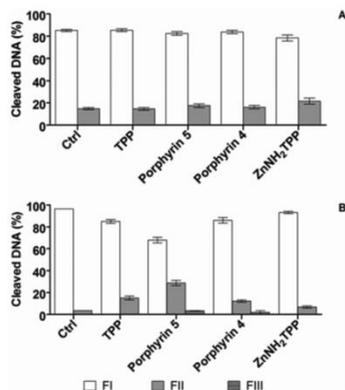


Fig. 9 DNA cleavage analysis promoted by the porphyrin derivatives (histograms represent the quantification of the bands observed in the agarose gel from Fig. 8). Control (Ctrl), 5,10,15,20-tetra(phenyl)porphyrin (TPP), ZnNH<sub>2</sub>TPP, free-base porphyrin 4 (Por 4) and Zn(n)-porphyrin 5 (Por 5). Standard reactions: ~25  $\mu$ M plasmid DNA, 10 mM tris-HCl pH 7.4, 25% CH<sub>3</sub>CN (from porphyrin stock solution) and a final concentration of 35  $\mu$ M for TPP and 250  $\mu$ M for the other compounds. (A) All samples were incubated for 24 hours at 37 °C in the dark and (B) all samples were incubated for 90 minutes at 37 °C under visible light (400–800 nm range). DNA forms were calculated based on the band intensities of each lane. Data represent mean and SD.

pronounced increase in the plasmid circular topoisomer (FII), as observed in Fig. 10 and 11. For zinc(n) metalloporphyrin 5 the increase was from 31% to 75%, and 18% to 62% for free-base porphyrin 4 and 7% to 58% for ZnNH<sub>2</sub>TPP samples. The presence of the linear form was also observed in free-base porphyrin 4 and metalloporphyrin 5 (Fig. 10).

Methyl green is well known as a specific double helix DNA major groove binder.<sup>59</sup> The addition of methyl green to the reaction mixture caused a slight increase in the cleavage activity of porphyrin 4 and ZnNH<sub>2</sub>TPP and a decrease to 13% of FII in the samples treated with Zn(n)-porphyrin 5. In general, increased DNA cleavage observed with the addition of minor groove binders suggests superior higher affinity of the complex to the major groove.<sup>64</sup> We observed a huge increase in the DNA cleavage with any of the complexes under analysis when associated with netropsin but a small loss in activity when methyl green was added. Hydrolytic complexes associated with DNA-binders (intercalators, minor groove binders or positively charged groups) are used as strategies to increase the affinity of the complex to DNA.<sup>65</sup> The new conjugated orientation inside the minor groove is described as being responsible for the higher reactivity since nucleobases face the minor groove and the metal ion points to the phosphate backbone. Studies found that the combination of the minor groove binder distamycin A to other drugs originate from heterodimers with high ability to modulate the DNA alkylation site of guanine residues in GC rich sequences promoting an efficient G-N3 alkylation *via* the cooperative binding.<sup>65,66</sup> Our results suggest that these complexes would gain a new binding specificity enabling connections in CG-rich regions, which wouldn't be possible by netropsin alone.

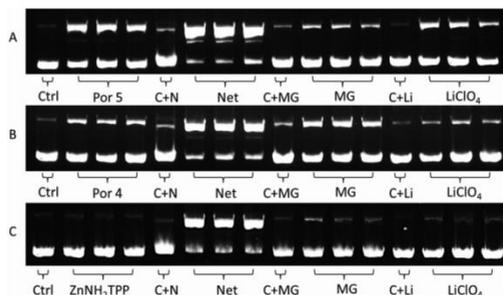


Fig. 10 Effect of DNA groove binders and ionic strength in the DNA cleavage reaction. Control (Ctrl or C). Porphyrins: (A) Zn(n)-porphyrin 5 (Por 5), (B) free-base porphyrin 4 (Por 4) and (C) ZnNH<sub>2</sub>TPP. Controls for Netropsin (NET or N), methyl green (MG) and LiClO<sub>4</sub> (LI) reactions: C + N, C + MG and C + Li. Standard reactions carried out in the presence of groove binders or salt. Standard reactions: ~25  $\mu$ M plasmid DNA, 10 mM tris-HCl pH 7.4, 25% CH<sub>3</sub>CN (from porphyrin stock solution) and a final concentration of 250  $\mu$ M for each compound. Addition of groove binders: netropsin and methyl green in a final concentration of 50  $\mu$ M. Influence of ionic strength: addition of LiClO<sub>4</sub> at a final concentration of 100 mM. All samples were incubated for 90 minutes at 37 °C under visible light. All the reactions were done in triplicate.

## Photochemical &amp; Photobiological Sciences

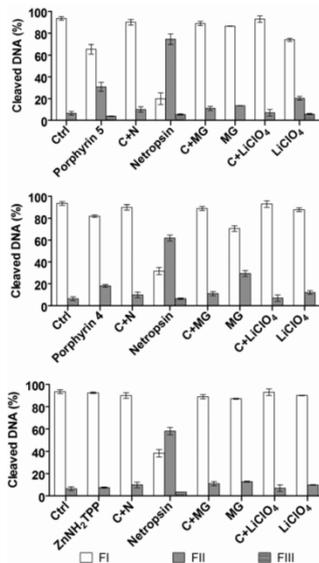


Fig. 11 Effect of DNA groove binders and ionic strength for DNA cleavage (%) by the complexes. Standard reactions carried out in the presence of groove binders or salt. Control (Ctrl or C). Porphyrins: (A) porphyrin 5, (B) porphyrin 4 and (C) ZnNH<sub>2</sub>TPP. Controls for netropsin (N), methyl green (MG) and LiClO<sub>4</sub> reactions: C + N, C + MG and C + LiClO<sub>4</sub>. Standard reactions: ~25 μM plasmid DNA, 10 mM tris-HCl pH 7.4, 25% CH<sub>3</sub>CN (from porphyrin stock solution) and a final concentration of 250 μM for each compound. Addition of groove binders: netropsin and methyl green in a final concentration of 50 μM. Influence of ionic strength: addition of LiClO<sub>4</sub> to a final concentration of 100 mM. All samples were incubated for 90 minutes at 37 °C under visible light. DNA forms were calculated based on the bands intensities of each lane. Data represent mean and SD.

To evaluate the influence of ionic strength on the DNA-complex interaction, LiClO<sub>4</sub> was added in the standard reactions to neutralize negative charges of DNA as previously described.<sup>66</sup> In this work the ionic strength does not seem to influence the DNA-complex interactions, except for the moderate inhibition of FII formation (from 31% to 20%) in Zn(n)-porphyrin 5 samples (Fig. 10 and 11).

#### Mechanism of DNA cleavage (ROS scavengers)

Reactive oxygen species (ROS) can be generated from a sequential reduction of molecular oxygen and are often involved in

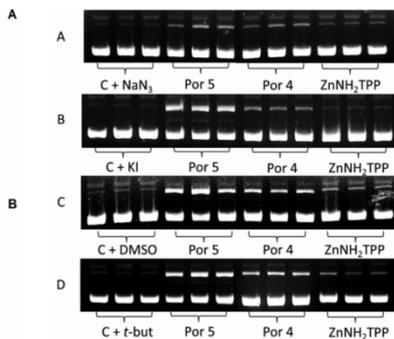
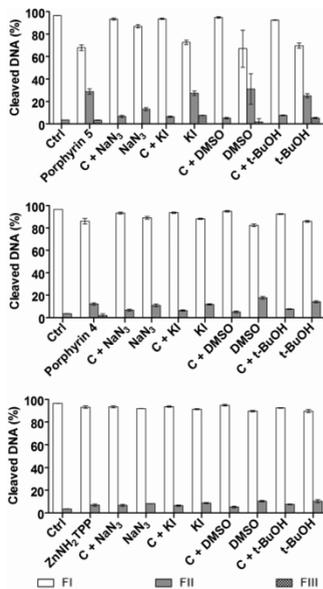


Fig. 12 Electrophoresis gels for standard reactions carried out in the presence of ROS scavengers. Porphyrins: porphyrin 5 (Por 5), porphyrin 4 (Por 4) and ZnNH<sub>2</sub>TPP. Controls (C) for Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, KI, DMSO and t-BuOH: C + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, C + KI, C + DMSO and C + t-BuOH (t-but). Standard reactions: ~25 μM plasmid DNA, 10 mM tris-HCl pH 7.4, 25% CH<sub>3</sub>CN (from porphyrin stock solution) and a final concentration of 250 μM for each derivative. Addition of ROS scavengers: (A) Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (8 mM), (B) KI (8 mM), (C) DMSO (0.8 mM) and (D) t-BuOH (0.8 mM). All samples were incubated for 90 minutes at 37 °C under visible light. All the reactions were done in triplicate.

DNA damage *via* an oxidative mechanism.<sup>67</sup> To attest if ROS are involved in the DNA-cleavage promoted by the complexes, standard reactions were performed in the presence of ROS scavengers. In general, the insensitivity to ROS scavengers is an indication of a hydrolytic reaction occurring.<sup>61</sup> As demonstrated in Fig. 12 and 13 DNA cleavage by porphyrin 4 and ZnNH<sub>2</sub>TPP is not dependent on ROS, and we can thus propose a non-oxidative pathway,<sup>44,68,69</sup> whereas there was an isolated FII inhibition by the oxygen singlet scavenger Na<sub>2</sub>S in porphyrin 5 samples showing that Na<sub>2</sub>S has an important role in the production of the active species responsible for DNA cleavage by this complex.<sup>70-72</sup>

We observed that the addition of Zn to the porphyrin macrocycle increases the activity in relation to free-base porphyrin on DNA photocleavage studies. The DNA charge neutralization promoted by ionic strength assays decreases porphyrin 5 activity suggesting that the electrostatic interactions between porphyrin 5 and the negative charge of DNA phosphate groups facilitate the interaction of both structures being a fundamental factor to DNA hydrolysis. The other compounds were not affected by this phenomenon assuming that the positive charge of the metal ion cooperates with the interaction with the negative charge of the phosphate groups, as discussed in our spectroscopy studies.<sup>73</sup>



**Fig. 13** Influence of ROS scavengers in DNA-cleavage by porphyrins. Standard reactions carried out in the presence of ROS scavengers. Porphyrin derivatives: (A) porphyrin 4, (B) porphyrin 4 and (C) ZnNH<sub>2</sub>TPP. Control (Ctrl). Controls (C) for Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, KI, DMSO and t-BuOH. C + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>, C + KI, C + DMSO and C + t-BuOH (t-but). Standard reactions: ~25 μM plasmid DNA, 10 mM tris-HCl pH 7.4, 25% CH<sub>2</sub>CN (from porphyrin stock solution) and a final concentration of 250 μM for each compound. Addition of ROS scavengers: Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> (8 mM), KI (8 mM), DMSO (0.8 mM) and t-BuOH (0.8 mM). All samples were incubated for 90 minutes at 37 °C under visible light. DNA forms were calculated based on the band intensities of each lane. Data represent mean and SD.

Moreover, porphyrin 5 shows a decrease of DNA cleavage in the presence of the <sup>1</sup>O<sub>2</sub> scavenger (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) while the other porphyrins were not affected. These results suggest that singlet oxygen may be the key for the cleavage mechanism.<sup>74</sup> However, it is difficult to speculate on how this derivative coordinates to the DNA phosphodiester backbone since the mechanism is still not fully elucidated. As a consequence of the porphyrin 5 ability to generate singlet oxygen under visible light, this compound seems a promising photosensitizer for photodynamic therapy.<sup>75</sup>

## A Experimental

### Materials

The (3-[[4,7-diisopropyl-1,4,7-triazacyclonon-1-yl]methyl]-2-hydroxy-5-methylbenz-aldehyde), labeled Cmf-f-TAGN, was synthesized according to the literature.<sup>16</sup> Agarose was obtained from Invitrogen™. Bluescript SK II Plasmid DNA (pBSK II) (2961 bp) was purchased from Stratagene (USA), HiSpeed Plasmid Purification Kit was purchased from QIAGEN, and Acetonitrile HPLC grade was purchased from TediaBrasil. Calf thymus DNA (ct-DNA) (8–15 kb), netropsin, tris-HCl and water molecular biology reagent were purchased from Sigma-Aldrich®. All other reagents used in this research were of analytical grade.

### Physical measurements

Elemental CHN% analyses were obtained using a Perkin-Elmer CHN% 2400e equipment (USP – São Paulo). Compounds were analyzed using a mass spectrometer with electrospray ionization (ESI-MS) in the positive mode using an Amazon X Ion Trap (Bruker Daltonics, Billerica, MA). Mass spectra were recorded with the methanolic solutions of around 500 ppb concentration with a flow of 180 μL min<sup>-1</sup> and capillary of 3000 V. High resolution ESI-MS (HRMS-ESI) was performed on a microTOF QII mass spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA). <sup>1</sup>H and COSY 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NMR spectra were recorded on a Varian AS-400 spectrometer at 400.13 (<sup>1</sup>H). CDCl<sub>3</sub> was used as the solvent and TMS as the internal reference. The chemical shifts are expressed in δ (ppm) and the coupling constants (*J*) in Hz. Unequivocal <sup>1</sup>H assignments were made with the aid of COSY 2D (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H). Infrared analyses (FT-IR) were performed on a Perkin Elmer FTIR 100 spectrophotometer, in the region 4000–400 cm<sup>-1</sup>, using KBr pellets (spectroscopy grade). Absorption, emission and excitation spectra were recorded using PerkinElmer Lambda 750 and Cary Eclipse Varian (excitation wavelengths at λ<sub>excitation</sub> = 420 nm and λ<sub>emission</sub> = 720 nm, slit 2.0 nm, emission range 500–800 nm and excitation range 300–650 nm), respectively. Cyclic voltammograms of the porphyrins were recorded with a BAS potentiostat-galvanostat system, model Epsilon, at room temperature under an Ar atmosphere, in dry dichloromethane solution. Electrochemical grade tetrabutylammonium hexafluorophosphate (TBAPF<sub>6</sub>) was used as the supporting electrolyte. A standard three-electrode system was employed to carry out these experiments: a glassy carbon working electrode; a platinum wire auxiliary electrode and a platinum wire pseudo-reference electrode. To monitor the reference electrode, a ferrocenium/ferrocene redox couple was used as an internal reference (*E*<sub>1/2</sub> = 0.4 V vs. NHE).<sup>17</sup>

### Biomolecule binding assays

Porphyrin interactions with ct-DNA were performed by taking spectral measurements at room temperature in tris-HCl buffer solution at pH 7.4 and 25% of CH<sub>2</sub>CN. The DNA base pair concentrations of low molecular weight DNA from calf thymus (ct-DNA) were determined by spectroscopy, using the molar

extinction coefficient  $13.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (per base pair) at  $\lambda_{\text{max}} = 260 \text{ nm}$ . Stock solutions of each porphyrin were prepared in acetonitrile. The standard DNA cleavage reactions were carried out with  $330 \text{ ng}$  per well ( $\sim 25 \text{ }\mu\text{M}$  bp) of supercoiled plasmid in  $10 \text{ mM}$  tris-HCl buffer pH 7.4 and 25% acetonitrile (v/v) (from porphyrin stock solution). The final concentrations of complexes used in all experiments were fixed at their maximal solubility in acetonitrile:  $35 \text{ }\mu\text{M}$  for TPP, and  $250 \text{ }\mu\text{M}$  for  $\text{ZnNH}_2\text{TPP}$ , porphyrin 4 and porphyrin 5. Controls were run under the same conditions with 25% acetonitrile (v/v) lacking compounds. Porphyrins in  $\text{CH}_3\text{CN}$ -tris-HCl buffer solutions (25%:75%, v : v) were titrated with increasing concentrations of ct-DNA (in tris-HCl buffer solution, ranging from 0 to  $20 \text{ }\mu\text{M}$ ). The absorption spectra of porphyrins were acquired in the wavelength range of 300–800 nm. The intrinsic binding constants ( $K_b$ ) of porphyrins 4 and 5 were calculated according to the decay of the absorption Soret band using the following eqn (1),<sup>38,39,55</sup> through a plot of  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{DNA}]$ ,

$$[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [\text{DNA}]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f) \quad (1)$$

where  $[\text{DNA}]$  is the concentration of DNA in the base pairs,  $\epsilon_a$  is the extinction coefficient  $[\text{A}_{\text{obs}}/[\text{porphyrin}]]$ ,  $\epsilon_b$ ,  $\epsilon_f$  and  $\epsilon_r$  are the extinction coefficients of free and fully bound forms, respectively. In the plots of  $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f)$  versus  $[\text{DNA}]$ ,  $K_b$  is given by the ratio of the slope to the interception (see the ESI†).

The emission spectra of the interaction of the porphyrin derivatives with ct-DNA were acquired in the wavelength range of 500–800 nm upon excitation at 420 nm, in  $\text{CH}_3\text{CN}$ -tris-HCl buffer solution at pH 7.4 (see the ESI†).

### <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generation and photostability assays

For the determination of singlet oxygen production, solutions containing DPA<sup>40</sup> ( $50 \text{ }\mu\text{M}$ ) with or without porphyrin derivatives at  $0.5 \text{ }\mu\text{M}$  were prepared in DMF solution in a  $1 \times 1 \text{ cm}$  quartz cuvette. The solutions were irradiated at room temperature and under gentle magnetic stirring, with a LED array system emitting red light ( $\lambda > 580 \text{ nm}$ ) at a fluence rate of  $26 \text{ mW cm}^{-2}$ . Measuring the decrease in absorbance at  $378 \text{ nm}$  at pre-established irradiation intervals monitored the breakdown of DPA. The photostability of the porphyrin derivatives ( $2 \text{ }\mu\text{M}$ ) was determined by measuring the absorbance at 410–430 nm range (TPP,  $\text{ZnNH}_2\text{TPP}$ , 4 and 5) before and after visible light irradiation (400–800 nm) at a fluence rate of  $30 \text{ mW cm}^{-2}$ .

### Photocleavage of plasmid DNA

**DNA cleavage analysis.** The pBSK II plasmid DNA was transformed into DH5 $\alpha$  competent cells, replicated and purified according to the QIAGEN HiSpeed Plasmid Purification Kit protocol. Plasmid concentrations in terms of base pair per L were determined spectrophotometrically by employing an extinction coefficient of  $13.200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  at 260 nm. The standard DNA cleavage reactions were carried out with  $330 \text{ ng}$  per well ( $\sim 25 \text{ }\mu\text{M}$  bp) of supercoiled plasmid in  $10 \text{ mM}$  tris-HCl buffer pH 7.4 and 25% acetonitrile. The final concentrations

of the complexes used in all experiments were fixed at their maximal solubility in acetonitrile:  $35 \text{ }\mu\text{M}$  for TPP, and  $250 \text{ }\mu\text{M}$  for  $\text{ZnNH}_2\text{TPP}$ , porphyrin 4 and porphyrin 5. Controls were run without compounds. The reaction mixture was incubated at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for 24 h in the absence of light or 90 minutes in the presence of a 100 W incandescent tungsten lamp and then quenched with a loading buffer – LB (bromophenol blue, glycerol 50% and 0.5 M EDTA). All the experiments were performed at least in triplicate.

**Electrophoresis.** Samples were run on horizontal agarose gels (1% agarose) containing ethidium bromide (EB,  $0.3 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ) in  $0.5 \times \text{TBE}$  buffer for 100 min at 90 V. The gels were visualized under UV light (KODAK Gel Logic 200 Imaging System) and the densitometric analysis was performed with Kodak 1D 3.6 Gel Logic software.

**DNA cleavage quantitation.** Supercoiled (FI), nicked (FII) and linear (FIII) DNA forms were calculated based on the band intensities of each lane obtained by densitometric analysis. The supercoiled intensity bands were corrected by a factor of  $1.47^{41,42}$  due to its different EB-DNA binding affinity compared to the form II and III.<sup>43</sup>

**Influence of groove binders, and ionic strength on DNA cleavage.** DNA groove binding preference of the porphyrins was performed by adding netropsin or methyl green ( $50 \text{ }\mu\text{M}$  final concentration), minor and major groove binders, respectively, to the standard reaction mixture. The mixtures were previously incubated for 30 minutes at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in the dark. The influence of the ionic strength of the reaction medium in compound activity was observed by adding  $\text{LiClO}_4$  ( $100.0 \text{ mM}$  final concentration) to the standard mixture and then incubated for 30 minutes before the addition of complexes. After the previous incubations all samples – with groove binders or salt – were maintained at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for 90 minutes under visible light (100 W), quenched with LB and electrophoresed in agarose gels. All the experiments were performed at least in triplicate.

**DNA cleavage mechanism pathway.** To verify the influence of reactive oxygen species (ROS) in the complex–DNA cleavage mechanism, reactions were carried out in the presence of scavengers for superoxide (KI;  $8 \text{ mM}$ ), hydroxyl radicals (DMSO and *t*-BuOH;  $0.8 \text{ mM}$ ) and singlet oxygen ( $\text{NaN}_3$ ;  $8 \text{ mM}$ ).<sup>44</sup> Reactions were incubated at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  for 90 minutes under visible light, quenched with LB and electrophoresed in agarose gels. All the experiments were performed at least in triplicate.

## Conclusions

In summary, we have synthesized and fully characterized the new mono-substituted free-base and its respective zinc(II) complex porphyrins, containing the peripheral triazacyclononyl moiety. The insertion of the Zn(II) ion into the macrocycle resulted an increased activity against other porphyrins reported in this work, which can be attributed to the DNA phosphate group interaction in Zn(II) axial position. These novel substituted-porphyrin derivatives show interesting interactions with biomolecules such as calf thymus DNA and

plasmid DNA and can be considered potential and promising candidates as bio-supramolecular compounds for DNA-interaction applications.

## Acknowledgements

This work was supported with funds from CNPq and CAPES (Brazilian agencies). Brazilian Research Councils: INCT-CNPq/BJT 301451/2014-1; CNPq (472956/2013-2) and CAPES (STINT Proc 009/2013). We thank CEBIME for HRMS-ESI mass analysis.

## References

- (a) S. Fukuzumi, Development of bioinspired artificial photosynthetic systems, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2008, **10**, 2283–2297; (b) L.-L. Li and E. W.-G. Diau, Porphyrin-sensitized solar cells, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 291–304.
- T. S. Balaban, Tailoring Porphyrins and Chlorins for Self-Assembly in Biomimetic Artificial Antenna Systems, *Acc. Chem. Res.*, 2005, **38**, 612–623.
- M. Jurow, A. E. Schuckman, J. D. Batteas and C. M. Drain, Porphyrins as molecular electronic components of functional devices, *Coord. Chem. Rev.*, 2010, **254**, 2297–2310.
- For catalysis see: (a) H. Shinokubo and A. Osuka, Marriage of porphyrin chemistry with metal-catalysed reactions, *Chem. Commun.*, 2009, 1011–1021; (b) S. Nakagaki, G. K. B. Ferreira, A. L. Marçal and K. J. Ciuffi, Metalloporphyrins Immobilized on Silica and Modified Silica as Catalysts in Heterogeneous Processes, *Curr. Org. Synth.*, 2014, **11**, 67–88; (c) M. J. F. Calvete, M. Silva, M. M. Pereira and H. D. Burrows, Inorganic helping organic: recent advances in catalytic heterogeneous oxidations by immobilised tetrapyrrolic macrocycles in micro and mesoporous supports, *RSC Adv.*, 2013, **3**, 22774–22789.
- (a) M. J. F. Calvete, A. V. C. Simões, C. A. Henriques, S. M. A. Pinto and M. M. Pereira, Tetrapyrrolic Macrocycles: Potentialities in Medical Imaging Technologies, *Curr. Org. Synth.*, 2014, **11**, 127–140; (b) P. Skupin-Mrugalska, J. Piskorz, T. Goslinski, J. Mielcarek, K. Konopka and N. Düzgünes, Current status of liposomal porphyrinoid photosensitizers, *Drug Discovery Today*, 2013, **18**, 776–784.
- P. A. Waghorn, Radiolabelled porphyrins in nuclear medicine, *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 2014, **57**, 304–309.
- (a) F. Giuntini, R. Boyle, M. Sibrían-Vázquez and M. G. H. Vicente, Porphyrin Conjugates for Cancer Therapy, in *The Handbook of Porphyrin Science*, ed. G. Ferreira, World Scientific Publishers, Singapore, 2013, 27, 303–416; (b) A. M. Rkein and D. M. Ozog, Photodynamic Therapy, *Dermatol. Clin.*, 2014, **32**, 415–425.
- J. N. Silva, P. Filipe, P. Morlière, J.-C. Mazière, J. P. Freitas, M. M. Gomes and R. Santos, Photodynamic therapy: Dermatology and ophthalmology as main fields of current applications in clinic, *Bio-Med. Mater. Eng.*, 2008, **18**, 319–327.
- J. N. Silva, A. Galmiche, J. P. C. Tomé, A. Boullier, M. G. P. M. S. Neves, E. M. P. Silva, J.-C. Capod, J. A. S. Cavaleiro, R. Santos, J.-C. Mazière, P. Filipe and P. Morlière, Chain-dependent photocytotoxicity of tricationic porphyrin conjugates and related mechanisms of cell death in proliferating human skin keratinocytes, *Biochem. Pharmacol.*, 2010, **80**, 1373–1385.
- J.-X. Zhang, J.-W. Zhou, C.-F. Chan, T. C.-K. Lau, D. W. J. Kwong, H.-L. Tam, N.-K. Mak, K.-L. Wong and W.-K. Wong, Comparative Studies of the Cellular Uptake, Subcellular Localization, and Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Properties of Ruthenium(II)-Porphyrin Conjugates with Different Linkers, *Bioconjugate Chem.*, 2012, **23**, 1623–1638.
- B. P. P. McCormick, M. F. Pansa, L. N. M. Sanabria, C. M. B. Carvalho, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro, N. B. R. Vittar and V. A. Rivarola, Cationic porphyrin derivatives for application in photodynamic therapy of cancer, *Laser Phys.*, 2014, **24**, 045603.
- F. Figueira, P. M. R. Pereira, S. Silva, J. A. S. Cavaleiro and J. P. C. Tomé, Porphyrins and phthalocyanines decorated with dendrimers: Synthesis and biomedical applications, *Curr. Org. Synth.*, 2014, **11**, 110–126.
- M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi and R. K. Pandey, The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 340–362.
- V. Sol, J. C. Blais, V. Carré, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro and P. J. Krausz, Synthesis, Spectroscopy, and Photocytotoxicity of Glycosylated Amino Acid Porphyrin Derivatives as Promising Molecules for Cancer Phototherapy, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 4431–4444.
- V. V. Serra, A. Zamarrón, M. A. F. Faustino, M. C. I.-D. L. Cruz, A. Blázquez, J. M. M. Rodrigues, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro, A. Juarraz and F. Sanz-Rodríguez, New porphyrin amino acid conjugates: Synthesis and photodynamic effect in human epithelial cells, *Bioorg. Med. Chem.*, 2010, **18**, 6170–6178.
- A. Viola, P. Mannoni, M. Chanon, M. Julliard, G. Mehta, B. G. Maiya, S. Muthusamy and T. J. Sambiah, Phototoxicity of some novel porphyrin hybrids against the human leukemic cell line TF-1, *J. Photochem. Photobiol.*, B, 1997, **40**, 263–273.
- H. Ibrahim, A. Kasselouri, C. You, P. Maillard, V. Rosillo, R. Pansu and P. J. Prognon, Meso-tetraphenyl porphyrin derivatives: The effect of structural modifications on binding to DMPC liposomes and albumin, *J. Photochem. Photobiol.*, A, 2011, **217**, 10–21.
- A. M. G. Silva, P. S. S. Lacerda, A. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves, A. M. S. Silva, J. A. S. Cavaleiro, E. A. Makarova and E. A. Lukanets, Porphyrins in 1,3-Dipolar Cycloaddition Reactions. Synthesis of New Porphyrin–Chlorin and Porphyrin–Tetraazachlorin Dyads, *J. Org. Chem.*, 2006, **71**, 8352–8356.

- 19 (a) R. M. Burger, Cleavage of nucleic acids by bleomycin, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1153–1170; (b) B. Armitage, Photocleavage of Nucleic Acids, *Chem. Rev.*, 1998, **98**, 1171–1200.
- 20 F. Mancini and P. Tecilla, Zinc(II) complexes as hydrolytic catalysts of phosphate diester cleavage: from model substrates to nucleic acids, *New J. Chem.*, 2007, **31**, 800–817.
- 21 C. Liu, M. Wang, T. Zhang and H. Sun, DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes, *Coord. Chem. Rev.*, 2004, **248**, 147–168.
- 22 K. P. Wainwright, Synthetic and structural aspects of the chemistry of saturated polyaza macrocyclic ligands bearing pendant coordinating groups attached to nitrogen, *Coord. Chem. Rev.*, 1997, **166**, 35–90.
- 23 A. Singh, Q. Yao, L. Tong, W. C. Still and D. Sames, Combinatorial approach to the development of fluorescent sensors for nanomolar aqueous copper, *Tetrahedron Lett.*, 2000, **41**, 9601–9605.
- 24 M. Costas, M. P. Mehn, M. P. Jensen and L. Que Jr., Dioxygen Activation at Mononuclear Nonheme Iron Active Sites: Enzymes, Models, and Intermediates, *Chem. Rev.*, 2004, **104**, 939–986.
- 25 See example: (a) J. D. Burstyn and K. A. Deal, Selective catalytic hydrolysis of a simple phosphodiester by a macrocyclic copper(II) complex, *Inorg. Chem.*, 1993, **32**, 3585–3586; (b) E. L. Hegg and J. N. Burstyn, Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry, *Coord. Chem. Rev.*, 1998, **173**, 133–165; (c) N. H. Williams, W. Cheung and J. Chin, Reactivity of Phosphate Diesters Doubly Coordinated to a Dinuclear Cobalt(III) Complex: Dependence of the Reactivity on the Basicity of the Leaving Group, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 8079–8087; (d) P. Rossi, F. Felluga, P. Tecilla, F. Formaggio, M. Crisma, C. Toniolo and P. Scrimin, A bimetallic helical heptapeptide as a transphosphorylation catalyst in water, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, **121**, 6948–6949; (e) E. L. Hegg, S. H. Mortimore, C. Li Cheung, J. E. Huyett, D. R. Powell and J. N. Burstyn, Structure–Reactivity Studies in Copper(II)-Catalyzed Phosphodiester Hydrolysis, *Inorg. Chem.*, 1999, **38**, 2961–2968; (f) B. R. Bodsgard and J. N. Burstyn, Silica-bound copper(II) triazacyclonane: a robust material for the heterogeneous hydrolysis of a phosphodiester, *Chem. Commun.*, 2001, 647–648.
- 26 E. L. Hegg and J. D. Burstyn, Copper(II) Macrocycles Cleave Single-Stranded and Double-Stranded DNA under Both Aerobic and Anaerobic Conditions, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 7474–7481.
- 27 K. M. Deck, T. A. Tseng and J. N. Burstyn, Triisopropyl-triazacyclonane Copper(II): An Efficient Phosphodiester Hydrolysis Catalyst and DNA Cleavage Agent, *Inorg. Chem.*, 2002, **41**, 669–677.
- 28 E. K. Barefield, Coordination chemistry of N-tetraalkylated cyclam ligands—A status report, *Coord. Chem. Rev.*, 2010, **254**, 1607–1627.
- 29 S. Hermann and W. Frank, Complex Formation with Tetraazacycloalkane-N,N',N'',N'''-tetraacetic Acids as a Function of Ring Size, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1976, **15**, 686.
- 30 F. Chaudhuri and K. Wieghardt, The chemistry of 1,4,7-Triazacyclonane and Related Tridentate Macrocyclic Compounds, *Prog. Inorg. Chem.*, 1987, **35**, 329–436.
- 31 C. P. Gros, A. Eggenpiller, A. Nonat, J.-M. Barbe and F. Denat, New potential bimodal imaging contrast agents based on DOTA-like and porphyrin macrocycles, *Med. Chem. Commun.*, 2011, **2**, 119–125.
- 32 A. Eggenpiller, C. Michelin, N. Desbois, P. Richard, J.-M. Barbe, F. Denat, C. Licon, C. Gaiddon, A. Sayeh, F. Choquet and C. P. Gros, Design of Porphyrin-dota-Like Scaffolds as All-in-One Multimodal Heterometallic Complexes for Medical Imaging, *Eur. J. Org. Chem.*, 2013, 6629–6643.
- 33 W.-J. Yi, X.-C. Yu, B. Wang, J. Zhang, Q.-Y. Yu, X.-D. Zhou and X.-Q. Yu, TACN-based oligomers with aromatic backbones for efficient nucleic acid delivery, *Chem. Commun.*, 2014, 6454–6457.
- 34 M. Fang, L. Wei, Z. Lin and G.-Y. Lu, Synthesis and DNA Cleavage Properties of Triazacrown Derivatives, *Chin. J. Chem.*, 2014, **32**, 142–150.
- 35 D. Montagner, V. Gandin, C. Marzano and A. Erxleben, Phosphate Diester Cleavage, DNA Interaction and Cytotoxic Activity of a Bimetallic Bis(1,4,7-triazacyclonane) Zinc Complex, *Eur. J. Inorg. Chem.*, 2014, 4084–4092.
- 36 V. R. de Almeida, F. R. Xavier, R. E. H. M. B. Osório, L. M. Bessa, E. L. Schilling, T. G. Costa, T. Bortolotto, A. Cavaletto, F. A. V. Castro, F. Vilhena, O. C. Alves, H. Terenzi, E. C. A. Eleutherio, M. D. Pereira, W. Haase, Z. Tomkowicz, B. Szpoganicz, A. J. Bortoluzzi and A. Neves, In vitro and in vivo activity of a new unsymmetrical dinuclear copper complex containing a derivative ligand of 1,4,7-triazacyclonane: catalytic promiscuity of [Cu<sub>2</sub>(L)Cl<sub>3</sub>], *Dalton Trans.*, 2013, **42**, 7059–7073.
- 37 R. R. Gagne, C. A. Koval and G. C. Lisensky, Ferrocene as an internal standard for electrochemical measurements, *Inorg. Chem.*, 1980, **19**, 2854–2855.
- 38 J. Kang, H. Wu, X. Lu, Y. Wang and L. Zhou, Study on the interaction of new water-soluble porphyrin with DNA, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2005, **61**, 2041–2047.
- 39 M. Ibrahim, I. S. Shehata and A. A. Al-Nayeli, Voltammetric studies of the interaction of lumazine with cyclodextrins and DNA, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2002, **28**, 217–225.
- 40 P. Kluson, M. Drobek, A. Kalaji, S. Zarubova, J. Krysa and J. Rakusan, Singlet oxygen photogeneration efficiencies of a series of phthalocyanines in well-defined spectral regions, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2008, **199**, 267–273.
- 41 A. Sreedhara, J. D. Freed and J. A. Cowan, Efficient Inorganic Deoxyribonucleases. Greater than 50-Million-Fold Rate Enhancement in Enzyme-Like DNA Cleavage, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 8814–8824.
- 42 J. Yan, A. M. Lewis, N. H. Gokhale, E. C. Long and J. A. Cowan, 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, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 8353–8361.
- 43 M. F. Shubda, J. Goodisman and J. C. Dabrowski, Quantitation of ethidium-stained closed circular DNA in agarose gels, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1997, **34**, 73–79.
- 44 W. Xu, X. Yang, L. Yang, Z. Jia, L. Wei, F. Liu and G. Lu, Synthesis and DNA cleavage activity of triazacrown-anthraquinone conjugates, *New J. Chem.*, 2010, **34**, 2654–2661.
- 45 S. Sharma and N. Nath, Synthesis of meso-substituted dihydro-1,3-oxazinoporphyryns, *Beilstein J. Org. Chem.*, 2013, **9**, 496–502.
- 46 D. J. Walaszek, K. Maximova, K. Rybicka-Jasińska, A. Lipke and D. Gryko, Synthesis of chiral porphyrins and their use in photochemical oxidation of carbonyl compounds, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2014, **18**, 493–505.
- 47 M. C. Gomes, S. Silva, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro, A. Almeida, A. Cunha and J. P. C. Tomé, Cationic galactoporphyrin photosensitizers against UV-B resistant bacteria: oxidation of lipids and proteins by 102, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2013, **12**, 262–271.
- 48 J. M. Zaleski, C. K. Chang, G. E. Leroi, R. I. Cukier and D. G. Nocera, Role of solvent dynamics in the charge recombination of a donor/acceptor pair, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 3564–3565.
- 49 B. A. Iglesias, M. Höfner, H. E. Toma and K. Araki, 5-[1-(4-phenyl)-3-(4-nitrophenyl)triazene]-10,15,20-triphenylporphyrin: a new triazene-porphyrin dye and its spectroelectrochemical properties, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2012, **16**, 200–209.
- 50 D. A. Al-Mutairi, J. D. Craik, I. Batinic-Haberle and L. T. Benov, Induction of oxidative cell damage by phototreatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin, *Free Radical Res.*, 2007, **41**, 89–96.
- 51 M. G. Alvarez, C. Prucca, M. E. Milanese, E. N. Durantini and V. Rivarola, Photodynamic activity of a new sensitizer derived from porphyrin-C<sub>60</sub> dyad and its biological consequences in a human carcinoma cell line, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2006, **38**, 2092–2101.
- 52 D. Samaroo, E. Perez, A. Aggarwal, A. Wills and N. O'Connor, Strategies for delivering porphyrinoid-based photosensitizers in therapeutic applications, *Ther. Delivery*, 2014, **5**, 859–872.
- 53 E. Barragán, B. Gordillo, G. Vargas and L. Velasco, The role of cobalt, copper, nickel, and zinc in the DNA replication inhibitory activity of p-aminophenyl triphenylporphyrin, *Appl. Organomet. Chem.*, 2004, **18**, 311–317.
- 54 T. Murashima, K. Hayata, Y. Saiki, J. Matsui, D. Miyoshi, T. Yamada, T. Miyazawa and N. Sugimoto, Synthesis, structure and thermal stability of fully hydrophobic porphyrin-DNA conjugates, *Tetrahedron Lett.*, 2007, **48**, 8514–8517.
- 55 (a) A. Wolfe, G. H. Shimer Jr. and T. Meehan, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Physically Intercalate into Duplex Regions of Denatured DNA, *Biochemistry*, 1987, **26**, 6392–6396; (b) J. E. N. Dolatabadi, Molecular aspects on the interaction of quercetin and its metal complexes with DNA, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2011, **48**, 227–233; (c) H. Chao, W.-J. Mei, Q.-W. Huang and L.-N. Ji, DNA binding studies of ruthenium(II) complexes containing asymmetric tridentate ligands, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **92**, 165–170.
- 56 K. Araki, C. A. Silva, H. E. Toma, L. H. Catalani, M. H. G. Medeiros and P. Di Mascio, Zinc tetraethenated porphyrin binding and photoinduced oxidation of calf-thymus DNA, *J. Inorg. Biochem.*, 2000, **78**, 269–273.
- 57 P. Kubát, K. Lang, V. Král and F. P. Schmidtchen, Photochemical properties of two novel tetraphenylporphyrins substituted by guanidiniocarbonyl and monocyclic guanidine groups, *Int. J. Photoenergy*, 2001, **3**, 147–151.
- 58 R. J. Fiel, J. C. Howard and N. D. Gupta, Interaction of DNA with a porphyrin ligand: evidence for intercalation, *Nucleic Acids Res.*, 1979, **6**, 3093–3118.
- 59 M. C. Gomes, S. M. Woronowicz-Barreira, M. A. F. Faustino, R. Fernandes, M. G. P. M. S. Neves, A. C. Tomé, N. C. M. Gomes, A. Almeida, J. A. S. Cavaleiro, A. Cunha and J. P. C. Tomé, Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, **10**, 1735–1743.
- 60 P. Zhao, J.-Z. Lu, J. He, W.-H. Chen, P.-P. Chen, D.-W. Chen and Q.-Y. Bin, Synthesis, DNA-Binding, and Photocleavage Properties of a Serious of Porphyrin-Daunomycin Hybrids, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, 2014, **33**, 597–614.
- 61 (a) S. Silva, P. M. R. Pereira, P. Silva, F. A. A. Paz, M. A. F. Faustino, J. A. S. Cavaleiro and J. P. C. Tomé, Porphyrin and phthalocyanine glycoendritic conjugates: synthesis, photophysical and photochemical properties, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 3608–3610; (b) D. Kumar, B. A. Mishra, K. P. C. Shekar, A. Kumar, K. Akamatsu, R. Kurihara and T. Ito, Novel porphyrin-psoralen conjugates: synthesis, DNA interaction and cytotoxicity studies, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 6675–6679.
- 62 Y. Montagner, V. Gandin, C. Marzano and A. Erleben, DNA damage and induction of apoptosis in pancreatic cancer cells by a new dinuclear bis(triazacyclonane) copper complex, *J. Inorg. Biochem.*, 2015, **145**, 101–107.
- 63 S. K. Kim and B. Norbén, Methyl green - A DNA major-groove binding drug, *FEBS Lett.*, 1993, **315**, 61–64.
- 64 M. W. Van Dyke, R. P. Hertzberg and P. B. Dervan, Map of distamycin, netropsin, and actinomycin binding sites on heterogeneous DNA: DNA cleavage-inhibition patterns with methidiumpropyl-EDTA.Fe(II), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1982, **79**, 5470–5474.
- 65 Y. Hiraku, S. Oikawa and S. Kawanishi, Distamycin A, a minor groove binder, changes enediyne-induced DNA cleavage sites and enhances apoptosis, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, 2002, **2**, 95–96.
- 66 (a) H. Sugiyama, C. Lian, M. Isomura, I. Saito and A. H.-J. Wang, Distamycin A modulates the sequence specificity of DNA alkylation by duocarmycin A, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 14405–14410; (b) Y. Sugiura, T. Shiraki, M. Konishi and T. Oki, DNA intercalation and

- cleavage of an antitumor antibiotic dynemicin that contains anthracycline and enediyne cores, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1990, **87**, 3831–3835; (c) K. Yamamoto, H. Sugiyama and S. Kawanishi, Concerted DNA recognition and novel site-specific alkylation by duocarmycin A with distamycin A, *Biochemistry*, 1993, **32**, 1059–1066; (d) R. Kuroda and H. Tanaka, DNA–porphyrin interactions probed by induced CD spectroscopy, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 1575–1576.
- 67 (a) S. Kawanishi and Y. Hiraku, Amplification of Anticancer Drug-Induced DNA Damage and Apoptosis by DNA-Binding Compounds, *Curr. Med. Chem.: Anti-Cancer Agents*, 2004, **4**, 415–419; (b) W. F. Donahue, B. M. Turczyk and K. A. Jarrell, Group II Introns: Catalysis for Splicing, Genomic Change and Evolution, *Nucleic Acids Res.*, 2002, **30**, 95–96; (c) S. Kawanishi, S. Oikawa, M. Kawanishi, H. Sugiyama, I. Saito, L. Strekowski and W. D. Wilson, Amplification of Pepleomycin-Mediated DNA Cleavage and Apoptosis by Unfused Aromatic Cations, *Biochemistry*, 2000, **39**, 13210–13215.
- 68 T. P. Camargo, F. F. Maia, C. Chaves, B. de Souza, A. J. Bortoluzzi, N. Castilho, T. Bortolotto, H. Terenzi, E. E. Castellano, W. Haase, Z. Tomkowicz, R. A. Peralta and A. Neves, Synthesis, characterization, hydrolase and catecholase activity of a dinuclear iron(III) complex: Catalytic promiscuity, *J. Inorg. Biochem.*, 2015, **146**, 77–88.
- 69 Q. Jiang, N. Xiao, P. Shi, Y. Zhu and Z. Guo, Design of artificial metallo-nucleases with oxidative mechanism, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, **251**, 1951–1972.
- 70 S. Oikama, M. Kurasaki, Y. Kojima and S. Kawanishi, Oxidative and Nonoxidative Mechanisms of Site-Specific DNA Cleavage Induced by Copper-Containing Metallothioneins, *Biochemistry*, 1995, **34**, 8763–8770.
- 71 S.-H. Wan, F. Liang, X.-Q. Xiong, L. Yang, X.-J. Wu, P. Wang, X. Zhou and C.-T. Wu, DNA hydrolysis promoted by 1,7-dimethyl-1,4,7,10-tetraazacyclododecane, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 2804–2806.
- 72 F. Mancin, P. Scrimin and P. Tecilla, Artificial metallo-nucleases, *Chem. Commun.*, 2005, 2540–2548.
- 73 N. Raman, R. Jeyamurugan, A. Sakthivel and L. Mitu, Novel metal-based pharmacologically dynamic agents of transition metal(II) complexes: Designing, synthesis, structural elucidation, DNA binding and photo-induced DNA cleavage activity, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2010, **75**, 88–97.
- 74 (a) J. Lu, W. Pan, R. He, S. Jin, X. Liao, B. Wu, P. Zhao and H. Guo, DNA-binding and photocleavage studies of metallofluorescein–porphyrin complexes of zinc(II) and copper (II), *Transition Met. Chem.*, 2012, **37**, 497–503; (b) B. de Souza, A. J. Bortoluzzi, T. Bortolotto, F. L. Fischer, H. Terenzi, D. E. C. Ferreira, W. R. Rocha and A. Neves, DNA photonuclease activity of four new copper(II) complexes under UV and red light: theoretical/experimental correlations with active species generation, *Dalton Trans.*, 2010, **39**, 2027–2035.
- 75 (a) K. Wang, Q. Jin, X. Zhang and S.-H. Song, Synthesis, DNA Photocleavage and Singlet Oxygen Measurement of Cationic Bisporphyrins, *J. Korean Chem. Soc.*, 2013, **57**, 246–251; (b) P. Sweigert, Z. Xu, Y. Hong and S. Swavey, Nickel, copper, and zinc centered ruthenium-substituted porphyrins: effect of transition metals on photoinduced DNA cleavage and photoinduced melanoma cell toxicity, *Dalton Trans.*, 2012, **41**, 5201–5208.

## Supplementary Information Section

### **Meso-mono-[4-(1,4,7-triazacyclononyl)]-tri(phenyl)porphyrin and respective zinc(II)-complex: complete characterization and biomolecules binding abilities**

Bruna L. Auras,<sup>a</sup> Vanessa A. Oliveira,<sup>c</sup> Hernán Tereza<sup>f</sup>, Ademir Neves<sup>a</sup> and Bernardo A. Iglesias<sup>\*ab</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

<sup>c</sup>Centro de Biologia Molecular Estrutural, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil.

Corresponding Author e-mail address: B. A. Iglesias ([bernardopq@gmail.com](mailto:bernardopq@gmail.com))

### Contents

<b>1. Experimental details</b> .....	2
<b>1.1. Synthesis of free-base porphyrin 4</b> .....	2
<b>1.2. Synthesis of zinc(II)-porphyrin 5</b> .....	3
<b>2. Spectral profile</b> .....	4
<b>2.1. ESI-MS and HRMS-ESI analysis</b> .....	4
<b>2.2. <sup>1</sup>H and 2D COSY NMR spectra</b> .....	7
<b>2.3. FT-IR analysis</b> .....	10
<b>2.4. Electrochemical analysis</b> .....	10
<b>2.5. Spectroelectrochemistry data</b> .....	12
<b>2.6. Photostability assay</b> .....	13
<b>2.7. UV-vis and emission ct-DNA titration data</b> .....	14
<b>2.8. References</b> .....	16



## APÊNDICE B – Artigo publicado referente ao capítulo III

Dalton  
Transactions

PAPER

View Article Online  
View Journal | View IssueCite this: *Dalton Trans.*, 2017, **46**, 1660Photoactive *meso*-tetra(4-pyridyl)porphyrin-tetrakis-[chloro(2,2'-bipyridine)platinum(II) derivatives recognize and cleave DNA upon irradiation†Vanessa A. Oliveira,<sup>a</sup> Bernardo A. Iglesias,<sup>b</sup> Bruna L. Auras,<sup>c</sup> Ademir Neves<sup>c</sup> and Hernán Terenzi\*<sup>a</sup>Received 7th December 2016,  
Accepted 25th December 2016

DOI: 10.1039/c6dt04634g

rsc.li/dalton

In this work, we evaluate the interaction of the peripheral Pt(bpy)Cl<sup>+</sup> substituted porphyrins, H<sub>2</sub>PtPor and ZnPtPor with DNA using UV-vis, emission fluorescence, CD spectroscopy, and DNA melting properties altered by the Pt(II)-porphyrinoid compounds. Additionally, we observe the ability of these porphyrin derivatives to generate <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and to efficiently photocleave plasmid DNA upon visible light irradiation based on a mixed (oxidative/hydrolytic) mechanism.

## Introduction

The interaction of DNA with small molecules is the aim of numerous studies in drug design.<sup>1,2</sup> Metal-drug complexes are a very important class of compounds which interact with DNA. There is special interest in transition metal complexes due to their diverse coordination geometries, redox potentials and the ability to interact with DNA *via* covalent or non-covalent interactions.<sup>2</sup> Covalent binding may be irreversible and result in the replacement, inter and intra-strand cross linking or alkylation of nitrogenous bases. The non-covalent binding is a reversible interaction where the molecule interacts with DNA *via* intercalation, electrostatic forces or groove binding, triggering changes in DNA conformation, strand breaks or inhibiting protein-DNA binding/interaction. In non-covalent binding the stability of the DNA-molecule complex depends on the DNA-molecule mode of recognition including electrostatic forces, hydrogen bonds, van der Waals and hydrophobic interactions.<sup>1</sup>

Photodynamic therapy (PDT) is a minimally invasive medical treatment involving light – in most cases a laser – molecular oxygen and a drug as a photosensitizer to induce cell death.<sup>3</sup> The oxidative stress caused by the photosensitizer

photoactivation, especially due to singlet oxygen production, promotes cancer cell death because of irreversible photo-damage caused by free oxygen radical generation.<sup>4,5</sup>

There are several reports of clinical studies using porphyrin-based drugs as photosensitizers for PDT in cancer.<sup>3</sup> Clinical trials using an hematoporphyrin derivative (HpD) began in the 70s and in the late 80s gave rise to Photofrin® as presented today.<sup>3</sup> Photofrin® and some second generation porphyrin-based photosensitizers are already approved for clinical use in addition to well-established cancer treatments.<sup>5</sup>

Porphyrins have been the subject of investigation for their use as photosensitizers in PDT due to their planar aromatic structure, photophysical properties – efficient singlet oxygen generation, high Q-band absorption in the red wavelength, extraordinary affinity for tumor cells, relatively inexpensive starting materials and straight synthesis.<sup>6,7</sup>

Among other transition metals, platinum has been widely used in metal-drug complexes, especially in porphyrin-based compounds. The literature reports that platinum-porphyrin complexes have presented prodigious efficiency as photosensitizers for PDT.<sup>2,8–11</sup>

Metalloporphyrins with a characteristic metal center core have proven to be more efficient in PDT than the free-base species. In melanoma cells the Zn(II) core porphyrin demonstrated to be a more effective photosensitizer than the free-base macrocycle, because of the higher ROS production in these cancer cells.<sup>8</sup> Zinc(II)-porphyrin-Pt(II) C<sup>+</sup>N<sup>+</sup>N acetylides were competent in singlet oxygen production in PDT.<sup>7</sup>

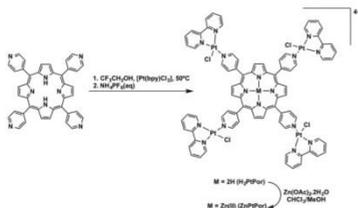
Cationic free-base or cationic metalloporphyrins are of great interest for use as photosensitizers.<sup>12</sup> There is special interest in cationic porphyrins because of their strong electrostatic interactions with the polyanionic DNA backbone.<sup>1,2,6</sup>

<sup>a</sup>Centro de Biologia Molecular Estrutural, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil. E-mail: Hernan.terenzi@ufsc.br

<sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c6dt04634g



**Scheme 1** Synthetic route representation of *meso*-tetra-[(4-pyridyl)porphyrin]tetraplatin(II) porphyrins (**H<sub>2</sub>PtPor** and **ZnPtPor**). The counterion hexafluorophosphate (PF<sub>6</sub><sup>-</sup>) is omitted for clarity.

A good example of this class is the *meso*-tetrakis(*N*-methyl-4-pyridinium)porphyrin (TMpP) used for the selective destruction of tumors due to its ability to produce singlet oxygen.<sup>12</sup> The efficacy of cationic porphyrins as photosensitizers is mainly due to their widespread interaction with negative charges of membranes – plasma membrane, mitochondria, lysosome and endoplasmic reticulum – promoting porphyrin permeation and accumulation into the membrane with ROS generation after photostimulation.<sup>13</sup> Of note, cationic porphyrins inhibit melanoma tumor evolution *in vivo* via light-dependent and independent mechanisms.<sup>14</sup>

In this work, we prepared the peripheral Pt(bpy)Cl<sup>+</sup> substituted porphyrins (**H<sub>2</sub>PtPor** and **ZnPtPor**, Scheme 1) and used UV-Vis, emission fluorescence and CD spectroscopy to measure their interaction with DNA. The thermal melting properties of the resulting Pt(II)-porphyrinoid compounds and the interaction of porphyrin-DNA assemblies were also analyzed. Additionally, we demonstrate the ability of these porphyrin derivatives to generate <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and to photocleave plasmid DNA after visible light irradiation.

## Results and discussion

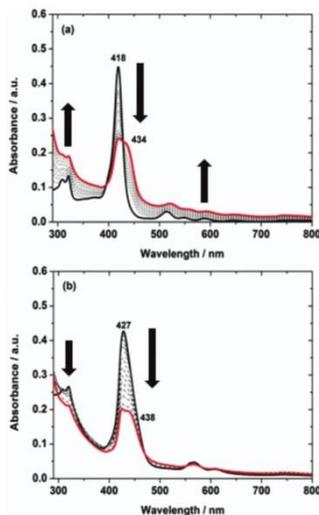
### Design of tetra-platinum(II) porphyrins

Considering the remarkable photophysical and chemical properties of porphyrins and also the excellent binding features of [Pt(bpy)Cl]<sup>+</sup> moieties with biomolecules, we envisaged a simple approach to obtain a tetra-platinated porphyrin and its respective Zn(II)-porphyrin Pt(II)-bipyridine complex (Scheme 1). The tetra-platinum(II) free-base porphyrin **H<sub>2</sub>PtPor** was first described by Toma and co-workers.<sup>11</sup> Metalloporphyrin **ZnPtPor** was easily prepared by mixing the free-base porphyrin **H<sub>2</sub>PtPor** with the corresponding zinc(II) acetate salt in a CHCl<sub>3</sub>/MeOH solvent mixture for one hour at room temperature.<sup>15</sup> The formation of the Zn(II) metalloporphyrin was confirmed by its typical UV-Vis spectrum behavior where the [Pt(bpy)Cl]<sup>+</sup> moiety was followed at 300–330 nm, while the porphyrin Soret-band and the two Q-bands were

detected at 427, 561 and 623 nm, respectively. At the end of the complexation reaction, the mixture was concentrated under vacuum and then precipitated with a saturated aqueous NH<sub>4</sub>PF<sub>6</sub> solution. The solid product was then filtered and washed several times with cold water, followed by recrystallization in cold diethyl ether. The obtained derivative **ZnPtPor** exhibited a dark-purple color and afforded a final yield of above 85%. Zinc(II)-porphyrin **ZnPtPor** was characterized and confirmed by elemental analysis, UV-vis and emission spectroscopy.

### Electronic absorption spectra properties with CT-DNA

Pt(II)-porphyrins were titrated with the increasing amounts of calf thymus DNA (CT-DNA) and the UV-vis spectra were measured (Fig. 1). The precursor **4-TpP** CT-DNA titration experiments are presented in the ESI (Fig. S1†). In the absence of CT-DNA, complexes **H<sub>2</sub>PtPor** and **ZnPtPor** (black solid line) had a higher absorbance at around 415–440 nm while in the presence of CT-DNA we observed a hypochromicity of the Soret-band for these derivatives. This hypochromicity was 5.6 and 6.75 fold higher for **H<sub>2</sub>PtPor** and **ZnPtPor**, respectively, than the corresponding non-cationic precursor **4-TpP** that



**Fig. 1** Electronic absorption spectra of (a) **H<sub>2</sub>PtPor** and (b) **ZnPtPor** (1.0 μM) with increasing CT-DNA concentrations ranging from 0.0 to 10.0 μM in CH<sub>3</sub>CN/Tris-HCl pH 7.4.

lacks the potential for cationic-anionic electrostatic binding with DNA phosphate groups. Therefore, the intensity of hypochromicity follows the decreasing order  $\text{ZnPtPor} > \text{H}_2\text{PtPor} > 4\text{-TPyP}$  (Table 1). The hypochromicity values suggest that these derivatives bind to DNA in a non-classical or secondary interaction mode (H-bonding and/or  $\pi$ - $\pi$  stacking interactions) involving the N-donor or the partial insertion of the pyridyl ring between the adjacent base pairs on DNA as described for poly-aza macrocyclic complexes.<sup>16–18</sup>

Small bathochromic shifts are observed in Pt(II)-complexes and have been described as a weak intercalation to the double stranded oligonucleotide  $\pi$ -system.<sup>11,19</sup>

The intrinsic binding constants ( $K_b$ ) of compounds **4-TPyP**, **H<sub>2</sub>PtPor** and **ZnPtPor** were calculated as summarized in Table 1 and compared to the values given in the literature for *meso*-tetra-[(4-pyridyl)porphyrin]platinum(II) using surface plasmon resonance techniques (SPR)<sup>11</sup>. In the present work, Pt(II) porphyrins in the *para* position ring demonstrated a weaker binding to CT-DNA than the *meta*-substituted Pt(II)-porphyrins proposed by Toma and co-workers<sup>11</sup> following the increasing order of ( $K_b$ ): **4-TPyP** < **H<sub>2</sub>PtPor** < **ZnPtPor**.

The spectral behavior observed in Fig. 1 suggests that a porphyrin-DNA adduct stabilized by cationic-anionic electrostatic interactions between porphyrin and the phosphate groups is located on DNA suggesting a non-intercalative mode for these porphyrin-DNA interactions.<sup>20</sup>

### Circular dichroism assays

Circular dichroism (CD) spectroscopy measures the difference in absorption of left and right circularly polarized light and was performed in this work to determine the potential DNA conformational changes induced by the platinum-porphyrin **H<sub>2</sub>PtPor** and **ZnPtPor**. The DNA-drug interactions may affect the electronic structure and electronic spectral characteristics of the molecules.<sup>21</sup> The addition of increasing amounts of Pt(II)-porphyrins to CT-DNA clearly modifies the CD spectra of B-DNA. In the CD spectra, the helicity characteristic of right-handed B-form DNA is represented by a negative band at 245 nm while base stacking is identified by the positive band at 275 nm (Fig. 2).<sup>22</sup> In these CD experiments the intensities of positive and negative bands decrease significantly, and a slight bathochromic effect (red shift) suggests the interaction

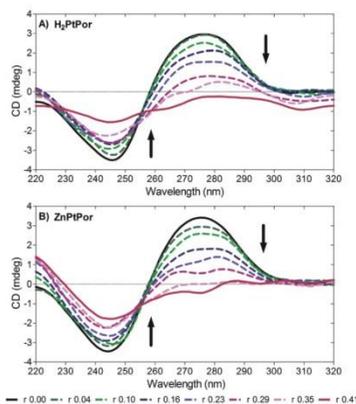


Fig. 2 Circular dichroism spectra of CT-DNA (200.0  $\mu\text{M}$  bp) in Tris-HCl (10.0 mM pH 7.4) and 2.0% (v/v) acetonitrile solution in the presence of increasing amounts of (A) **H<sub>2</sub>PtPor** and (B) **ZnPtPor** porphyrins at the following stoichiometric ratios:  $r = [\text{porphyrin}]/[\text{DNA}] = 0.00, 0.04, 0.10, 0.16, 0.23, 0.29, 0.35$  and  $0.41$ , respectively.

between DNA base pairs and the aromatic rings of the complexes.<sup>22</sup>

Induced circular dichroism (ICD) also occurs upon porphyrin-DNA interactions and may reflect a geometric change in the drug as a chiral twist among the porphyrin chromophores, or a combination between drug and DNA electronic transitions such as conformational changes from B- to Z-DNA or a double to single-strand DNA transition.<sup>21,23</sup> In the present case, an ICD band was observed at 443–420 nm for **H<sub>2</sub>PtPor** and 448–420 nm for **ZnPtPor** samples (Fig. 3). An increase in a positive ICD band is probably related to outside/groove binding (AT binding sites) while a negative one, as shown for **H<sub>2</sub>PtPor**, is characteristic of intercalative binding at GC binding sites.<sup>21,24</sup> Possibly, **H<sub>2</sub>PtPor** approaches the DNA backbone *via* outside binding and also in parallel to the DNA bases axis. The concentration of DNA, porphyrin and acetonitrile in each titration is shown in Table S1.† In the ESI the control titrations are shown (Fig. S2 and S3†).

### Emission spectra with CT-DNA

The effect of the addition of CT-DNA on the Pt(II)-porphyrins was also monitored by fluorescence emission spectroscopy (Fig. 4). Porphyrin solutions were titrated with the increasing concentrations of CT-DNA and the emission spectra were recorded between 600 and 800 nm using an excitation wavelength of 420 nm. The emission band maximum wavelength remained constant but the intensity decreased in the following

Table 1 Spectral data for the interaction of porphyrins **4-TPyP**, **H<sub>2</sub>PtPor** and **ZnPtPor** with DNA

	<b>4-TPyP</b>	<b>H<sub>2</sub>PtPor</b>	<b>ZnPtPor</b>
Hypochromicity ( $H$ , %) <sup>a</sup>	8.0	45.0	54.0
Red shift ( $\Delta\lambda$ , nm) <sup>b</sup>	0.0	16.0	11.0
Quenching ( $Q$ , %) <sup>c</sup>	7.85	53.5	79.8
$K_b$ (M <sup>-1</sup> )	$1.89 \times 10^4$	$1.21 \times 10^5$	$9.76 \times 10^5$
$T_m$ (°C)	—	55.34	54.21

<sup>a</sup>  $H$  (%) =  $(\text{Abs}_{\text{initial}} \text{ Soret-band} - \text{Abs}_{\text{final}} \text{ Soret-band}) / (\text{Abs}_{\text{initial}} \text{ Soret-band}) \times 100$ . <sup>b</sup>  $\Delta\lambda$  (nm) =  $\lambda_{\text{final}} \text{ Soret-band} - \lambda_{\text{initial}} \text{ Soret-band}$ . <sup>c</sup>  $Q$  (%) =  $(\text{Max. initial emission} - \text{Max. final emission}) / (\text{Max. initial emission}) \times 100$ . <sup>d</sup> Binding constant ( $K_b$ ). <sup>e</sup> Melting temperature ( $T_m$ ).

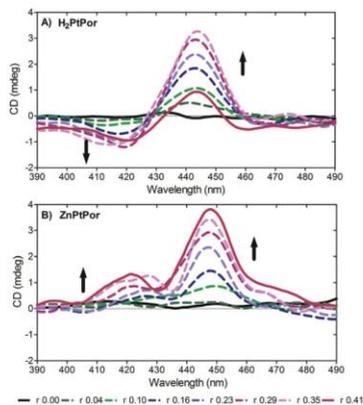


Fig. 3 Induced circular dichroism spectra of CT-DNA (200.0  $\mu\text{M}$  bp) in Tris-HCl (10.0 mM pH 7.4) and 2.0% (v/v) acetonitrile solution in the presence of increasing amounts of (A)  $\text{H}_2\text{PtPor}$  and (B)  $\text{ZnPtPor}$  derivatives at the following stoichiometric ratios:  $r = [\text{porphyrin}]/[\text{DNA}] = 0.00, 0.04, 0.10, 0.16, 0.23, 0.29, 0.35$  and  $0.41$ , respectively.

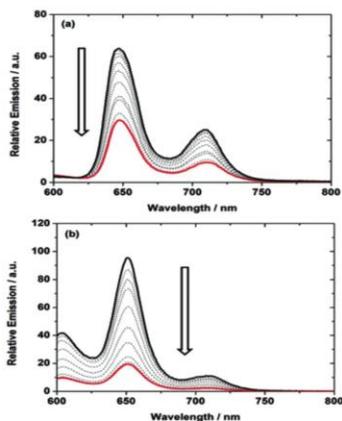


Fig. 4 Emission spectra of (a)  $\text{H}_2\text{PtPor}$  and (b)  $\text{ZnPtPor}$  (1.0  $\mu\text{M}$ ) with increasing CT-DNA concentrations ranging from 0.0 to 10.0  $\mu\text{M}$  in  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{Tris-HCl}$  buffer solution mixture ( $\lambda_{\text{exc}} = 420$  nm).

order:  $\text{ZnPtPor} > \text{H}_2\text{PtPor} > 4\text{-TPyP}$  (emission quenching, Table 1). The titration emission experiments for the precursor  $4\text{-TPyP}$  CT-DNA are presented in the ESI (Fig. S4†). The largest hypochromicity (without a maximum wavelength emission shift) and the observed emission quenching for platinum(II)-porphyrin compounds  $\text{H}_2\text{PtPor}$  and  $\text{ZnPtPor}$  after the addition of CT-DNA indicate that these compounds may potentially interact *via* a non-intercalative mode with DNA. We also suggest that in  $\text{ZnPtPor}$  porphyrins, an interaction between the phosphate groups of DNA and the Zn(II) center may occur (the insertion of  $\text{ZnPtPor}$  into the DNA major or minor grooves). Previous studies have reported that the Zn(II) ion coordination position in the porphyrin macrocycle can promote the interaction with DNA by electrostatic or coordination binding with the phosphate groups of DNA.<sup>25,26</sup>

#### DNA thermal melting analysis

DNA melting experiments are used to demonstrate the DNA-drug interaction through the determination of the stability of the DNA secondary structure, the melting temperature data reflects the transition of the double helix to single stranded DNA by heating.<sup>27,28</sup>

The strength of DNA-complex interaction can alter the DNA double helix stability and also its melting temperature ( $T_m$ ).<sup>29</sup>  $T_m$  or the temperature of midtransition refers to the equilibrium temperature at which half of the sample is folded and half is unfolded.<sup>22,23</sup> Large increases in  $T_m$  are associated with strongest interactions.<sup>23</sup> CT-DNA thermal melting experiments in the presence of either  $\text{H}_2\text{PtPor}$  or  $\text{ZnPtPor}$  were performed. The  $T_m$  for CT-DNA in the presence or absence of the porphyrin derivatives ( $r = 0.02$  [porphyrin]/[CT-DNA]) is shown in Fig. 5 and Table 1. The  $\text{H}_2\text{PtPor}$  increases the  $T_m$  by 2.03  $^\circ\text{C}$  compared to  $T_m$  control (only CT-DNA) while  $\text{ZnPtPor}$  slightly increases the  $T_m$  by 1.3  $^\circ\text{C}$ . The increased  $T_m$  value promoted

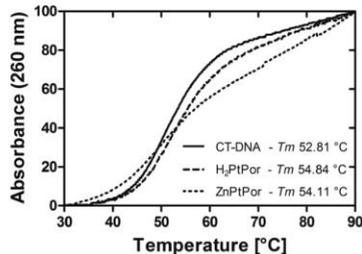


Fig. 5 Normalized thermal denaturation curve of CT-DNA (200  $\mu\text{M}$  bp) in denaturing solution (1.5 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  and 0.25 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) in the absence or presence of platinum(II) complexes ( $\text{H}_2\text{PtPor}$  and  $\text{ZnPtPor}$ ) at a 0.02 stoichiometric ratio ( $r = [\text{porphyrin}]/[\text{DNA}]$ ).  $T_m$  was estimated using Boltzmann sigmoidal approximations.

Paper

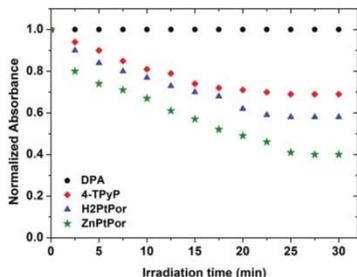


Fig. 6 Photo-oxidation of DPA (100.0  $\mu\text{M}$ ) in DMF with or without porphyrin derivatives 4-TpP,  $\text{H}_2\text{PtPor}$  and  $\text{ZnPtPor}$  at 1.0  $\mu\text{M}$ , after red light irradiation (LED array system;  $\lambda > 600$  nm) at a potency of 26  $\text{mW cm}^{-2}$ . The DPA absorbance was recorded at  $\lambda_{\text{max}} = 378$  nm.

by these compounds may be suggestive of DNA partial intercalation (Fig. 6).<sup>30</sup>

#### Photostability and ROS generation ( $^1\text{O}_2$ )

Photostability and the ability of porphyrin derivatives  $\text{H}_2\text{PtPor}$  and  $\text{ZnPtPor}$  to generate  $^1\text{O}_2$  upon photoexcitation were determined to evaluate their potential to induce DNA strand breaks by a mechanism dependent on reactive oxygen species (ROS).

The photostability of  $\text{H}_2\text{PtPor}$  and  $\text{ZnPtPor}$  was measured by monitoring the decrease in the absorbance of the corresponding Soret-bands ( $\lambda = 400\text{--}800$  nm range) after different times of white light irradiation at an intensity of 30  $\text{mW cm}^{-2}$ .<sup>31</sup> These compounds were quite photostable over the irradiation period (30 min; Table 2). However,  $\text{ZnPtPor}$  seems to be more susceptible to degradation upon illumination. This effect may be due to its higher capacity to generate  $^1\text{O}_2$  (see below).

The ability of  $\text{H}_2\text{PtPor}$  and  $\text{ZnPtPor}$  to generate  $^1\text{O}_2$  in DMF solution was determined by a chemical method using 9,10-

Table 2 Photostability of porphyrin derivatives 4-TpP,  $\text{H}_2\text{PtPor}$  and  $\text{ZnPtPor}$

Porphyrins	Irradiation time (min)						
	0	5	10	15	20	25	30
4-TpP	100	100	99	99	98	96	96
$\text{H}_2\text{PtPor}$	100	96	94	92	92	91	91
$\text{ZnPtPor}$	100	97	95	95	95	95	88

Each complex is present at a concentration of 1.0  $\mu\text{M}$  in  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{Tris-HCl}$  buffer mixture solutions, after irradiation with white light (400–800 nm) at a fluence rate of 30  $\text{mW cm}^{-2}$  for different periods of time (0–30 min). The results are presented as the ratio of residual absorbance at Soret-bands at different periods of time, and absorbance before irradiation.

diphenylanthracene (DPA) as an  $^1\text{O}_2$  scavenger.<sup>32</sup> Free-base porphyrin and zinc(II) derivatives were able to photo-oxidize DPA (Fig. 6). The compounds demonstrated to be potent generators of  $^1\text{O}_2$ , decomposing 39% and 61% of DPA, respectively, after 30 min irradiation. Both dyes have shown the ability to photooxidize DPA when compared to the corresponding porphyrin standard 4-TpP. The ability of these derivatives to photooxidize DPA decreases in the order:  $\text{ZnPtPor} > \text{H}_2\text{PtPor} > 4\text{-TpP}$ . The photostability and the ability to generate  $^1\text{O}_2$  of  $\text{H}_2\text{PtPor}$  and  $\text{ZnPtPor}$  after being exposed to light and oxygen allowed us to envisage them as potential candidates for PDT studies.

#### DNA cleavage studies

DNA photocleavage by the  $\text{H}_2\text{PtPor}$  and  $\text{ZnPtPor}$  complexes was investigated and, interestingly, no evident DNA cleavage products were observed in experiments performed in the dark for 24 hours (Fig. 7A–C). In an attempt to induce tetra-platinum(II) porphyrin activity the reaction media was exposed to visible light which, indeed, substantially amplified the activity (Fig. 7B–D).

In concentrations above 5.0  $\mu\text{M}$  we were unable to observe DNA bands in the agarose gels, and we suspect that this could be due to the inhibition of ethidium bromide (this dye is used for DNA staining) binding to DNA, and porphyrins may be

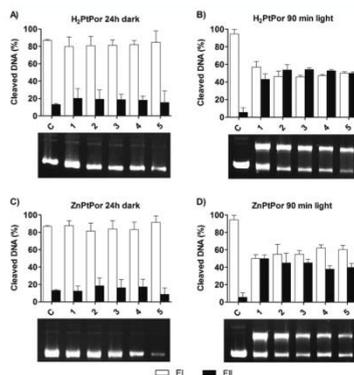


Fig. 7 DNA cleavage promoted by the complexes observed through agarose gel electrophoresis. Standard reactions: plasmid DNA ( $\sim 25.0$   $\mu\text{M}$  bp), Tris-HCl (10.0 mM pH 7.4), 25% (v/v) acetonitrile. Complexes concentration curves (1.0–5.0  $\mu\text{M}$ ) of  $\text{H}_2\text{PtPor}$  (A and B) and  $\text{ZnPtPor}$  (C and D). (a) Ctrl – control (no complex). Dark (A and C): all the samples were incubated for 24 hours at 37  $^{\circ}\text{C}$  in the dark. Visible light (B and D): all the samples were incubated for 90 minutes at 37  $^{\circ}\text{C}$  under visible light. Data represent mean and SD.

acting as competitors of ethidium bromide.<sup>33,34</sup> The precursor 4-TpP was also investigated and there was no evidence of DNA cleavage by this compound in the dark, and very low cleavage under visible light conditions, indicating that the insertion of the Pt(n)-bpy peripheral complexes was essential for DNA cleavage activity (Fig. S5†).

### Effect of the ionic strength on DNA cleavage

The effect of the ionic strength in the reaction medium on the DNA–porphyrin interaction was estimated in an attempt to observe if the neutralization of negative charges from the polyanionic plasmid DNA affects porphyrin activity. Increasing concentrations of LiClO<sub>4</sub> were added to the standard reactions and a decrease in the activity was seen, proportional to the increase of the LiClO<sub>4</sub> concentration in the H<sub>2</sub>PtPor samples, and less pronounced for the ZnPtPor samples (Fig. 8). In fact positive charges of platinum(n) porphyrins seem to have a fundamental role in DNA–porphyrin interaction *via* electrostatic forces at the polyanionic DNA helix. Electrostatic forces are important in  $\pi$ -stacking interactions which together with dipole–dipole electronically stabilize the interaction.<sup>35,34a</sup>

### Mechanism of DNA binding

In order to clarify the potential selectivity of the complexes towards the DNA major or minor grooves, we used the classical groove binding reagents: methyl green (major groove) or netropsin (minor groove).

Methyl green, previously added to the reactions, promoted a decrease of the DNA circular form for all porphyrin samples. The antibiotic netropsin is a double stranded DNA minor groove binder with high specificity for adenine and thymine base pairs.<sup>35,36</sup> This type of compound binds into the minor groove in a curved conformation or in a more linear conformation offset by a linked water molecule to fit in the minor groove curvature.<sup>28</sup> Netropsin caused an interesting increase in

the activity of the complexes, and the increase observed for ZnPtPor was higher than that for free base porphyrin H<sub>2</sub>PtPor (Fig. 9 and S6†). This phenomenon was already portrayed by

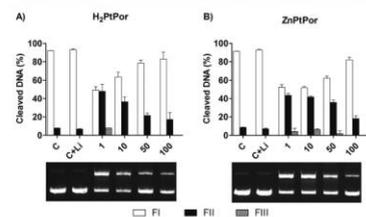


Fig. 8 Effect of ionic strength on DNA cleavage by the Pt(n)–porphyrin complexes. Standard reactions: H<sub>2</sub>PtPor (A) or ZnPtPor (B) 4.0  $\mu$ M, plasmid DNA (~25.0  $\mu$ M bp), Tris-HCl (10.0 mM pH 7.4), 25% (v/v) acetonitrile. C – control (without porphyrins) and C + Li – control + LiClO<sub>4</sub> 100.0 mM. LiClO<sub>4</sub> concentration: 0–100.0 mM. All the samples were incubated for 90 minutes at 37 °C under visible light. Data represent mean and SD.

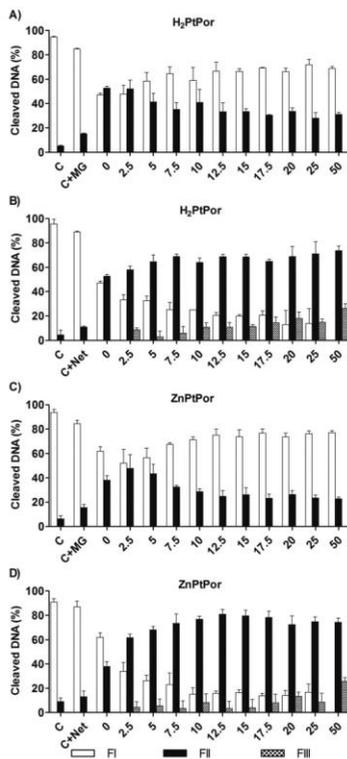


Fig. 9 Influence of DNA groove binders in the DNA cleavage reaction. Standard reactions were carried out in the presence of groove binders. Standard reactions: H<sub>2</sub>PtPor (A and B) or ZnPtPor (C and D) 4.0  $\mu$ M, plasmid DNA (~25  $\mu$ M bp), Tris-HCl (10 mM pH 7.4), 25% (v/v) acetonitrile. Concentration of groove binders: 2.5–50.0  $\mu$ M of methyl green (MG) or netropsin (Net). C – control (no complex); C + MG – control + methyl green 50  $\mu$ M; C + Net – control + netropsin 50  $\mu$ M. All the samples were pre-incubated for 10 min at 37 °C in the dark and the complexes were then added. The reactions were incubated for 90 minutes at 37 °C under visible light. Data represent mean and SD.

our group with *meso*-mono-[4-(1,4,7-triazacyclononyl)]-tri(phenyl)porphyrin.<sup>37</sup>

These experiments suggest that *meso*-tetra-[(4-pyridyl)porphyrin]tetraplatinum(*n*) porphyrins interact with DNA preferentially *via* the major groove.<sup>30</sup> It is already reported that for zinc(*n*) porphyrins the zinc ion insertion into the macrocycle promotes a stronger binding to the DNA structure compared to the free macrocycle.<sup>38</sup> The Zn(*n*) ion center binds to deprotonated thymine and interacts with groups in the DNA major groove. This may be due to the change of the Lewis acidity caused by variations in the macrocycle donor groups.<sup>38</sup>

#### Investigation of the DNA cleavage mechanism pathway

Reactive oxygen species (ROS) are often involved in the oxidative mechanism of DNA damage.<sup>39</sup> Singlet oxygen and superoxide undergo a series of reactions like the Haber–Weiss and Fenton reaction with the generation of hydroxyl radicals that damage DNA in an oxidative manner. To verify the DNA cleavage mechanism standard reactions were carried out in the presence of ROS scavengers (KI for superoxide species, DMSO and *t*-BuOH for hydroxyl radicals and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for singlet

oxygen species) in an attempt to verify if ROS are crucial for DNA-cleavage promoted by these platinum(*n*)-porphyrin complexes.<sup>40</sup> The data presented in Fig. 10 (Fig. S7 and S8†) show that DNA-cleavage by the complexes is not inhibited by typical scavengers of singlet oxygen or hydroxyl radical species. Interestingly, we observe a considerable decrease in activity in the presence of KI in the **H<sub>2</sub>PtPor** samples while in the **ZnPtPor** samples this decrease was milder (Fig. S7 and S8). In solution, the chloride ion of each pyridyl ligand of the *meso*-tetra-[(4-pyridyl)porphyrin]tetraplatinum(*n*) porphyrin is substituted by a water molecule enabling the interaction with KI which, according to the literature, promotes a decay in the Soret-band absorption, which causes the inhibition of DNA photocleavage.<sup>41</sup> To check if this also occurs with the porphyrin complexes presented here, we performed KI titrations, and decay in absorption was observed, thus confirming the literature (data not shown). If we consider that ROS generation under photostimulation is occurring, diminishing the concentration of porphyrin in the reaction may facilitate the ROS scavenger effect. However, even at lower concentrations of porphyrin complexes the putative inhibitory effect of ROS scavengers was not observed (Fig. S9†). Neither a scavenger of carbon centered radicals (TEMPO, Fig. S10†) was effective. For this reason oxygen was excluded from the reaction medium (Fig. S11 and S12†) and now a clear inhibition of the DNA photocleavage is observed, especially for **H<sub>2</sub>PtPor**. We thus propose a mixed type mechanism for the cleavage reaction of these porphyrin complexes based on oxidative as well as non-oxidative (potentially hydrolytic for **ZnPtPor**) pathways.<sup>38,40,42</sup>

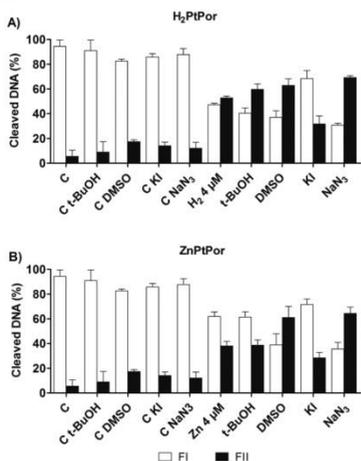


Fig. 10 Representative graphic of porphyrin–DNA reactions carried out in the presence of ROS scavengers. Standard reactions: **H<sub>2</sub>PtPor** (A) or **ZnPtPor** (B), 4.0 μM, plasmid DNA (~25 μM pb), Tris-HCl (10 mM pH 7.4), 25% (v/v) acetonitrile. Scavengers added: *t*-BuOH and DMSO (0.8 mM), KI (8 mM) and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (8 mM). C – control (no complex); C + scavenger – control + corresponding scavenger. All the samples were incubated for 90 minutes at 37 °C under visible light. Data represent mean and SD.

## Conclusions

In this study we demonstrate the interaction among *meso*-tetra-[(4-pyridyl)porphyrin]tetraplatinum(*n*) derivatives (**H<sub>2</sub>PtPor** and **ZnPtPor**) and the DNA double stranded structure. Our findings suggest that these photoactive porphyrins interact with DNA *via* outside binding through a porphyrin–DNA adduct formation stabilized by cationic–anionic electrostatic interactions between the porphyrin and the phosphate groups located on DNA. These porphyrins may be interesting as photosensitizers in photodynamic therapy and photodynamic therapy, since we demonstrate their activity towards DNA cleavage under exposure to light.

## Experimental

### General materials

The *cis*-dichloro(2,2'-bipyridine)platinum(*n*) complex and respective *meso*-tetra-substituted platinum(*n*)-porphyrin compounds **H<sub>2</sub>PtPor** and **ZnPtPor** were synthesized and purified according to the literature.<sup>11,15</sup> **H<sub>2</sub>PtPor** was metallated with Zn(*n*) ions using the acetate method, as described in the Experimental section.<sup>15</sup> *meso*-Tetra-(4-pyridyl)porphyrin (**4-TPyP**) was purchased from Sigma-Aldrich®. Bluescript SK II

Plasmid DNA (pBSK II, 2961 base pair – bp) was purchased from Stratagene (USA) and the HiSpeed Plasmid Purification Kit from QIAGEN. Agarose was obtained from Invitrogen™ and acetonitrile HPLC grade from TediaBrasil. Calf Thymus DNA (CT-DNA, 8–15 kb), netropsin, methyl green, Tris-HCl and water molecular biology reagent were acquired from Sigma-Aldrich®. All other reagents used in this research were of analytical grade.

### Spectroscopic analysis

Elemental CHN% analysis for zinc(II) complex **ZnPtPor** was performed using a PerkinElmer CHN% 2400e equipment. **ZnPtPor** characterization, absorption and emission spectra were recorded using a PerkinElmer Lambda 750 (absorption range 290–800 nm) and Cary Eclipse Varian (excitation wavelengths at 420 nm, slit 2.0 nm, emission range 500–800 nm), respectively. Due to low solubility of the *meso*-tetra-[(4-pyridyl)porphyrinate]zinc(II) complex in the acetonitrile/Tris-HCl buffer solution mixture (precipitation), could not perform the spectroscopic characterization and biomolecule assays in this work.

The spectroscopic results obtained from Zn(II) complex **ZnPtPor**: elemental analysis for **ZnPtPor**: C<sub>40</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>PTZn·5H<sub>2</sub>O, exp. (calc.): %C = 76.0 (75.9), %H = 4.7 (4.8), %N = 17.1 (16.8). UV-vis (in DMF), λ<sub>max</sub>, nm (ε; M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>): 308 (12 845), 320 (13 448), 427 (21 383), 564 (2422) and 611 (1317).

### DNA–porphyrin interaction assays

DNA–porphyrin interaction assays were performed by UV-vis absorption and fluorescence emission spectra measurements at room temperature. CT-DNA concentration was determined by UV-vis spectroscopy using 13 200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> as a molar extinction coefficient (per base pair) at 260 nm. Porphyrin (1.0 μM) in Tris-HCl buffer solutions (pH 7.4) was titrated with the increasing amounts of CT-DNA (from 0.0 to 10.0 μM) with the absorption spectra acquisition range of 290–800 nm. The intrinsic binding constants of compounds **H<sub>2</sub>PtPor** and **ZnPtPor** were calculated according to the absorption Soret-band decay using the following eqn (1), through a plot of [DNA]/(ε<sub>a</sub> – ε<sub>f</sub>) versus [DNA]:

$$[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) = [DNA]/(\epsilon_b - \epsilon_f) + 1/K_b(\epsilon_b - \epsilon_f) \quad (1)$$

where [DNA] is the concentration of DNA in the base pairs, ε<sub>a</sub> is the extinction coefficient [*A*<sub>obs</sub>/[porphyrin]], and ε<sub>b</sub> and ε<sub>f</sub> are the extinction coefficients of free and fully bound forms, respectively. In the plots of [DNA]/(ε<sub>a</sub> – ε<sub>f</sub>) versus [DNA] K<sub>b</sub> is given by the ratio of the slope to the intercept. The emission spectra of DNA–porphyrin interaction were acquired in the wavelength range of 600–800 nm upon excitation at 420 nm.

### Circular dichroism studies

Circular dichroism spectra were recorded on a Jasco J-815 Circular dichroism spectropolarimeter (with the PFD-425S Peltier thermostat accessory) using a quartz cuvette of 2.0 mm optical pathlength at 37 °C. The measured range was

520–220 nm with a bandwidth of 1.0 nm and a resolution of 0.5 nm at a scan speed of 100.0 nm min<sup>-1</sup> resulting in 601 data points. The initial CT-DNA concentration was 200.0 μM (bp) and the spectra were registered in the absence and in the presence of the complexes. Control reaction: CT-DNA (200.0 μM bp) in Tris-HCl (10.0 mM pH 7.4) and 2.0% (v/v) acetonitrile solution. The porphyrins (500.0 μM) were titrated into CD cuvette until the precipitation of the solution.

### Thermal melting studies

Thermal melting data were collected using a quartz cuvette of 1.0 cm optical pathlength on an Ultraspec 2100 pro UV/Visible Spectrophotometer (The Amersham Biosciences/GE Healthcare). The reactions were held at 30.0 °C for 10 minutes and then heated from 30.0 to 90.0 °C at 1.0 °C min<sup>-1</sup>. Absorbances were recorded at 260 nm. Reaction conditions: CT-DNA 200.0 μM (bp) in denaturing solution (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM and Na<sub>2</sub>EDTA 0.25 mM).<sup>29</sup> In the presence of porphyrin: [porphyrin]/[CT-DNA] = *r* = 0.02.

### Photostability and <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generation

The photostability of porphyrin derivatives was determined by measuring the absorbance for free-base **H<sub>2</sub>PtPor** at 417 nm and for Zn(II)-complex **ZnPtPor** at 427 nm before and after white light irradiation (400–800 nm) at a fluence rate of 30 mW cm<sup>-2</sup>. To determine singlet oxygen production, solutions containing 9,10-diphenylanthracene (DPA; 100.0 μM) with or without porphyrin derivatives at 1.0 μM were prepared in degassed DMF solution in a 1.0 × 1.0 cm quartz cuvette and was monitored by measuring the absorbance decrease at 378 nm in pre-established irradiation intervals. The solutions were irradiated at room temperature and under gentle magnetic stirring with a LED array system emitting red light (λ > 600 nm) at a fluence rate of 26 mW cm<sup>-2</sup>.

### DNA cleavage studies

The pBSK II plasmid DNA was transformed into DH5α competent cells replicated and purified using the QIAGEN HiSpeed Plasmid Purification Kit protocol. The pBSK II concentrations in terms of base pair per L were determined spectrophotometrically by employing an extinction coefficient of 13 200 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> at 260 nm. DNA cleavage standard reactions were carried out with 330 ng per well (~25.0 μM bp) of supercoiled plasmid in Tris-HCl buffer (10.0 mM pH 7.40) and 25% (v/v) acetonitrile solution at 37 °C. The final concentrations of compounds used in all experiments were 3.0 μM for **4-TpP** (maximal solubility) and 0–5.0 μM for **H<sub>2</sub>PtPor** and **ZnPtPor**. Controls lacking porphyrins were run. The samples were incubated at 37 °C for 24 hours in the absence of light or for 90 minutes in the presence of a 100 W incandescent tungsten lamp (photo-cleavage), quenched with a loading buffer – LB (bromophenol blue, glycerol 50% and 0.5 M EDTA) and loaded in agarose gels.

### Electrophoresis and DNA cleavage quantitation

DNA cleavage reactions were run on horizontal agarose gels (1%) containing ethidium bromide (EB  $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) in  $0.5\times$  TBE buffer for 100 minutes at 90 V. The gels were pictured under UV light (KODAK Gel Logic 200 Imaging System). All the experiments were performed at least in triplicate. Plasmid DNA forms, supercoiled (FI), circular (FII) and linear (FIII), were calculated based on the band intensities of each lane obtained by densitometric analysis (Kodak 1D 3.6 Gel Logic software). The supercoiled intensity bands were corrected by 1.47 factors<sup>43,44</sup> due their different EB-DNA binding affinity compared to the form II and III.<sup>33</sup>

### Effect of ionic strength on DNA cleavage

The effect of the ionic strength on the DNA cleavage by the complexes was observed by adding  $\text{LiClO}_4$  to the standard reaction mixture. Incubation (30 min) was previously performed for the assays containing  $\text{LiClO}_4$  in different concentrations (0, 1.0, 10.0, 50.0 and 100.0 mM – final concentration). After this the complexes were added (4.0 mM final concentration) and the samples were maintained at 37 °C for 90 minutes under visible light (100 W), quenched with LB and electrophoresed in agarose gels.

### DNA groove binders as probes of DNA–complex recognition

Groove binder's trials were performed by adding netropsin and methyl green to the standard reaction mixture. The standard reaction mixtures with the groove binders in different concentrations (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0, 25.0 and 50.0  $\mu\text{M}$  – final concentration) were previously incubated for 30 minutes at 37 °C in the dark. After this the complexes were added (4.0  $\mu\text{M}$  – final concentration) and the samples were maintained at 37 °C for 90 minutes under visible light (100 W), quenched with LB and loaded in agarose gels.

### DNA cleavage mechanism pathway

To investigate the impact of reactive oxygen species (ROS) in the complex–DNA cleavage mechanism, reactions were performed in the presence of scavengers for superoxide species (KI 8.0 mM), hydroxyl radicals (DMSO, and *t*-BuOH 0.8 mM) and singlet oxygen [ $\text{NaN}_3$ , 8.0 mM].<sup>40</sup> The reaction mixtures were incubated at 37 °C for 90 minutes under visible light, quenched with LB and electrophoresed in agarose gels.

## Acknowledgements

This work was supported by CNPq, INCT-Catálise, INCT-INBEB, CAPES and FINEP (Brazilian scientific financial support agencies) with the following grants INCT-CNPq/BJT 301451/2014-1; CNPq (472956/2013-2 and 443625/2014-0) and CAPES (STINT Proc 009/2013).

## Notes and references

- M. M. Aleksić and V. Kapetanović, *Acta Chim. Slov.*, 2014, **61**, 555–573.
- B. J. Pages, D. L. Ang, E. P. Wright and J. R. Aldrich-Wright, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 3505–3526.
- E. D. Sternberg, D. Dolphin and C. Brückner, *Tetrahedron*, 1998, **54**, 4151–4202.
- T. Bříza, J. Králová, P. Cigler, Z. Kejik, P. Poučková, P. Vašek, I. Moserová, P. Martásek and V. Král, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**(1), 82–84.
- M. Ethirajan, Y. Chen, P. Joshi and R. K. Pandey, *Chem. Soc. Rev.*, 2011, **40**, 340–362.
- S. Swavey and M. Tran, in *Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma*, ed. D. L. Davids, InTech, Croatia, 2013, ch. 11, pp. 253–282, DOI: 10.5772/54940.
- (a) A. Jana, L. McKenzie, A. B. Wragg, M. Ishida, J. P. Hill, J. A. Weinstein, E. Baggaley and M. D. Ward, *Chem. – Eur. J.*, 2016, **22**, 4164–4174; (b) G. Pratiavel, *Coord. Chem. Rev.*, 2016, **308**, 460–477.
- (a) L. M. O. Lourenço, B. A. Iglesias, P. M. R. Pereira, H. Girão, R. Fernandes, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro and J. P. C. Tomé, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 530–538; (b) B. A. Iglesias, J. F. B. Barata, P. M. R. Pereira, H. Girão, R. Fernandes, J. P. C. Tomé, M. G. P. M. S. Neves and J. A. S. Cavaleiro, *J. Inorg. Biochem.*, 2015, **153**, 32–41.
- X.-H. Zheng, Q. Cao, Y.-L. Ding, Y.-F. Zhong, G. Mu, P. Z. Qin, L.-N. Jia and Z.-W. Mao, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 50–53.
- A. Naik, R. Rubbiani, G. Gasser and B. Spingler, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, **53**, 6938–6941.
- J. A. Nau, S. H. Toma, J. A. Bonacin, K. Araki and H. E. Toma, *J. Inorg. Biochem.*, 2009, **103**, 182–189.
- B. Girek and W. Sliva, *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem.*, 2015, **82**, 283–300.
- B. P. P. McCormick, M. F. Pansa, L. N. M. Sanabria, C. M. B. Carvalho, M. A. F. Faustino, M. G. P. M. S. Neves, J. A. S. Cavaleiro, N. B. R. Vitar and V. A. Rivarola, *Laser Phys.*, 2014, **24**, 045603.
- V. Rapozzi, S. Zorzet, M. Zaccagna, E. D. Pietra, S. Cogoi and L. E. Xodo, *Mol. Cancer*, 2014, **13**, 75.
- D. A. Shultz, K. P. Gwaltney and H. Lee, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 769–774.
- J. Liu, T. Zhang, T. Lu, L. Qu, H. Zhou, Q. Zhang and L. Ji, *J. Inorg. Biochem.*, 2002, **91**, 269–276.
- Q. Lu, J. J. Reibenspies, A. E. Martell and R. J. Motekaitis, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 2630–2636.
- B. V. Kumar, H. S. B. Naik, D. Giriya, N. Sharath, S. M. Pradeepa, H. J. Hoskeri and M. C. Prabhakar, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2012, **94**, 192–199.
- J. E. N. Dolatabadi, *Int. J. Biol. Macromol.*, 2011, **48**, 227–233.
- L. A. Lipscomb, F. X. Zhou, S. R. Presnell, R. J. Woo, M. E. Peck, R. R. Plaskon and L. D. Williams, *Biochemistry*, 1996, **35**, 2818–2823.

- 21 A. Rodger, *Methods Mol. Biol.*, 2010, **613**, 37–54.
- 22 N. Shahabadi, S. Kashanian and A. Fatahi, *Bioinorg. Chem. Appl.*, 2011, 525794.
- 23 M. Balaz, K. Bitsch-Jensen, A. Mammama, G. A. Ellestad, K. Nakanishi and N. Berova, *Pure Appl. Chem.*, 2007, **79**, 801–809.
- 24 R. J. Fiel, B. G. Jenkins and J. L. Alderfer, in *Molecular Basis of Specificity in Nucleic Acid-Drug Interaction*, ed. A. Pullman and J. Jortner, Published by the Israel Academy of Sciences and Humanities, distributed by Academic Press (N.Y.), 1990, pp. 385–399.
- 25 K. Araki, C. A. Silva, H. E. Toma, L. H. Catalani, M. H. G. Medeiros and P. D. Mascio, *J. Inorg. Biochem.*, 2000, **78**, 269–273.
- 26 P. Zhao, J.-W. Huang, W.-J. Mei, J. He and L.-N. Ji, *Spectrochim. Acta, Part A*, 2010, **75**, 1108–1114.
- 27 (a) J.-L. Mergny and L. Lacroix, *Oligonucleotides*, 2004, **13**, 515–537; (b) A. Guédin, J.-L. Mergny and L. Lacroix, *Methods Mol. Biol.*, 2010, **613**, 25–35.
- 28 I. Belozerova and R. Levicky, *J. Am. Chem. Soc.*, 2012, **134**, 18667–18676.
- 29 P. Poddutoori, P. K. Poddutoori and B. G. Maiya, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2006, **10**, 1–12.
- 30 S. Arounaguir, D. Easwaramoorthy, A. Ashokkumar, A. Dattagupta and G. Bhaskar, *Proc. – Indian Acad. Sci., Chem. Sci.*, 2000, **112**, 1–17.
- 31 (a) S. Silva, P. M. R. Pereira, P. Silva, F. A. A. Paz, M. A. F. Faustino, J. A. S. Cavaleiro and J. P. C. Tomé, *Chem. Commun.*, 2012, **48**, 3608–3610; (b) D. Kumar, B. A. Mishra, K. P. C. Shekar, A. Kumar, K. Akamatsu, R. Kurihara and T. Ito, *Org. Biomol. Chem.*, 2013, **11**, 6675–6679.
- 32 P. Kluson, M. Drobek, A. Kalaji, S. Zarubova, J. Krysa and J. Rakusan, *J. Photochem. Photobiol., A*, 2008, **199**, 267–273.
- 33 M. F. Shubsda, J. Goodisman and J. C. Dabrowski, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 1997, **34**, 73–79.
- 34 (a) S. Nafisi, A. A. Saboury, N. Keramat, J.-F. Neault and H.-A. Tajmir-Riahi, *J. Mol. Struct.*, 2007, **827**, 35–43; (b) J. B. Lepecq and C. Paoletti, *J. Mol. Biol.*, 1967, **27**, 87–106.
- 35 S. K. Kim and B. Nórdén, *FEBS Lett.*, 1993, **315**, 61–64.
- 36 M. W. Van Dyke, R. P. Hertzberg and P. B. Dervan, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1982, **79**, 5470–5474.
- 37 B. L. Auras, V. A. Oliveira, H. Terenzi, A. Neves and B. A. Iglesias, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2016, **15**, 564–579.
- 38 K. E. Sifers, S. A. Sander, J. R. Devlin and J. R. Morrow, *Dalton Trans.*, 2015, **44**, 3708–3716.
- 39 Q. Jiang, N. Xiao, P. Shi, Y. Zhu and Z. Guo, *Coord. Chem. Rev.*, 2007, **251**, 1951–1972.
- 40 W. Xu, X. Yang, L. Yang, Z. Jia, L. Wei, F. Liu and G. Lu, *New J. Chem.*, 2010, **34**, 2654–2661.
- 41 Li-Na Zhu, S. Shi, L. Yang, M. Zhang, Ke-Ke Li and Li-Na Zhang, *RSC Adv.*, 2016, **6**, 13080–13087.
- 42 (a) S.-H. Wan, F. Liang, X.-Q. Xiong, L. Yang, X.-J. Wu, P. Wang, X. Zhou and C.-T. Wu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 2804–2806; (b) F. Mancin, P. Scrimin, P. Tecilla and U. Tonellato, *Chem. Commun.*, 2005, **20**, 2540–2548.
- 43 A. Sreedhara, J. D. Freed and J. A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 8814–8824.
- 44 Y. Jin, M. A. Lewis, N. H. Gokhale, E. C. Long and J. A. Cowan, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, **129**, 8353–8361.

## Supplementary Information Section

### Photoactive *meso*-tetra(4-pyridyl)porphyrin-tetrakis- [chloro(2,2'-bipyridine)platinum(II) derivatives recognize and cleave DNA upon irradiation

Vanessa A. Oliveira,<sup>a</sup> Bernardo A. Iglesias,<sup>b</sup> Bruno L. Auras,<sup>c</sup> Ademir Neves<sup>a</sup> and Hernán Terenzi<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro de Biologia Molecular Estrutural, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

<sup>c</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil.

#### Table of Contents:

1. 4-TPyP Electronic absorption spectra .....	2
2. Circular dichroism assays .....	3
3. 4-TPyP Emission spectra .....	5
4. Plasmidial DNA cleavage by 4-TPyP .....	6
5. DNA groove binder .....	7
6. ROS scavengers .....	8
7. TEMPO .....	11
8. Anaerobic atmosphere .....	12