



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

MAURICIO CÉSAR BOF DE OLIVEIRA

**NUCLEASES SINTÉTICAS:
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE DNA**

**FLORIANÓPOLIS – SC
2006**

MAURICIO CÉSAR BOF DE OLIVEIRA

**NUCLEASES SINTÉTICAS:
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE DNA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Hernán Terenzi

Florianópolis-SC
2006

MAURICIO CÉSAR BOF DE OLIVEIRA

**NUCLEASES SINTÉTICAS:
CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E MECANISMO DE AÇÃO SOBRE DNA**

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

Florianópolis, 14 de fevereiro de 2006.

Prof. Faruk José Nome Aguilera, Dr.
Coordenador do Curso

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hernán Terenzi
Orientador

Prof^a. Dr^a. Liane Márcia Rossi
Relatora - USP

Prof^a. Dr^a. Maria da Graça Nascimento
UFSC

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza
UFPR

Prof. Dr. Ademir Neves
UFSC

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard
UFSC

Aos meus pais e à minha querida Namo.

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Hernán Terenzi pela oportunidade, orientação e pela amizade criada nestes anos de convívio.
- Aos grupos dos professores Ademir Neves e Bruno Szpoganicz pelo fornecimento dos compostos estudados neste trabalho e pelas inúmeras discussões pertinentes ao trabalho.
- Aos colegas de laboratório Patrícia, Javier, Tassiele, Viviane, Carol, Franciele, Vanessa e Ana por todo apoio e amizade.
- À Namorada por todo amor, carinho, apoio, críticas, sugestões, conversas, discussões, broncas, pouquíssimas brigas... e muitas outras coisas. Ou seja, por ser essa pessoa maravilhosa que é e por estar sempre ao meu lado, mesmo com mais de 700 km de separação.
- Aos meus pais, Maria Inês e José Carlos, ao meu irmão Ricardo e à minha cunhada Rosane por sempre me apoiarem e incentivarem na realização de meus objetivos.
- Ao Departamento de Química e a Pós-Graduação em Química da UFSC pela oportunidade.
- Ao CNPq pelo apoio financeiro.
- A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o meu crescimento não só profissional, mas também pessoal.
- À Deus pela oportunidade maravilhosa de poder conviver e aprender com todas estas pessoas.

"O conhecimento torna a alma jovem e diminui a amargura da velhice. Colhe, pois, a sabedoria. Armazena suavidade para o amanhã".

Leonardo da Vinci

"Nós cientistas, devemos contentar-nos em ser os artífices menos dignos que descobrem e extraem das pedreiras aquele mármore em que, mais tarde, escultores habilidosos fazem aparecer figuras maravilhosas".

Galileu Galilei

*"Não podemos esquecer que quando o rádio foi descoberto, ninguém sabia que ele seria útil em hospitais. Era um trabalho de **ciência pura**, e isso é prova de que um trabalho científico não deve ser avaliado do ponto de vista de sua utilidade direta. Ele precisa ser feito por si só, pela **beleza da ciência**".*

Marie Curie

RESUMO

Nos dias de hoje, o entendimento de processos químicos e bioquímicos requer cada vez mais abordagens multidisciplinares. Desta forma, a química e a biologia são freqüentemente interligadas visando à elucidação de processos fisiológicos e patológicos. Dentro deste contexto, pode ser citado o estudo de nucleases sintéticas, que no passado eram utilizadas principalmente como estratégias químicas para analisar a conformação e especificidade de uma biomolécula em solução. Contudo, com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas e a biologia molecular, surgiram novas oportunidades para se explorar o espectro de uso de nucleases sintéticas, tanto das que atuam por um mecanismo oxidativo como das que atuam hidroliticamente.

Neste trabalho foi feita a caracterização da interação de cinco complexos metálicos de cobre (II) com moléculas de DNA. Os complexos estudados foram o complexo macrocíclico binuclear Cu_2BMXD , o complexo mononuclear CuMFF e os complexos binucleares $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$, $\text{Cu}_2\text{L-H}$ e $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$. Estes últimos diferenciam-se por substituições no anel fenólico terminal de seus ligantes. A caracterização da ação destes complexos foi feita pela incubação com o plasmídeo pBSK-II em diferentes condições de pH, temperatura, tempo de incubação e presença de outras moléculas (inibidores/seqüestradores, ligantes específicos do DNA). Foi determinada também a constante de ligação intrínseca dos complexos com o DNA através de espectroscopia eletrônica UV-Vis.

Todos os complexos foram capazes de causar quebras na fita dupla do DNA, porém, esta atividade é diferente em cada caso. O complexo Cu_2BMXD tem uma grande afinidade por DNA, sendo ativo na clivagem oxidativa destas moléculas. Esta atividade está relacionada com um ciclo catalítico que envolve a formação de Cu^+ e radicais $\text{HO}\cdot$. Por outro lado, o complexo CuMFF possui menor afinidade por moléculas de DNA, mas é capaz de clivar estas moléculas hidroliticamente.

Já os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ apresentam um mecanismo misto de clivagem de DNA, sendo o complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ o mais ativo, seguido do $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ e depois do $\text{Cu}_2\text{L-H}$. O complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ é o que apresenta a maior tendência de clivagem oxidativa do DNA. Entretanto, para todos os complexos a clivagem hidrolítica foi aumentada com o aumento do pH. A constante de ligação intrínseca destes

complexos com o DNA é menor do que para os anteriores, porém, parece ser ela a responsável pela diferença de atividade encontrada entre os complexos $\text{Cu}_2\text{L-H}$ e $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$.

Palavras-chave: Nucleases sintéticas, complexos de cobre(II), interação de pequenas moléculas com DNA.

ABSTRACT

In order to efficiently understand how some chemical and biochemical processes take place into living systems, research has become a multidisciplinary science. In this way, chemistry and biology have been very close aiming to elucidate physiological and pathological processes. The study of synthetic nucleases is one example, which in the past was utilized mainly as a chemical strategy to analyze biomolecules conformation and specificity. However, because of the development of new analytical and molecular biology techniques new opportunities have appeared to explore synthetic nucleases uses.

In this work interaction of five copper (II) complexes with DNA molecules was analyzed. The complexes were: Cu₂BMXD – a binuclear macrocyclic complex; CuMFF – a mononuclear complex; and Cu₂L-dtb, Cu₂L-H e Cu₂L-NO₂ – binuclear complexes differing from each other by substitutions at the terminal phenolic ring of the ligand. Complexes activity characterization was done under different conditions of pH, temperature, incubation period and addition of adjuvants or specific inhibitors. Moreover, intrinsic binding constants of the complexes were determined by UV-Vis spectroscopy.

All complexes were able to interact with and cleave DNA molecules, although with very specific and particular activities for each one. Cu₂BMXD has greater affinity for DNA, cleaving it by an oxidative pathway. This activity is related to a catalytic cycle where Cu⁺ and HO· radical are produced. On the other hand, CuMFF has less affinity for DNA, and cleaves DNA molecules by a hydrolytic mechanism.

Cu₂L-X complexes showed a two way mechanism composed by oxidative and hydrolytic pathways. Cu₂L-dtb was the most active complex, followed by Cu₂L-NO₂ and then by Cu₂L-H. While Cu₂L-dtb complex had the greatest tendency for oxidative cleavage, the hydrolytic pathway for all complexes increased with increasing pH values of the reaction medium. Intrinsic binding constants for Cu₂L-X complexes are smaller than the constants for the previous complexes. The difference in binding constant seems to be correlated to the difference in Cu₂L-H and Cu₂L-NO₂ DNA cleavage activity.

Keywords: synthetic nucleases, copper (II) complexes, small molecules interaction with DNA.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1.1 – Representação da estrutura de nucleosídeos e nucleotídeos. | 21 |
| FIGURA 1.2 – Estrutura das bases purínicas e pirimidínicas dos ácidos nucléicos, com o sistema de numeração IUPAC..... | 22 |
| FIGURA 1.3 – Conformações da 2-desoxi-D-ribose. | 22 |
| FIGURA 1.4 – Estrutura química da molécula de ATP. | 23 |
| FIGURA 1.5 – Estrutura da ligação fosfodiéster (em vermelho) unindo nucleosídeos de DNA e RNA. | 24 |
| FIGURA 1.6 – A dupla hélice proposta por Watson e Crick..... | 24 |
| FIGURA 1.7 – A dupla fita antiparalela da molécula de DNA e o perfil das ligações de hidrogênio formadas entre as bases A-T e C-G. | 25 |
| FIGURA 1.8 – Desnaturação térmica de moléculas de DNA. Relação entre a temperatura de desnaturação e o conteúdo de C-G. | 25 |
| FIGURA 1.9 – Conformações <i>C^{2'}-endo</i> e <i>C^{3'}-endo</i> do anel de ribose da molécula de DNA..... | 26 |
| FIGURA 1.10 – Representação das estruturas do B, A e Z-DNA..... | 26 |
| FIGURA 1.11 – Sulcos maior e menor da estrutura do B-DNA..... | 27 |
| FIGURA 1.12 – Tipos de interações reversíveis entre o DNA e pequenas moléculas..... | 28 |
| FIGURA 1.13 – Modos diretos (1 – 3) e indiretos (4 – 5) de ativação que um complexo (ou íon) metálico pode fornecer para acelerar a velocidade de hidrólise de ésteres de fosfato..... | 30 |
| FIGURA 1.14 – Ativação simples e dupla da hidrólise de ésteres de fosfato por ácido de Lewis. | 30 |
| FIGURA 1.15 – Combinação dos modos de ativação que podem levar a aceleração da velocidade de hidrólise das ligações fosfodiéster..... | 31 |
| FIGURA 1.16 – Exemplos de ligantes utilizados em complexos de lantanídeos com atividade na clivagem de DNA..... | 34 |
| FIGURA 1.17 – Estrutura do ligante HXTA. | 35 |
| FIGURA 1.18 – Estrutura do ligante [9]aneN ₃ (A) e da neamina (B)..... | 36 |
| FIGURA 1.19 – Estrutura do ligante HPTB (A) e do ligante DTPB (B)..... | 37 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 1.20 – Estrutura do complexo $[\text{Fe}_2^{3+}(\text{BPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ (A); modelagem molecular da interação do complexo $[\text{Fe}_2^{3+}(\text{BPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ com o sulco maior do DNA [32] (B). | 38 |
| FIGURA 3.1 – Representação do complexo macrocíclico Cu_2BMXD | 41 |
| FIGURA 3.2 – Estrutura química do ligante MFF. | 42 |
| FIGURA 3.3 – Proposta para os equilíbrios observados para as espécies 1 , 2 e 3 do complexo CuMFF , em solução aquosa. | 42 |
| FIGURA 3.4 – Estrutura química dos ligantes dos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ | 43 |
| FIGURA 3.5 – Representação da estrutura química dos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ | 43 |
| FIGURA 3.6 – Esquema da proposta para os equilíbrios observados para os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ | 44 |
| FIGURA 3.7 – Mapa do plasmídeo pBSK-II. | 45 |
| FIGURA 3.8 – Superenovelamento do DNA. | 46 |
| FIGURA 3.9 – Esquema representativo do princípio do método utilizado pelo kit comercial HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN | 49 |
| FIGURA 3.10 – Confiabilidade das leituras de A_{260} | 50 |
| FIGURA 3.11 – As três diferentes formas do DNA plasmidial. | 51 |
| FIGURA 3.12 – Ilustração do glove bag utilizado para a realização dos experimentos em atmosfera isenta de oxigênio. | 53 |
| FIGURA 3.13 – Estrutura da agarose | 54 |
| FIGURA 3.14 – Eletroforese em gel de agarose. | 56 |
| FIGURA 4.1 – Clivagem de DNA plasmidial por diferentes concentrações do complexo Cu_2BMXD | 58 |
| FIGURA 4.2 – Efeito da concentração do complexo Cu_2BMXD | 59 |
| FIGURA 4.3 – Variação de $\ln(F I)$ em função do tempo de reação, para diferentes temperaturas | 60 |
| FIGURA 4.4 – Influência de captadores de $\text{HO}\cdot$ na clivagem de DNA plasmidial por diferentes concentrações do complexo Cu_2BMXD | 61 |
| FIGURA 4.5 – Variação da fração de $F I$ em função da concentração do complexo Cu_2BMXD , na ausência e presença de DMSO e glicerol | 62 |
| FIGURA 4.6 – Clivagem de DNA plasmidial por Cu_2BMXD em condições aeróbias e anaeróbias. | 63 |
| FIGURA 4.7 – Estrutura química dos tampões MES, HEPES e PIPES | 64 |
| FIGURA 4.8 – Efeito do tampão na clivagem de DNA plasmidial por Cu_2BMXD | 65 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 4.9 – Titulação espectrofotométrica do complexo Cu ₂ BMXD com CT-DNA | 66 |
| FIGURA 4.10 – Esquema da clivagem de DNA dependente e independente de O ₂ pelo complexo Cu ₂ BMXD. | 68 |
| FIGURA 4.11 – Clivagem de DNA plasmidial por CuMFF em pH = 7,0 e 7,5..... | 69 |
| FIGURA 4.12 – Clivagem de DNA plasmidial por CuMFF em pH = 8,0 e 9,0..... | 70 |
| FIGURA 4.13 – Gráfico da fração de F I em função do pH do meio, para diferentes concentrações de CuMFF | 71 |
| FIGURA 4.14 – Clivagem de DNA plasmidial por CuMFF em condições aeróbias e anaeróbias..... | 73 |
| FIGURA 4.15 – Clivagem de DNA plasmidial por CuMFF na presença de um agente reduzidor externo (DTT)..... | 74 |
| FIGURA 4.16 – Estrutura química da batocuproína..... | 75 |
| FIGURA 4.17 – Clivagem de DNA plasmidial por CuMFF na presença de BC..... | 76 |
| FIGURA 4.18 – Espectro eletrônico do complexo CuMFF na ausência e na presença de BC | 77 |
| FIGURA 4.19 – Distamicina | 78 |
| FIGURA 4.20 – Titulação espectrofotométrica do complexo CuMFF com CT-DNA . | 79 |
| FIGURA 4.21 – Clivagem de DNA plasmidial por CuMFF na presença de distamicina | 80 |
| FIGURA 4.22 – Hidrólise ácida de nucleosídeo de purina no DNA..... | 82 |
| FIGURA 4.23 – Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu ₂ L-dtb em diferentes pHs..... | 84 |
| FIGURA 4.24 – Experimento controle da clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu ₂ L-dtb em diferentes pHs | 84 |
| FIGURA 4.25 – Efeito da variação da força iônica na clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu ₂ L-dtb | 85 |
| FIGURA 4.26 – Efeito da variação da força iônica na clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu ₂ L-dtb | 85 |
| FIGURA 4.27 – Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu ₂ L-dtb | 86 |
| FIGURA 4.28 – Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu ₂ L-H..... | 87 |
| FIGURA 4.29 – Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu ₂ L-NO ₂ | 87 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 4.30 – Gel de agarose das amostras controle (somente DNA) para a reação de clivagem de DNA plasmidial pelos complexos Cu ₂ L-X, na presença e na ausência de luz (lâmpada de tungstênio)..... | 88 |
| FIGURA 4.31 – Gráfico da fração de F I em função do tempo, para a reação de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu ₂ L-dtb, na presença e na ausência de luz (lâmpada de tungstênio) | 89 |
| FIGURA 4.32 – Gráfico da fração de F I em função do tempo, para a reação de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu ₂ L-H, na presença e na ausência de luz (lâmpada de tungstênio) | 90 |
| FIGURA 4.33 – Gráfico da fração de F I em função do tempo, para a reação de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu ₂ L-NO ₂ , na presença e na ausência de luz (lâmpada de tungstênio). | 90 |
| FIGURA 4.34 – Clivagem de DNA plasmidial por Cu ₂ L-X na presença de DMSO. ... | 92 |
| FIGURA 4.35 – Clivagem de DNA plasmidial por Cu ₂ L-X em condições aeróbias e anaeróbias..... | 93 |
| FIGURA 4.36 – Clivagem de DNA plasmidial por Cu ₂ L-X na presença de BC | 95 |
| FIGURA 4.37 – Foto das amostras de Cu ₂ L-dtb 250 μM (esquerda) e de Cu ₂ L-dtb 250 μM + BC 2 mM (direita) recém preparadas | 96 |
| FIGURA 4.38 – Espectro eletrônico do complexo Cu ₂ L-H na ausência e na presença de BC | 97 |
| FIGURA 4.39 – Espectro eletrônico do complexo Cu ₂ L-NO ₂ na ausência e na presença de BC..... | 98 |
| FIGURA 4.40 – Espectro eletrônico do complexo Cu ₂ L-dtb..... | 99 |
| FIGURA 4.41 – Titulação espectrofotométrica do complexo Cu ₂ L-H com CT-DNA | 100 |
| FIGURA 4.42 – Titulação espectrofotométrica do complexo Cu ₂ L-NO ₂ com CT-DNA | 101 |
| FIGURA 4.43 – Clivagem de DNA plasmidial por Cu ₂ L-X na presença de distamicina | 102 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| TABELA 3.1 – Valores de pKa determinados para os complexos Cu ₂ L-X | 44 |
| TABELA 3.2 – Concentração necessária de agarose no gel para uma eficiente separação de moléculas de DNA linear de diferentes tamanhos | 54 |
| TABELA 4.1 – Valores de <i>k</i> para a clivagem de DNA pelo complexo Cu ₂ BMXD, a diferentes temperaturas..... | 60 |
| TABELA 4.2 – Valores de $\lambda_{\text{máx}}$ e ϵ obtidos pela titulação espectrofotométrica de Cu ₂ BMXD por CT-DNA. | 67 |
| TABELA 4.3 – Valores de <i>K_b</i> para o brometo de etídio e diferentes complexos metálicos. | 68 |
| TABELA 4.4 – Géis de agarose de amostras de DNA plasmidial incubados com os complexos Cu ₂ L-X em diferentes tampões e valores de pH. | 82 |
| TABELA 4.5 – Clivagem de DNA plasmidial pelos complexos Cu ₂ L-X em condições aeróbias e anaeróbias. | 94 |
| TABELA 4.6 – Dados de eletroquímica para os complexos Cu ₂ L-X..... | 98 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------------------|---|
| [9]aneN ₃ | 1,4,7-triazaciclono nonano |
| A | adenina |
| Ac | acetato |
| ADP | adenosina 5'-difosfato |
| ATP | adenosina 5'-trifosfato |
| A _x | absorvância no comprimento de onda X |
| BC | batocuproína – 2,9-dimetil-4,7-di(fenil-sulfonato de sódio)-1,10-fenantrolina |
| Bis-Tris | bis(2-hidroxietil)imino-tris(hidroximetil)metano |
| BMXD | ligante poliaza macrocíclico 3,6,9,17,20,23-hexaazatriciclo [23.3.1.1 ^{11,15}]-triaconta-1(29),11 (30),12,14,25,27-hexano |
| BPCINOL | <i>N</i> -(2-hidroxilbenzil)- <i>N</i> -(piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxil)]propilamina |
| BTP | 1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano |
| C | citossina |
| CT-DNA | DNA de timo de bezerro “ <i>Calf Thymus DNA</i> ” |
| Cu ₂ BMXD | complexo [Cu ₂ (BMXD)] ⁴⁺ |
| Cu ₂ L-dtb | complexo [Cu ₂ (L-dtb)(μ-OCH ₃)](ClO ₄) ₂ |
| Cu ₂ L-H | complexo [Cu ₂ (L-H)(μ-OAc)(ClO ₄)] [ClO ₄].H ₂ O |
| Cu ₂ L-NO ₂ | complexo [Cu ₂ (L-NO ₂)(μ-OAc)(H ₂ O)(ClO ₄)] |
| Cu ₂ L-X | os três complexos Cu ₂ L-dtb, Cu ₂ L-H e Cu ₂ L-NO ₂ |
| CuMFF | complexo [Cu(MFF)(Cl ₂)].H ₂ O |
| dA | desoxiadenosina |
| dC | desoxicitidina |
| dG | desoxiguanosina |
| DMSO | dimetil sulfóxido |
| DNA | ácido desoxirribonucléico |
| DOTA | 1,4,7,10-tetraazaciclododecano- <i>N,N,N',N'</i> -ácido tetracético |
| dT | desoxitimidina |
| DTPB | 1,1,4,7,7-penta(2'-bezimidazol-2-ilmetil)-triazasheptano |
| DTT | ditiotreitól |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |

| | |
|----------------------------------|--|
| EDTA | ácido etilenodiaminotetracético |
| ENH | eletrodo normal de hidrogênio |
| F I | forma superenovelada do plasmídio |
| F II | forma circular aberta do plasmídio |
| F III | forma linear do plasmídio |
| G | guanina |
| H ₂ L-dtb | 2-[<i>N</i> -bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[<i>N</i> -(2-piridilmetil)(2-hidróxi-3,5-di- <i>tert</i> -butilbenzil)aminometil]fenol |
| H ₂ L-H | 2-[<i>N</i> -bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[<i>N</i> -(2-piridilmetil)(2-hidróxibenzil)aminometil]fenol |
| H ₂ L-NO ₂ | 2-[<i>N</i> -bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[<i>N</i> -(2-piridilmetil)(2-hidróxi-5-nitrobenzil)aminometil]fenol |
| HEPES | <i>N</i> -2-hidroxi-etilpiperazina- <i>N'</i> -2-ácido etanosulfônico |
| HO· | radical hidroxila |
| HPTB | <i>N,N,N,N'</i> -tetrakis(2-benzimidazolilmetil)-2-hidroxil-1,3-diaminopropano |
| HXTA | 5-metil-2-hidroxil-1,3-xileno- α,α -diamina- <i>N,N,N,N'</i> -ácido tetracético |
| <i>k</i> | constante de velocidade |
| <i>K_b</i> | constante de ligação intrínseca ao DNA |
| LB | meio de crescimento para bactérias Luria-Bertani |
| MES | ácido 2-[<i>N</i> -morfolino] etanosulfônico |
| MFF | ligante 2-[(bis(piridilmetil)amino)metil]-4-metil-6-formilfenol |
| MOPS | ácido 3-[<i>N</i> -morfolino] propanosulfônico |
| pb | pares de bases de DNA |
| pBSK-II | plasmídio pBluescript [®] II SK(+) |
| PIPES | piperazina- <i>N,N'</i> -bis(ácido 2-etano sulfônico) |
| RNA | ácido ribonucléico |
| RS· | radicais tiila |
| RSH | tiol reduzido |
| T | timina |
| <i>t</i> _½ | tempo de meia vida |
| TBE | tampão Tris/borato/EDTA |

| | |
|------------|--------------------------------|
| Tris | tris(hidroximetil) aminometano |
| tRNA | RNA transportador |
| U | uracila |
| UV-Vis | ultravioleta-visível |
| ϵ | coeficiente de extinção |
| λ | comprimento de onda |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 19 |
| 1.1 DNA | 21 |
| 1.1.1 Estrutura e propriedades | 21 |
| 1.1.2 Interações reversíveis com pequenas moléculas..... | 28 |
| 1.1.3 Interações covalentes com pequenas moléculas | 29 |
| 1.1.3.1 <i>Hidrólise da ligação fosfodiéster</i> | 29 |
| 1.1.3.2 <i>Clivagem oxidativa do DNA</i> | 32 |
| 1.2 Clivagem de DNA por complexos metálicos | 33 |
| 1.2.1 Complexos de lantanídeos | 33 |
| 1.2.2 Complexos de metais de transição | 35 |
| 2 OBJETIVOS | 39 |
| 2.1 Objetivo geral | 39 |
| 2.2 Objetivos específicos | 39 |
| 3 PARTE EXPERIMENTAL | 40 |
| 3. 1 Complexos metálicos em estudo | 40 |
| 3.1.1 Cu ₂ BMXD | 40 |
| 3.1.2 CuMFF..... | 41 |
| 3.1.3 Cu ₂ L-X..... | 42 |
| 3.2 DNA plasmidial | 45 |
| 3.3 Esterilização dos materiais e soluções | 46 |
| 3.4 Preparação de bactérias competentes | 47 |
| 3.5 Transformação de bactérias | 48 |
| 3.6 Extração de DNA plasmidial | 48 |
| 3.7 Quantificação e pureza do DNA plasmidial | 49 |
| 3.8 Estudos com moléculas de DNA | 50 |
| 3.8.1 Clivagem de DNA | 50 |
| 3.8.2 Clivagem anaeróbia – atmosfera de argônio..... | 52 |
| 3.8.3 Eletroforese em gel de agarose..... | 53 |
| 3.8.4 Espectroscopia eletrônica | 56 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 58 |

| | |
|--------------------------------|-----|
| 4.1 Cu ₂ BMXD | 58 |
| 4.2 CuMFF | 69 |
| 4.3 Cu ₂ L-X | 81 |
| 5 CONCLUSÕES | 104 |
| 6 PERSPECTIVAS | 106 |
| REFERÊNCIAS | 108 |
| ANEXO A | 120 |
| ANEXO B | 121 |
| ANEXO C | 122 |
| ANEXO D | 123 |
| Artigos publicados | 124 |

1 INTRODUÇÃO

Nos dias de hoje, torna-se cada vez mais claro o caráter interdisciplinar da pesquisa, a fim de se estudar eficientemente como ocorrem processos químicos e bioquímicos, dentro e fora dos organismos vivos. Desta forma, a química e a biologia têm sido frequentemente interligadas visando à elucidação de processos fisiológicos e patológicos. Um exemplo da convergência entre estas ciências, é a interação entre a química bioinorgânica e a bioquímica. A química bioinorgânica encarrega-se do planejamento, da síntese e da caracterização estrutural e físico-química de análogos sintéticos para sítios ativos de metaloproteínas, membranas e ácidos nucleicos. A bioquímica, por sua vez, determina a reatividade e o mecanismo pelos quais estes compostos sintéticos interagem com as biomoléculas isoladas e a sua influência em células e organismos vivos.

Dentro deste contexto, pode ser citado como de fundamental importância, o estudo de nucleases sintéticas. Estes compostos foram definidos pela primeira vez em 1990 por Sigman como sendo: “Complexos de coordenação com atividade redox capazes de clivar ácidos nucleicos em condições fisiológicas, através de um ataque oxidativo no anel de ribose, ou desoxirribose” [1]. No passado, nucleases sintéticas eram utilizadas principalmente como estratégias químicas para analisar a conformação e especificidade de uma biomolécula em solução. Desta forma, a principal aplicação destes compostos era para a técnica de “DNA footprinting” [1]. Por exemplo, o complexo $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})_2]^+$ foi o primeiro complexo de coordenação sintético que demonstrou uma atividade nucleolítica eficiente, por um mecanismo oxidativo de clivagem [2; 3].

Contudo, com o desenvolvimento de novas técnicas analíticas e de biologia molecular, surgiram novas oportunidades para se explorar o espectro de uso de nucleases sintéticas. Além disto, inúmeros compostos vêm sendo descritos com atividade na clivagem de DNA, que ocorrem por duas vias principais: (i) por clivagem hidrolítica, envolvendo o grupo fosfato; (ii) por clivagem oxidativa, envolvendo o açúcar e / ou a base nitrogenada [4]. Desta forma, é necessária uma definição mais ampla e atual para as nucleases sintéticas do que a proposta por Sigman. Assim, pode-se sugerir como sendo: “Compostos capazes de clivar ácidos nucleicos em condições próximas às fisiológicas, de maneira hidrolítica ou oxidativa”.

Pequenas moléculas sintéticas que clivem o DNA oxidativamente têm se destacado como agentes na técnica de “DNA footprinting” [1; 5] e mais recentemente, como ferramenta para fragmentação e marcação fluorescente de ácidos nucleicos para hibridização através da tecnologia do microchip de DNA [6]. Entretanto, atualmente há um maior interesse em compostos que clivem o DNA por um mecanismo hidrolítico, e por uma série de razões [7]: compostos que clivam o DNA oxidativamente produzem radicais livres difusíveis; a abstração por radicais resulta em fitas do DNA com terminais que não podem ser religados enzimaticamente; a clivagem oxidativa pode causar dano periférico indiscriminado para uma célula; e a difusão de radicais pode diminuir significativamente a especificidade na clivagem que pode ser alcançada.

Por sua vez, compostos que clivem o DNA hidroliticamente podem ser utilizados como enzimas de restrição artificiais. Estas moléculas podem apresentar uma série de vantagens sobre as enzimas de restrição, uma vez que poderiam clivar o DNA em sítios de restrição não reconhecidos pelas enzimas utilizadas [8] e, por serem menores em tamanho, poderiam alcançar regiões estericamente impedidas de uma macromolécula [9]. Além disso, podem ser utilizadas em estudos que correlacionam estrutura e reatividade, já que é muito mais fácil entender esta correlação em modelos simples usando-se complexos do que utilizando as enzimas [10]. Outras aplicações tais como sondas conformacionais e no estudo da função dos íons metálicos nas enzimas hidrolíticas [8]. Segundo Cowan, “a habilidade em clivar ácidos nucleicos, em um modo não degradativo, e com altos níveis de seletividade por sítios ou estruturas, oferecerá muitas aplicações para a manipulação de genes (biologia molecular), para o desenho de sondas estruturais e o desenvolvimento de novas terapêuticas” [11]. Clinicamente, poderiam ser planejados agentes para bloquear a transcrição gene-específica, para aplicações antibióticas e quimioterápicas, permitindo potencialmente até atingir alvos de mutações oncogênicas [7].

1.1 DNA

1.1.1 Estrutura e propriedades

Os ácidos nucléicos são polímeros lineares muito longos constituídos de monômeros chamados nucleotídeos. Diferentes ácidos nucléicos podem ter desde cerca de 80 nucleotídeos, como em tRNA, até mais de 10^8 pares de nucleotídeos em um único cromossomo eucariótico [12]. A unidade de tamanho de um ácido nucléico é o par de bases (para espécies com fita dupla), geralmente abreviado como pb, ou base (para espécies com fita simples). O cromossomo na *Escherichia coli* (*E. coli*) tem 4×10^6 pb o que significa uma massa molar de 3×10^9 Da e um comprimento de 1,5 mm. Já o DNA genômico de uma única célula humana tem $3,9 \times 10^9$ pb e 990 mm de comprimento [12].

Os nucleotídeos são constituídos por uma base nitrogenada heterocíclica, uma pentose e um grupo fosfato, sendo que a molécula sem este grupo fosfato é chamada de nucleosídeo (Figura 1.1). No DNA, as seqüências de bases contêm a informação genética, enquanto que o açúcar e o fosfato têm um papel estrutural [13]. As bases nitrogenadas são derivadas de anéis de purina e pirimidinas (Figura 1.2). As principais purinas são adenina (**A**) e guanina (**G**), que são encontradas tanto em DNA como em RNA. Já as principais pirimidinas são citosina (**C**), timina (**T**) e uracila (**U**), a primeira sendo encontrada tanto em DNA como em RNA, a segunda somente em DNA e a terceira somente em RNA.

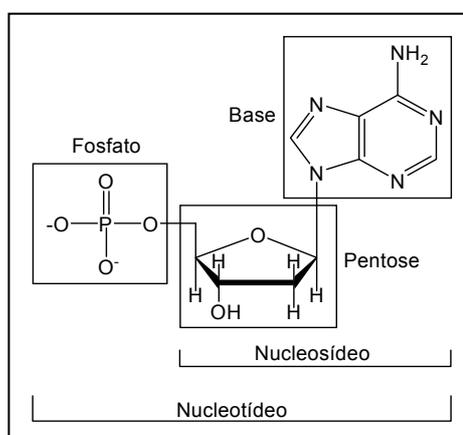


FIGURA 1.1 – Representação da estrutura de nucleosídeos e nucleotídeos.

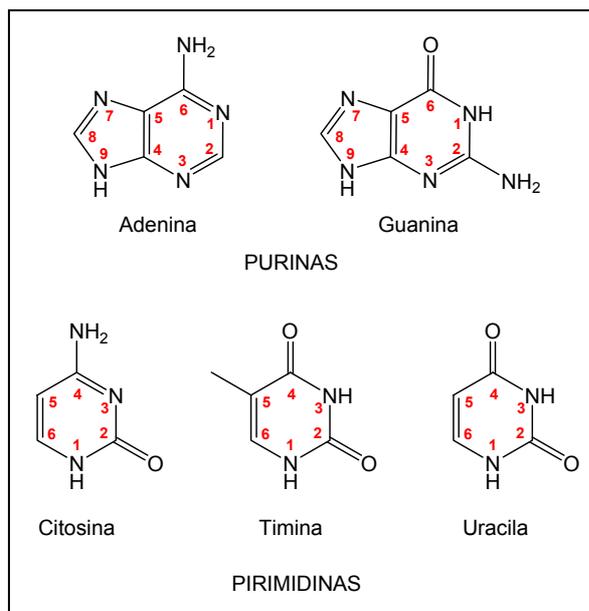


FIGURA 1.2 – Estrutura das bases purínicas e pirimidínicas dos ácidos nucleicos, com o sistema de numeração IUPAC [12].

Nos nucleosídeos (para o DNA – desoxiadenosina, desoxiguanosina, desoxicitidina e desoxitimidina), as bases de purinas e pirimidinas estão ligadas por um átomo de nitrogênio do anel ao carbono 1 da pentose. Nas moléculas de RNA a pentose é a D-ribose, enquanto que nas moléculas de DNA a pentose é a desoxi-D-ribose. Em solução, a conformação destes açúcares está em equilíbrio entre a cadeia aberta (aldopentose) e o anel fechado (β -furanose), porém, nas moléculas de RNA e DNA só existe a forma de um anel de cinco membros, respectivamente, β -D-ribofuranose e β -2'-desoxi-D-ribofuranose (Figura 1.3).

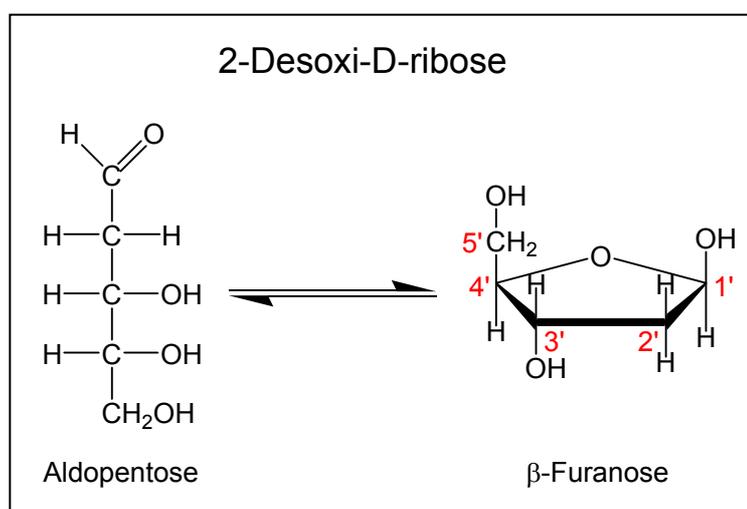


FIGURA 1.3 – Conformações da 2-desoxi-D-ribose.

Finalmente, os nucleotídeos são os ésteres de fosfato dos nucleosídeos. Os nucleotídeos podem conter grupos monoéster de fosfato, de ácido pirofosfórico e de ácido tripolifosfórico, sendo chamados, respectivamente, de nucleosídeos mono, di e trifosfato. A molécula adenosina 5'-trifosfato (ATP) é um clássico exemplo (Figura 1.4).

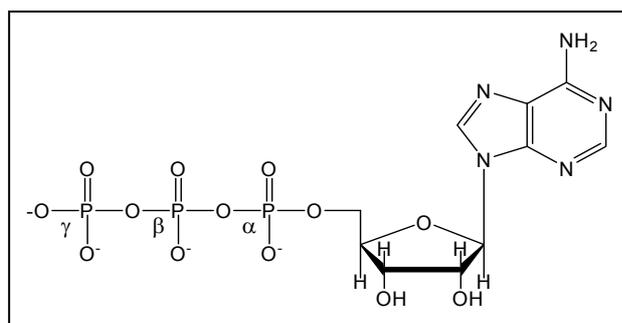


FIGURA 1.4 – Estrutura química da molécula de ATP.

Os nucleotídeos que constituem as moléculas de DNA e RNA estão ligados covalentemente uns aos outros através dos grupos fosfato. Esta ligação é formada pela junção do grupo 5'-fosfato de um nucleotídeo com o grupo 3'-OH de outro nucleotídeo, criando uma ligação fosfodiéster (Figura 1.5). Desta forma, o esqueleto covalente dos ácidos nucleicos é constituído por grupos fosfato e anéis de ribose de forma alternada. Todas as ligações fosfodiéster possuem a mesma orientação ao longo da cadeia, dando a cada fita do ácido nucleico linear uma polaridade específica e diferentes terminais 3' e 5' (3'-OH e 5'-OPO₃²⁻). Convencionalmente, as seqüências de nucleotídeos nas moléculas de DNA e RNA são descritas no sentido da extremidade 5'-OPO₃²⁻ para a extremidade 3'-OH (5'→3'), e correspondem a estrutura primária desses ácidos nucleicos.

As ligações fosfodiéster que formam o esqueleto covalente do DNA são extremamente estáveis em relação à hidrólise não enzimática. Esta grande estabilidade, inclusive, torna difícil a determinação do seu tempo de meia vida ($t_{1/2}$), sendo necessário a utilização de altas temperaturas, para posterior extrapolação para 25 °C. Na literatura podem ser encontrados valores distintos para o $t_{1/2}$ do RNA e do DNA. Para o RNA em água a 25 °C e pH = 7, os valores variam de 110 a 800 anos, enquanto que para o DNA os valores de $t_{1/2}$, em água a 25 °C e pH = 7, variam de 130 mil a dezenas ou centenas de bilhões de anos [14-16].

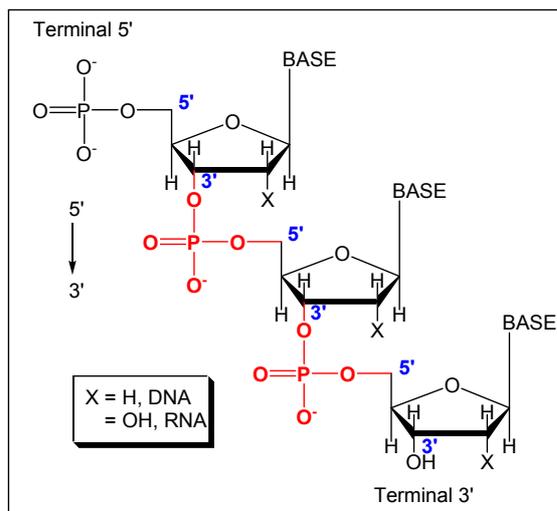


FIGURA 1.5 – Estrutura da ligação fosfodiéster (em vermelho) unindo nucleosídeos de DNA e RNA.

Além disso, em pH fisiológico as moléculas de DNA estão negativamente carregadas, o que inibe a hidrólise das ligações fosfodiéster pelo ataque de nucleófilos. Este comportamento revela o porquê da escolha, pela natureza, do DNA como forma de armazenamento do material genético.

A estrutura tridimensional do DNA foi resolvida e publicada por Watson e Crick há mais de 50 anos [17]. Este trabalho foi um marco para a ciência, e foi a partir dele que se desenvolveram diversas áreas de pesquisas exploradas atualmente, entre elas: a biologia molecular, a clonagem e produção de organismos geneticamente modificados, a determinação da seqüência genômica de diferentes organismos e até os estudos de proteômica.

Neste trabalho foi proposto que o DNA é composto por duas cadeias polinucleotídicas, de sentidos opostos, enroladas em torno de um eixo, formando uma dupla hélice (Figura 1.6). Estas duas cadeias são mantidas unidas através de ligações de hidrogênio entre as bases de cada fita, mas sempre pareando uma adenina com uma timina e uma citosina com uma guanina (Figura 1.7).

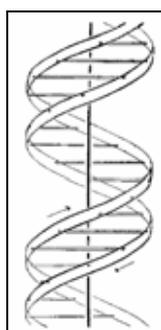


FIGURA 1.6 – A dupla hélice proposta por Watson e Crick [17].

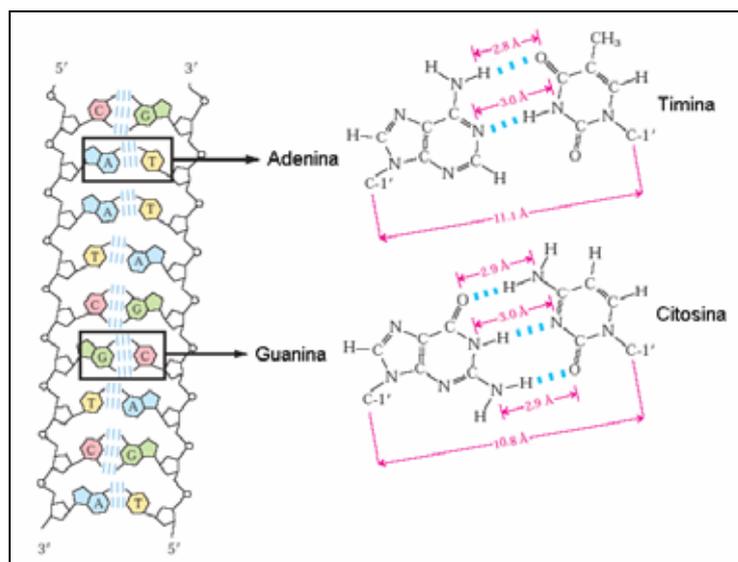


FIGURA 1.7 – A dupla fita antiparalela da molécula de DNA e o perfil das ligações de hidrogênio formadas entre as bases A-T e C-G [13].

A formação de três ligações de hidrogênio entre as bases C e G, e de apenas duas entre A e T, é a razão para a maior estabilidade térmica de moléculas de DNA (em relação à desnaturação das fitas) com uma maior composição de CG, como pode ser visto na Figura 1.8 [13]. A dissociação da fita dupla do DNA em solução, gerando moléculas de fita simples, é função não só da temperatura e da composição das bases, mas também da seqüência e comprimento da molécula, da concentração salina e do pH do solvente [12].

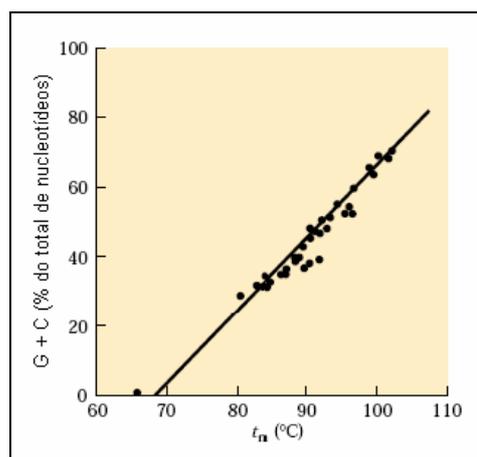


FIGURA 1.8 – Desnaturação térmica de moléculas de DNA. Relação entre a temperatura de desnaturação e o conteúdo de C-G [13].

Na primeira fase da investigação da estrutura secundária do DNA, duas conformações foram identificadas: A-DNA e B-DNA [12]. A primeira seria favorecida em condições de baixa “hidratação” (e alta concentração salina) e a segunda em

condições de alta “hidratação” (e baixa concentração salina). Esta “hidratação” se refere à quantidade de moléculas de água efetivamente ligadas à molécula de DNA, ou seja, quanto menor a “hidratação” menos moléculas de água estão efetivamente ligadas ao DNA. Esta variação de “hidratação” do DNA é conseguida, por exemplo, pela variação da composição do solvente. Atualmente são conhecidas diversas conformações da dupla hélice direita do DNA, denominadas A, A', B, α -B', β -B', C, C', D, E e T [12]. Em termos gerais, todas elas podem ser classificadas em duas famílias genericamente distintas: A e B. Esta classificação está associada à conformação do anel de desoxirribose: C^3' -endo para a família A e C^2' -endo (ou o equivalente C^3' -exo) para a família B [12] (Figura 1.9). Além destas conformações, existe ainda a Z-DNA que é uma estrutura de dupla hélice esquerda. A Figura 1.10 apresenta a estrutura das conformações A, B e Z do DNA (no anexo A é apresentado uma tabela com alguns parâmetros estruturais para diferentes conformações do DNA).

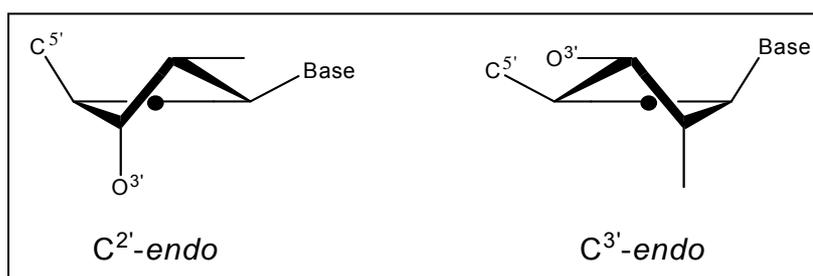


FIGURA 1.9 – Conformações C^2' -endo e C^3' -endo do anel de ribose da molécula de DNA.

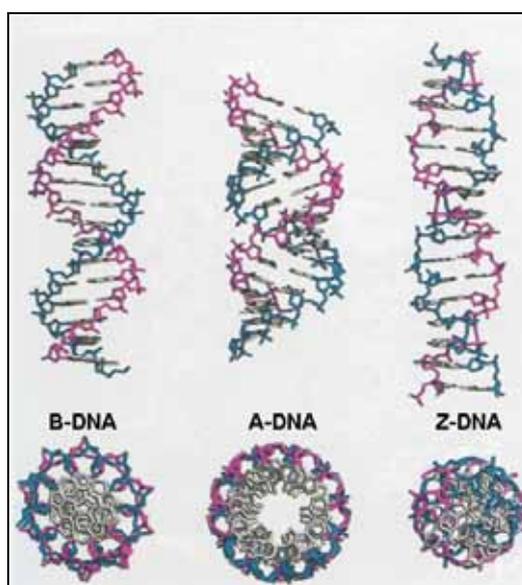


FIGURA 1.10 – Representação das estruturas do B, A e Z-DNA. Figura extraída do site http://www2.muw.edu/~rwhitwam/230F05_Ch2ExtraDNAPix.html (acessado em 09/01/2006).

No B-DNA, os pares de base estão localizados no eixo da hélice e, por sua vez, as bases estão empilhadas predominantemente acima das bases vizinhas na mesma fita e perpendiculares ao eixo da hélice. As conformações do anel de ribose são $C^{2'}$ -endo e a ligação glicosídica *anti*. Em razão das características estruturais dos nucleotídeos e da dupla hélice do DNA, são formados sulcos na estrutura do B-DNA que, apesar de terem profundidades similares (ver anexo **A**), possuem larguras distintas e, desta forma, são denominados sulco maior e sulco menor (Figura 1.11).

Na estrutura do A-DNA os pares de base estão deslocados do eixo da hélice em direção ao sulco menor (4,5 Å) e estão um pouco mais inclinados (20° – “tilt”) uns em relação aos outros. Nesta conformação existem 11 bases por volta da hélice, contra 10 bases no B-DNA. As conformações do anel de ribose são $C^{3'}$ -endo e a ligação glicosídica *anti* [12].

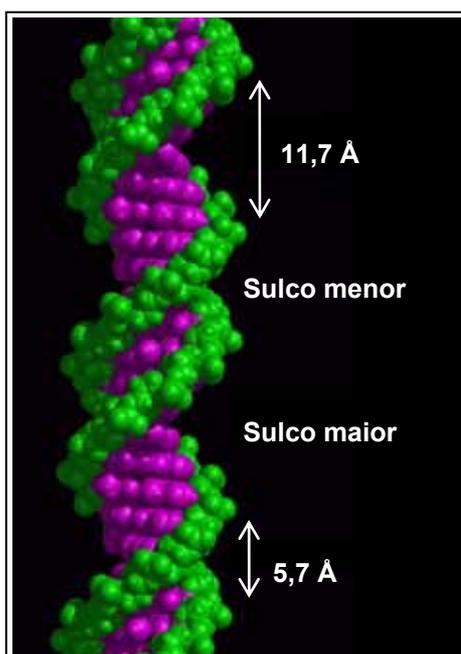


FIGURA 1.11 – Sulcos maior e menor da estrutura do B-DNA. Figura original extraída do site <http://web.uconn.edu/gage/Media/229%20Pictures/1-DNA%20structure.JPG> (acessado em 20/02/2006).

Já na estrutura do Z-DNA (que é mais bem exemplificado por um polímero $(dG-dC)_n$), apesar de a fita dupla também ser antiparalela, a conformação assumida é bem diferente das anteriores. Numa dupla hélice esquerda ideal, todas as ligações glicosídicas deveriam ter conformação *sin*, o que não é possível para as pirimidinas. Assim, as citosinas assumem conformação *anti* e as guaninas *sin*, o que resulta num aspecto de zig-zag na cadeia do DNA (daí o nome Z-DNA) [12].

1.1.2 Interações reversíveis com pequenas moléculas

O DNA interage reversivelmente com uma ampla variedade de espécies químicas que incluem água, íons metálicos e seus complexos, pequenas moléculas orgânicas e proteínas [12]. Estas interações têm uma grande importância para sua estrutura e função, primeiramente porque todas as conformações que a molécula de DNA assume são estabilizadas, e só são possíveis, por interações reversíveis com água, íons metálicos e/ou cátions orgânicos. Além disso, uma das mais importantes linhas de desenvolvimento de novos fármacos e de quimioterapias contra alguns tipos de câncer e doenças virais e parasitárias envolve fármacos que interagem reversivelmente com o DNA. Ainda, por causa da sua relativa simplicidade, as interações de pequenas moléculas com o DNA têm fornecido muito das informações sobre especificidade de ligação do DNA, transições conformacionais induzidas por ligantes, a base molecular da cooperatividade na ligação, a interação das cadeias laterais de aminoácidos aromáticos com as bases do DNA, e outros aspectos críticos similares da interação, e química, do DNA [12].

Em relação aos tipos de interações reversíveis entre o DNA e outras moléculas e íons, pode-se dizer que a princípio existem três maneiras distintas: interação eletrostática externa; interação através dos sulcos; e a intercalação (Figura 1.12).

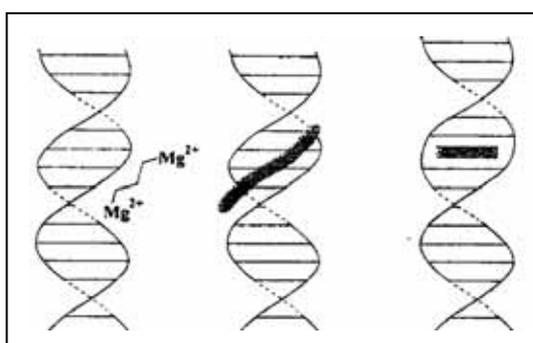


FIGURA 1.12 – Tipos de interações reversíveis entre o DNA e pequenas moléculas [12].

A primeira ocorre ao longo do exterior da dupla hélice do DNA através de interações que geralmente não são específicas e tem origem eletrostática. As interações através dos sulcos envolvem a interação direta do ligante com as bases nitrogenadas, tanto pelo sulco maior quanto pelo sulco menor. Estes sulcos diferem significativamente no potencial eletrostático, nas características das ligações de

hidrogênio, nos efeitos estéricos e na hidratação. Desta forma, muitas proteínas apresentam uma especificidade de ligação primariamente pelo sulco maior, enquanto que pequenas moléculas que interagem pelos sulcos, em geral, preferem o sulco menor do DNA [12].

Os dois primeiros modos de interação não requerem mudanças conformacionais do DNA, mas podem induzir transições estruturais na formação do complexo. Já a intercalação de sistemas de anéis aromáticos planares, ou aproximadamente planares, entre os pares de base requerem mudanças nos ângulos torcionais da cadeia açúcar-fosfato. Estas alterações são necessárias para a separação dos pares de base adjacentes por uma distância suficiente para permitir a inserção do sistema de anéis intercalantes. Isto pode vir acompanhado por outras alterações na dupla hélice, como por exemplo, desenovelamento, dobramento, etc [12].

1.1.3 Interações covalentes com pequenas moléculas

Existem diversas reações possíveis envolvendo moléculas de DNA e moléculas pequenas [12]. Entretanto, em virtude do enfoque deste trabalho apenas as reações de hidrólise das ligações fosfodiéster e de clivagem oxidativa do DNA, mediadas por complexos metálicos, serão comentadas.

1.1.3.1 Hidrólise da ligação fosfodiéster

Como já foi discutido anteriormente, as ligações fosfodiéster são extremamente estáveis em relação à hidrólise espontânea. Assim, para que se possa acelerar a velocidade de sua hidrólise, é necessária uma ativação destas ligações. Os complexos (e íons) metálicos podem acelerar a velocidade da hidrólise através de três modos de ativação direta (esfera interna), e três de ativação indireta (esfera externa), das ligações fosfodiéster [16] (Figura 1.13). Os modos diretos são: ativação por ácido de Lewis (**1**, coordenação do oxigênio do grupo fosfato ao metal), ativação do nucleófilo (**2**, coordenação de um nucleófilo como o hidróxido ao metal) e ativação do grupo de saída (**3**, coordenação do grupo de saída ao metal) [16; 18]. Os grupos hidróxidos e as moléculas de água coordenadas ao metal atuando,

respectivamente, como uma catálise básica (4) ou ácida (5) geral intramolecular, são modos indiretos de ativação. Além destes, a interação eletrostática entre o metal e ésteres de fosfato não coordenados também pode fornecer alguma aceleração para a reação de hidrólise (ativação indireta) [16; 19; 20]. Contudo, de todos estes modos os de ativação direta parecem ser os mais relevantes.

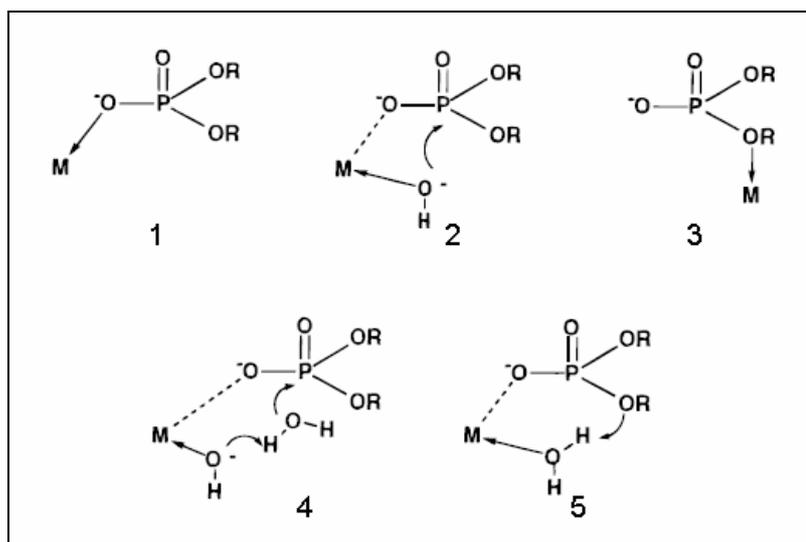


FIGURA 1.13 – Modos diretos (1 – 3) e indiretos (4 – 5) de ativação que um complexo (ou íon) metálico pode fornecer para acelerar a velocidade de hidrólise de ésteres de fosfato [16].

A ativação por ácido de Lewis em complexos metálicos binucleares pode ser simples ou dupla quando os grupos fosfato são coordenados a um ou aos dois centros metálicos, respectivamente (Figura 1.14). Entretanto, a ativação dupla pode resultar numa aceleração da velocidade de reação de hidrólise muito maior, uma vez que a carga negativa é mais bem estabilizada neste caso. Este modo de ativação é possível quando a distância entre os centros metálicos é de 2,9 a 7,0 Å [16].

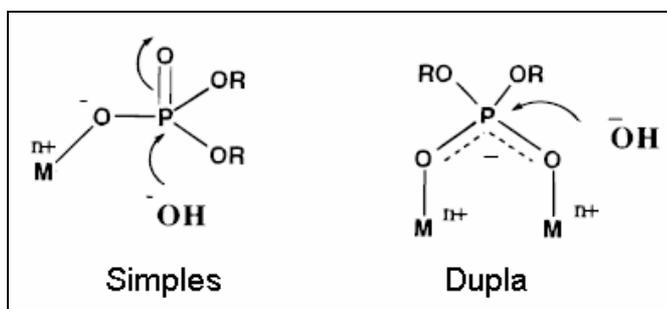


FIGURA 1.14 – Ativação simples e dupla da hidrólise de ésteres de fosfato por ácido de Lewis [16].

Nucleófilos ativados por complexos (ou íons) metálicos, como hidróxido, alcóxido, óxido ponte e peróxido ponte, podem hidrolisar ligações fosfodiéster que possuam grupos de saída bons, mas apenas o hidróxido ativado parece hidrolisar as que possuam grupos de saída ruins. Para os outros nucleófilos serem efetivos é necessário a ativação do grupo de saída [16]. Recentemente Schenk e colaboradores mostraram que para a enzima fosfatase ácida púrpura extraída de batata doce (contendo o centro metálico Fe(III)-Mn(II)) o átomo de oxigênio ponte (μ -hidróxido ou μ -oxo, dependendo do pH) é o nucleófilo na reação de hidrólise do éster de fosfato [21].

Em muitos casos a aceleração da velocidade de hidrólise das ligações fosfodiéster resultante é uma combinação simples (ou uma cooperatividade) dos modos de ativação, como exemplificados na Figura 1.15. Nesta figura também é apresentado um mecanismo hipotético onde poderia ser conseguida uma aceleração na velocidade de hidrólise das ligações fosfodiéster da ordem de 10^{18} vezes, já que seria uma combinação de duas ativações por ácido de Lewis, uma ativação do nucleófilo e uma ativação do grupo de saída [16].

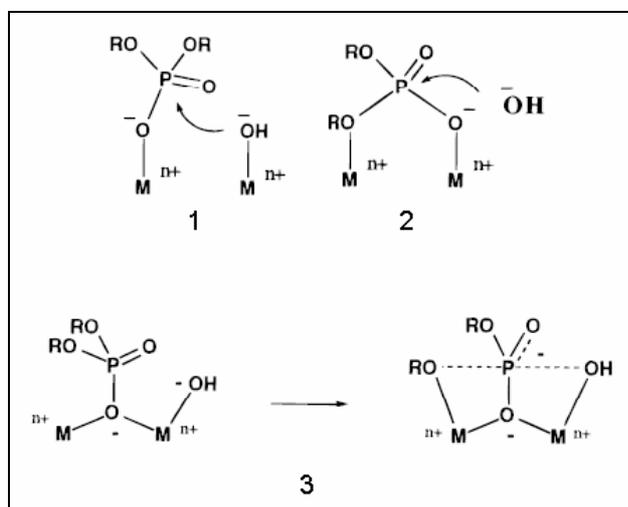


FIGURA 1.15 – Combinação dos modos de ativação que podem levar a aceleração da velocidade de hidrólise das ligações fosfodiéster. **1)** ativação por ácido de Lewis simples / ativação do nucleófilo; **2)** ativação por ácido de Lewis simples / ativação do grupo de saída; **3)** ativação por ácido de Lewis / ativação do nucleófilo / ativação do grupo de saída [16].

Todos os complexos metálicos que podem ser encontrados na literatura com mecanismo hidrolítico para a clivagem de moléculas de DNA se enquadram em algum destes casos descritos [7; 8; 10; 11; 15; 22-44].

Em relação à natureza do centro metálico dos complexos, Hegg e Burstyn descreveram as principais características de um íon metálico idealmente apropriado a promover hidrólise de ligações fosfodiéster [8]. Estas características são a dureza (para ligar átomos de oxigênio do grupo fosfato), a acidez de Lewis (para polarizar tanto os grupos fosfato como o nucleófilo) e a rápida troca de ligante (para garantir o ciclo catalítico).

Desta forma, dentre os íons metálicos que melhor preenchem estes critérios estão os íons de lantanídeos essencialmente trivalentes, Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} e Ce^{4+} . Por outro lado, os íons metálicos que ocorrem mais frequentemente em nucleases naturais são Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Zn^{2+} . Esta “escolha” da natureza se deve, principalmente, por limitação na disponibilidade ambiental. Além disso, a toxicidade dos lantanídeos (em razão da similaridade ao íon Ca^{2+}) e o comportamento redox do íon Cu^{2+} são outras razões para a escolha da natureza.

1.1.3.2 Clivagem oxidativa do DNA

A clivagem oxidativa de moléculas de DNA por complexos metálicos [9; 45-63] basicamente envolve as propriedades redox dos metais e do O_2 para produzir espécies reativas de oxigênio (por exemplo, peróxidos, hidroperóxidos, radical ânion superóxido, etc. e em especial o radical hidroxila), que por sua vez, são as reais responsáveis em oxidar o DNA [46]. Enquanto que as bases heterocíclicas do DNA são importantes alvos para modificações mediadas por radicais livres (que podem levar a quebra da fita do DNA) [64], o esqueleto açúcar-fosfato é também muito vulnerável a este ataque. A abstração de um átomo de hidrogênio da desoxirribose produz um radical centrado no carbono do açúcar que pode sofrer rearranjo, culminando na quebra da fita do DNA [65].

Como as reações destas espécies reativas de oxigênio com moléculas de DNA são inúmeras, e podem ser revistas em trabalhos como o de Burrows e Muller [64] e Pogozelski e Tullius [65], elas não serão aqui descritas.

1.2 Clivagem de DNA por complexos metálicos

Como já foi dito anteriormente, o complexo $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})_2]^+$ foi o primeiro complexo metálico a apresentar uma atividade nucleolítica eficiente. Esta atividade foi descoberta enquanto se estudava o mecanismo de inibição da enzima DNA polimerase I de *E. coli* por 1,10-fenantrolina. Inicialmente, presumiu-se que a inibição por esta molécula seria devido à presença de um íon de zinco cataliticamente essencial no sítio ativo da enzima. Entretanto, estudos subsequentes estabeleceram que a inibição é resultado de uma reação nucleolítica surpreendentemente eficiente envolvendo o complexo $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})_2]^+$ e peróxido de hidrogênio, como um co-reagente [2].

Desde então, inúmeros complexos metálicos têm sido descritos com atividade na clivagem de moléculas de DNA, tanto por mecanismos hidrolíticos [7; 8; 10; 11; 15; 22-44] como por oxidativos [9; 45-63]. O grande interesse nesta linha de pesquisa pode ser notado, inclusive, pelo número de artigos de revisões sobre reconhecimento e hidrólise de DNA por complexos metálicos mono, bi e multinucleares que foram publicados recentemente [7; 8; 10; 11; 15; 16; 66-70]. Entretanto, não é possível fazer uma comparação direta entre a atividade destes complexos, uma vez que há uma grande variação nas condições experimentais utilizadas [10; 66]. Além disso, amostras de diferentes plasmídios comerciais podem diferir no comportamento cinético em razão da quantidade de pares de bases que eles contêm (tamanho) e da sua origem natural [66].

Apesar destes fatos, os complexos $\text{Ce}_2(\text{HXTA})$ [34], Cu^{2+} -neamina [28] e $\text{Fe}_2(\text{DTPB})(\mu\text{-O})(\mu\text{-Ac})\text{Cl}(\text{BF}_4)_2$ [44] são considerados alguns dos complexos mais ativos na clivagem de moléculas de DNA encontrados na literatura. Estes e mais alguns outros exemplos serão descritos a seguir, e estarão subdivididos em dois grupos: os complexos de lantanídeos e os complexos de metais de transição.

1.2.1 Complexos de lantanídeos

Embora os íons hidratados de Ln^{3+} mostrem-se efetivos como agentes de clivagem de DNA, os íons livres possuem a tendência em precipitar da solução na forma de hidróxidos, em torno de $\text{pH} = 9$. Devido a sua similaridade ao íon Ca^{2+} ,

estes compostos são tóxicos para os sistemas biológicos, o que requer a encapsulação dos mesmos no intuito de modular e direcionar sua reatividade [7]. Neste sentido, os compostos mais bem sucedidos incluem bases de Schiff macrocíclicas, ligantes polihidroxílicos, éteres coroa e azacoroas, derivados de poliaminocarboxilatos, derivados de DOTA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-*N,N,N,N*-ácido tetracético), ácidos hidroxâmicos, polissacarídeos, micelas e vários sistemas mistos Ln-M (onde M = metal de transição ou outro Ln³⁺) [7]. Na Figura 1.16 estão representados alguns exemplos destes ligantes utilizados em complexos de lantanídeos com atividade na clivagem de DNA.

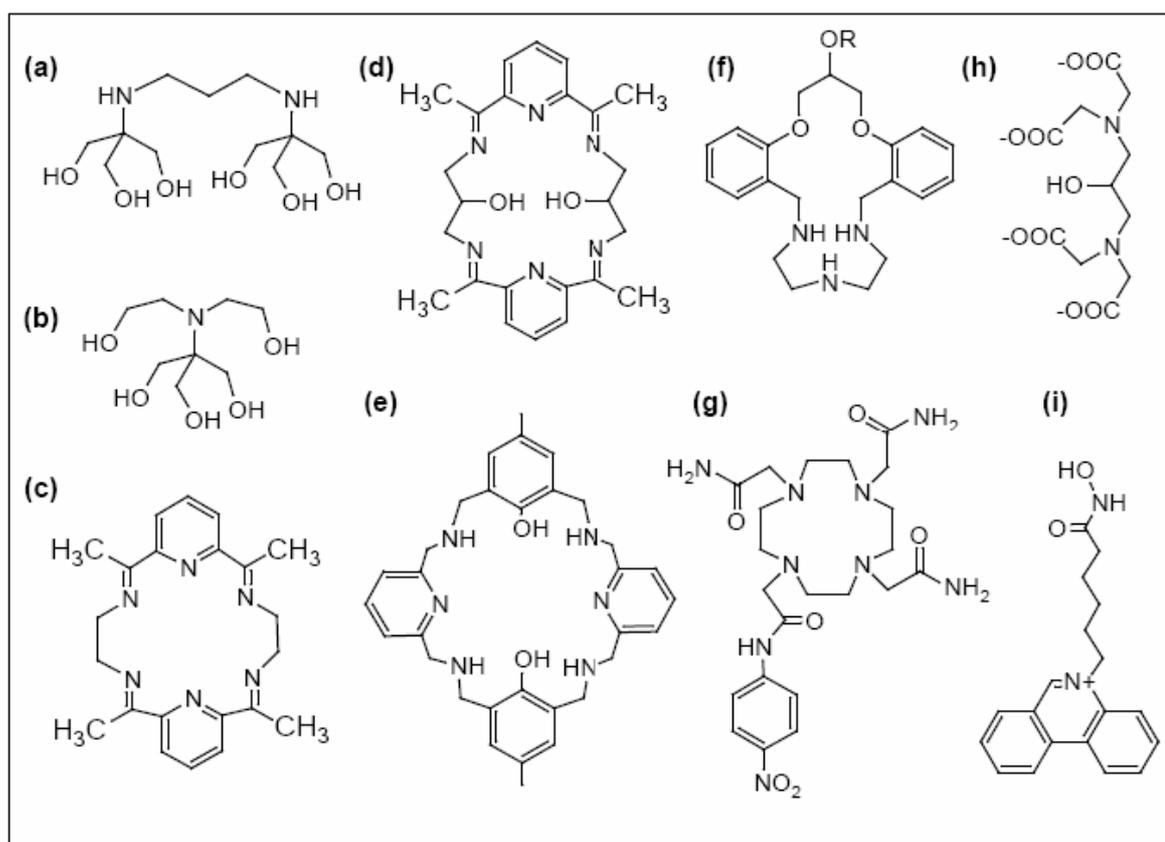


FIGURA 1.16 – Exemplos de ligantes utilizados em complexos de lantanídeos com atividade na clivagem de DNA. (a) BTP; (b) Bis-Tris; (c) base de Schiff macrocíclica de Morrow e colaboradores [71]; (d) base de Schiff macrocíclica de Zhu e colaboradores [72]; (e) composto azacoroa de Martell e colaboradores [73]; (f) esqueleto azacoroa de Janda e colaboradores [74]; (g) ligante DOTA-amida de Akkaya e colaboradores [75]; (h) ligante poliaminocarboxilato de Branun e Que [30]; (i) ligante intercalativo unido ao ácido hidroxâmico [76]. Figura adaptada de Franklin [7].

Branun e Que [34] mostraram a grande eficiência do complexo Ce₂(HXTA) (onde HXTA = 5-metil-2-hidroxil-1,3-xileno- α,α -diamina-*N,N,N,N*-ácido tetracético – Figura 1.17) na clivagem hidrolítica de moléculas de DNA. A uma concentração de 10 μ M, pH = 8 e 37 °C, o complexo cliva um DNA plasmidial com uma constante de

velocidade de $1,4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, o que corresponde a uma meia vida de 1,4 horas. Foi mostrado também que o complexo causa um corte de fita dupla para dez cortes de fita simples, indicando que a forma linear do DNA plasmidial que é gerada não é resultado de dois eventos de cortes de fita simples aleatórios. Apesar do rendimento dos produtos lineares serem baixos ($\sim 20\%$), o complexo apresentou alta regioesletividade, gerando produtos com os terminais 5'-OPO₃ e 3'-OH com alto rendimento ($> 90\%$), como os produtos de enzimas que hidrolisam o DNA.

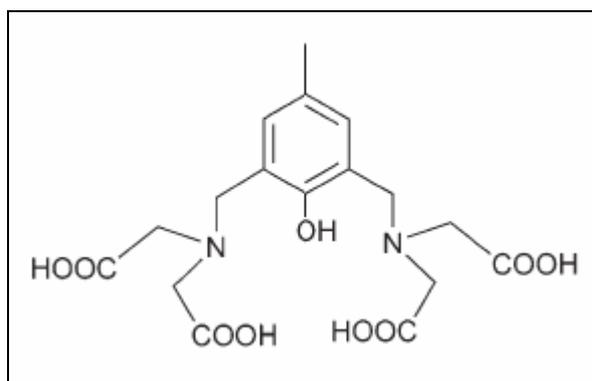


FIGURA 1.17 – Estrutura do ligante HXTA.

1.2.2 Complexos de metais de transição

Em razão de suas propriedades redox, complexos de cobre (II) tem sido usados frequentemente no desenvolvimento de agentes para clivagem oxidativa do DNA [9; 45-59]. Entretanto, há vários exemplos de complexos de cobre (II) que clivam DNA por um mecanismo hidrolítico [22-28; 42], sendo que o primeiro deles, $[\text{Cu}([\text{9}]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2]$ (onde $[\text{9}]\text{aneN}_3 = 1,4,7\text{-triazaciclononano}$ – Figura 1.18 A), foi publicado por Hegg e Burstyn em 1996 [22].

Foi mostrado que o complexo $[\text{Cu}([\text{9}]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2]$ é capaz de clivar tanto DNA fita simples como DNA fita dupla, e que $25 \mu\text{M}$ do complexo cliva um DNA superenovelado, a 50°C e $\text{pH} = 7,8$, com uma constante de velocidade estimada de $1,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Experimentos em condições anaeróbicas mostraram que a atividade na ausência de oxigênio é reduzida em 30% , indicando a ocorrência simultânea de uma clivagem hidrolítica preferencial e de uma clivagem oxidativa [22].

Cowan e colaboradores mostraram a eficiente clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu^{2+} -neamina, onde neamina é um aminoglicosídeo natural (Figura 1.18 B) [28]. Neste caso foi observado uma constante de velocidade máxima de $5,2$

$.10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e uma constante de ligação ao DNA de $2,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. A alta afinidade do complexo pelo DNA foi atribuída a forte ligação do ligante aminoglicosídeo carregado positivamente: aparentemente isto torna o sistema muito eficiente mesmo em concentrações baixas (o tempo de meia vida para a forma superenovelada, na presença de $25 \text{ }\mu\text{M}$ do complexo, é de 26 minutos). A clivagem de DNA não foi inibida pela presença de captadores de radicais livres e nem pela realização de reações em condições anaeróbias. Estes fatos evidenciam claramente um mecanismo de clivagem hidrolítico, além de também ter sido identificado a geração de terminais 5'-OPO₃ e 3'-OH.

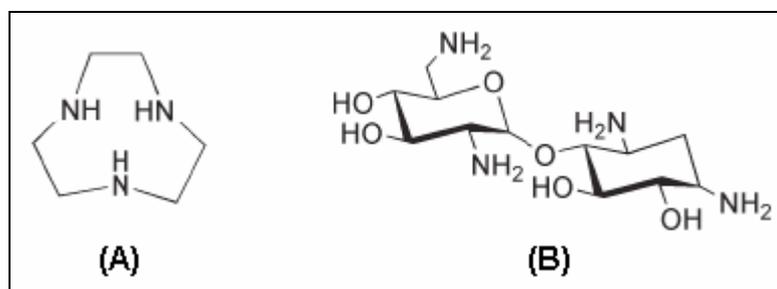


FIGURA 1.18 – Estrutura do ligante [9]aneN₃ (A) e da neamina (B).

Sistemas para hidrólise de DNA por complexos bi e multinucleares de Fe³⁺ são relatados frequentemente [10]. O complexo binuclear Fe₂(HPTB)(OH)(NO₃)₄ (HPTB = *N,N,N',N'*-tetrakis(2-benzimidazolilmetil)-2-hidroxi-1,3-diaminopropano – Figura 1.19 A) foi publicado inicialmente por Que e colaboradores, mostrando ser capaz de clivar DNA plasmidial por um mecanismo “hidrolítico” na presença de H₂O₂ ou O₂ e um redutor (ditiotreitól (DTT) ou ascorbato) [43]. A linearização do plasmídeo superenovelado por este complexo não foi inibida pela presença de captadores de radical hidroxila. Por outro lado, foram identificados os terminais 5'-OPO₃ e 3'-OH, e o DNA linearizado foi religado eficientemente pela enzima T4 DNA ligase. Os autores propõem um mecanismo pelo qual há um ataque nucleofílico à ligação fosfodiéster por um peróxido ligado ao centro metálico do complexo [43].

O complexo Fe₂(DTPB)(μ-O)(μ-Ac)Cl(BF₄)₂ (onde DTPB = 1,1,4,7,7-penta(2'-bezimidazol-2-ilmetil)-trizaheptano e Ac = acetato – Figura 1.19 B) descrito por Liu e colaboradores apresenta um dos maiores fatores de aumento de velocidade conhecidos, $\sim 10^{10}$ contra DNA superenovelado [44]. A clivagem de DNA (tanto para o DNA fita dupla superenovelado, como para o linear) foi independente da presença

de O_2 , não havendo a necessidade de co-reagente (como H_2O_2) e o DNA linearizado pôde ser religado, confirmando, assim, a ocorrência de um mecanismo hidrolítico. O complexo apresentou uma constante de afinidade alta pelo DNA plasmidial ($1 \cdot 10^5 M^{-1}$), provavelmente relacionada a carga altamente positiva da sua estrutura bimetalica. Os dados espectroscópicos sugeriram que o modo de ligação entre o complexo $Fe_2(DTPB)(\mu-O)(\mu-Ac)Cl(BF_4)_2$ e o DNA deve ser pela coordenação dos oxigênios do esqueleto de fosfato do DNA pelos dois íons de Fe^{3+} . Este modo de ligação leva a uma clivagem hidrolítica com uma pobre especificidade de seqüência.

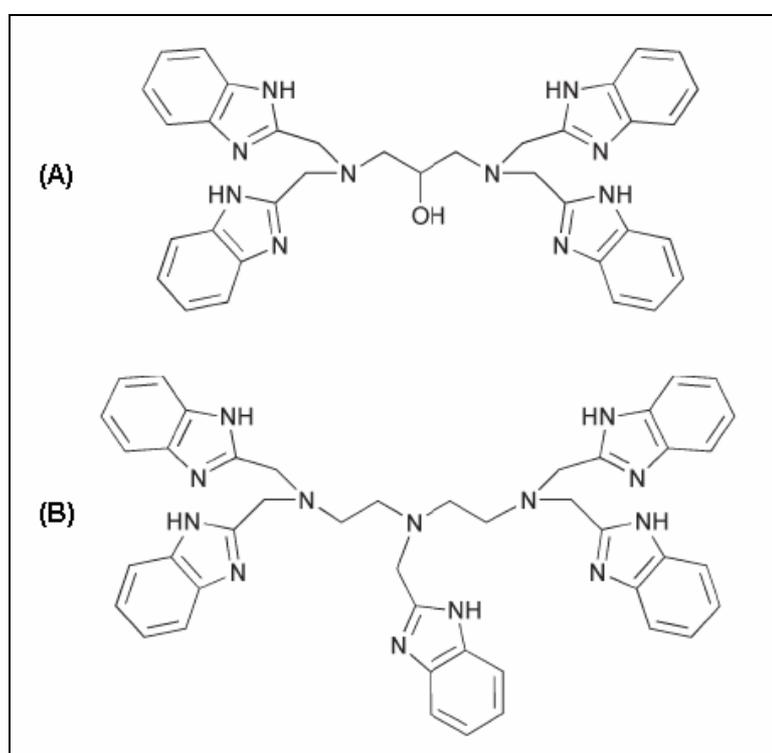


FIGURA 1.19 – Estrutura do ligante HPTB (A) e do ligante DTPB (B).

O nosso grupo de pesquisa também tem contribuído com este tipo de trabalho [32; 36-41]. Um exemplo que vale ser destacado é o do complexo $[Fe_2^{3+}(BPCINOL)_2(H_2O)_2]^{2+}$ (Figura 1.20 A – onde BPCINOL = *N*-(2-hidroxilbenzil)-*N*-(piridilmetil)[(3-cloro)(2-hidroxil)]propilamina), que apesar de não possuir atividade sobre os substratos ativados 4-nitrofenil fosfato e bis(2,4-dinitrofenil) fosfato, o complexo foi efetivo na hidrólise de moléculas de DNA [32]. Neste estudo é proposta uma interação do complexo com o sulco maior do DNA, o que resultaria numa geometria favorável à hidrólise da molécula, a qual não ocorreria com o substrato modelo (Figura 1.20 B) [32].

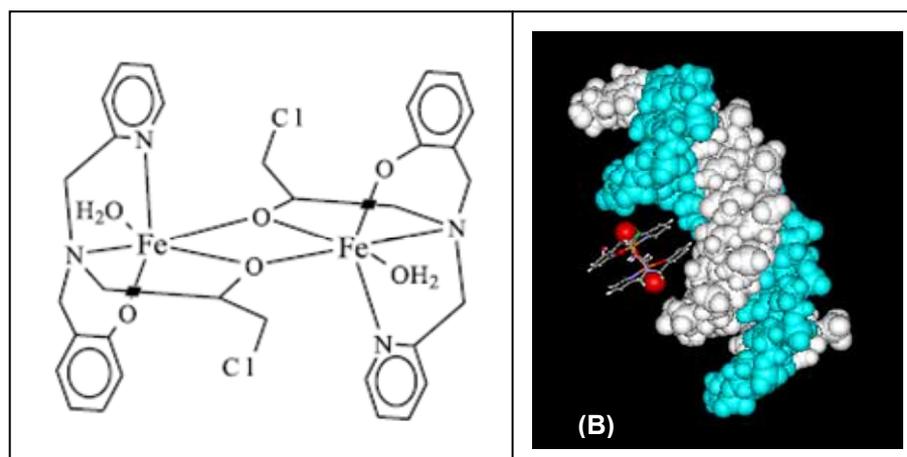


FIGURA 1.20 – Estrutura do complexo $[Fe_2^{3+}(BPCINOL)_2(H_2O)_2]^{2+}$ (A); modelagem molecular da interação do complexo $[Fe_2^{3+}(BPCINOL)_2(H_2O)_2]^{2+}$ com o sulco maior do DNA [32] (B).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar a interação dos complexos Cu₂BMXD, CuMFF e Cu₂L-X com moléculas de DNA.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a capacidade dos complexos Cu₂BMXD, CuMFF e Cu₂L-X de clivar moléculas de DNA.
- Determinar o efeito do tempo e da temperatura de incubação, da concentração do complexo e do pH da solução na reação de clivagem de DNA pelos complexos Cu₂BMXD, CuMFF e Cu₂L-X.
- Determinar o efeito da luz de uma lâmpada de tungstênio na reação de clivagem de DNA pelos complexos Cu₂L-X.
- Determinar o efeito de captadores de radicais livres (DMSO e glicerol), da distamicina (ligante do sulco menor do DNA) e da batocuproína (seqüestrador de Cu⁺) na reação de clivagem de DNA pelos complexos Cu₂BMXD, CuMFF e Cu₂L-X.
- Determinar o efeito do O₂ na clivagem de DNA pelos complexos Cu₂BMXD, CuMFF e Cu₂L-X, através da realização de reações em condições aeróbias e anaeróbias.
- Determinar a constante de ligação intrínseca ao DNA para os complexos Cu₂BMXD, CuMFF e Cu₂L-X, através de titulação espectrofotométrica.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Complexos metálicos em estudo

3.1.1 Cu₂BMXD

Cu₂BMXD é a representação que será utilizada durante este trabalho para identificar o complexo [Cu₂(BMXD)]⁴⁺ (Figura 3.1), onde BMXD representa o ligante poliaza macrocíclico 3,6,9,17,20,23-hexaazatriciclo[23.3.1.1^{11,15}]-triaconta-1(29),11(30),12,14,25,27-hexano que foi primeiramente sintetizado em 1990 por Menif e colaboradores [77]. Este ligante consiste de um macrociclo formado por dois grupos dietilenotriamina, separados por duas pontes m-xilil, e é capaz de formar um complexo mono ou binuclear de Cu(II) através da coordenação, de cada centro metálico, por três átomos de nitrogênio dos grupos dietilenotriamina [77]. Desta forma, deixando sítios de coordenação livres que, em meio aquoso, podem ser ocupados por H₂O, HO⁻ ou substratos aniônicos [77-79], alguns deles com relevância biológica [80-82]. Mais recentemente, foi mostrado que Cu₂BMXD pode também formar um complexo com o dipeptídeo glicilglicina [83]. Foi demonstrado anteriormente que Cu₂BMXD tem afinidade por ATP e é capaz de convertê-lo em ADP e ortofosfato [84]. Em virtude da sua capacidade de interação com diferentes ânions e da sua atividade na conversão de ATP em ADP o complexo Cu₂BMXD tornou-se um interessante candidato para os estudos de clivagem de moléculas de DNA.

O complexo Cu₂BMXD foi sintetizado, e cedido para este estudo, por Gledir T. Stein Martins [83] do grupo do Prof. Dr. Bruno Szpoganicz, Laboratório de Equilíbrio Químico da UFSC.

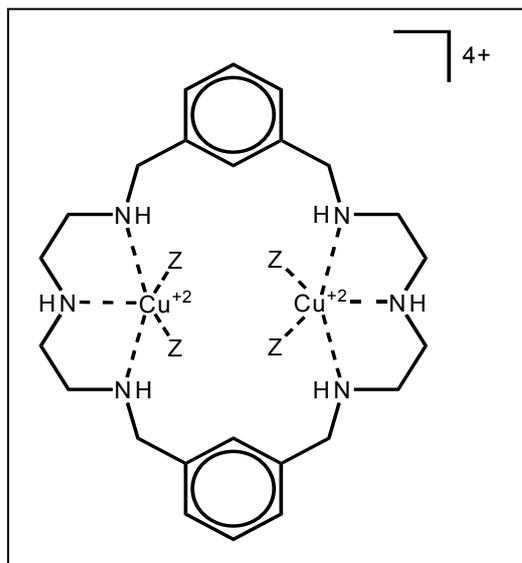


FIGURA 3.1 – Representação do complexo macrocíclico Cu_2BMXD , onde Z = solvente ou substratos aniônicos.

3.1.2 CuMFF

CuMFF é a representação que será utilizada durante este trabalho para identificar o complexo $[\text{Cu}(\text{MFF})(\text{Cl}_2)] \cdot \text{H}_2\text{O}$, onde MFF representa o ligante 2-[(bis(piridilmetil)amino)metil]-4-metil-6-formilfenol (Figura 3.2). CuMFF é um complexo mononuclear de cobre (II) que foi sintetizado como modelo de uma fosfatase pelo grupo do Prof. Dr. Ademir Neves, Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia da UFSC [85]. Em solução aquosa o complexo apresenta dois pK_a 's ($\text{pK}_{a1} = 5,75$ e $\text{pK}_{a2} = 9,23$), sendo o primeiro atribuído ao grupo fenol, enquanto que o segundo é atribuído à molécula de água coordenada ao cobre (Figura 3.3). A única, entre as três estruturas apresentadas, que ainda não foi totalmente caracterizada é a **3**, que provavelmente resulta da substituição da molécula de água (estrutura **2**) por um grupo hidróxido. A curva de distribuição de espécies e as estruturas obtidas por difração de raios-x para as espécies **1** e **2** estão apresentadas no anexo **B** [85]. No mesmo trabalho onde foi apresentada a síntese e a caracterização deste complexo também foi mostrado, por nosso grupo, a sua atividade na clivagem hidrolítica das proteínas BSA e *Taq* DNA polimerase [85].

O fato de ter sido sintetizado como modelo de uma fosfatase foi a razão fundamental que levou o complexo CuMFF a ser testado na clivagem de moléculas de DNA.

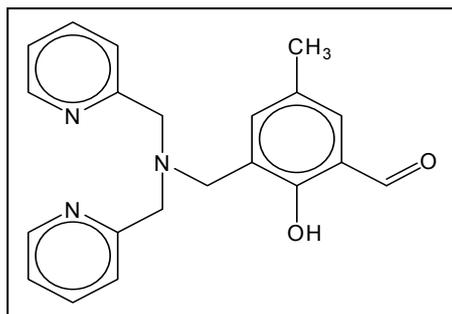


FIGURA 3.2 – Estrutura química do ligante MFF.

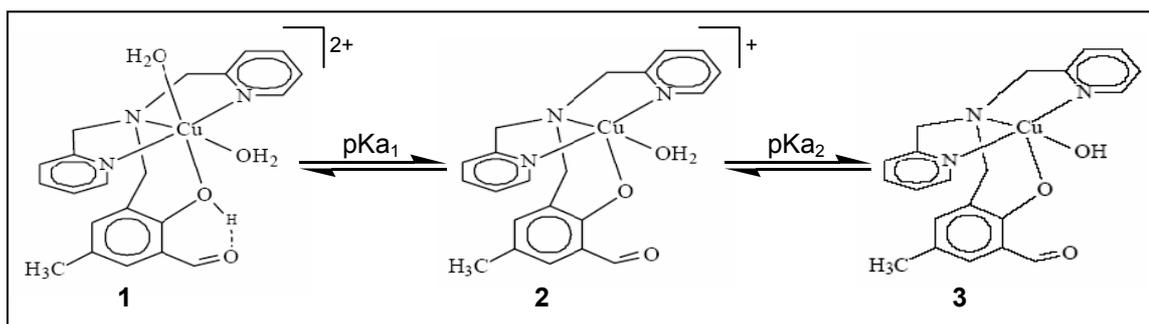


FIGURA 3.3 – Proposta para os equilíbrios observados para as espécies **1**, **2** e **3** do complexo CuMFF, em solução aquosa.

3.1.3 Cu₂L-X

A sigla Cu₂L-X se refere aos três complexos binucleares de cobre (II) [Cu₂(L-dtb)(μ-OCH₃)](ClO₄)₂, [Cu₂(L-H)(μ-OAc)(ClO₄)](ClO₄).H₂O e [Cu₂(L-NO₂)(μ-OAc)(H₂O)(ClO₄)], que por sua vez serão representados neste trabalho como Cu₂L-dtb, Cu₂L-H e Cu₂L-NO₂, respectivamente. Estes complexos foram sintetizados por Rosely A. Peralta (durante a realização de sua tese de doutorado no grupo do Prof. Dr. Ademir Neves, Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia da UFSC) inicialmente como modelos estruturais e/ou funcionais para o sítio ativo das catecol oxidases [86]. Os ligantes H₂L-dtb, H₂L-H e H₂L-NO₂ (respectivamente para os complexos Cu₂L-dtb, Cu₂L-H e Cu₂L-NO₂), onde H₂L-H = 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-*N*-[(2-piridilmetil)(2-hidróxibenzil)aminometil]fenol, diferenciam-se por substituições no anel fenólico terminal, como representado na Figura 3.4.

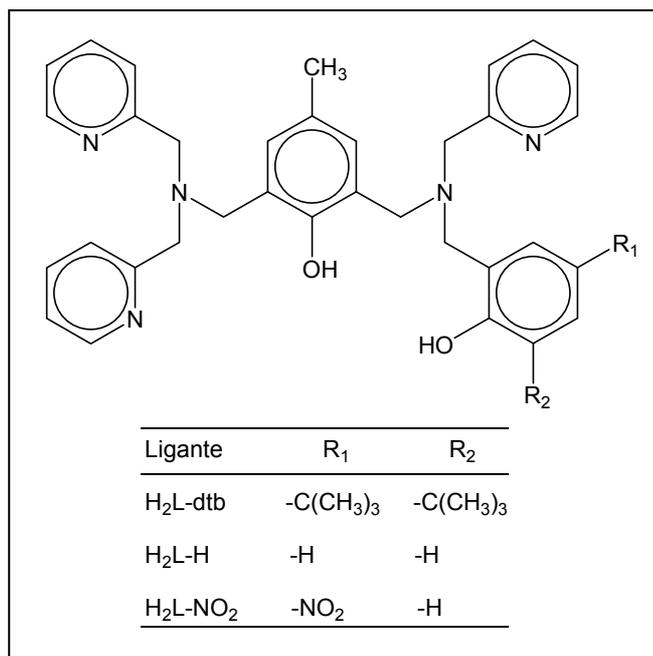


FIGURA 3.4 – Estrutura química dos ligantes dos complexos Cu₂L-X.

As estruturas dos três complexos já foram resolvidas por difratometria de raios-x, e são apresentadas no anexo C [86]. Para o complexo Cu₂L-dtb foram obtidas estruturas tanto para a espécie com o anel fenólico protonado, como para a espécie desprotonada. Uma representação das estruturas destes complexos é apresentada na Figura 3.5.

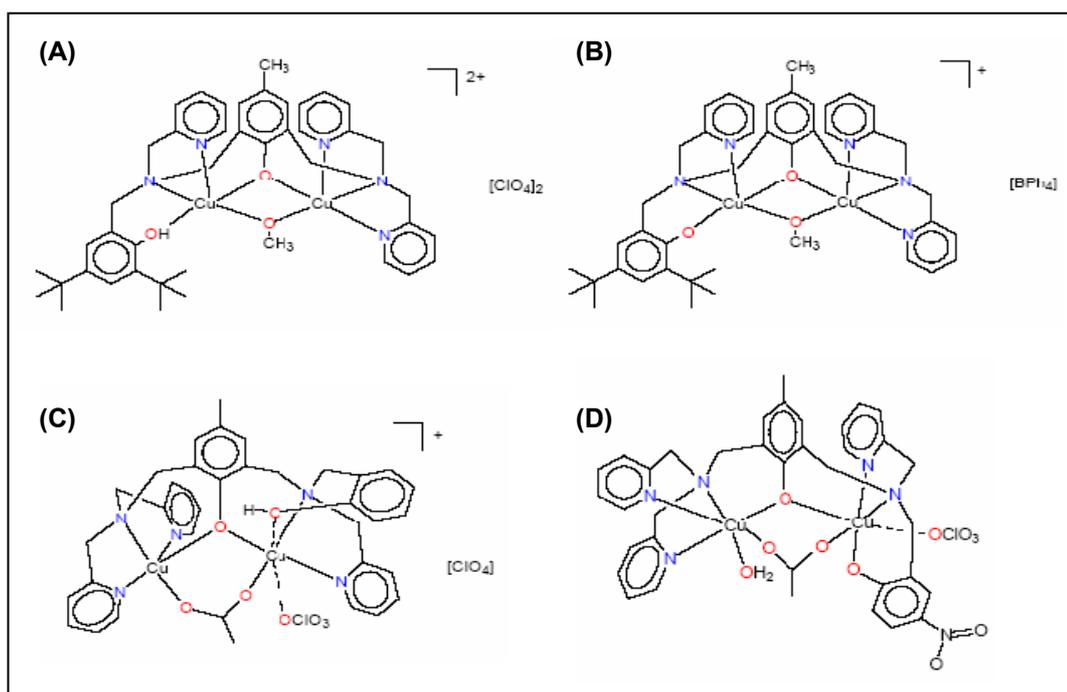


FIGURA 3.5 – Representação da estrutura química dos complexos Cu₂L-X: (A) Cu₂L-dtb protonado; (B) Cu₂L-dtb desprotonado; (C) Cu₂L-H; (D) Cu₂L-NO₂ [86].

Em solução, os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ apresentam três pK_a 's, cujos valores são apresentados na Tabela 3.1 (as curvas com as distribuições das espécies são apresentadas no anexo **D** [86]). A primeira constante foi atribuída à desprotonação do grupo fenol terminal, visto que os pK_a 's sofrem influência do efeito do substituinte. A segunda constante foi atribuída à formação de uma espécie contendo uma ponte do tipo hidróxido entre os centros metálicos, após a hidrólise dos grupos ponte. Finalmente, a terceira constante foi atribuída à desprotonação de uma molécula de água coordenada ao centro de Cu(II) [86]. A Figura 3.6 apresenta um esquema com os equilíbrios propostos por Peralta para os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ [86].

TABELA 3.1 – Valores de pK_a determinados para os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ [86].

| Complexo | pK_a_1 | pK_a_2 | pK_a_3 |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ | 5,23 | 5,94 | 7,59 |
| $\text{Cu}_2\text{L-H}$ | 4,81 | 5,93 | 7,60 |
| $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ | 4,70 | 5,94 | 7,56 |

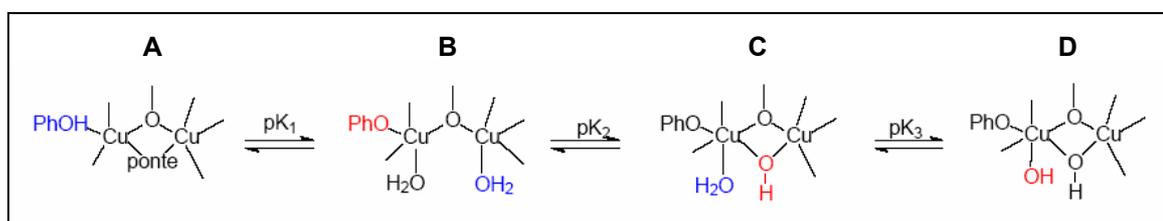


FIGURA 3.6 – Esquema da proposta para os equilíbrios observados para os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ [86].

O interesse no estudo da clivagem de moléculas de DNA pelos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ vem do fato de que $\text{H}_2\text{L-H}$ é o mesmo ligante dos complexos $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Ni}^{\text{II}}(\text{L-H})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$ e $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L-H})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$. Estes complexos foram sintetizados como modelos para as fosfatases ácidas púrpuras e, em trabalhos realizados por nosso grupo, foi mostrado que ambos interagem com moléculas de DNA [38; 40]. O complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{L-H})(\text{OAc})_2]\text{ClO}_4$, inclusive, mostrou ser ativo na clivagem hidrolítica de DNA plasmidial mesmo em concentrações tão baixas quanto $2,5 \mu\text{M}$ [40].

3.2 DNA plasmidial

Neste trabalho foi utilizado como modelo de molécula de DNA o plasmídeo pBluescript[®] II SK(+), Stratagene. Este plasmídeo é derivado do pUC19, possui 2961 pares de bases e contém um gene que confere resistência à ampicilina (Figura 3.7).

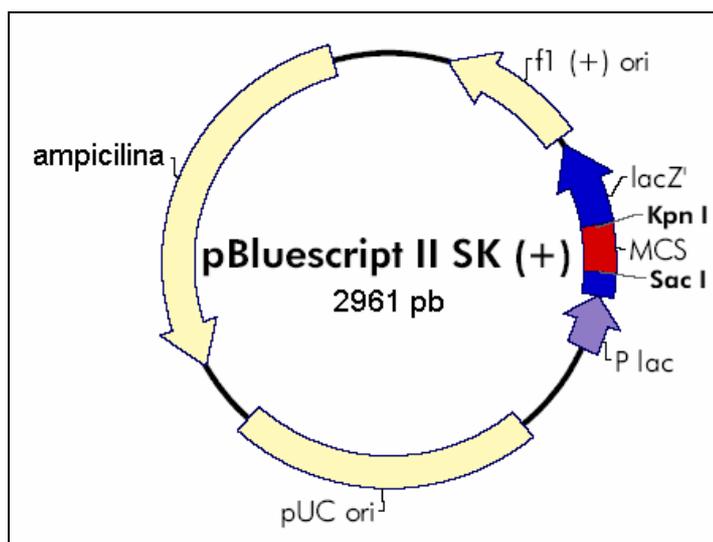


FIGURA 3.7 – Mapa do plasmídeo pBSK-II.

Plasmídios são pequenas moléculas circulares de DNA fita dupla (em geral alguns milhares de pares de bases), extracromossomais e replicados independentemente do cromossomo, presentes (uma ou mais cópias) em muitas bactérias, mas também encontrados em alguns organismos eucarióticos unicelulares como leveduras e outros fungos [13]. Na natureza, alguns plasmídios conferem resistência a toxinas e antibióticos no ambiente. São facilmente extraídos intactos de bactérias, e podem ser geneticamente modificados, ou seja, é possível extrair, modificar e clonar genes através de técnicas de biologia molecular [13].

As moléculas de DNA no interior das células estão altamente compactadas para ocupar o menor espaço possível, desta maneira o DNA plasmidial se encontra numa forma onde o eixo da dupla hélice do DNA está enrolado ao redor de si mesmo, gerando uma nova hélice, chamada super-hélice. Esta conformação também é usualmente chamada de superenovelada (forma I, ou simplesmente **F I**). Na Figura 3.8 é mostrada uma representação esquemática do eixo da molécula de

DNA ao redor de si mesma, e também micrografias eletrônicas de moléculas de DNA circular e com diferentes graus de superenovelamento.

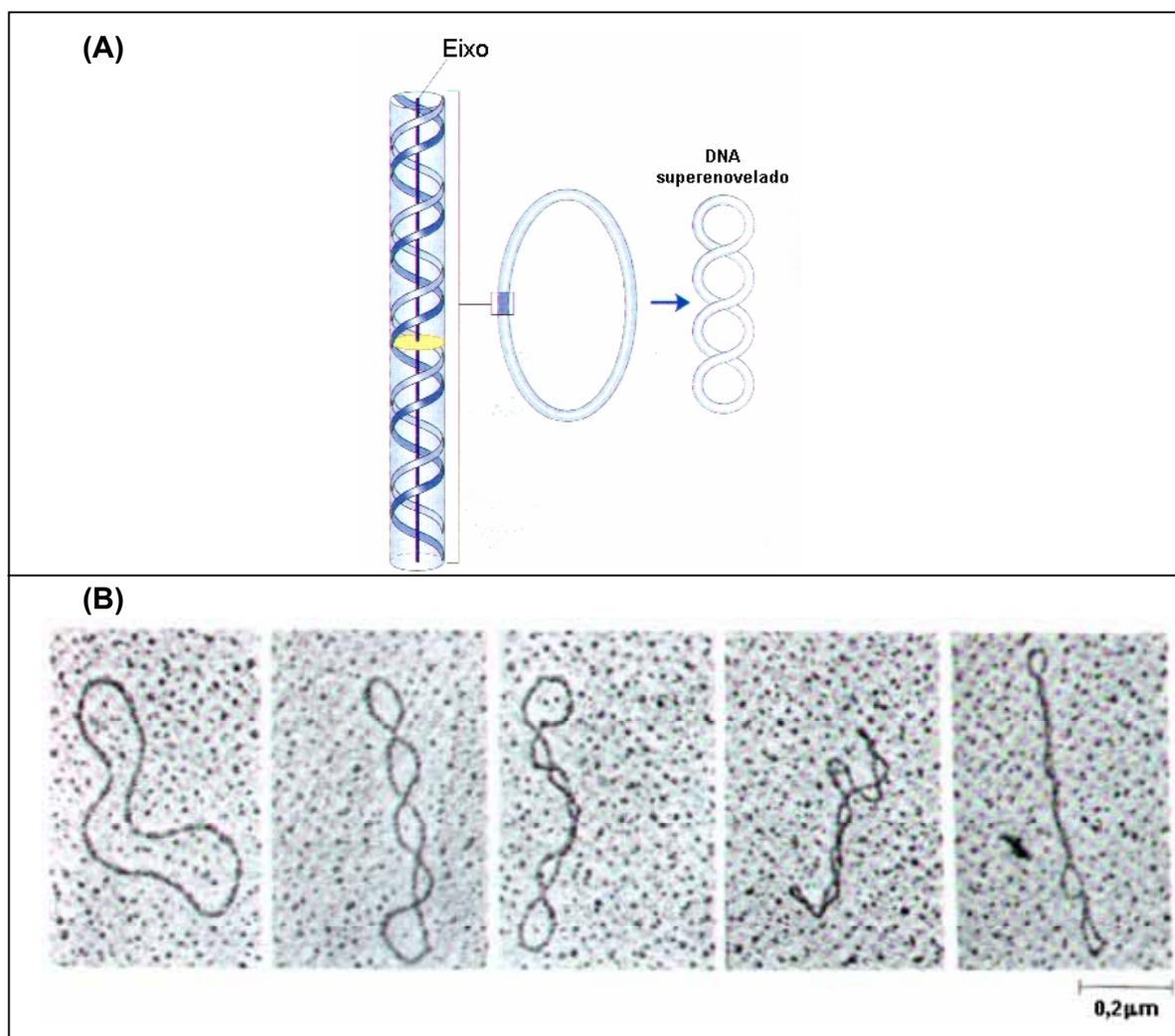


FIGURA 3.8 – Superenovelamento do DNA (A) Representação esquemática do enrolamento do eixo da molécula de DNA ao redor de si mesma; (B) Micrografias eletrônicas de moléculas de DNA circular (mais a esquerda) e com diferentes graus de superenovelamento (em direção à direita) [13].

3.3 Esterilização dos materiais e soluções

Todos os materiais utilizados neste estudo, como ponteiras, tubos plásticos (microtubos e tubos tipo “Falcon”), frascos de vidro e placas de petri foram esterilizados em autoclave vertical (modelo AV 75, Phoenix equipamentos científicos) por 15 minutos a 120°C e pressão de 1 kgf/cm². As soluções utilizadas também foram esterilizadas em autoclave (meios de cultura) ou por filtração

(tampões) com filtros Millex[®] GV, Millipore (membrana de PVDF hidrofílica de baixa ligação, 0,22 μm de tamanho de poro).

A água utilizada no preparo de todas as soluções utilizadas neste trabalho foi obtida de um sistema de ultrapurificação de água Simplicity[®], Millipore. Este sistema produz água ultrapura do tipo I ASTM, com resistividade de 18,2 M Ω .cm a 25°C e quantidade de carbono orgânico total (COT) de 15 ppb.

Todos os tampões utilizados neste trabalho foram adquiridos exclusivamente da SIGMA e com pureza para biologia molecular (livre de DNase, RNase e protease). Os demais reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos de fontes comerciais e utilizados sem purificação prévia, com exceção da distamicina, da batocuproína e do DNA de timo de bezerro (CT-DNA – “*Calf Thymus DNA*”) que também foram adquiridos exclusivamente da SIGMA.

Toda a manipulação de bactérias foi realizada em condições estéreis em uma capela de fluxo laminar modelo VLFS-12, Veco.

3.4 Preparação de bactérias competentes

A metodologia empregada é baseada no protocolo descrito por Ausubel [87], e tem por finalidade tornar cepas bacterianas capazes de incorporar facilmente fragmentos de DNA, através de tratamento químico. A cepa utilizada neste trabalho foi a *E. coli* DH5 α .

Foram inoculados 4 ml de uma cultura de bactéria pré-crescida durante a noite a 37°C, em 50 ml de meio LB líquido (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1% em pH = 7,5). Esta cultura foi incubada a 37 °C, sob agitação (140 rpm), até atingir $A_{590} = 0,4$ (aproximadamente 18 horas). A cultura foi então dividida em alíquotas, em microtubos, e mantida no gelo por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados 7 minutos a 1600 g e 4°C. O sobrenadante foi desprezado por inversão e foram adicionados ao precipitado 10 ml de solução de CaCl₂ gelado (CaCl₂ 60 mM, glicerol 15%, tampão PIPES 10 mM pH = 7,0). Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1600 g e 4°C, em seguida o sobrenadante foi descartado e foram adicionados mais 10 ml de solução de CaCl₂ ao precipitado, mantendo-se no gelo por 30 minutos. Os tubos foram novamente centrifugados por 5 minutos a 1600 g e 4°C, em seguida o sobrenadante foi descartado. As células

bacterianas foram suspensas em 1,5 ml de solução de CaCl_2 , sendo divididas em alíquotas de 150 μl e congeladas em freezer a -80°C , para posterior uso.

3.5 Transformação de bactérias

Esta metodologia também é baseada em protocolo descrito por Ausubel [87], e tem por objetivo introduzir o plasmídeo desejado nas bactérias competentes, através de choque térmico. Com isso, se obtém, em placas de petri com meio sólido, colônias de bactérias transformadas.

As bactérias competentes e o plasmídeo desejado foram retirados do freezer -80°C e descongelados em banho de gelo. Foram transferidos 10-100 ng do plasmídeo para um tubo com 50 μl de bactérias. Este foi deixado no gelo por 15 minutos sendo, em seguida, transferido para um banho a $37-42^\circ\text{C}$ por 1 minuto. Após ser adicionado 1 ml de meio LB líquido, o tubo foi deixado por 1 hora em estufa a 37°C . Este foi então centrifugado por 2 minutos a 5000 g, para retirada de 750 μl do sobrenadante. As bactérias foram suspensas com o restante da solução e transferidas para uma placa de petri com meio LB sólido (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, agar 1,5% em pH = 7,5) e ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$ de meio LB – antibiótico utilizado para a seleção das bactérias portadoras do plasmídeo). Com auxílio de uma alça de vidro, a solução foi espalhada pela placa e esta levada para estufa a 37°C com a tampa para cima, por 1 hora. Após este período, a placa foi virada com a tampa para baixo e deixada em incubação durante a noite, para crescimento das bactérias. Por fim, a placa foi armazenada em geladeira por no máximo 10 dias (sendo que ao término deste período é necessário repicar a placa ou fazer nova transformação).

3.6 Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi realizada com o kit comercial HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN, seguindo protocolo padrão do fabricante [88]. A Figura 3.9 mostra um esquema das etapas do processo de purificação de DNA plasmidial utilizando-se o referido kit.

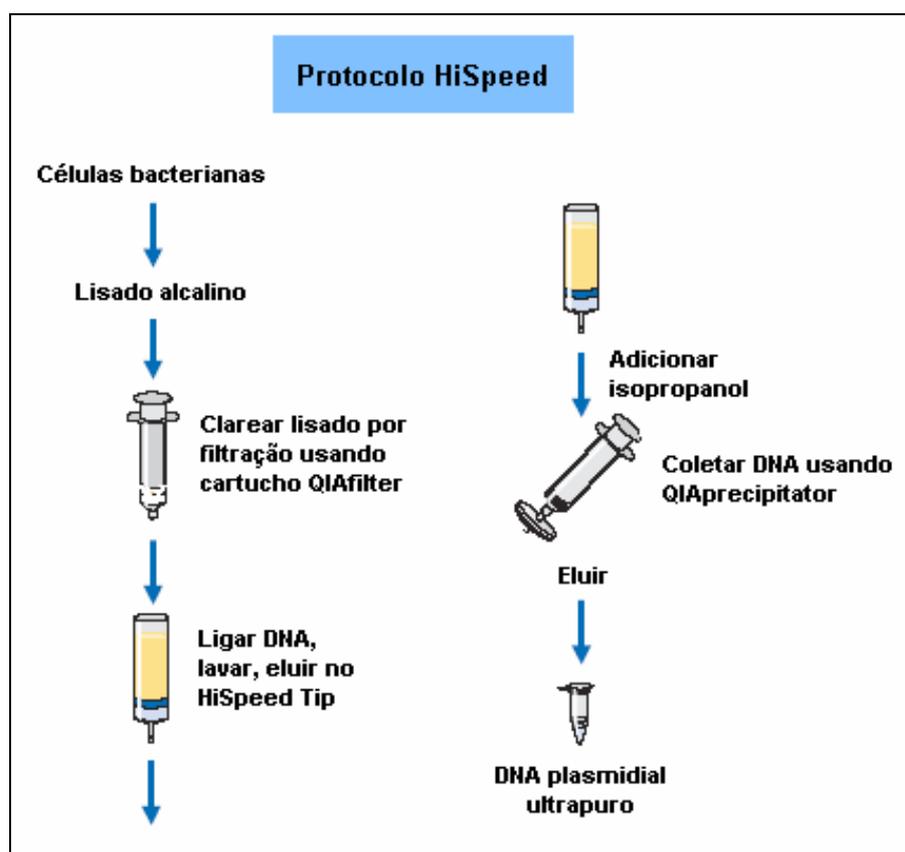


FIGURA 3.9 – Esquema representativo do princípio do método utilizado pelo kit comercial HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN [88].

3.7 Quantificação e pureza do DNA plasmidial

A concentração de ácidos nucleicos na solução pode ser facilmente calculada a partir da absorvância a 260 nm. Entretanto, existe uma faixa de A_{260} onde esta leitura é reprodutível e, conseqüentemente, leva a resultados confiáveis. A Figura 3.10 mostra um gráfico com o desvio padrão das leituras de A_{260} para diversas diluições de uma solução de DNA [88]. Pode ser notado neste gráfico que as leituras de A_{260} entre 0,1 e 1,0 são bem reprodutíveis. Por outro lado, as leituras $<0,1$ e $>1,0$ não apresentam boa reprodutibilidade. Além disso, as leituras acima de 3,0 estão incorretas, o que, potencialmente, pode levar a uma quantidade de DNA subestimada [88]. Portanto, para a realização de uma quantificação de DNA confiável, as medidas de A_{260} devem estar entre 0,1 e 1,0. Para se determinar a concentração de quantidades pequenas de DNA, a quantificação por eletroforese em gel de agarose pode ser mais confiável [88].

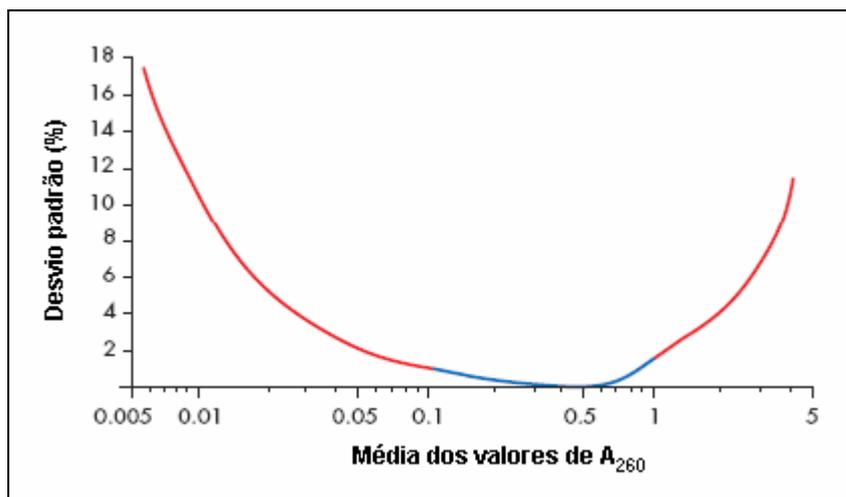


FIGURA 3.10 – Confiabilidade das leituras de A_{260} . As leituras de A_{260} foram tomadas de diluições seriais de um DNA plasmidial. Para cada amostra a porcentagem de desvio padrão foi plotado contra a média de 4 valores de A_{260} . A região azul da curva representa a faixa de leitura de A_{260} que é mais reprodutível (0,1 – 1,0). A região vermelha representa leituras de A_{260} com alto desvio padrão [88].

A concentração de DNA é determinada utilizando-se $\varepsilon = 2 \cdot 10^{-2} \text{ ml} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, que é um valor médio das absorvidades das bases do DNA em 260 nm [87].

Concomitantemente à determinação da concentração, foi feita uma avaliação da pureza do DNA plasmidial obtido, onde os principais contaminantes são RNA e proteínas (absorve em 280nm). Esta avaliação é feita através do valor da relação A_{260}/A_{280} , onde valores entre 1,8 e 1,9 indicam uma solução de DNA com alta pureza [87].

Todas as medidas espectrofotométricas para a quantificação e pureza do DNA plasmidial, como os espectros eletrônicos obtidos para os complexos em estudo, foram realizadas num espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences.

3.8 Estudos com moléculas de DNA

3.8.1 Clivagem de DNA

A metodologia empregada na avaliação da clivagem, ou quebra das fitas, de moléculas de DNA se baseia em duas propriedades das diferentes formas do DNA plasmidial. Primeiramente, o superenovelamento faz com que a molécula de DNA esteja tensionada e que ao sofrer um corte em uma das fitas tenda a perder esta tensão, “desenrolando” a super-hélice e passando para a forma circular aberta

(forma II ou **F II** – Figura 3.11A). Um segundo corte, mas agora na fita oposta, leva à abertura do DNA circular gerando a forma linear do plasmídeo (forma III ou **F III** – Figura 3.11A). Em segundo lugar, as três diferentes formas do DNA plasmidial (**F I**, **F II** e **F III**) apresentam mobilidades distintas umas das outras numa eletroforese em gel de agarose. Esta distinção de mobilidade ($F I > F III > F II$), devido ao diferente grau de compactação das moléculas, torna possível a completa separação, e posterior quantificação, das formas do DNA plasmidial.

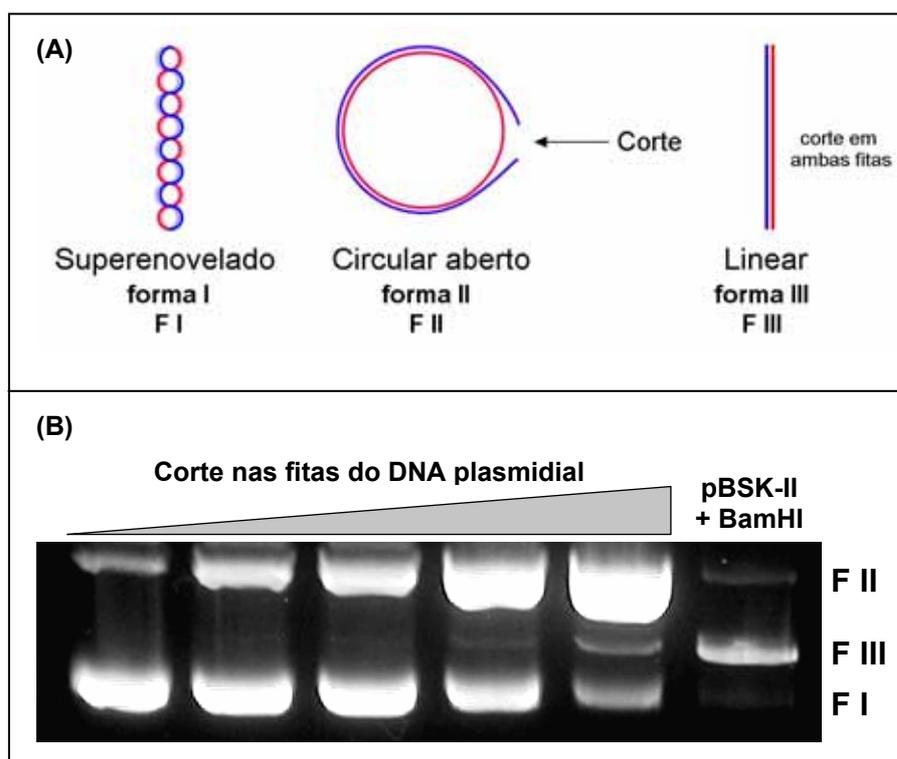


FIGURA 3.11 – As três diferentes formas do DNA plasmidial. (A) representação esquemática das três diferentes formas das moléculas de DNA plasmidial. (B) foto ilustrativa de um gel de agarose de amostras do plasmídeo pBSK-II, expostas a condição (de crescente intensidade) capaz de gerar cortes nas fitas do DNA. A última amostra se refere ao plasmídeo pBSK-II digerido (quase que completamente, pois ainda há as formas I e II) com a enzima de restrição *Bam*HI.

A Figura 3.11B mostra um gel de agarose de amostras do plasmídeo pBSK-II com níveis crescentes de clivagem. Esta figura ilustra como é possível avaliar a clivagem de moléculas de DNA, uma vez que com o aumento dos “cortes” nas amostras de DNA há uma diminuição no conteúdo de **F I**, um aumento de **F II** e posterior aparecimento de **F III**. O aparecimento de **F III**, por sua vez, pode acontecer de duas maneiras: a primeira, em eventos de cortes independentes, em fitas opostas, na molécula de DNA (caso das amostras 1-5 da Figura 3.11B); a segunda quando num único evento ambas as fitas são cortadas simultânea ou

consecutivamente. Esta última é o que acontece quando um DNA plasmidial é tratado com uma enzima de restrição, que corta ambas as fitas do DNA. A última amostra da Figura 3.11B ilustra estas observações, uma vez que este é o resultado do tratamento do plasmídeo pBSK-II com a enzima de restrição *Bam*HI (que reconhece apenas um único sítio de corte neste plasmídeo).

Os experimentos de clivagem de DNA foram realizados através da incubação dos complexos metálicos em estudo com 330 ng do plasmídeo pBSK-II superenovelado, num volume final de reação de 20 μ l. Isto corresponde a uma concentração de DNA de 25 μ M, em pares de bases (pb). Em virtude de terem sido testados diferentes complexos e em diferentes condições de pH, temperatura, tempo de incubação e presença de outras substâncias (inibidores, por exemplo), a condição específica de cada experimento será descrita juntamente com a apresentação do respectivo resultado.

Ao término do período de incubação as reações foram interrompidas pela adição de 4 μ l de tampão de corrida 6X concentrado (EDTA 0,25 M, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01% - pH 8,0) e imediatamente resfriadas em banho de gelo. Em seguida, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose ou armazenadas a -20°C para uso posterior.

3.8.2 Clivagem anaeróbia – atmosfera de argônio

Esta metodologia foi empregada com a finalidade de se avaliar a influência do oxigênio (O₂) nas reações de clivagem de DNA pelos complexos metálicos em estudo, como previamente descrita em trabalhos do nosso grupo [37; 39]. A água desoxigenada foi preparada num procedimento de duas etapas: primeiro, a água foi submetida à agitação sob vácuo, até completa eliminação das bolhas de ar; em seguida foi equilibrada com argônio (borbulhando argônio através da água) para ajudar no processo de desoxigenação. Esta água foi mantida sob atmosfera de argônio até o momento do uso. Todas as soluções e misturas reacionais foram preparadas dentro de um glove bagTM (Figura 3.12) modelo X-27-27, I²R. As amostras foram, então, incubadas dentro de um dessecador selado e preenchido com argônio, pelo tempo e temperatura adequados. Após o término deste período,

as reações foram interrompidas e submetidas às mesmas condições e procedimentos das realizadas na presença de oxigênio.

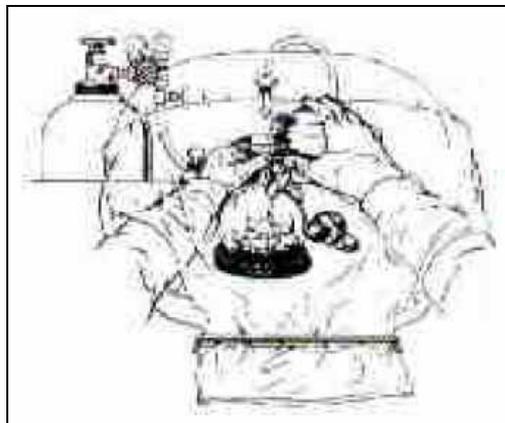


FIGURA 3.12 – Ilustração do glove bag utilizado para a realização dos experimentos em atmosfera isenta de oxigênio.

3.8.3 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é um método padrão usado para separar, identificar e até purificar ácidos nucleicos (DNA ou RNA) e seus fragmentos, especialmente por ser uma técnica simples e relativamente rápida.

A agarose é um polissacarídeo extraído de certos gêneros de algas vermelhas do gênero *Rhodophyceae*. Este polissacarídeo consiste na repetição do dissacarídeo formado entre os resíduos de β -D-galactose (ligado pelas posições 1,3) e 3,6-anidro- α -L-galactose (ligado pelas posições 1,4), como representado na Figura 3.13A. Géis de vários graus de pureza podem ser obtidos pela remoção da agarpectina, e que se caracterizam pelo ponto de fusão (35 a 95 °C) e grau de eletroendoosmose (que é dependente do número de grupos polares). A agarose quando dissolvida em água fervente e depois resfriada, forma um gel com o aspecto representado na Figura 3.13B. Neste processo são formadas duplas hélices que se unem lateralmente para formar filamentos relativamente finos, formando, assim, poros. Estes poros têm seu tamanho variado de acordo com a concentração do gel, ou seja, quanto mais concentrado em agarose, menor o tamanho dos poros. Devido a esta característica é possível relacionar o tamanho das moléculas de DNA (linear) com a concentração do gel de agarose, de maneira que se consiga uma separação

eficiente. A Tabela 3.2 mostra a relação entre as diversas faixas de tamanho do DNA e a concentração de agarose no gel.

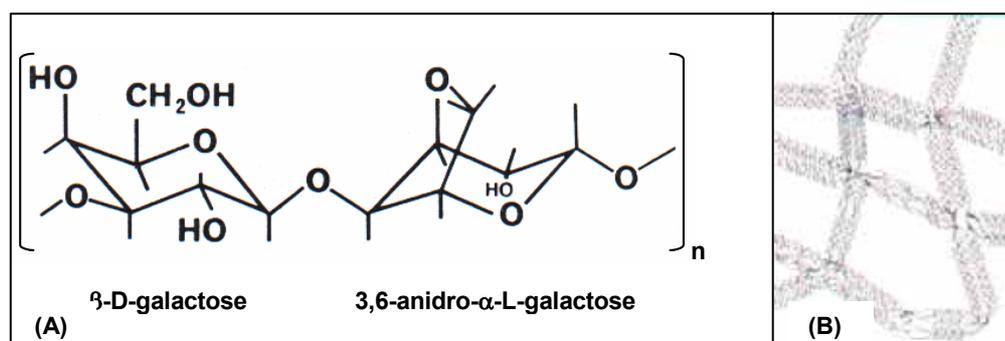


FIGURA 3.13 – Estrutura da agarose. (A) Estrutura química da unidade de repetição da agarose; (B) Morfologia do polímero durante a formação do gel [89].

TABELA 3.2 – Concentração necessária de agarose no gel para uma eficiente separação de moléculas de DNA linear de diferentes tamanhos [90].

| Concentração de agarose (%) | Faixa de tamanho do DNA (pb) |
|-----------------------------|------------------------------|
| 0,3 | 5.000 – 60.000 |
| 0,6 | 1.000 – 20.000 |
| 0,7 | 800 – 10.000 |
| 0,9 | 500 – 7.000 |
| 1,2 | 400 – 6.000 |
| 1,5 | 200 – 3.000 |
| 2,0 | 100 – 2.000 |

Entretanto, como já foi discutido, não só o tamanho da molécula de DNA é importante na separação num gel de agarose, mas também a forma desta molécula. As formas **F I**, **F II** e **F III** de um DNA plasmidial possuem o mesmo tamanho, porém migram com velocidades distintas, graças a diferenças na sua conformação ou compactação.

A preparação dos géis de agarose foi feita a partir da dissolução, sob aquecimento em forno de microondas, da quantidade necessária de agarose para um gel com concentração de 1,0 % (m/v), em tampão TBE 0,5 X (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM – pH 8,0). Após resfriamento da solução até 60°C, é adicionado o brometo de etídio (concentração final de 0,3 μ g/ml), e a solução resultante é despejada numa forma adequada para dar formato ao gel e aos poços onde serão aplicadas as amostras (Figura 3.14A). Este resfriamento da solução antes da adição do brometo de etídio, é de extrema importância para evitar

a formação de vapores desta substância que é extremamente perigosa, por ser mutagênica. Após o resfriamento total, os géis resultantes são levados para uma cuba de eletroforese horizontal (modelo Horizon[®] 11-14, Life Technologies[™] ou Sub-Cell[®] GT, BioRad) contendo tampão TBE 0,5 X. Este tipo de eletroforese também é conhecido como submarina, devido ao fato de o gel estar completamente imerso no tampão.

Foram aplicados 20 µl de cada amostra nos poços do gel, para em seguida ser aplicado uma tensão de 3 a 5 V/cm (distância entre os eletrodos), por aproximadamente 2 horas, ou até que a frente de migração (azul de bromofenol) atingisse o final do gel. As fontes de corrente contínua Life Technologies[™] modelo 250 ou 250EX foram utilizadas. A Figura 3.14 mostra de maneira ilustrativa a realização deste tipo de eletroforese.

A qualidade da separação dos fragmentos de DNA, ou no caso as diferentes formas do DNA plasmidial, é dependente de vários fatores, dentre eles a velocidade de migração. Esta é, para um fragmento de DNA linear, proporcional à voltagem aplicada, ou seja, quanto maior a voltagem, maior a velocidade de migração. Entretanto, a efetividade da separação diminui com este aumento de velocidade. Portanto, deve-se fazer um balanço entre o tempo de corrida e a qualidade da separação, para definição da voltagem a ser aplicada.

Outro fator a ser considerado é a concentração do tampão utilizado na cuba de eletroforese. A utilização de tampões muito concentrados pode levar a um aquecimento excessivo do gel (devido à elevada concentração de íons, e conseqüente elevação da corrente), o que pode provocar, inclusive, a desnaturação da dupla fita do DNA.

Por fim, os géis resultantes são digitalizados num sistema de fotodocumentação DigiDoc.It System (UVP), basicamente composto por um transiluminador UV ($\lambda = 302 \text{ nm}$) e uma câmera digital acoplada a um microcomputador. Em seguida são analisados (quantificação das bandas resultantes) com o software LabWorks[™] 4.0, UVP.

Após a quantificação das bandas é necessário multiplicar os valores de **F I** por um fator de correção, uma vez que a ligação do brometo de etídio é menor para esta forma [62]. Foi utilizado o valor de 1,4 como fator de correção, que é uma média dos valores encontrados na literatura [22; 56; 57; 62; 91]. Uma metodologia que

pode ser empregada para a determinação deste fator foi descrita por Bernadou e colaboradores [62].

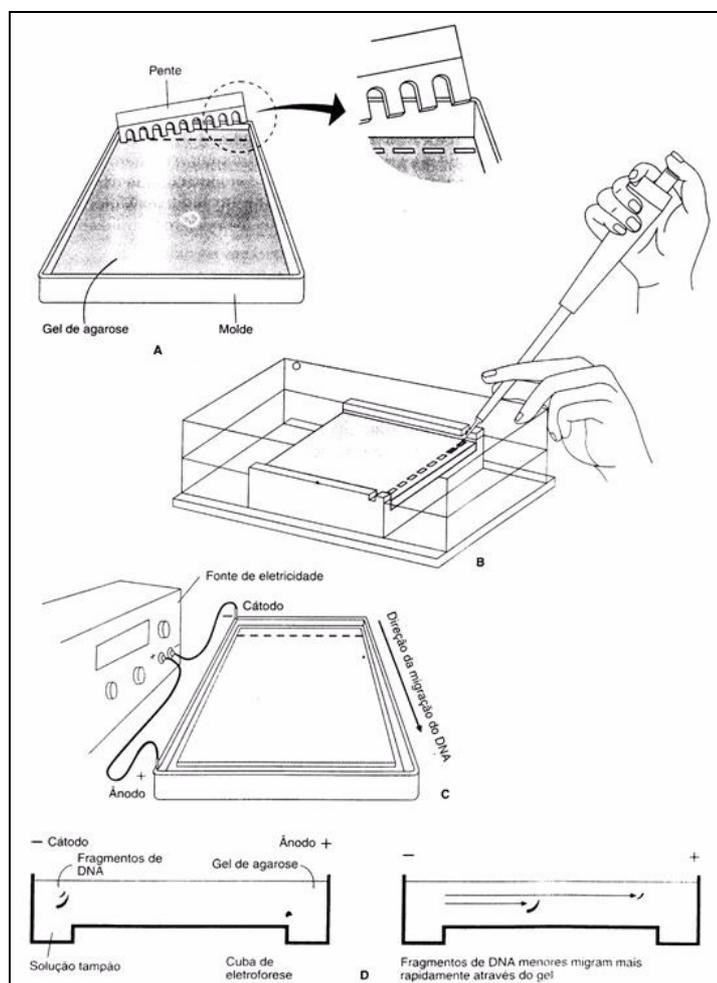


FIGURA 3.14 – Eletroforese em gel de agarose. A matriz é solidificada deixando-se formar poços (A) nos quais as amostras de DNA serão depositadas (B) e submetidas a um campo elétrico (C). Os fragmentos apresentam uma migração diferencial de acordo com o tamanho ou forma (D) [92].

3.8.4 Espectroscopia eletrônica

Foi utilizada a titulação espectrofotométrica dos complexos metálicos em estudo com CT-DNA para se caracterizar a ligação destes compostos com moléculas de DNA [24; 45; 54; 55; 63; 93-95]. Para tanto, foram feitos espectros eletrônicos UV-Vis de soluções com valores crescentes de $[CT-DNA]/[complexo]$ (R), para cada complexo. Com esses espectros, foram avaliadas mudanças na absorção dos complexos, bem como deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima. Foram também calculadas as constantes de ligação intrínsecas (K_b) dos complexos com o CT-DNA, através da equação 1.

$$(1) \quad [\text{DNA}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_F) = [\text{DNA}]/(\varepsilon_B - \varepsilon_F) + 1/K_b(\varepsilon_B - \varepsilon_F)$$

Nesta equação ε_F , ε_A e ε_B correspondem respectivamente ao coeficiente de extinção para o complexo metálico livre, ao coeficiente de extinção para cada adição de DNA e ao coeficiente de extinção para o complexo metálico completamente ligado. Para se determinar o valor de K_b é feito um gráfico de $[\text{DNA}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_F) \times [\text{DNA}]$, faz-se um ajuste linear dos dados e através da razão entre a inclinação e o intercepto da reta obtida, obtém-se o valor de K_b .

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Cu₂BMXD

O estudo realizado com o complexo Cu₂BMXD na clivagem de moléculas de DNA que será apresentado e discutido nesta seção é um prosseguimento ao estudo iniciado por Manuel S. R. Couto, ex-aluno do nosso laboratório. A maioria destes resultados obtidos para o complexo Cu₂BMXD já estão publicados [96].

A Figura 4.1 apresenta o resultado da incubação do plasmídio pBSK-II com diferentes concentrações do complexo Cu₂BMXD. Como pode ser visto nesta figura, e pela quantificação das bandas observadas no gel (Figura 4.2), após um período de 18 horas de incubação a 50 °C e pH = 7,0 (50 mM de tampão PIPES) o plasmídio superenovelado (F I) é convertido para a forma F II e, inclusive, para F III. É evidente também a dependência da concentração do complexo na solução para este processo de clivagem.

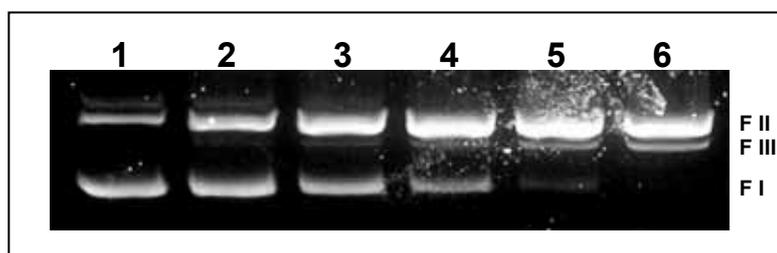


FIGURA 4.1 – Clivagem de DNA plasmidial por diferentes concentrações do complexo Cu₂BMXD. Poço 1: controle – somente DNA (pBSK-II 30 μM pb); poços 2 – 6: DNA + Cu₂BMXD 1, 2, 5, 10 e 20 μM, respectivamente. Todas as amostras foram incubadas por 18 horas a 50°C em tampão PIPES 50 mM, pH = 7,0.

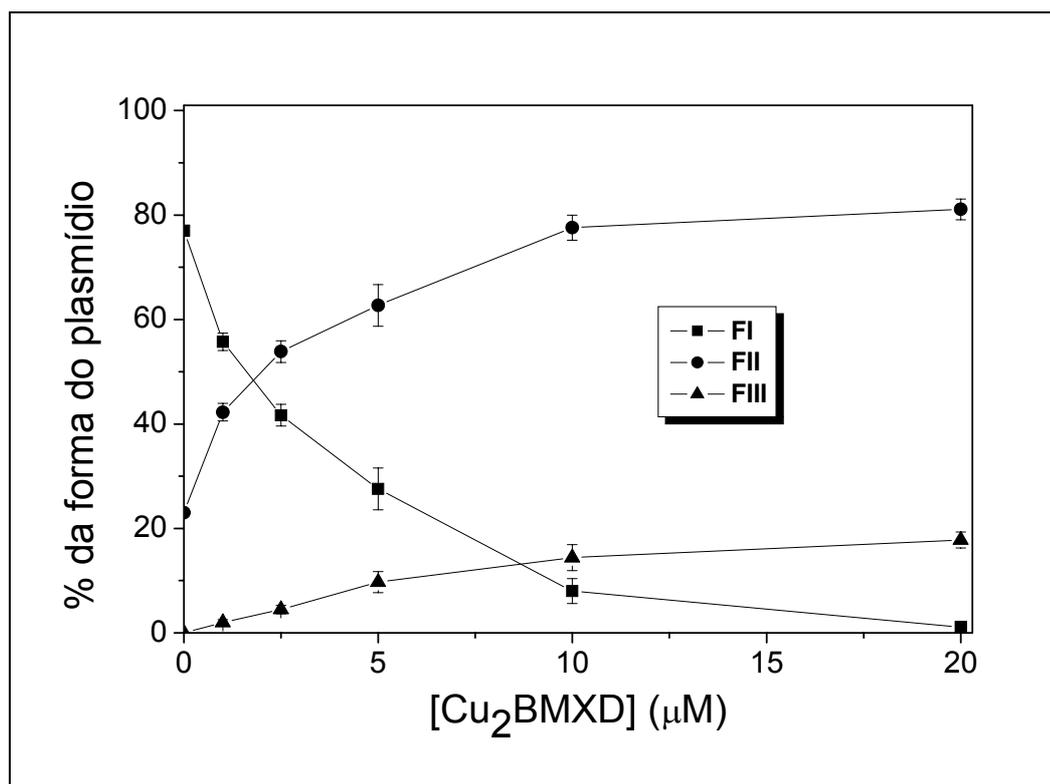


FIGURA 4.2 – Efeito da concentração do complexo Cu₂BMXD. Gráfico da porcentagem das formas do DNA plasmídico em função da concentração do complexo Cu₂BMXD, representando a quantificação das bandas do gel mostrado na Figura 4.1.

A dependência do tempo e da temperatura de incubação também foi avaliada, e os resultados destes experimentos estão demonstrados na Figura 4.3 e Tabela 4.1. Como um único corte em uma molécula de DNA plasmídico superenovelada já é suficiente para converter o plasmídeo para a forma **F II**, considerou-se cada molécula do plasmídeo pBSK-II como o “substrato” do complexo Cu₂BMXD. Desta maneira, como os experimentos foram realizados com concentrações do complexo e do plasmídeo de 20 μM e 10 nM, respectivamente, os resultados foram tratados como uma reação de *pseudo*-primeira ordem. Sendo assim, na Figura 4.3 é apresentado um gráfico de $\ln(\text{fração de F I}) \times \text{tempo}$, onde a fração de **F I** corresponde a % de **F I** num determinado tempo, dividida pela % de **F I** no tempo zero. Neste gráfico pode ser visto que o tratamento utilizado foi adequado para o sistema, uma vez que foi capaz de linearizar os dados. Através deste gráfico foi possível calcular as constantes de velocidade de *pseudo*-primeira ordem (k) para a clivagem do DNA plasmídico pelo complexo Cu₂BMXD a diferentes temperaturas (Tabela 4.1).

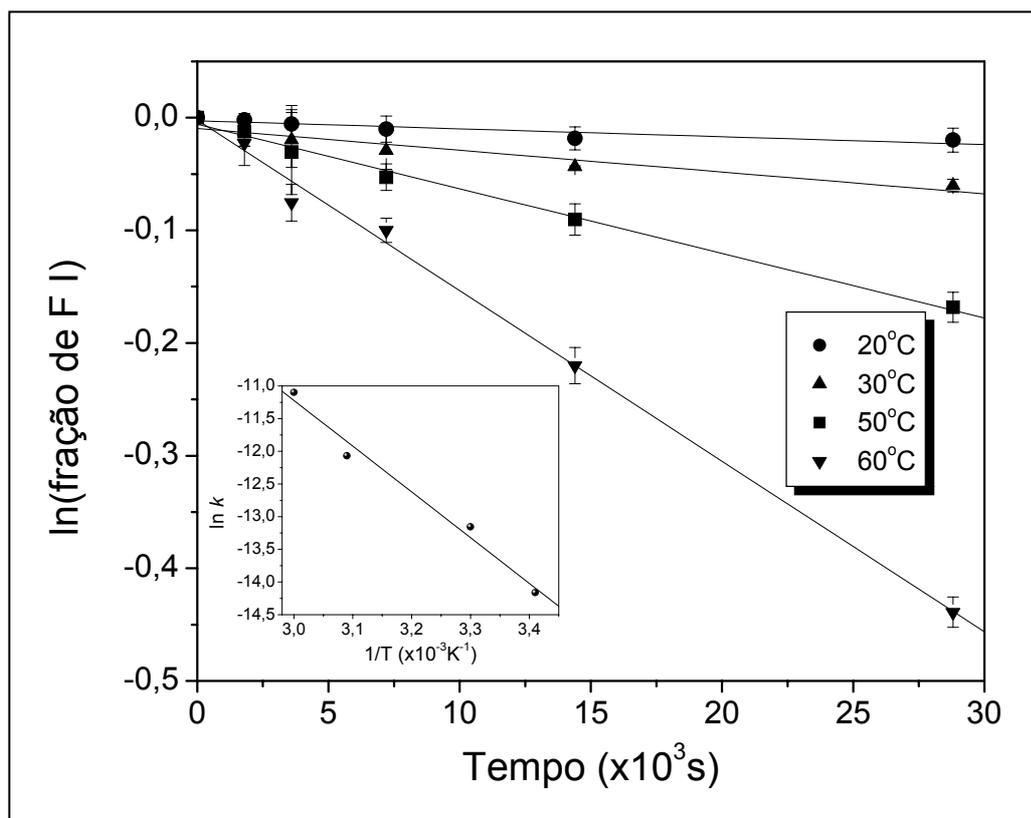


FIGURA 4.3 – Variação de $\ln(F I)$ em função do tempo de reação, para diferentes temperaturas. Gráfico menor inserido na figura – gráfico de $\ln k$ em função de $1/T$, calculado a partir dos dados cinéticos. $[Cu_2BMXD] = 20 \mu M$; $[pBSK-II] = 10 nM$; tampão PIPES 50 mM.

TABELA 4.1 – Valores de k para a clivagem de DNA pelo complexo Cu_2BMXD , a diferentes temperaturas.

| Temperatura (°C) | $k (x 10^{-7} s^{-1})$ |
|------------------|------------------------|
| 20 | $7,0 \pm 1,6$ |
| 30 | $19,3 \pm 2,9$ |
| 50 | $57,4 \pm 2,1$ |
| 60 | $151,4 \pm 4,8$ |

Com estes dados de k a diferentes temperaturas, e utilizando-se um gráfico de $\ln k \times 1/T$ (gráfico menor inserido na Figura 4.3) pode ser calculada a energia de ativação (**Ea**) do sistema, segundo a equação de Arrhenius (equação 2).

$$(2) \quad k = Ae^{-E_a/RT}$$

Nesta equação **R** é a constante dos gases, **T** a temperatura absoluta e **A** uma constante chamada de fator pré-exponencial. O valor desta energia foi determinado como sendo $58,6 \text{ kJ.mol}^{-1}$, um valor que é superior a barreira difusional para pequenas moléculas (ao redor de 20 kJ.mol^{-1} [97]). Dois eventos são considerados

como contribuintes para essa barreira energética. O primeiro poderia ser a exigência de mudanças estruturais na molécula de DNA para a acomodação do complexo, durante a etapa lenta do mecanismo de reação. O outro pode estar relacionado com a ativação do centro metálico em produzir radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$), que por sua vez seria de fato o responsável pelo processo de clivagem.

O envolvimento do $\text{HO}\cdot$ pode ser notado pela evidente inibição da clivagem do DNA plasmidial pelo complexo Cu_2BMXD na presença de DMSO e glicerol, conhecidos captadores, ou seqüestradores, de $\text{HO}\cdot$ (Figura 4.4 e 4.5). Na Figura 4.4 é apresentado o gel resultante das amostras de DNA plasmidial incubados com diferentes concentrações do complexo Cu_2BMXD na presença de DMSO e glicerol. As amostras controle deste experimento (sem os captadores) são as que foram anteriormente apresentadas na Figura 4.1. A Figura 4.5 apresenta a fração de **F I** para cada uma destas amostras, onde pode ser notado que, apesar de o DMSO e o glicerol estarem em excesso em relação à concentração do complexo (10 % na reação, o que corresponde a $\sim 1,4$ M de cada um deles), a inibição da reação foi apenas parcial, para ambos. Este fato pode ser resultado da presença de um ciclo catalítico que estaria continuamente gerando $\text{HO}\cdot$.

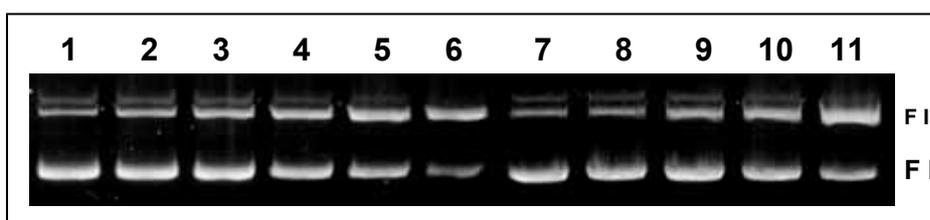


FIGURA 4.4 – Influência de captadores de $\text{HO}\cdot$ na clivagem de DNA plasmidial por diferentes concentrações do complexo Cu_2BMXD . Poços 1 – 6: DMSO 10 %; poços 7 – 11: glicerol 10 %; poços 1 e 7: controle – somente DNA (pBSK-II 30 μM pb); poços 2 e 8: DNA + Cu_2BMXD 1 μM ; poços 3 e 9: DNA + Cu_2BMXD 2,5 μM ; poços 4 e 10: DNA + Cu_2BMXD 5 μM ; poços 5 e 11: DNA + Cu_2BMXD 10 μM ; poços 6: DNA + Cu_2BMXD 20 μM . Todas as amostras foram incubadas por 18 horas a 50°C em tampão PIPES 50 mM, pH = 7,0.

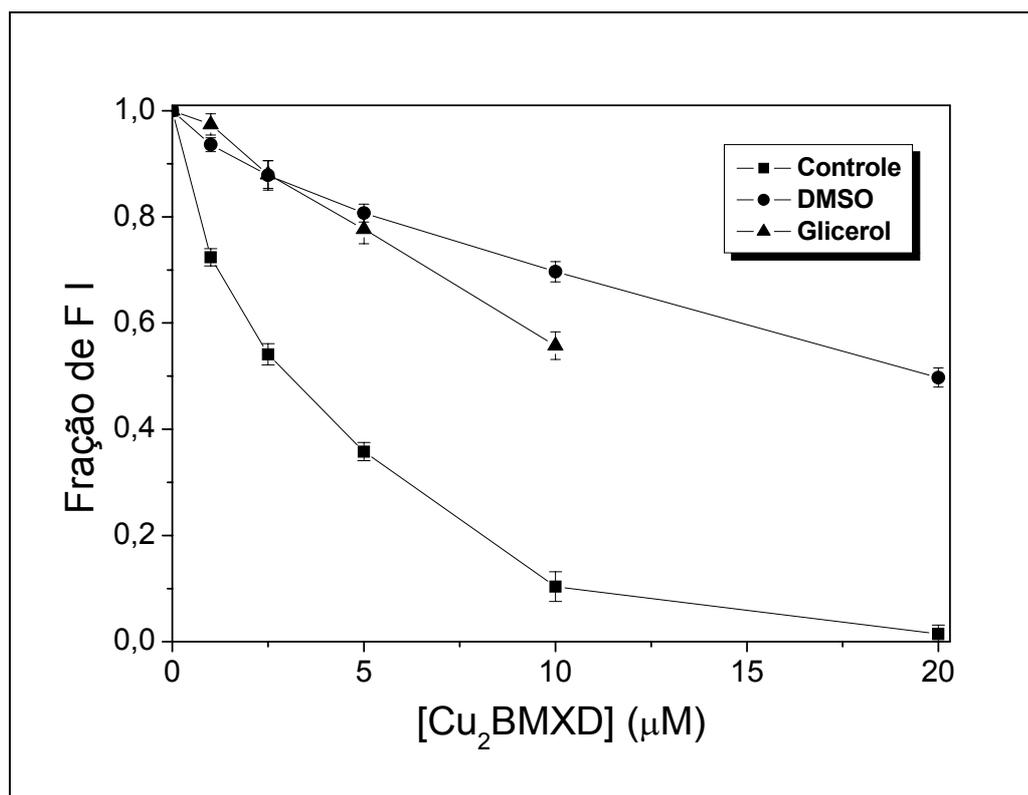
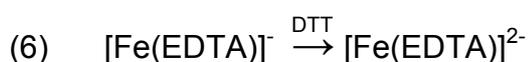
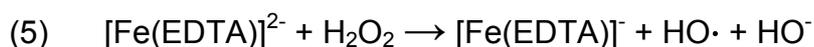
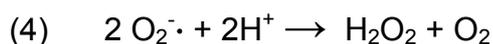


FIGURA 4.5 – Variação da fração de F I em função da concentração do complexo Cu₂BMXD, na ausência e presença de DMSO e glicerol. Os valores da fração de F I foram obtidos pela quantificação das bandas dos géis mostrados nas Figuras 4.4 e 4.1.

Com a finalidade de se avaliar a influência do oxigênio molecular (O₂) no processo de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu₂BMXD, foram realizadas, paralelamente, reações em condições aeróbias e anaeróbias (atmosfera de argônio). A Figura 4.6 mostra o resultado deste experimento, onde é utilizado o sistema [Fe(EDTA)]²⁻/DTT como controle positivo, uma vez que este é um conhecido sistema gerador de HO· na presença de O₂, através da reação de Fenton. Este radical pode ser formado através da série de reações mostradas nas equações 3 – 6 [65; 98; 99]:



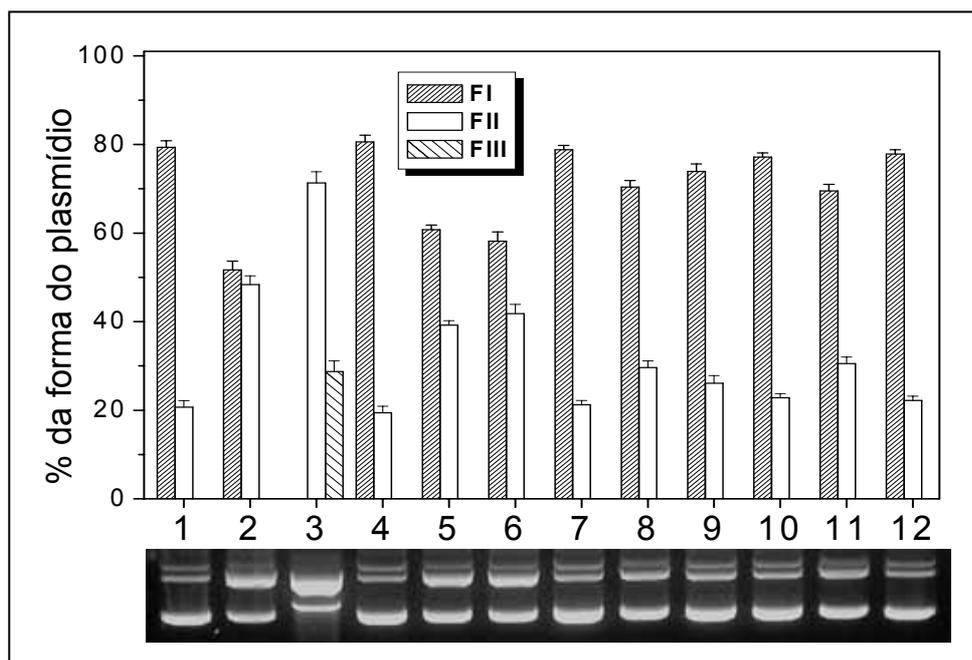


FIGURA 4.6 – Clivagem de DNA plasmidial por Cu₂BMXD em condições aeróbias e anaeróbias. Poços 1 – 6: condições aeróbias; poços 7 – 12: condições anaeróbias (atmosfera de argônio); poços 1 e 7: controle – somente DNA (pBSK-II 30 μM pb); poços 2 e 8: DNA + Cu₂BMXD 20 μM; poços 3 e 9: DNA + Fe(EDTA)²⁻ 100 μM + DTT 10 mM; poços 4 e 10: DNA + DMSO 400 mM; poços 5 e 11: DNA + DMSO 400 mM + Cu₂BMXD 20 μM; poços 6 e 12: DNA + DMSO 400 mM + Fe(EDTA)²⁻ 100 μM + DTT 10 mM. Todas as amostras foram incubadas por 4 horas a 50°C em tampão PIPES 50 mM, pH = 7,0. Acima da foto do gel é mostrado um gráfico com a quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial de cada amostra.

Primeiramente, pode ser notado que em todas as amostras há o aparecimento de uma banda logo acima a de F II. Esta banda corresponde ao dímero do plasmídeo superenovelado, que é uma forma que pode estar presente em muitas preparações de DNA plasmidial, como resultado das condições de crescimento bacteriano (cepa bacteriana utilizada, concentração salina, velocidade de agitação, temperatura e tempo de crescimento) e metodologia empregada para extração do DNA. Entretanto, a presença desta forma do DNA plasmidial nas amostras não influencia o resultado final deste experimento.

Em relação ao resultado do experimento, pode ser observado que a clivagem tanto pelo complexo Cu₂BMXD (comparar poços 2 e 5), como pelo sistema [Fe(EDTA)]²⁻/DTT (comparar poços 3 e 6), foi inibida parcialmente pela presença de DMSO na reação. Entretanto, a inibição para este último foi muito mais evidente. Também pode ser notado que a clivagem do DNA pelo sistema [Fe(EDTA)]²⁻/DTT é completamente inibida quando realizada numa atmosfera livre de oxigênio (comparar

poços 3 e 9), enquanto que para o complexo Cu_2BMXD ainda resta uma pequena atividade residual (comparar poços 2 e 8).

Estes resultados indicam que a presença de O_2 tem um papel fundamental no processo de clivagem de DNA pelo complexo Cu_2BMXD , desta forma fornecendo forte evidência de um mecanismo oxidativo envolvido neste processo de clivagem. Porém, nenhum agente redutor externo foi adicionado (por exemplo, H_2O_2 e ascorbato, que poderiam reduzir o Cu^{2+} a Cu^+ e, através de uma série de reações, causarem dano às moléculas de DNA), o que indica que alguma das espécies presentes no sistema reacional em estudo esteja fazendo tal papel.

Wang e Sayre [100; 101] mostraram que o complexo de cobre (II) $[\text{Cu}^{2+}(\text{batho})_2]$ (onde batho = 2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-disulfonato de fenantrolina) é capaz de oxidar aminas terciárias, incluindo os tampões MES, HEPES e PIPES (Figura 4.7). Nestes trabalhos eles descrevem que qualquer complexo metálico com potencial de redução superior a 0,6 V contra ENH (eletrodo normal de hidrogênio) é capaz de oxidar tais tampões de aminas terciárias.

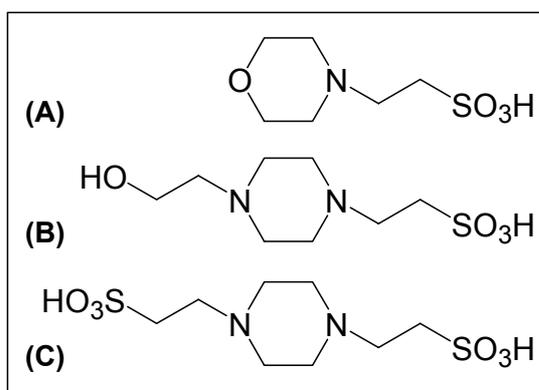


FIGURA 4.7 – Estrutura química dos tampões MES (A), HEPES (B) e PIPES (C).

Com a finalidade de se verificar se o próprio tampão PIPES poderia estar atuando como um agente redutor para o complexo Cu_2BMXD , foi realizado experimentos substituindo-se o tampão em estudo pelo tampão fosfato de sódio. A Figura 4.8 apresenta o resultado de tais experimentos.

Apesar da clivagem de DNA (representada pela diminuição de F I) ter sido inibida na presença de tampão fosfato, ela continua acontecendo. Este fato indica que a presença do tampão PIPES (atuando como redutor do centro metálico) não é um requisito para a reação de clivagem de DNA pelo complexo Cu_2BMXD . A inibição na reação de clivagem de DNA deve ser resultado de uma competição entre o

fosfato do tampão e o DNA pelo complexo, uma vez que já foi mostrado anteriormente que este complexo tem afinidade por fosfato inorgânico [78].

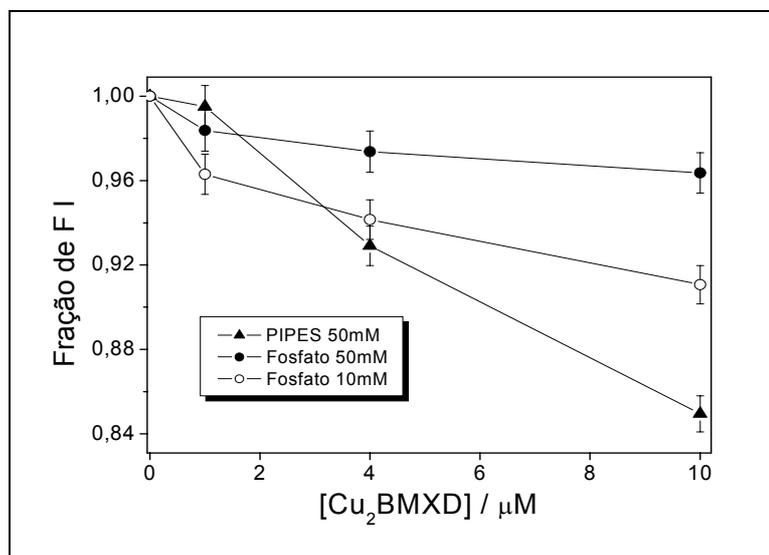
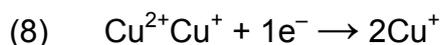
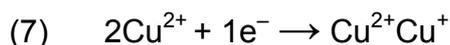


FIGURA 4.8 – Efeito do tampão na clivagem de DNA plasmidial por Cu₂BMXD. Gráfico da fração de F I em função da concentração do complexo Cu₂BMXD, na presença de tampão PIPES 50 mM, tampão fosfato de sódio 10 e 50 mM. Todas as amostras foram incubadas a 50°C por 8 horas e pH = 7,0.

Adicionalmente, o potencial redox deste complexo foi determinado por voltametria cíclica por Rosely A. Peralta – Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia da UFSC [96]. O complexo apresentou dois processos redox irreversíveis a -0,29 e -0,42 V contra ENH, considerados como potenciais de pico catódico, e atribuídos aos sucessivos pares redox apresentados nas equações 7 e 8.



Estes valores estão deslocados catodicamente 0,89 e 1,02 V, respectivamente, em relação ao valor sugerido por Wang e Sayre [100; 101]. Portanto, estes resultados indicam que não ocorre uma reação redox entre o complexo Cu₂BMXD e o tampão PIPES.

Uma outra observação relevante para o entendimento das reações envolvidas no sistema em estudo é a de que quando se preparou um grande volume de reação (1 ml - 500 µM de Cu₂BMXD em 50 mM tampão PIPES pH = 7,0) sob atmosfera de argônio, foi formado rapidamente um precipitado branco (e a solução perdeu sua coloração azul) ao se adicionar CT-DNA (250 µM pb) à solução. Este precipitado foi dissolvido ao se passar ar através da solução, readquirindo sua coloração azul. A formação deste precipitado foi atribuída à redução de Cu²⁺ a Cu⁺ (menos solúvel), e

a sua dissolução (com a volta da coloração azul) à reoxidação de Cu^+ a Cu^{2+} na presença de O_2 (ar).

Estes resultados sugerem que a própria molécula de DNA estaria atuando como o agente redutor no processo $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$. Entretanto, o menor potencial redox de um nucleosídeo é o da guanosina ($dG < dA < dC \approx dT < U$) e foi determinado por Steenken e Jovanovic [102] como sendo $E^\circ_{(\text{Guo}\cdot/\text{Guo})} = 1,58 \text{ V}$ (para Seidel e colaboradores [103] $E^\circ_{(\text{Guo}\cdot/\text{Guo})} = 1,49 \text{ V}$), e em $\text{pH} = 7,0$ $E_{7(\text{Guo}\cdot/\text{Guo})} = 1,29 \text{ V}$. Estes valores mostram que a redução $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ do complexo Cu_2BMXD pelo DNA é, ao menos termodinamicamente, desfavorável. Porém, como os resultados encontrados neste trabalho sugerem que o DNA seja de fato o agente redutor, esta reação deve ser suficientemente favorável, em termos cinéticos ao ponto de superar o desfavorecimento termodinâmico.

Um fator que pode estar influenciando positivamente esta reação é a força da “ligação” do complexo à molécula de DNA. A avaliação da “ligação” (ou associação) do complexo Cu_2BMXD à molécula de DNA foi feita por espectroscopia eletrônica, através da titulação espectrofotométrica do complexo com CT-DNA. A Figura 4.9 (e a Tabela 4.2) mostra o resultado deste experimento, onde pode ser notado um aumento na absorvidade molar do complexo (hipercromismo), bem como um deslocamento hipsocrômico (deslocamento para menores valores de $\lambda_{\text{máx}}$).

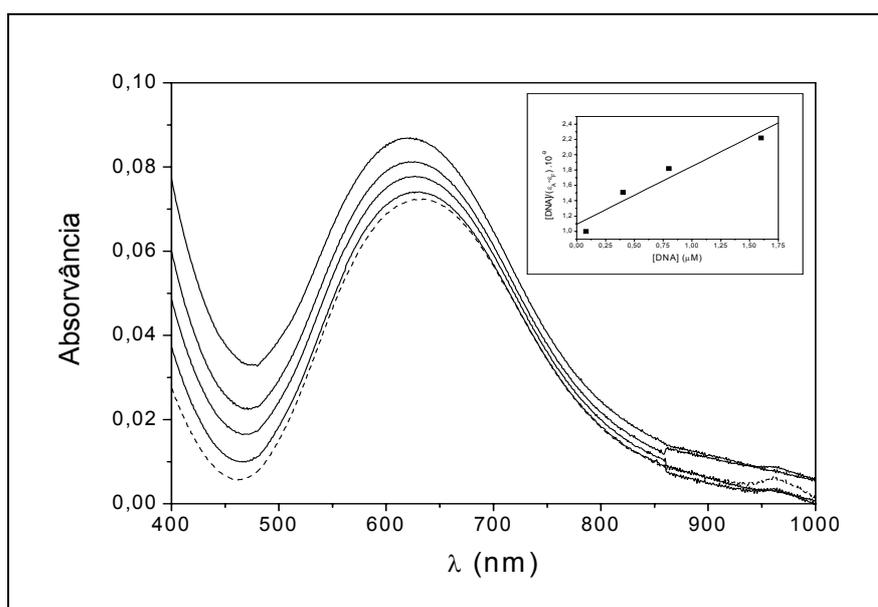


FIGURA 4.9 – Titulação espectrofotométrica do complexo Cu_2BMXD com CT-DNA. Espectroscopia eletrônica do complexo Cu_2BMXD ($20 \mu\text{M}$) na ausência (---) e na presença (—) de quantidades

crescentes de CT-DNA ([DNA]/[Cu₂BMXD] = 0, 1/250, 1/50, 1/25 e 1/12,5), em tampão PIPES 50 mM, pH = 7,0. Gráfico menor inserido na figura – gráfico de [DNA]/(ε_A - ε_F) x [DNA].

TABELA 4.2 – Valores de λ_{máx} e ε obtidos pela titulação espectrofotométrica de Cu₂BMXD por CT-DNA.

| [DNA]/[Cu ₂ BMXD] | λ _{máx} (nm) | ε (M ⁻¹ .cm ⁻¹) |
|------------------------------|-----------------------|--|
| 0 | 634 | 3625 |
| 1/250 | 630 | 3705 |
| 1/50 | 626 | 3890 |
| 1/25 | 624 | 4065 |
| 1/12,5 | 620 | 4345 |

Complexos metálicos que se ligam ao DNA através de intercalação normalmente resultam em hipocromismo e deslocamento batocrômico, devido ao modo intercalativo envolvendo uma forte interação de empilhamento entre o cromóforo aromático e os pares de base do DNA [104]. A intensidade do hipocromismo é comumente consistente com a força da interação de intercalação [104; 105].

O comportamento encontrado para o complexo Cu₂BMXD (hipercromismo e hipsocromismo) já foi demonstrado por outros complexos de cobre [26; 45; 54; 55; 94], porém a sua origem ainda não foi completamente esclarecida. A ligação de complexos de cobre à dupla fita do DNA pode ocorrer de diferentes maneiras, em função de sua estrutura, carga e tipo de ligante [55]. Assim, várias explicações têm sido sugeridas para a origem dos efeitos mencionados [26; 45; 54; 55; 94], como por exemplo: pela interação eletrostática do complexo com o DNA; em razão da formação de ligações de hidrogênio entre o ligante e as bases do DNA; pela dissociação de agregados de ligantes; além de ainda não excluirmos a possibilidade de uma intercalação parcial.

A razão para o efeito encontrado com o complexo Cu₂BMXD pode estar na interação eletrostática do complexo com os grupos fosfato da molécula de DNA, o que resultaria na coordenação destes fosfatos pelos átomos de Cu²⁺ do complexo. Isto se torna plausível, uma vez que já foi demonstrado que este complexo se liga tanto em fosfato inorgânico [78], como em moléculas de ATP [84].

Utilizando-se do gráfico de [DNA]/(ε_A - ε_F) x [DNA] (gráfico menor inserido na Figura 4.9) foi possível calcular a constante de ligação intrínseca K_b para o complexo Cu₂BMXD, que foi determinada como sendo 7,0 ± 0,9 .10⁵ M⁻¹. Este valor é inferior ao valor de K_b para o brometo de etídio (Tabela 4.3) que é um agente intercalante

clássico e possui uma forte interação com moléculas de DNA. Nesta mesma tabela, entretanto, pode-se notar que o valor de K_b para o Cu_2BMXD é maior ou semelhante do que o de vários complexos metálicos descritos na literatura. Isto mostra que a associação do complexo Cu_2BMXD à molécula de DNA é relativamente forte, o que, como já foi mencionado, poderia ser um fator que estaria contribuindo positivamente para o favorecimento da reação entre o complexo Cu_2BMXD e moléculas de DNA.

TABELA 4.3 – Valores de K_b para o brometo de etídio e diferentes complexos metálicos.

| Centro metálico | K_b (M^{-1}) | Referência |
|-------------------|-----------------------------------|------------|
| Brometo de etídio | $7 \cdot 10^7$ | [106] |
| Brometo de etídio | $1,4 \cdot 10^6$ | [107] |
| Ru^{2+} | $1,2 - 8,3 \cdot 10^5$ | [95] |
| Cr^{3+} | $0,25 - 1,7 \cdot 10^4$ | [63] |
| Cu^{2+} | $1,1 - 6 \cdot 10^3$ | [93] |
| Cu^{2+} | $6,35 \cdot 10^3$ | [54] |
| Cu^{2+} | $1,3 - 4,9 \cdot 10^4$ | [45] |
| Cu^{2+} | $0,9 \cdot 10^5 - 9,6 \cdot 10^6$ | [55] |
| Cu^+ | $0,6 - 9,7 \cdot 10^{-4}$ | [94] |
| Cu^+ | $5,1 \cdot 10^4$ | [24] |

Diante dos resultados obtidos neste estudo, propõe-se um esquema para os eventos que levam à clivagem de moléculas de DNA pelo complexo Cu_2BMXD , e que está representado na Figura 4.10.

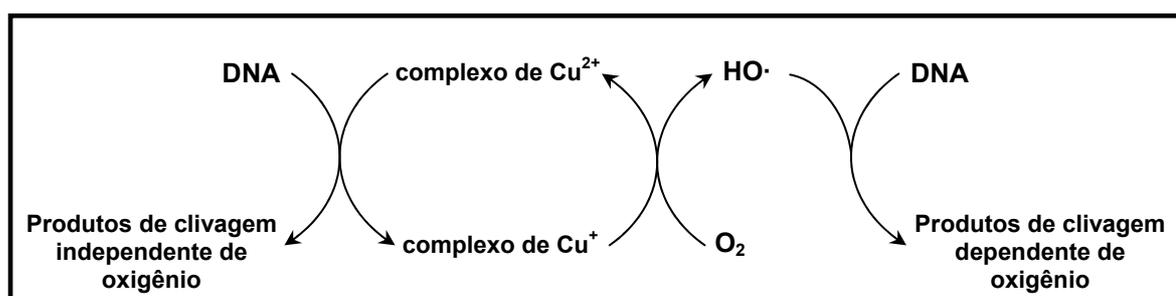


FIGURA 4.10 – Esquema da clivagem de DNA dependente e independente de O_2 pelo complexo Cu_2BMXD .

Inicialmente há uma interação do complexo Cu_2BMXD com o DNA que leva à redução do(s) átomo(s) de Cu^{2+} a Cu^+ e formação de produtos de clivagem independentes da presença de O_2 . O Cu^+ gerado é posteriormente reoxidado a Cu^{2+} pelo O_2 , regenerando o complexo de Cu^{2+} , e levando a formação de $\text{HO}\cdot$. Este radical $\text{HO}\cdot$, por sua vez, ataca as moléculas de DNA tanto nas bases como nos anéis de ribose, gerando novos produtos de clivagem.

4.2 CuMFF

O estudo da clivagem de moléculas de DNA pelo complexo CuMFF que será apresentado e discutido nesta seção é uma continuação ao estudo realizado por Deise J. Mazera, durante o seu trabalho de mestrado em nosso laboratório [108]. O artigo com todos estes resultados está em fase final de preparação.

As Figuras 4.11 e 4.12 apresentam os resultados dos experimentos de clivagem de DNA por diferentes concentrações do complexo CuMFF, em diferentes valores de pH. Pode-se notar que a clivagem apresentada é dependente tanto da concentração do complexo em solução, como do pH do meio.

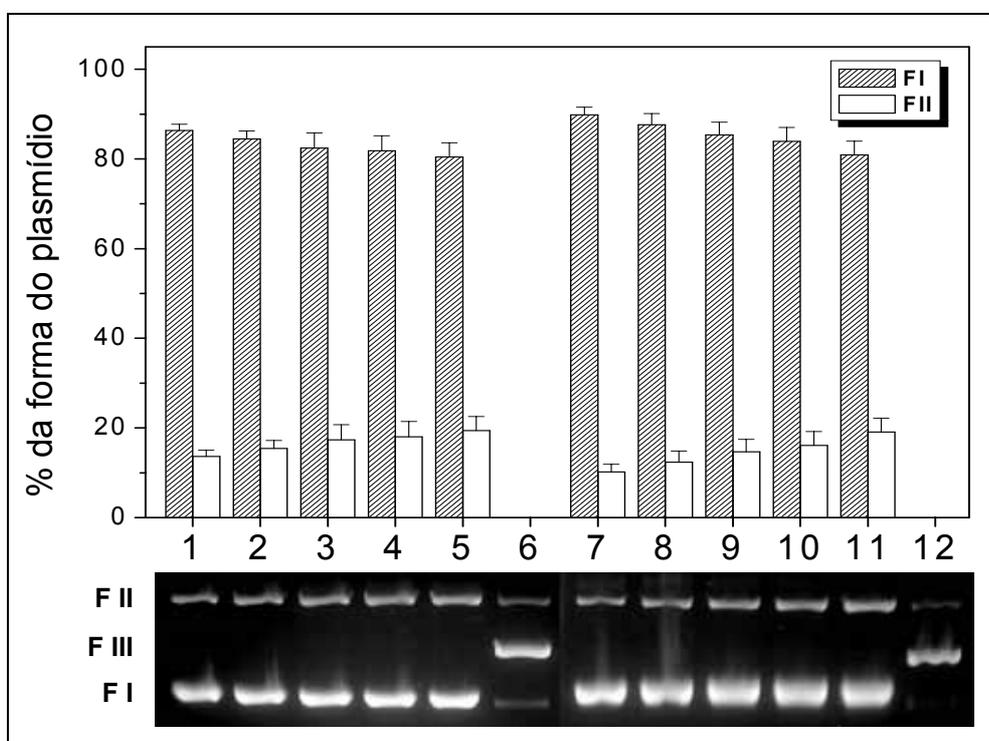


FIGURA 4.11 – Clivagem de DNA plasmidial por CuMFF em pH = 7,0 e 7,5. Poços 1 – 5: Tris 100 mM pH = 7,0; poços 7 – 11: Tris 100 mM pH = 7,5; poços 1 e 7: controle – somente DNA (pBSK-II 26 μM pb); poços 2 e 8: DNA + CuMFF 10 μM; poços 3 e 9: DNA + CuMFF 50 μM; poços 4 e 10: DNA + CuMFF 100 μM; poços 5 e 11: DNA + CuMFF 250 μM; poços 6 e 12: pBSK-II digerido com *Bam*HI. Todas as amostras foram incubadas por 16 horas a 50°C. Acima da foto do gel é mostrado um gráfico com a quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial de cada amostra.

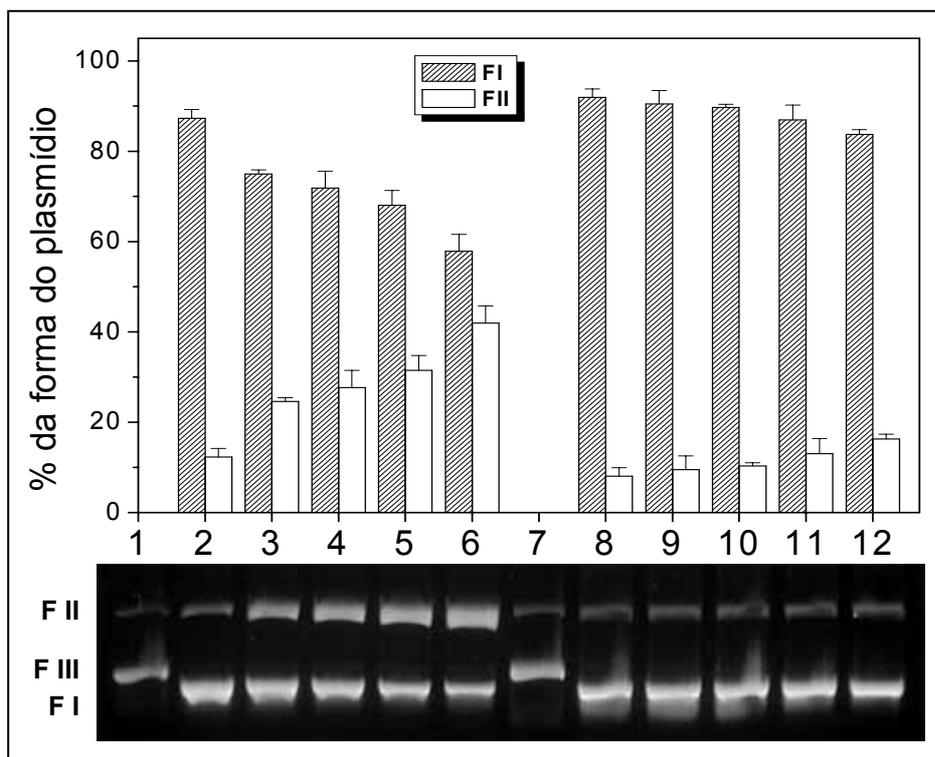


FIGURA 4.12 – Clivagem de DNA plasmidial por CuMFF em pH = 8,0 e 9,0. Poços 2 – 6: Tris 100 mM pH = 8,0; poços 8 – 12: Tris 100 mM pH = 9,0; poços 2 e 8: controle – somente DNA (pBSK-II 26 μ M pb); poços 3 e 9: DNA + CuMFF 10 μ M; poços 4 e 10: DNA + CuMFF 50 μ M; poços 5 e 11: DNA + CuMFF 100 μ M; poços 6 e 12: DNA + CuMFF 250 μ M; poços 1 e 7: pBSK-II digerido com *Bam*HI. Todas as amostras foram incubadas por 16 horas a 50°C. Acima da foto do gel é mostrado um gráfico com a quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial de cada amostra.

A partir de um gráfico da fração de F I em função do pH do meio (Figura 4.13) nota-se que praticamente não há um aumento na atividade (clivagem) quando o pH aumenta de 7,0 para 7,5. Entretanto, em pH = 8,0 o aumento de atividade se torna significativo, mas voltando a diminuir em pH = 9,0.

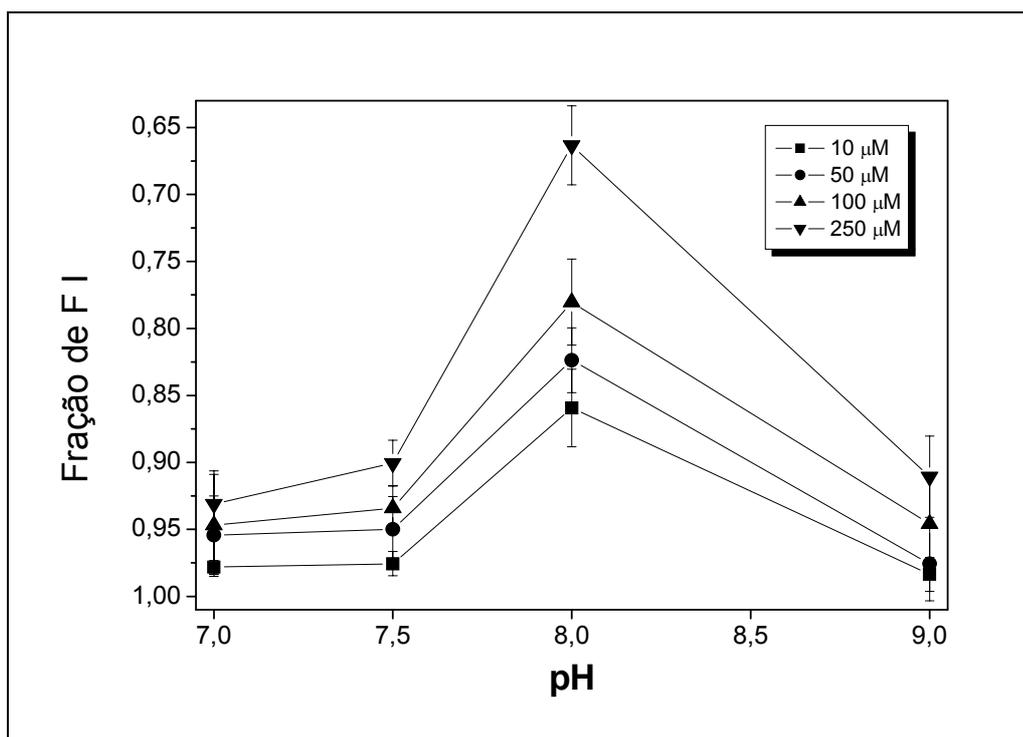
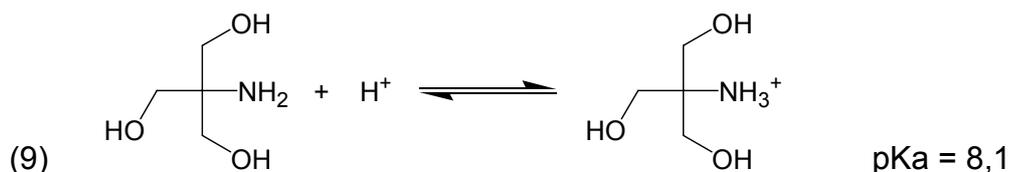


FIGURA 4.13 – Gráfico da fração de **FI** em função do pH do meio, para diferentes concentrações de CuMFF. Representa a quantificação das bandas dos géis apresentados nas Figuras 4.10 e 4.11.

Este perfil pode ser comparado com a curva de distribuição de espécies em função do pH, para este complexo (anexo **B**). Nesta curva, entre pH 7,0 e 8,0 praticamente só há a presença da espécie 2. Já em pH = 9,0 existem praticamente 50 % de cada uma das espécies 2 e 3, uma vez que se está praticamente no valor do segundo pKa para este complexo (pKa2 = 9,23).

Desta maneira, pode-se inferir que a espécie 3 ou não tem atividade, ou que é muito menor que a da espécie 2. O fato de que, na faixa de pH entre 7,0 e 8,0, a porcentagem da espécie 2 é praticamente a mesma, e a atividade tão diferente, pode ser explicado por um efeito salino do tampão Tris.

A equação 9 representa a reação de equilíbrio envolvida na protonação/desprotonação do tampão Tris:



De acordo com este equilíbrio, uma solução 100 mM do tampão Tris apresenta força iônica (I) de ~93, 80, 56 e 11 mM para pH = 7,0, 7,5, 8,0 e 9,0, respectivamente. Adicionalmente, no estudo realizado por Mazera [108] foi mostrado

um efeito salino negativo, indicando que os reagentes envolvidos no estado de transição possuem sinais opostos [109]. Desta maneira, a força iônica da solução deve ser o principal fator responsável pela diferença de atividade encontrada na faixa de pH entre 7 e 8, apesar da fração da espécie 2 praticamente não se alterar nesta faixa de pH. Por outro lado, em pH = 9,0, onde a força iônica tem o seu menor valor, a atividade é menor do que em pH = 8,0. Isso só reforça a proposta da espécie 3 ser menos ativa do que a espécie 2.

Como já foi descrito na seção anterior, não é raro o envolvimento de radicais livres, em especial o HO·, na clivagem de DNA por complexos de cobre. Do mesmo modo o O₂ muitas vezes tem papel fundamental no mecanismo de reação destes complexos, participando de processos redox.

Sendo assim, foram realizados experimentos de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo CuMFF na presença de DMSO, um captador de HO·. Nestes mesmos experimentos foi avaliado o comportamento desta reação quando realizada em condições aeróbias e anaeróbias (atmosfera de argônio). A Figura 4.14 representa os resultados destes experimentos, através das fotos do gel de agarose, bem como a quantificação das bandas de cada amostra. Nestes experimentos foi utilizado o sistema Fe(EDTA)²⁻/DTT como controle positivo.

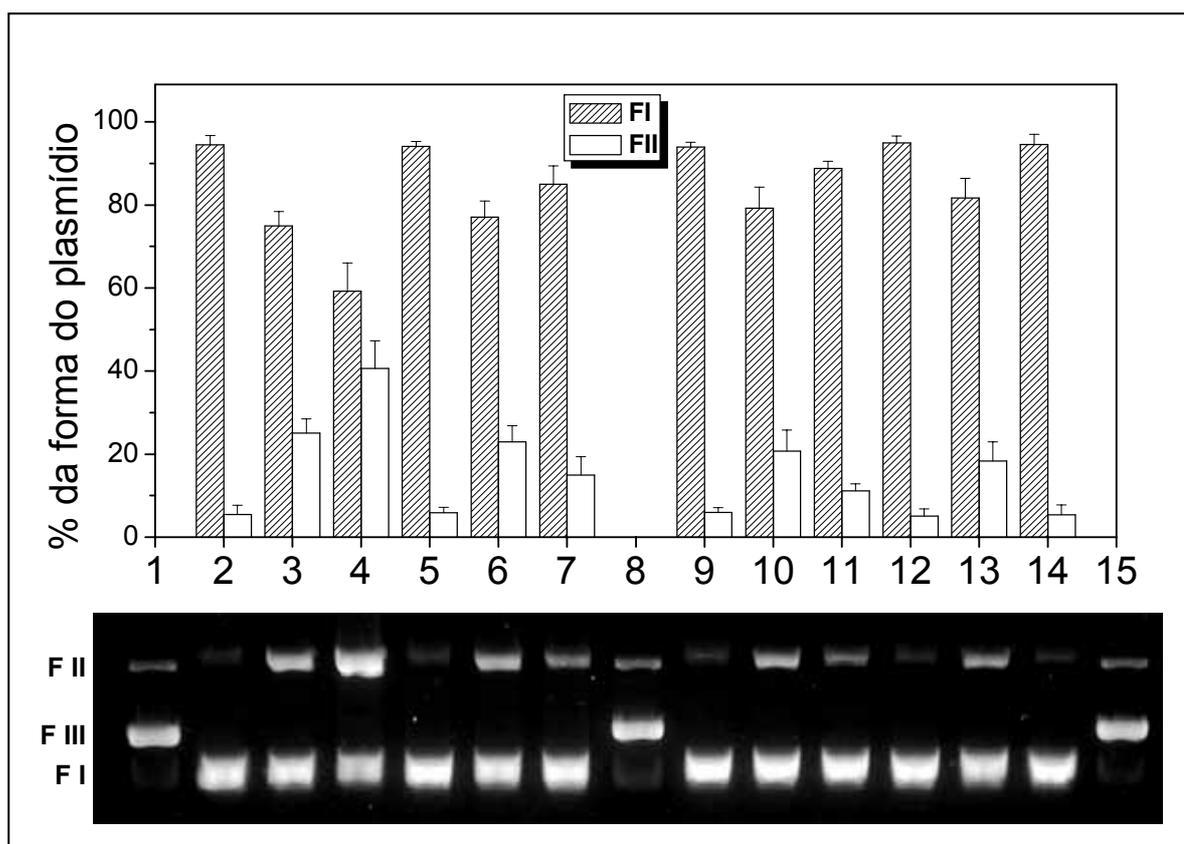


FIGURA 4.14 – Clivagem de DNA plasmidial por CuMFF em condições aeróbias e anaeróbias. Poços 2 – 7: condições aeróbias; poços 9 – 14: condições anaeróbias (atmosfera de argônio); poços 2 e 9: controle – somente DNA (pBSK-II 24 μ M pb); poços 3 e 10: DNA + CuMFF 500 μ M; poços 4 e 11: DNA + Fe(EDTA)²⁻ 25 μ M + DTT 2,5 mM; poços 5 e 12: DNA + DMSO 400 mM; poços 6 e 13: DNA + DMSO 400 mM + CuMFF 500 μ M; poços 7 e 14: DNA + DMSO 400 mM + Fe(EDTA)²⁻ 25 μ M + DTT 2,5 mM; poços 1, 8 e 15: pBSK-II digerido com *Bam*HI. Todas as amostras foram incubadas por 4 horas a 50°C em tampão Tris 100 mM, pH = 8,0. Acima da foto do gel é mostrado um gráfico com a quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial de cada amostra.

Pode ser notado que a clivagem de DNA pelo sistema Fe(EDTA)²⁻/DTT é inibida tanto pela presença de DMSO (comparar poços 4 e 7) como pela ausência de O₂ no meio reacional (comparar poços 4 e 11), o que já era esperado. Por outro lado, a clivagem pelo complexo CuMFF permanece praticamente inalterada em todas as condições experimentais testadas. Estes resultados sugerem que o radical HO· não está envolvido no mecanismo de clivagem de DNA por este complexo, e ainda que esta reação é independente da presença de O₂ no meio reacional.

Assim, os resultados sugerem que o mecanismo pelo qual o complexo CuMFF cliva moléculas de DNA é hidrolítico, e não oxidativo.

Apesar da provável atividade hidrolítica do complexo, também foi testada a influência da adição de um agente redutor externo (DTT 2,5 mM) na reação de clivagem de DNA pelo complexo CuMFF. O resultado deste experimento é mostrado

na Figura 4.15, onde pode ser notado que após um período de apenas 1 hora de incubação o DNA plasmidial foi altamente clivado (poço 3 em comparação ao poço 2 – controle), inclusive com o aparecimento da forma F III do plasmídio, e que a presença de DMSO causou apenas uma leve inibição na reação (poço 5 em comparação ao poço 3). Pode ser notado, inclusive, uma pequena clivagem de DNA mesmo na ausência do complexo CuMFF (e na presença de DMSO – poços 2 e 4). Apesar da ausência de oxigênio causar uma evidente diminuição na reação, ainda nota-se uma considerável clivagem do DNA plasmidial (poços 7 e 9 em comparação aos poços 3 e 5).

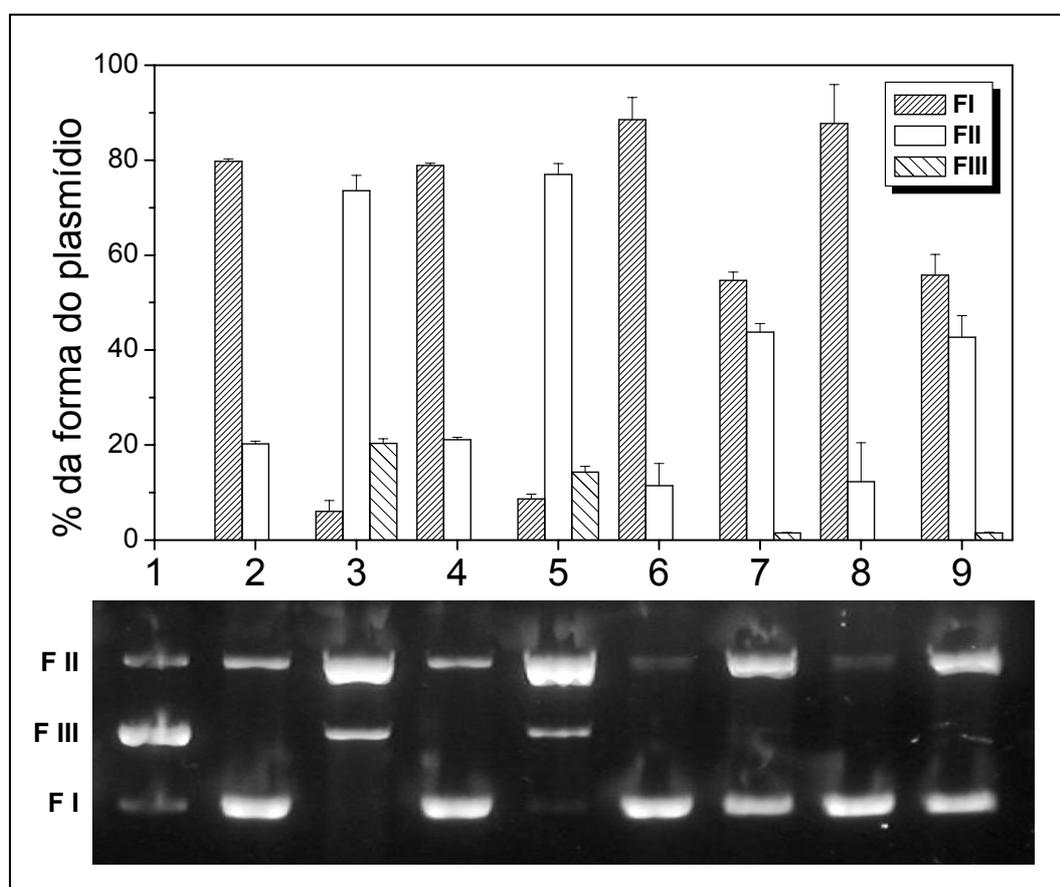
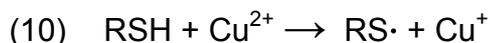


FIGURA 4.15 – Clivagem de DNA plasmidial por CuMFF na presença de um agente redutor externo (DTT). Poços 2 – 5: condições aeróbias; poços 6 – 9: condições anaeróbias (atmosfera de argônio); poço 1: pBSK-II digerido com *Bam*HI; poços 2 e 6: controle – somente DNA (pBSK-II 24 μ M pb); poços 3 e 7: DNA + CuMFF 500 μ M; poços 4 e 8: DNA + DMSO 400 mM; poços 5 e 9: DNA + DMSO 400 mM + CuMFF 500 μ M. Todas as amostras foram incubadas por 4 horas a 50°C em tampão Tris 100 mM, pH = 8,0 e DTT 2,5 mM. Acima da foto do gel é mostrado um gráfico com a quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial de cada amostra.

Estes resultados estão de acordo com trabalhos descritos na literatura [98; 110-112]. Foi mostrado que tióis são capazes de causar quebras em moléculas de

DNA [111] e podem gerar radicais tiila ($RS\cdot$) na presença de metais (equação 10), como Fe^{3+} e Cu^{2+} [98; 111].



Na presença de O_2 este radical $RS\cdot$ e o Cu^+ podem, através de uma série de reações, levar a formação de outras espécies capazes de causar quebras em moléculas de DNA, entre elas o $HO\cdot$ e o oxigênio singlete. Também já foi descrito que o próprio $RS\cdot$ pode causar dano em moléculas de DNA, tanto nas bases [110] como no açúcar [112], e que esta espécie seria a responsável pela clivagem de DNA em condições anaeróbias [111].

Uma outra forma para se avaliar o mecanismo envolvido na clivagem de DNA pelo complexo CuMFF é através da identificação de uma possível formação de Cu^+ . A identificação desta espécie pode ser feita através da utilização do conhecido, e amplamente utilizado, agente quelante de Cu^+ batocuproína (BC – 2,9-dimetil-4,7-di(fenil-sulfonato de sódio)-1,10-fenantrolina – Figura 4.16) [113-116].

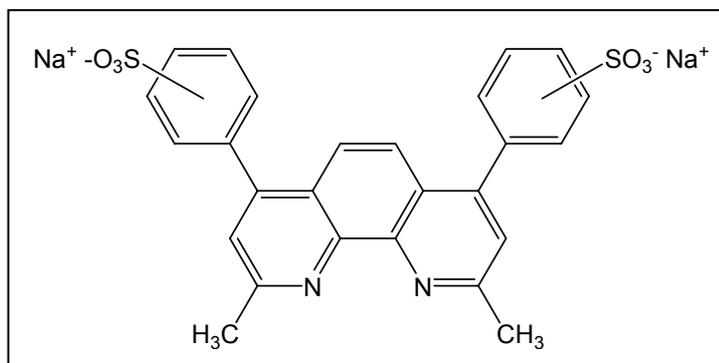


FIGURA 4.16 – Estrutura química da batocuproína.

A Figura 4.17 mostra o resultado da reação de clivagem de DNA por CuMFF na presença de BC, onde pode ser notado claramente que este último causou uma completa inibição da reação. Isto não significa, necessariamente, que há formação de Cu^+ , uma vez que BC também se liga em Cu^{2+} e poderia, por exemplo, estar bloqueando o complexo de atuar sobre as moléculas de DNA. O esclarecimento deste fato pode ser conseguido através de espectroscopia eletrônica, uma vez que o complexo formado entre BC e Cu^+ apresenta uma absorção característica em 480 nm ($\epsilon = 12,2 - 13,5 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) [113-116], que é utilizada não só para a identificação, mas também para a quantificação de Cu^+ .

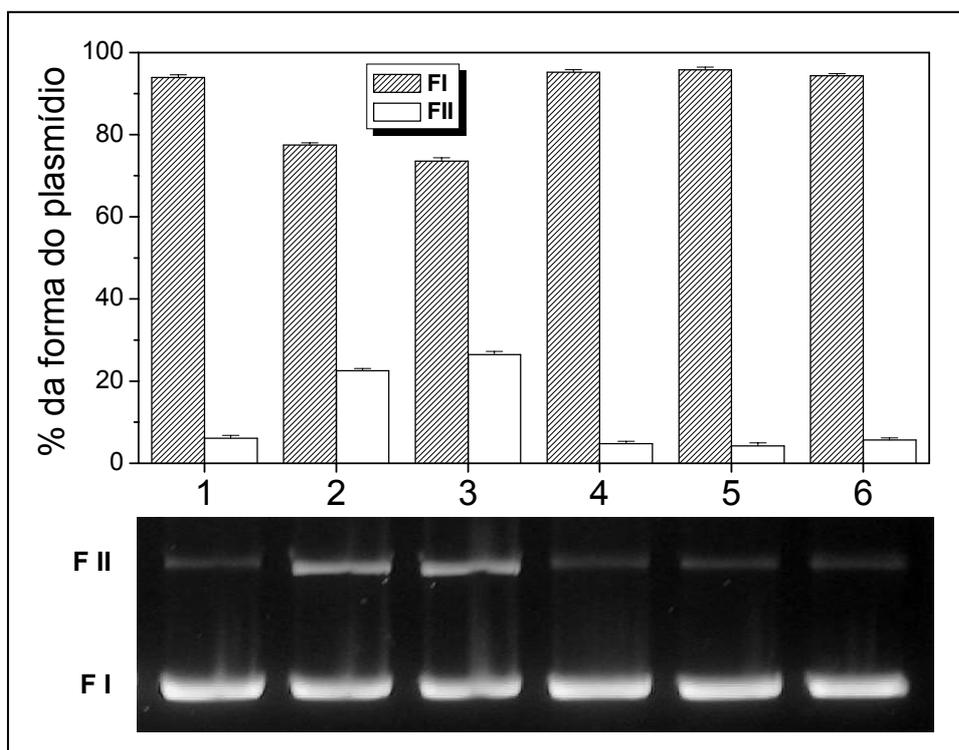


FIGURA 4.17 – Clivagem de DNA plasmidial por CuMFF na presença de BC. Poços 1 – 3: sem BC; poços 4 – 6: com BC 2 mM; poços 1 e 4: controle – somente DNA (pBSK-II 24 μ M pb); poços 2 e 5: DNA + CuMFF 500 μ M; poços 3 e 6: DNA + CuMFF 1 mM. Todas as amostras foram incubadas por 2 horas a 50°C em tampão Tris 100 mM, pH = 8,0. Acima da foto do gel é mostrado um gráfico com a quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial de cada amostra.

A Figura 4.18 mostra o espectro eletrônico do complexo CuMFF na ausência (linha tracejada) e na presença (linha cheia) de BC. Após 10 minutos de incubação, a temperatura ambiente, já é notada uma diminuição na intensidade de absorção do complexo (hipocromismo), com um deslocamento batocrômico ($\lambda_{\text{máx}} = 409 \rightarrow 414$ nm) e o aparecimento de outra banda de absorção na região esperada para o complexo formado entre BC e Cu^+ . Com 30 e 60 minutos de incubação a 50 °C, nota-se que não há alteração nem em ϵ e nem em $\lambda_{\text{máx}}$, porém, há um aumento na absorção na região de 480 nm.

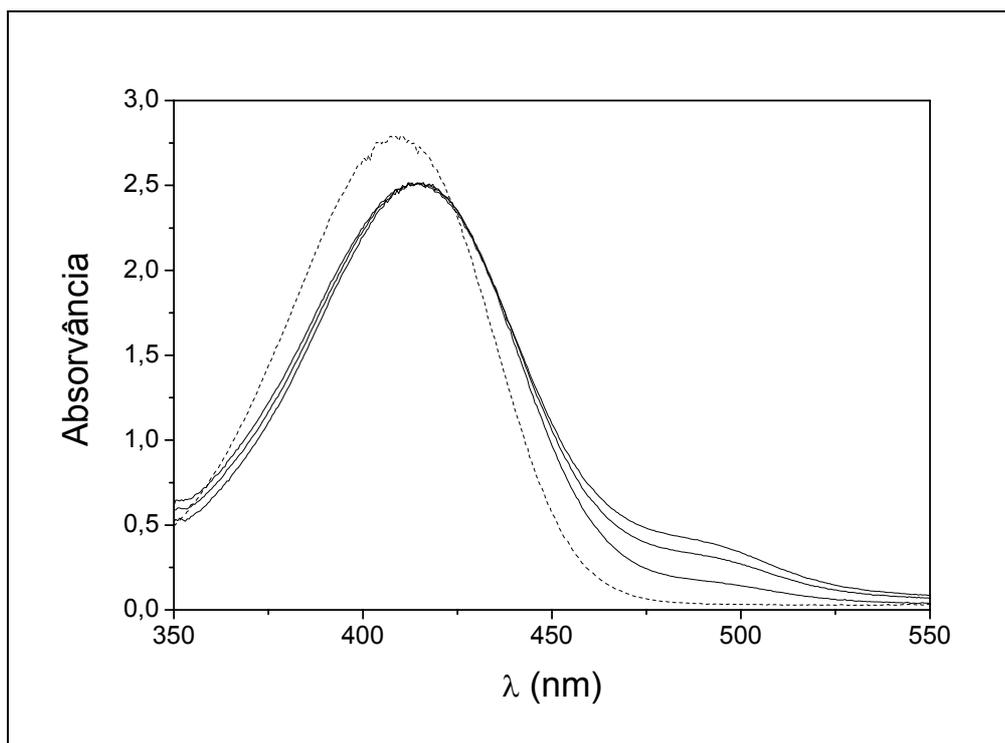


FIGURA 4.18 – Espectro eletrônico do complexo CuMFF (500 μM) na ausência (---) e na presença (—) de BC (2 mM), em tampão Tris 100 mM, pH = 8,0 + CT-DNA 31 μM . Os espectros foram obtidos após incubação de 10 minutos a temperatura ambiente (24 °C) e 30 e 60 minutos a 50 °C.

O hipocromismo e o deslocamento batocrômico indicam uma mudança no ambiente de coordenação do centro metálico do complexo, provavelmente pela ligação de BC ao Cu(II). Esta ligação pode bloquear a interação do complexo com as moléculas de DNA, resultando na inibição da reação de clivagem. Por outro lado, o aparecimento da banda de absorção na região de 480 nm na presença de BC indica a formação de Cu^+ , e através dos valores de ϵ anteriormente citados, pode-se chegar a uma estimativa da $[\text{Cu}^+]$ gerado. Assim, estimou-se a concentração de Cu^+ para os crescentes tempos de incubação como sendo 12, 24 e 31 μM , respectivamente.

Estes resultados sugerem que, apesar de haver a formação de pequena quantidade de Cu^+ , a ligação de BC a CuMFF (bloqueando o complexo) parece ser o principal fator para a completa inibição da reação anteriormente descrita (Figura 4.17).

A partir destas observações, pode-se propor que a atividade do complexo CuMFF sobre o DNA ocorre, inicialmente, pela substituição da molécula de água coordenada ao centro de cobre (II) do complexo (espécie **2**) por um átomo de oxigênio do grupo fosfato da molécula de DNA. Desta forma, o complexo aceleraria

a hidrólise das ligações fosfodiéster atuando como um ácido de Lewis (modo 1 descrito na seção 1.1.3.1). Esta proposta também poderia explicar a menor atividade da espécie **3** do complexo CuMFF que foi sugerida a partir dos experimentos em diferentes valores de pH (Figuras 4.11, 4.12 e 4.13). Uma vez que o grupo hidróxido coordenado ao centro de cobre (II) na espécie **3** é menos lábil do que a molécula de água na espécie **2**, a coordenação do grupo fosfato é mais difícil, assim dificultando a aceleração da hidrólise das ligações fosfodiéster.

A ligação do complexo CuMFF à molécula de DNA foi avaliada através da titulação espectrofotométrica do complexo com CT-DNA e pela realização da reação de clivagem na presença de distamicina (Figura 4.19), um ligante específico do sulco menor do DNA [12; 117].

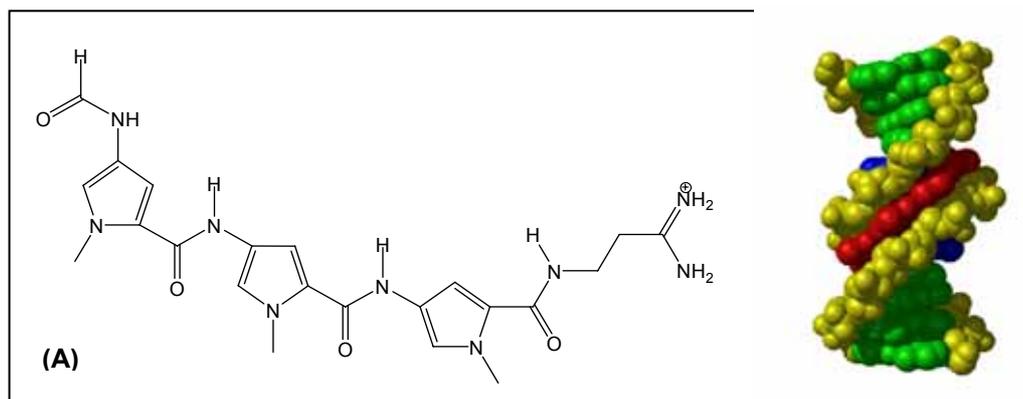


FIGURA 4.19 – Distamicina. (A) Estrutura química da distamicina; **(B)** Ligação específica da distamicina (vermelho) ao sulco menor do DNA (figura extraída do site http://www.pharmacy.umaryland.edu/courses/PHAR531/lectures_old/fig/dna_fig8a.gif - acessada em 10/02/2006).

O resultado da titulação espectrofotométrica está mostrado na Figura 4.20. O gráfico (A) inserido dentro desta figura é uma ampliação da região de absorção do complexo, onde pode ser notada uma diminuição na absorvidade molar do complexo (hipocromismo), mas sem alteração no valor de $\lambda_{\text{máx}}$ (409 nm).

Através do gráfico de $[\text{DNA}]/(\epsilon_A - \epsilon_F) \times [\text{DNA}]$ (gráfico (B) inserido dentro da Figura 4.20) foi possível calcular a constante de ligação intrínseca K_b para o complexo CuMFF como sendo $1,5 \pm 0,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$. Comparando-se este valor com os apresentados na Tabela 4.3 (seção anterior), nota-se que ele é da mesma ordem de magnitude do valor de K_b para outros complexos de cobre, porém, indica uma fraca interação do complexo CuMFF com DNA. Apesar da presença de um efeito hipocromico, ele é de pequena intensidade (refletido no valor de K_b) e não há um

deslocamento batocrômico, indicando que o modo de ligação deste complexo com DNA não deve ser intercalativo. Como a interação não é muito forte e levando-se em conta o efeito salino negativo, anteriormente citado, pode-se sugerir que esta ligação ocorra através de interações eletrostáticas.

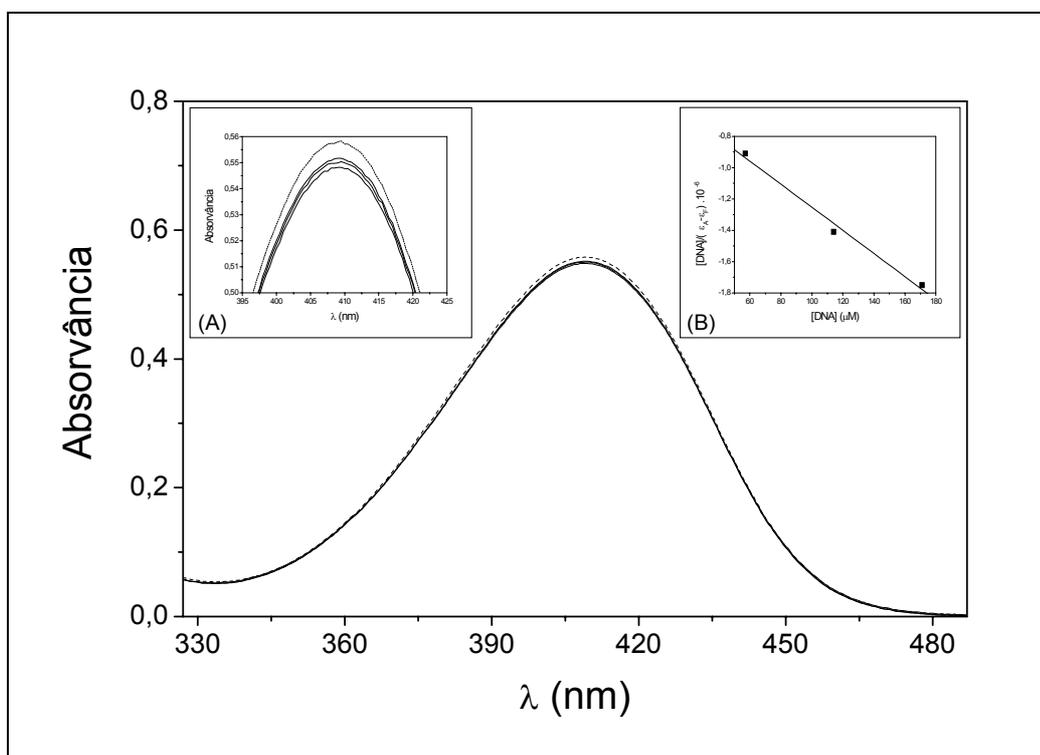


FIGURA 4.20 – Titulação espectrofotométrica do complexo CuMFF com CT-DNA. Espectroscopia eletrônica do complexo CuMFF (100 μ M) na ausência (---) e na presença (—) de quantidades crescentes de CT-DNA ($[DNA]/[CuMFF] = 0, 0,6, 1,1$ e $1,7$), em tampão Tris 100 mM, pH = 8,0. Gráficos menores inseridos na figura – **(A)** ampliação da região de absorção máxima; **(B)** gráfico de $[DNA]/(\epsilon_A - \epsilon_F) \times [DNA]$.

A Figura 4.21 mostra o resultado do outro experimento que visa um melhor entendimento do modo de ligação do complexo CuMFF com o DNA. Neste experimento foi utilizado o ligante do sulco menor de moléculas de DNA, distamicina [12; 117]. Nota-se que a presença desta molécula causa uma inibição parcial na reação de clivagem de DNA pelo complexo CuMFF. Este resultado indica que como há uma diminuição na atividade, o complexo deve agir pelo sulco menor do DNA, mas por outro lado como a inibição não é total, indica que nem todos os sítios de interação entre o complexo e o DNA foram bloqueados, ou seja, há interação também através do sulco maior. Desta forma, o que se sugere é que o complexo CuMFF deve interagir com moléculas de DNA tanto pelo sulco menor, como pelo sulco maior.

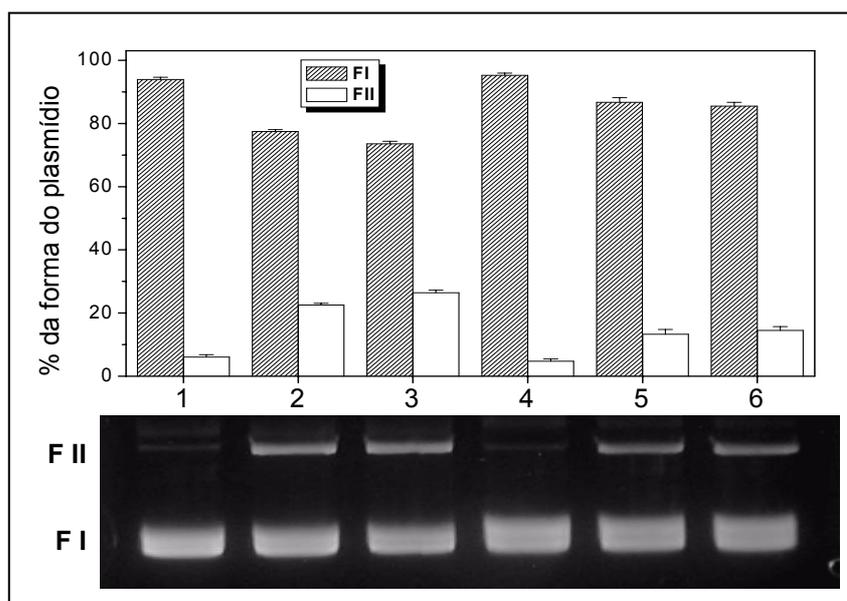


FIGURA 4.21 – Clivagem de DNA plasmidial por CuMFF na presença de distamicina. Poços 1 – 3: sem distamicina; poços 4 – 6: com distamicina 12,5 μ M; poços 1 e 4: controle – somente DNA (pBSK-II 24 μ M pb); poços 2 e 5: DNA + CuMFF 500 μ M; poços 3 e 6: DNA + CuMFF 1 mM. Todas as amostras foram incubadas por 2 horas a 50°C em tampão Tris 100 mM, pH = 8,0. Acima da foto do gel é mostrado um gráfico com a quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial de cada amostra.

Ao final dos resultados para a clivagem de DNA pelo complexo CuMFF, pode-se fazer algumas proposições. Primeiramente, que seria a espécie 2 do complexo a mais ativa neste processo, atuando como ácido de Lewis na aceleração da hidrólise das ligações fosfodiéster do DNA. Por se tratar de um mecanismo hidrolítico, a atividade deste complexo é independente da presença de O₂. A ligação do complexo CuMFF deve ocorrer tanto pelo sulco menor como pelo sulco maior das moléculas de DNA, porém, com uma força de ligação não muito elevada.

4.3 Cu₂L-X

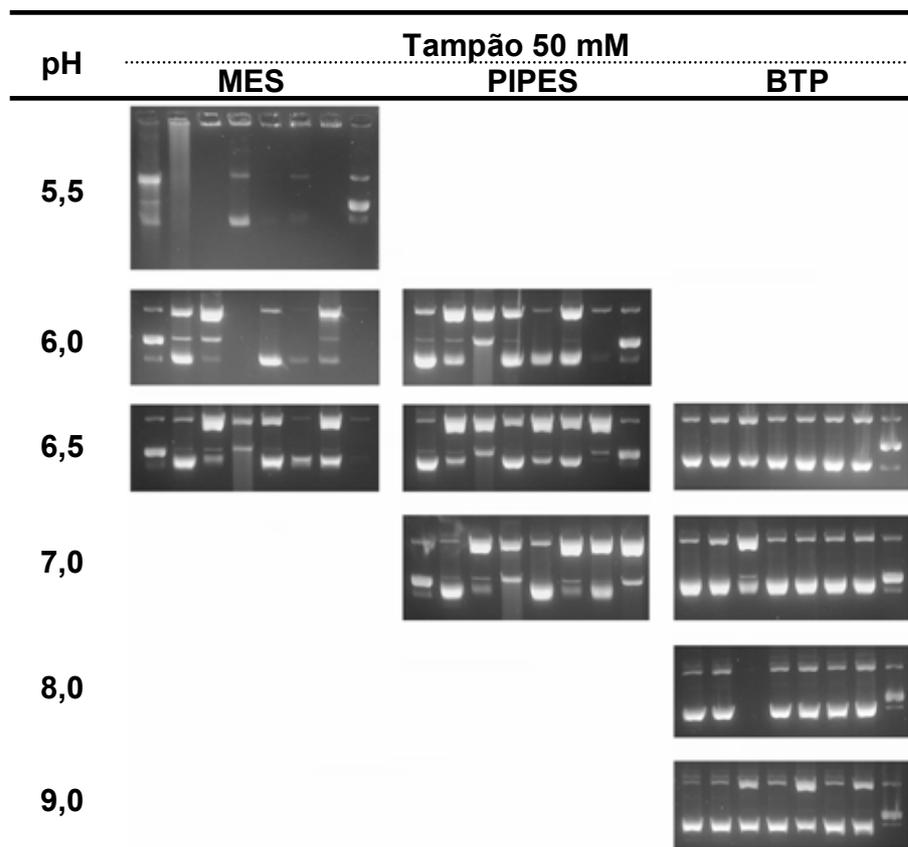
Nesta seção serão apresentados os resultados obtidos para o estudo da clivagem de DNA plasmidial pelos complexos Cu₂L-X. Parte dos resultados que serão apresentados e discutidos nesta seção para o complexo Cu₂L-dtb foram publicados juntamente com os resultados de síntese e caracterização do mesmo [118]. O artigo com os demais resultados para este complexo, juntamente com os resultados para os complexos Cu₂L-H e Cu₂L-NO₂ está em preparação.

No início dos estudos com estes complexos, pouco se sabia sobre o comportamento deles em solução. Este fato aconteceu em função deles terem sido recém sintetizados na época dos primeiros experimentos, e ainda estarem sendo caracterizados, pela então doutoranda do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia da UFSC Rosely A. Peralta.

Desta maneira, uma série de experimentos foi realizada com estes complexos em uma ampla faixa de pH com diferentes tampões. Na Tabela 4.4 são apresentadas fotos de géis de agarose obtidas nestes experimentos.

Através destes resultados fica evidente a influência não só do pH do meio, mas também a do tampão na clivagem do DNA pelos complexos Cu₂L-X. Porém, o importante a ser comentado sobre esses resultados, é que para estudos que envolvem a interação entre moléculas de DNA e metais, ou complexos metálicos, a faixa de pH e o tampão a ser utilizado são fatores extremamente importantes, e limitantes. Para o DNA, por exemplo, o pH do meio é fundamental, uma vez que ácidos nucleicos são rapidamente desnaturados em soluções aquosas a pHs extremos e, também, sob aquecimento [12]. As ligações fosfodiéster são hidrolisadas apenas lentamente, mas as ligações N-glicosídicas são mais lábeis, sob pH moderadamente ácido (Figura 4.22). Nucleosídeos de purina são clivados mais rapidamente do que os de pirimidinas, enquanto ribonucleosídeos são mais estáveis do que desoxirribonucleosídeos [12].

TABELA 4.4 – Géis de agarose^a de amostras de DNA plasmidial^b incubados com os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}^{\text{c,d,e}}$ em diferentes tampões e valores de pH.



^a A primeira, ou a última, amostra de cada gel corresponde ao pBSK-II digerido com *Bam*HI, as demais seguem a ordem: 1 – controle (somente DNA); 2 e 3 – $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$; 4 e 5 – $\text{Cu}_2\text{L-H}$; 6 e 7 – $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$.

^b Todas as amostras continham [pBSK-II] = 33 μM pb e [acetonitrila] = 25 %; e foram incubadas por 16 horas a 50 °C.

^c $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ 20 e 100 μM

^d $\text{Cu}_2\text{L-H}$ 100 e 500 μM

^e $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ 100 e 500 μM

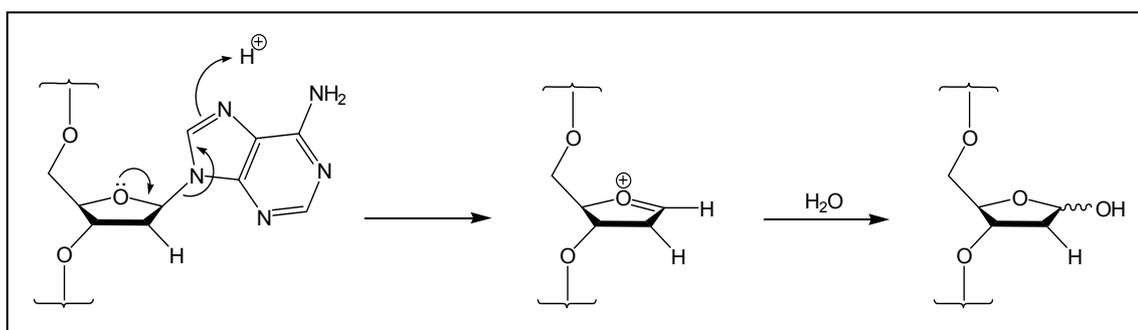


FIGURA 4.22 – Hidrólise ácida de nucleosídeo de purina no DNA [12].

Por outro lado, uma série de trabalhos mostra que os tampões amplamente utilizados em estudos químicos e bioquímicos, entre eles o Tris e os chamados tampões de Good (Good's buffers) [119-121], não são tão inertes quanto se

pensava. Entre os efeitos que foram demonstrados para estes tampões, pode-se destacar: a formação e captação de radicais [100; 101; 122-125]; atuação como agentes complexantes de íons metálicos [126; 127]; atividade como surfactantes [126; 128] e a influência na atividade de enzima de restrição [129]. Entretanto, alguns estudos mostram que os tampões PIPES e MOPS não apresentam tantos inconvenientes como outros tampões [126; 127; 130].

Desta forma, os estudos de clivagem de DNA plasmidial pelos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ realizados neste trabalho, ficaram restritos a utilização dos tampões PIPES e MOPS, na faixa de pH entre 6 e 8. Mais especificamente, foi escolhido o tampão PIPES em concentração 10 mM e pH = 7,4, com força iônica do sistema ajustada para $I = 0,1$ M com NaCl (condição próxima da fisiológica), para a realização dos experimentos deste trabalho, com exceção dos que envolveram variação de pH.

A Figura 4.23 mostra o resultado da incubação do DNA plasmidial com o complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ em diferentes pHs para os tampões MOPS e PIPES (os respectivos controles estão apresentados na Figura 4.24). Nota-se um claro aumento da atividade do complexo com o aumento do pH do meio. Apesar de haver uma ligeira diferença de atividade quando os dois tampões são comparados em um mesmo valor de pH (a atividade é ligeiramente maior em PIPES), a tendência é a mesma: quanto mais básico o pH maior a atividade. Analisando-se a curva de distribuição de espécies para este complexo (anexo D), pode ser notado que na faixa de pH testada há um aumento da fração da espécie **D** do complexo com o aumento do pH. Por ora, os comentários sobre a influência do pH do meio para a clivagem de DNA ficarão restritos apenas a estas observações, porém, esta influência voltará a ser discutida mais adiante.

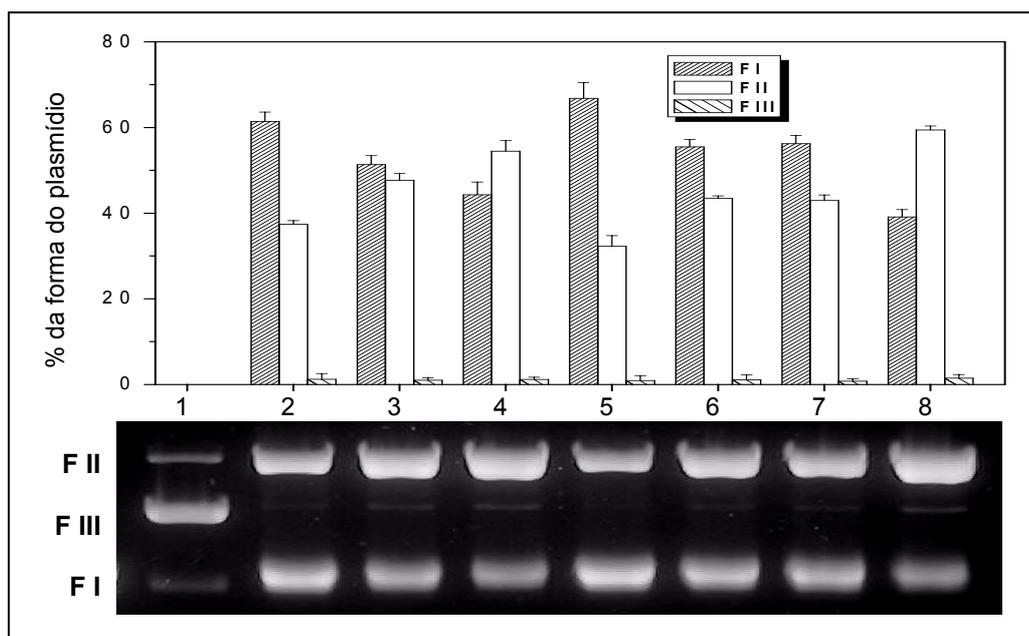


FIGURA 4.23 – Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ em diferentes pHs. Todas as amostras contém plasmídeo pBSK-II $33 \mu\text{M}$ + $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ $50 \mu\text{M}$ + acetonitrila 25 % (v/v). Poço 1: pBSK-II digerido com *Bam*HI; poço 2: tampão PIPES pH = 6,5; poço 3: tampão PIPES pH = 7,0; poço 4: tampão PIPES pH = 7,6; poço 5: tampão MOPS pH = 6,5; poço 6: tampão MOPS pH = 7,0; poço 7: tampão MOPS pH = 7,5; poço 8: tampão MOPS pH = 7,9. Todas as amostras foram incubadas por 16 horas a 50°C , em 10 mM dos respectivos tampões e ajustados para $I = 0,1 \text{ M}$, com NaCl. Acima da foto do gel é mostrado um gráfico com a quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial de cada amostra.

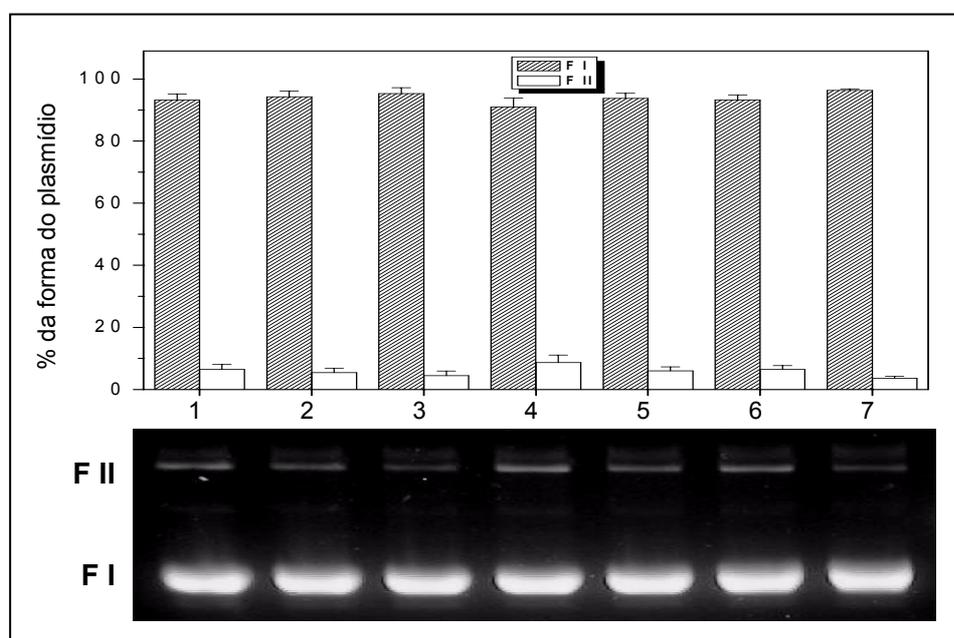


FIGURA 4.24 – Experimento controle da clivagem de DNA plasmidial pelo complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ em diferentes pHs. Todas as amostras contém plasmídeo pBSK-II $33 \mu\text{M}$ + acetonitrila 25 % (v/v). Poço 1: tampão PIPES pH = 6,5; poço 2: tampão PIPES pH = 7,0; poço 3: tampão PIPES pH = 7,6; poço 4: tampão MOPS pH = 6,5; poço 5: tampão MOPS pH = 7,0; poço 6: tampão MOPS pH = 7,5; poço 7: tampão MOPS pH = 7,9. Todas as amostras foram incubadas por 16 horas a 50°C , em 10 mM dos respectivos tampões e ajustados para $I = 0,1 \text{ M}$, com NaCl. Acima da foto do gel é mostrado um gráfico com a quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial de cada amostra.

Outro fator que também tem grande influência na clivagem de DNA por complexos metálicos é a força iônica do sistema. Esta influência foi avaliada, e os resultados dos experimentos são apresentados nas Figuras 4.25 e 4.26. Pode ser notado um claro efeito salino negativo, como também ocorre para o complexo CuMFF [108; 109]. Este efeito já era esperado, uma vez que a molécula de DNA é carregada negativamente e os complexos em estudo apresentam carga positiva. Ainda, não foi notada nenhuma alteração de atividade quando o controle da força iônica da reação foi feito com NaCl ou com LiClO₄.

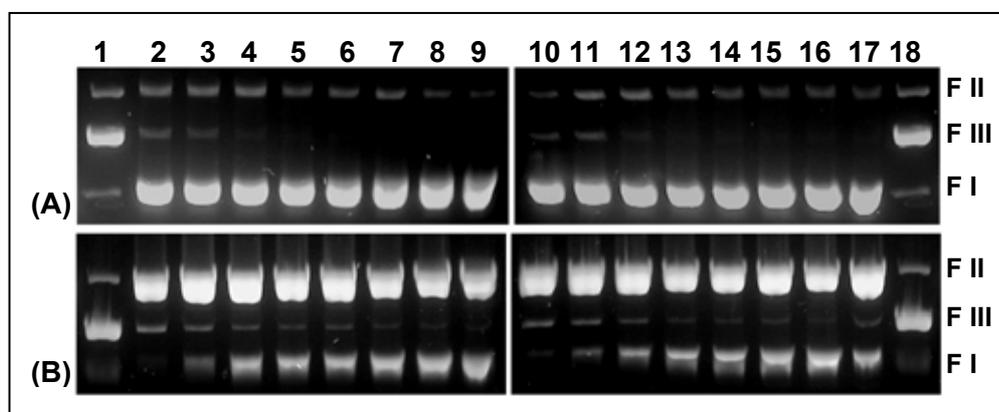


FIGURA 4.25 – Efeito da variação da força iônica na clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu₂L-dtb. **(A)** controle – somente DNA (pBSK-II 33 μM pb); **(B)** DNA + Cu₂L-dtb 50 μM. Poços **1** e **18**: pBSK-II digerido com *Bam*HI; Poços **2 – 9**: I = 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 500 mM, com LiClO₄, respectivamente; poços **10 – 17**: I = 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250 e 500 mM, com NaCl, respectivamente. Todas as amostras foram incubadas por 16 horas a 50°C em tampão PIPES 10 mM, pH = 7,4 + acetonitrila 25 % (v/v).

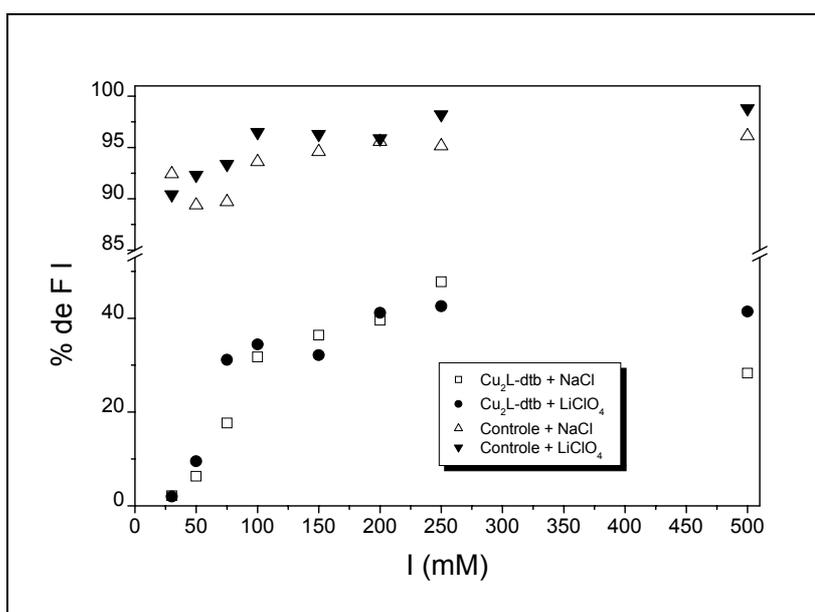


FIGURA 4.26 – Efeito da variação da força iônica na clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu₂L-dtb. Gráfico com a quantificação da % de F I das amostras da Figura 4.23.

As Figuras 4.27, 4.28 e 4.29 mostram o efeito da variação da concentração dos complexos na reação de clivagem de DNA plasmidial, respectivamente para $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$, $\text{Cu}_2\text{L-H}$ e $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$. Na Figura 4.27 pode ser notado que a menor concentração testada ($5 \mu\text{M}$) para o complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ já foi capaz de causar uma grande clivagem no DNA plasmidial, após 16 horas de incubação a 50°C , com a % de **F I** passando de 93,4 para 46,6 %, bem como a presença de 1 % de **F III**. Foi notada também, a formação de um rastro de DNA nas amostras com concentrações de $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ a partir de $50 \mu\text{M}$. Este rastro corresponde a uma extensiva clivagem das moléculas de DNA, que acabam por gerar fragmentos de uma infinidade de tamanhos, resultando na ausência de bandas definidas. Com $500 \mu\text{M}$ do complexo nenhum fragmento de DNA foi visualizado, em razão de uma degradação completa.

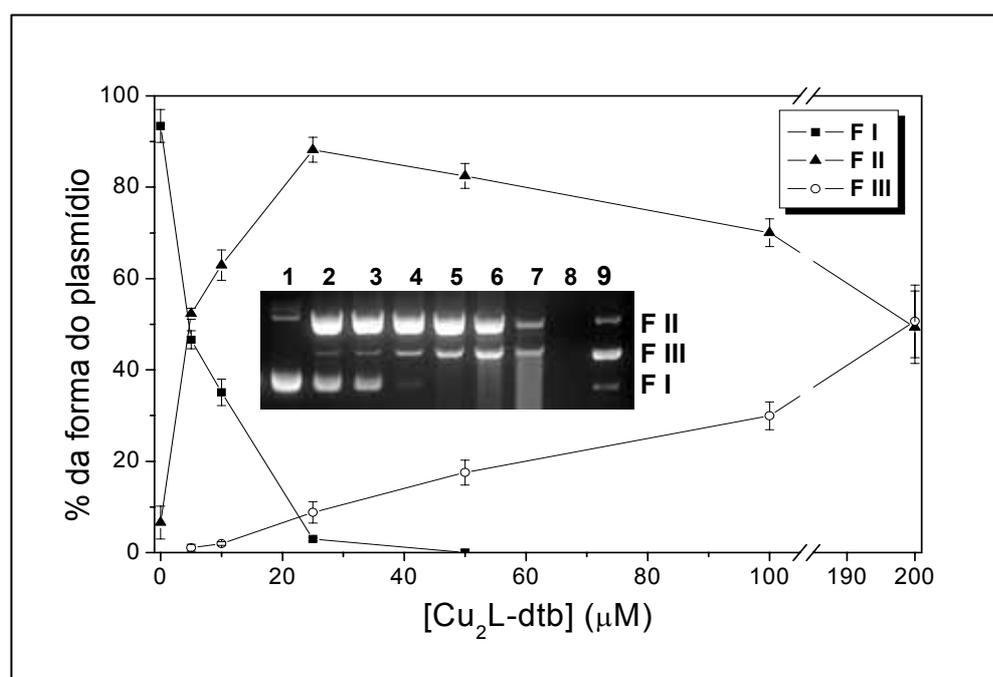


FIGURA 4.27 – Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$. Gráfico da % das formas do DNA plasmidial em função da concentração do complexo. Figura inserida – foto do gel de agarose com as respectivas amostras. Poço 1: controle – somente DNA (pBSK-II $26 \mu\text{M}$ pb); poços 2 – 8: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ 5, 10, 25, 50, 100, 200 e $500 \mu\text{M}$; poço 9: pBSK-II digerido com *Bam*HI. Todas as amostras foram incubadas por 16 horas a 50°C em tampão PIPES 10 mM, pH = 7,4 com I = 0,1 M (NaCl) + acetonitrila 25 % (v/v).

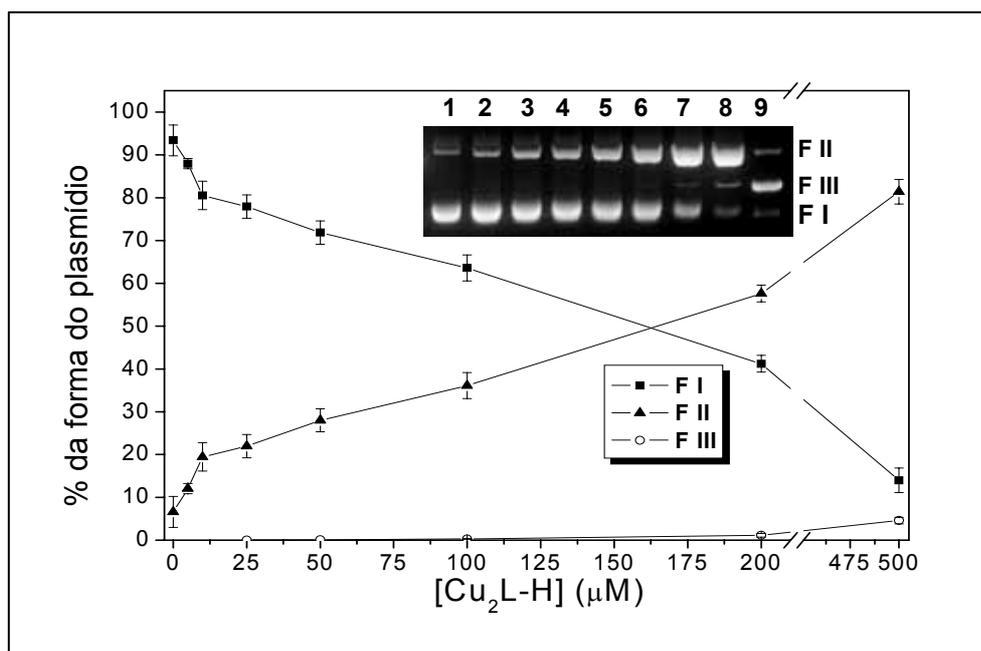


FIGURA 4.28 – Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu₂L-H. Gráfico da % das formas do DNA plasmidial em função da concentração do complexo. Figura inserida – foto do gel de agarose com as respectivas amostras. Poço 1: controle – somente DNA (pBSK-II 26 µM pb); poços 2 – 8: DNA + Cu₂L-H 5, 10, 25, 50, 100, 200 e 500 µM; poço 9: pBSK-II digerido com *Bam*HI. Todas as amostras foram incubadas por 16 horas a 50°C em tampão PIPES 10 mM, pH = 7,4 com I = 0,1 M (NaCl) + acetonitrila 25 % (v/v).

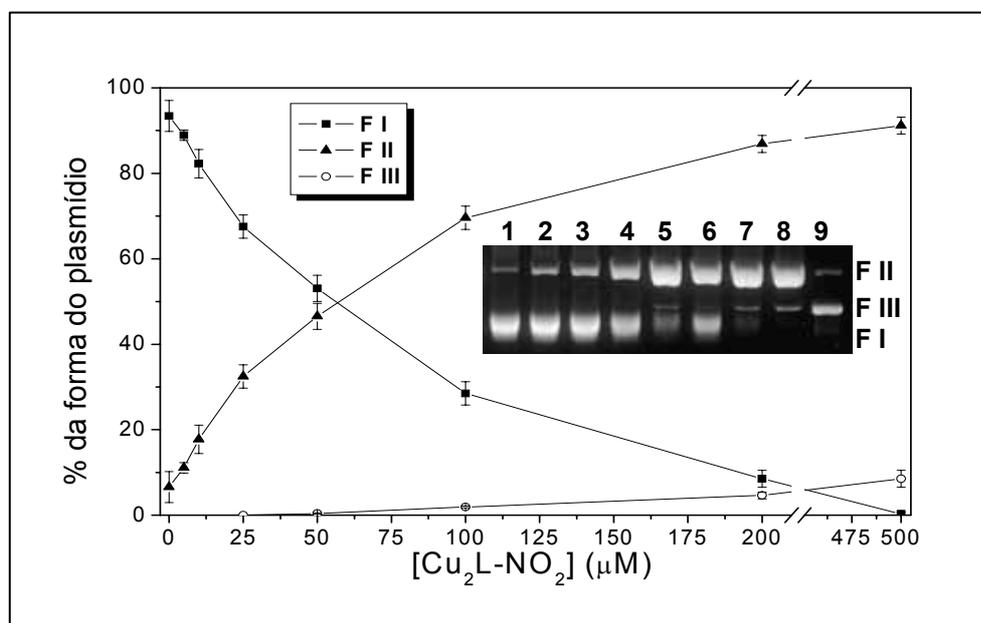


FIGURA 4.29 – Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo Cu₂L-NO₂. Gráfico da % das formas do DNA plasmidial em função da concentração do complexo. Figura inserida – foto do gel de agarose com as respectivas amostras. Poço 1: controle – somente DNA (pBSK-II 26 µM pb); poços 2 – 8: DNA + Cu₂L-NO₂ 5, 10, 25, 100, 50, 200 e 500 µM; poço 9: pBSK-II digerido com *Bam*HI. Todas as amostras foram incubadas por 16 horas a 50°C em tampão PIPES 10 mM, pH = 7,4 com I = 0,1 M (NaCl) + acetonitrila 25 % (v/v).

A clivagem de DNA por $\text{Cu}_2\text{L-H}$ e $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ também foi dependente da concentração do complexo em solução, como pode ser visto na Figuras 4.28 e 4.29. Entretanto, a clivagem de DNA foi menos intensa para estes complexos, quando comparada com o $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$. Como já foi mencionado, e para se fazer uma comparação, $5 \mu\text{M}$ do complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ foi capaz de reduzir a porcentagem de **F I** para cerca de 50 % (46,6 %). Já no caso dos complexos $\text{Cu}_2\text{L-H}$ e $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ a concentração necessária para a redução da porcentagem de **F I** a 50 % é de aproximadamente 160 e 60 μM , respectivamente. Desta forma, pode-se dizer que a atividade de clivagem de DNA plasmidial pelos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ é: $\text{Cu}_2\text{L-dtb} > \text{Cu}_2\text{L-NO}_2 > \text{Cu}_2\text{L-H}$.

O efeito do tempo de exposição à luz (lâmpada de tungstênio) na clivagem de DNA pelos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ também foi avaliado e os resultados estão apresentados nas Figuras 4.30, 4.31 e 4.32.

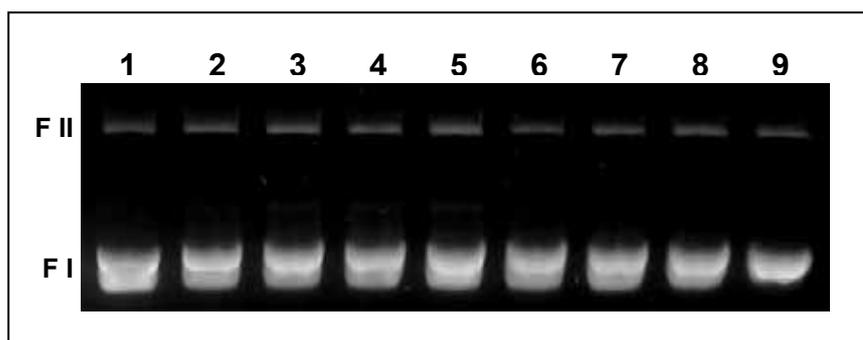


FIGURA 4.30 – Gel de agarose das amostras controle (somente DNA) para a reação de clivagem de DNA plasmidial pelos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$, na presença e na ausência de luz (lâmpada de tungstênio). Poço 1: amostra sem incubação (tempo zero); poços 2 – 5: respectivamente 2, 4, 6 e 8 horas de incubação na presença de luz; poços 6 – 9: respectivamente 2, 4, 6 e 8 horas de incubação na ausência de luz. Todas as amostras continham plasmídeo pBSK-II $26 \mu\text{M}$ + acetonitrila 25 % (v/v) e foram incubadas a 50°C em tampão PIPES 10 mM pH = 7,4 com $[\text{NaCl}] = 0,1 \text{ M}$.

A Figura 4.30 mostra o resultado do experimento controle, onde o DNA plasmidial é incubado sem a presença dos complexos na presença e na ausência de luz. Pode ser notado que a incubação das amostras em ambas as condições não causaram clivagem do DNA plasmidial. Vale lembrar que radiação UV pode causar dano às moléculas de DNA, porém, lâmpadas de tungstênio como a que foi utilizada neste estudo não emitem tal radiação.

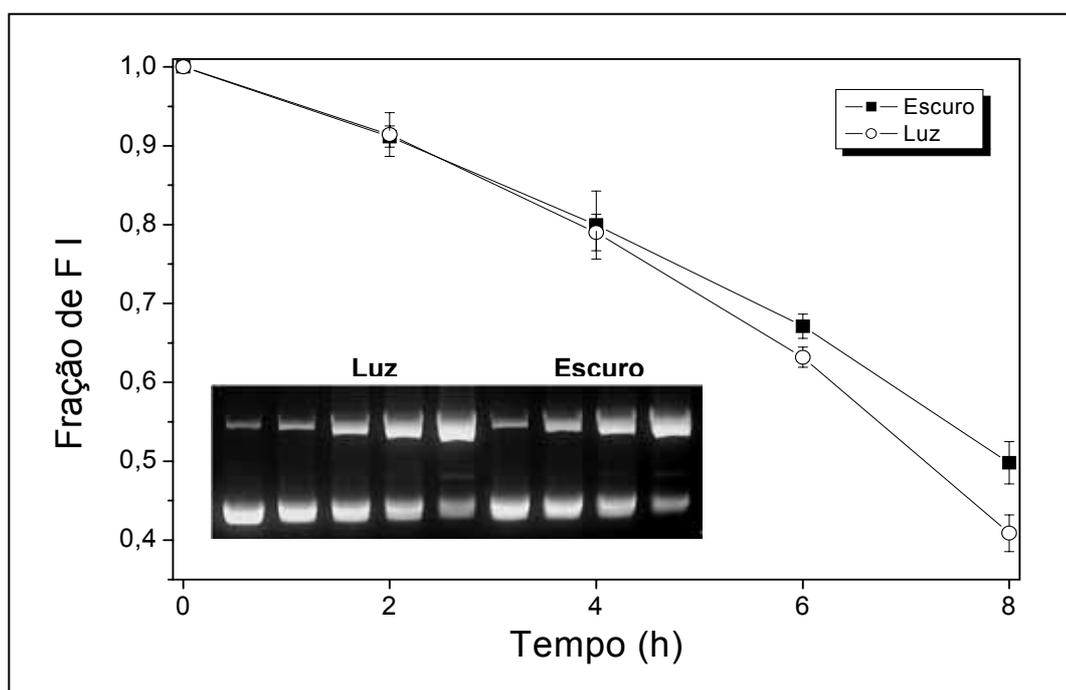


FIGURA 4.31 – Gráfico da fração de F I em função do tempo, para a reação de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$, na presença e na ausência de luz (lâmpada de tungstênio). Figura inserida – foto do gel de agarose com as respectivas amostras. Todas as amostras continham plasmídeo pBSK-II $26 \mu\text{M}$ + $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ $50 \mu\text{M}$ + acetonitrila 25 % (v/v) e foram incubadas a 50°C em tampão PIPES 10 mM pH = 7,4 com I = 0,1 M (NaCl).

A presença de luz durante a reação de clivagem de DNA teve apenas uma pequena influência para o complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$, como pode ser visto na Figura 4.31. Apesar de ser pequena, esta influência é estatisticamente significativa após 6 horas de incubação. No caso dos complexos $\text{Cu}_2\text{L-H}$ e $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$, os resultados mostrados nas Figuras 4.32 e 4.33, respectivamente, indicam que a reação na presença de luz não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação à realizada na ausência de luz.

Apesar dos resultados indicarem que a clivagem de DNA pelo complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ é foto-estimulada e que isto, aparentemente, não ocorre para os outros dois complexos, é importante ressaltar que estes são apenas resultados preliminares. A substituição da radiação multicromática da lâmpada de tungstênio por uma fonte de radiação monocromática (através de lâmpadas, filtros ou até lasers) se faz necessária para a realização de um estudo de foto-clivagem mais adequado.

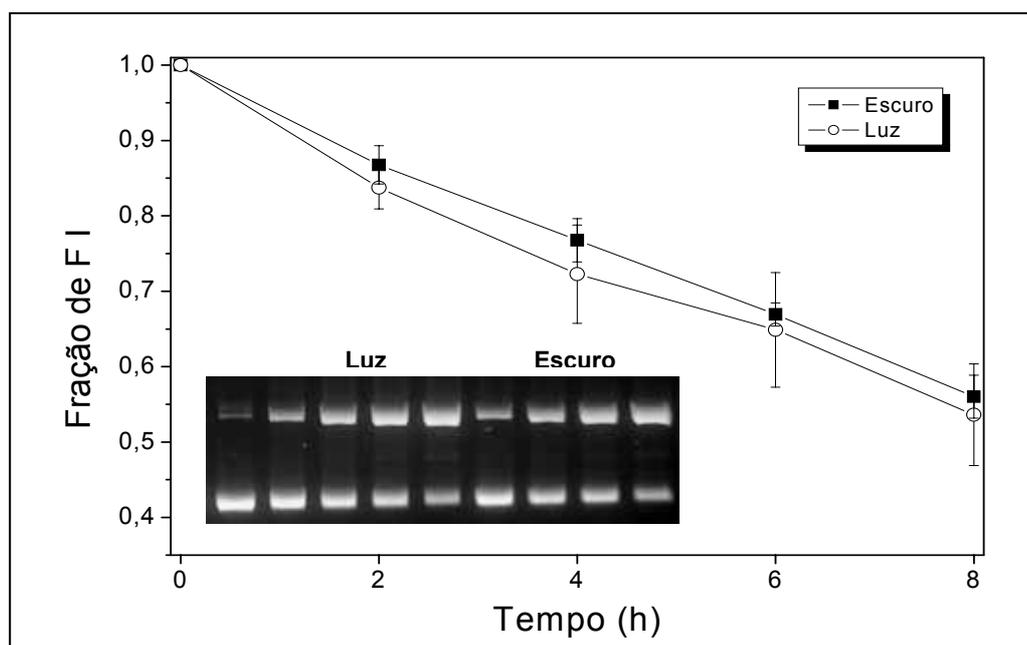


FIGURA 4.32 – Gráfico da fração de F I em função do tempo, para a reação de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo $\text{Cu}_2\text{L-H}$, na presença e na ausência de luz (lâmpada de tungstênio). Figura inserida – foto do gel de agarose com as respectivas amostras. Todas as amostras continham plasmídeo pBSK-II $26 \mu\text{M}$ + $\text{Cu}_2\text{L-H}$ $500 \mu\text{M}$ + acetonitrila 25 % (v/v) e foram incubadas a 50°C em tampão PIPES 10 mM pH = 7,4 com $\text{I} = 0,1 \text{ M}$ (NaCl).

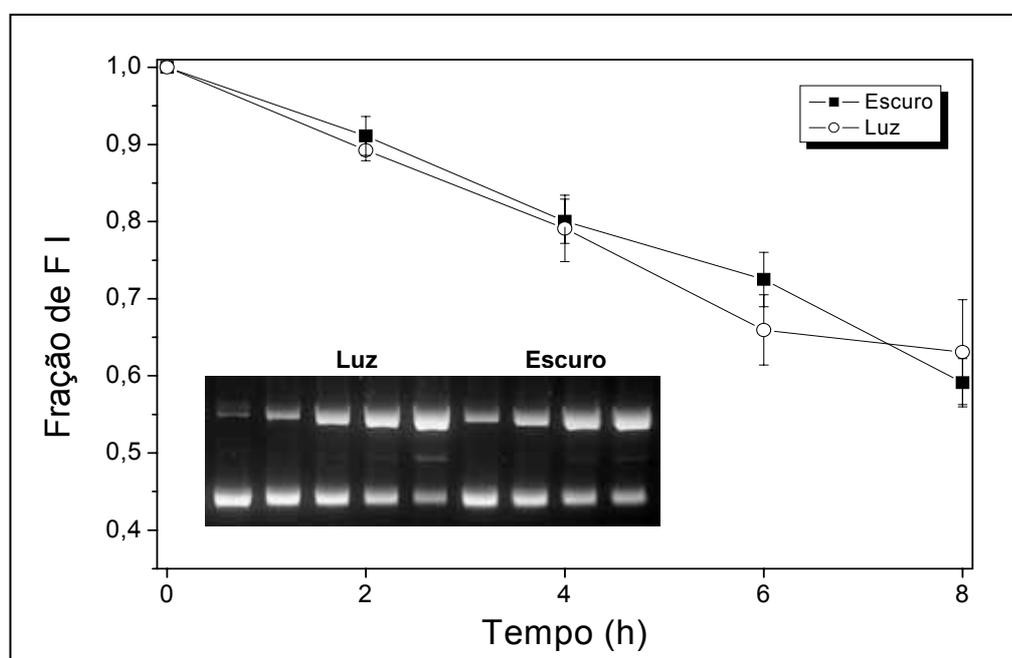


FIGURA 4.33 – Gráfico da fração de F I em função do tempo, para a reação de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$, na presença e na ausência de luz (lâmpada de tungstênio). Figura inserida – foto do gel de agarose com as respectivas amostras. Todas as amostras continham plasmídeo pBSK-II $26 \mu\text{M}$ + $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ $250 \mu\text{M}$ + acetonitrila 25 % (v/v) e foram incubadas a 50°C em tampão PIPES 10 mM pH = 7,4 com $\text{I} = 0,1 \text{ M}$ (NaCl).

Através dos dados de clivagem de DNA pelos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ na ausência de luz, calculou-se a velocidade da reação como sendo $3,98 \pm 0,29$, $3,45 \pm 0,11$ e $3,21 \pm 0,15 \times 10^{-4} \mu\text{M}\cdot\text{s}^{-1}$, respectivamente para os complexos $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$, $\text{Cu}_2\text{L-H}$ e $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$. Nota-se que estes valores são muito próximos (para os complexos $\text{Cu}_2\text{L-H}$ e $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ os valores são estatisticamente iguais), porém as concentrações utilizadas para cada complexo foram diferentes. Levando-se em conta estas diferenças de concentração pode-se chegar a seguinte relação entre as atividades resultantes para os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$:



o que concorda com a tendência encontrada nos experimentos de dependência da concentração dos complexos, anteriormente discutidos.

Com a finalidade de avaliar qual o tipo de mecanismo envolvido na clivagem de DNA pelos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$, foram realizadas reações na presença de DMSO e os resultados são apresentados na Figura 4.34. Nesta figura pode-se notar claramente que há uma inibição da reação de clivagem para todos os três complexos, o que sugere o envolvimento de radicais $\text{HO}\cdot$. Estes resultados mostram também que a inibição não é total. Este fato pode estar ocorrendo pela presença de um ciclo catalítico (como o que foi sugerido para o complexo Cu_2BMXD) que poderia estar gerando radicais $\text{HO}\cdot$ continuamente. Uma outra possibilidade seria a de essas reações acontecerem através de um mecanismo misto, em parte oxidativo e em parte hidrolítico.

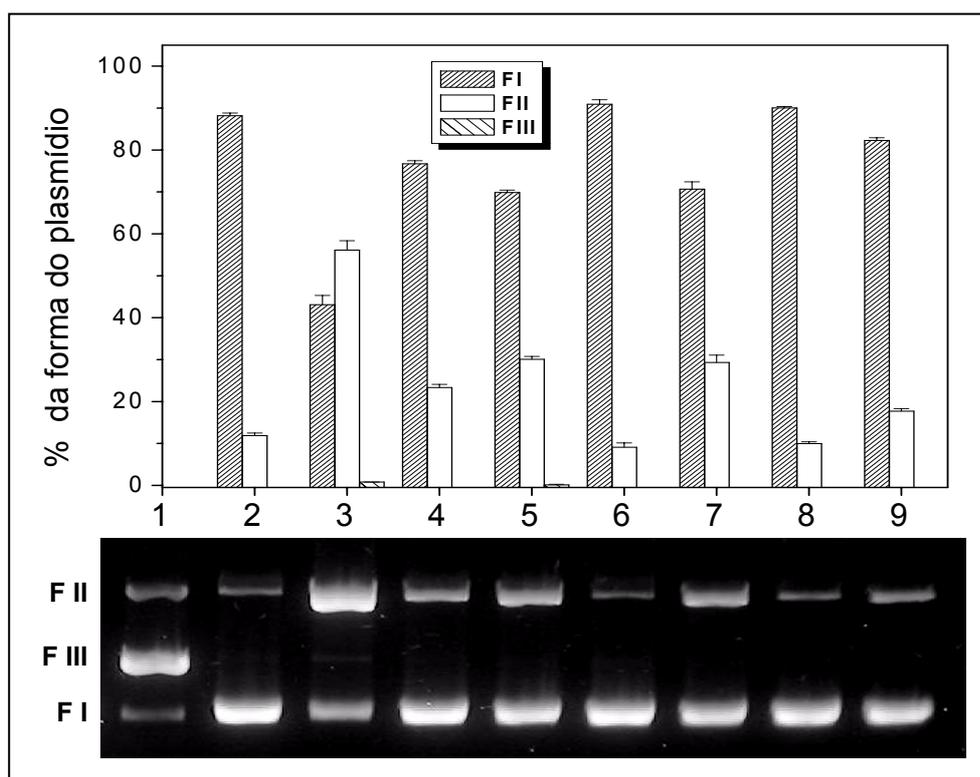


FIGURA 4.34 – Clivagem de DNA plasmidial por $\text{Cu}_2\text{L-X}$ na presença de DMSO. Poço 1: pBSK-II digerido com *Bam*HI; poços 2 – 5: sem DMSO; poços 6 – 9: com DMSO 1 M; poços 2 e 6: controle – somente DNA (pBSK-II 26 μM pb); poços 3 e 7: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ 250 μM ; poços 4 e 8: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-H}$ 500 μM ; poços 5 e 9: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ 500 μM . Todas as amostras foram incubadas por 4 horas a 50°C em tampão PIPES 10 mM pH = 7,4 com I = 0,1 M (NaCl) + acetonitrila 25 % (v/v). Acima da foto do gel é mostrado um gráfico com a quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial de cada amostra.

No caso de um eventual ataque hidrolítico à molécula de DNA, pode-se sugerir a espécie **D** dos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ (Figura 3.6) como sendo a espécie mais propensa a tal ataque. Esta espécie possui um grupo hidróxido terminal coordenado a um dos átomos de cobre que poderia estar atuando como o nucleófilo “ativado” nesta reação. Desta forma, caso haja uma clivagem hidrolítica por estes complexos, ela deve aumentar com o aumento do pH do meio. Um aumento da atividade com o aumento do pH da solução já foi mostrado na Figura 4.23. Porém, nesse caso não é possível fazer uma ligação direta entre essas observações, uma vez que foi identificado o envolvimento de radicais $\text{HO}\cdot$. Em função disto, foram realizados experimentos de clivagem de DNA pelos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ em condições anaeróbias e em diferentes pHs.

As fotos dos géis de agarose resultantes destes experimentos são mostradas na Figura 4.35 e a quantificação das formas do DNA plasmidial de cada amostra é apresentada na Tabela 4.5.

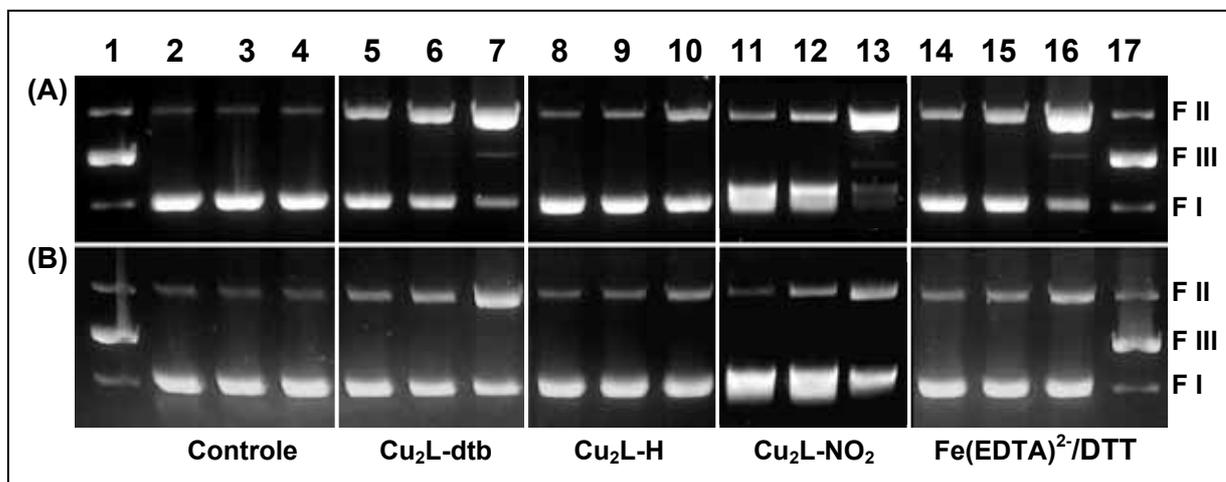


FIGURA 4.35 – Clivagem de DNA plasmidial por $\text{Cu}_2\text{L-X}$ em condições aeróbias (A) e anaeróbias (B).

Poços 1 e 17: pBSK-II digerido com *Bam*HI; poços 2 – 4: controle – somente DNA (pBSK-II 24 μM pb); poços 5 – 7: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ 250 μM ; poços 8 – 10: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-H}$ 500 μM ; poços 11 – 13: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ 500 μM ; poços 14 – 16: DNA + $\text{Fe}(\text{EDTA})^{2-}$ 25 μM + DTT 2,5 mM; poços 2, 5, 8, 11 e 14: pH = 6,5; poços 3, 6, 9, 12 e 15: pH = 7,0; poços 4, 7, 10, 11 e 16: pH = 7,9. Todas as amostras foram incubadas por 4 horas a 50°C em tampão MOPS 10 mM (I = 0,1 M – NaCl) + acetonitrila 25 % (v/v).

Estes resultados mostram que há uma inibição na clivagem do DNA quando as reações são realizadas em atmosfera livre de oxigênio. Isto mostra que o O_2 é importante para a clivagem de DNA pelos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$, provavelmente envolvido nas reações que resultam na formação de radicais $\text{HO}\cdot$. Contudo, o aumento do pH do meio causou um aumento na clivagem, mesmo em atmosfera livre de oxigênio. Este fato, juntamente com o que foi discutido anteriormente, sugere fortemente que ocorre também um processo hidrolítico na clivagem de DNA pelos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$.

TABELA 4.5 – Clivagem de DNA plasmidial pelos complexos Cu₂L-X em condições aeróbias e anaeróbias.

| Condições de reação ^a | | Reação aeróbia | | | Reação anaeróbia | | |
|--|-----|----------------|------------|-----------|------------------|------------|-----------|
| Amostra | pH | % F I | % F II | % F III | % F I | % F II | % F III |
| DNA ^b | 6,5 | 92,6 ± 0,2 | 7,4 ± 0,2 | - | 90,8 ± 0,8 | 9,2 ± 0,8 | - |
| | 7,0 | 92,0 ± 3,6 | 8,0 ± 3,6 | - | 91,4 ± 1,7 | 8,6 ± 1,7 | - |
| | 7,9 | 90,2 ± 1,5 | 9,8 ± 1,5 | - | 91,3 ± 0,5 | 8,7 ± 0,5 | - |
| DNA + Cu ₂ L-dtb ^c | 6,5 | 65,4 ± 3,2 | 34,6 ± 3,2 | - | 82,6 ± 0,2 | 17,4 ± 0,2 | - |
| | 7,0 | 57,0 ± 1,4 | 43,0 ± 1,4 | - | 74,0 ± 1,5 | 26,0 ± 1,5 | - |
| | 7,9 | 32,1 ± 3,5 | 65,8 ± 3,2 | 2,1 ± 0,3 | 59,4 ± 0,1 | 40,4 ± 0,1 | 0,2 ± 0,2 |
| DNA + Cu ₂ L-H ^d | 6,5 | 88,8 ± 0,4 | 11,2 ± 0,4 | - | 90,3 ± 0,4 | 9,7 ± 0,4 | - |
| | 7,0 | 84,4 ± 0,2 | 15,6 ± 0,2 | - | 87,5 ± 1,4 | 12,5 ± 1,4 | - |
| | 7,9 | 71,0 ± 0,3 | 29,0 ± 0,3 | - | 82,4 ± 1,6 | 17,6 ± 1,6 | - |
| DNA + Cu ₂ L-NO ₂ ^e | 6,5 | 84,2 ± 2,5 | 15,8 ± 2,5 | - | 87,6 ± 1,3 | 12,4 ± 1,3 | - |
| | 7,0 | 72,1 ± 4,2 | 27,9 ± 4,2 | - | 83,1 ± 0,1 | 16,9 ± 0,1 | - |
| | 7,9 | 40,9 ± 3,8 | 59,1 ± 3,8 | - | 65,2 ± 3,8 | 34,8 ± 3,8 | - |
| DNA + Fe(EDTA) ²⁻ /DTT ^f | 6,5 | 72,3 ± 4,8 | 27,7 ± 4,8 | - | 84,2 ± 0,9 | 15,8 ± 0,9 | - |
| | 7,0 | 64,6 ± 0,7 | 35,4 ± 0,7 | - | 81,5 ± 0,2 | 18,5 ± 0,2 | - |
| | 7,9 | 36,0 ± 0,9 | 62,2 ± 0,9 | 1,8 ± 0,0 | 71,2 ± 2,1 | 28,8 ± 2,1 | - |

^a Todas as amostras foram preparadas em tampão MOPS 10 mM (I = 0,1 M – NaCl) e foram incubadas por 4 h a 50 °C.

^b 24 μM pBSK-II (pb).

^c 250 μM Cu₂L-dtb.

^d 500 μM Cu₂L-H.

^e 500 μM Cu₂L-NO₂.

^f 25 μM Fe(EDTA)²⁻; 2,5 mM DTT.

Para a identificação de uma possível formação de Cu⁺ no sistema em estudo, realizaram-se experimentos de incubação do DNA plasmidial com os complexos Cu₂L-X na presença de BC. Na Figura 4.36 são apresentados estes resultados. Nota-se que a reação de clivagem pelos complexos Cu₂L-X é substancialmente reduzida na presença de BC. No entanto, como já foi citado para o complexo CuMFF, este resultado não implica necessariamente a formação de Cu⁺. Desta forma, utilizou-se a espectroscopia eletrônica para identificação do Cu⁺.

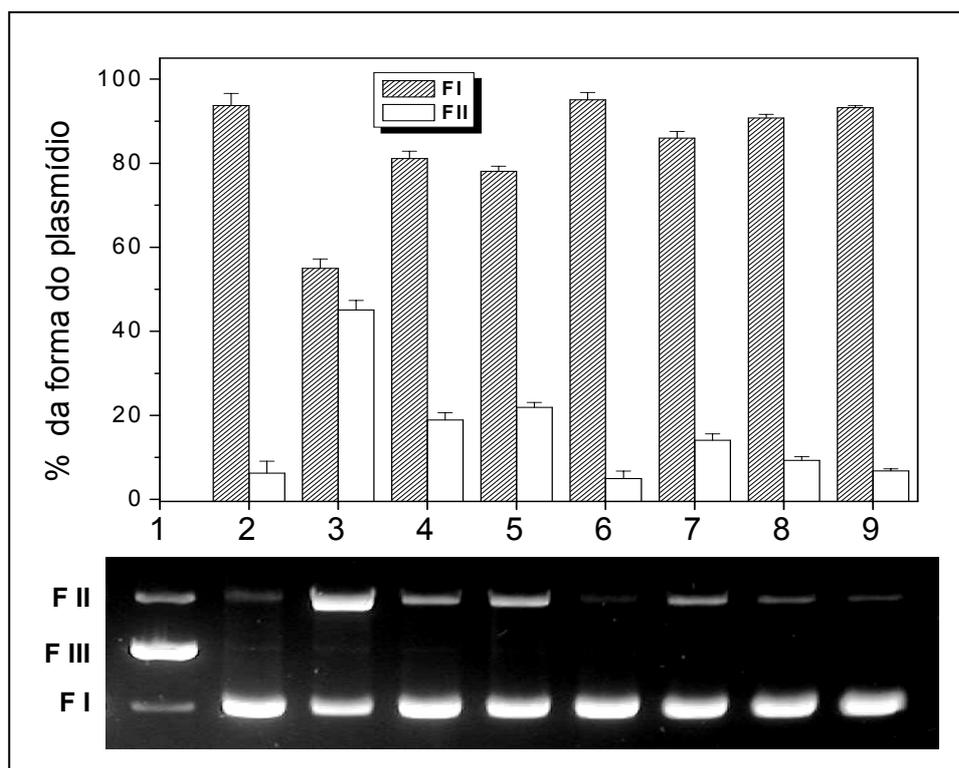


FIGURA 4.36 – Clivagem de DNA plasmidial por $\text{Cu}_2\text{L-X}$ na presença de BC. Poço 1: pBSK-II digerido com *Bam*HI; poços 2 – 5: sem BC; poços 6 – 9: com BC 2 mM; poços 2 e 6: controle – somente DNA (pBSK-II 33 μM pb); poços 3 e 7: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ 250 μM ; poços 4 e 8: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-H}$ 500 μM ; poços 5 e 9: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ 500 μM . Todas as amostras foram incubadas por 2 horas a 50°C em tampão PIPES 10 mM pH = 7,4 com I = 0,1 M (NaCl) + acetonitrila 25 % (v/v). Acima da foto do gel é mostrado um gráfico com a quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial de cada amostra.

Não foi possível a obtenção do espectro eletrônico para o complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ na presença de BC, uma vez que a amostra tornou-se turva imediatamente após ser preparada. Contudo, juntamente com esta turbidez, a amostra tornou-se avermelhada, como pode ser verificado pelas fotos das cubetas mostradas pela Figura 4.37. Estes fatos indicam não só a formação da espécie Cu^+ , mas também que ele é formado rapidamente e em uma grande quantidade.

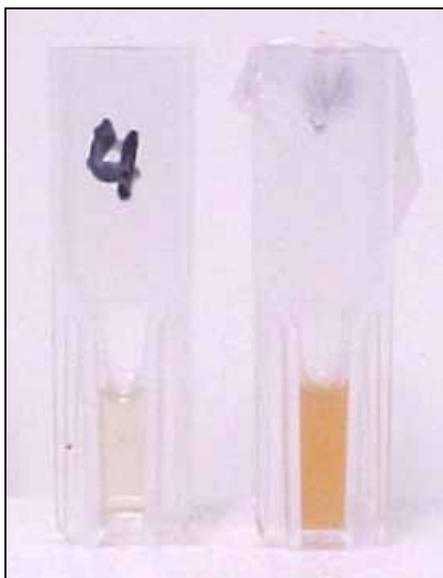


FIGURA 4.37 – Foto das amostras de $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ 250 μM (esquerda) e de $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ 250 μM + BC 2 mM (direita) recém preparadas. As amostras foram preparadas em tampão PIPES 10 mM pH = 7,4 com I = 0,1 M (NaCl) + acetonitrila 25 % (v/v) + CT-DNA 31 μM .

A Figura 4.38 mostra o espectro eletrônico do complexo $\text{Cu}_2\text{L-H}$ na presença de DNA e na ausência (linha tracejada) ou na presença (linha cheia) de BC. É evidente o aparecimento de um máximo de absorção em 480 nm, indicando a formação de Cu^+ , mesmo após apenas 10 minutos de incubação a temperatura ambiente. Porém, a absorção aumenta enormemente quando a amostra é incubada por 30 e 60 minutos a 50 °C. Foi determinado que a concentração de Cu^+ formado após 10, 20 e 25 minutos de incubação a temperatura ambiente é de 14, 21 e 23 μM , respectivamente, e após 30 e 60 minutos de incubação a 50 °C essa concentração aumenta para 92 e 126 μM , indicando que uma porção considerável de Cu^{2+} foi reduzido a Cu^+ .

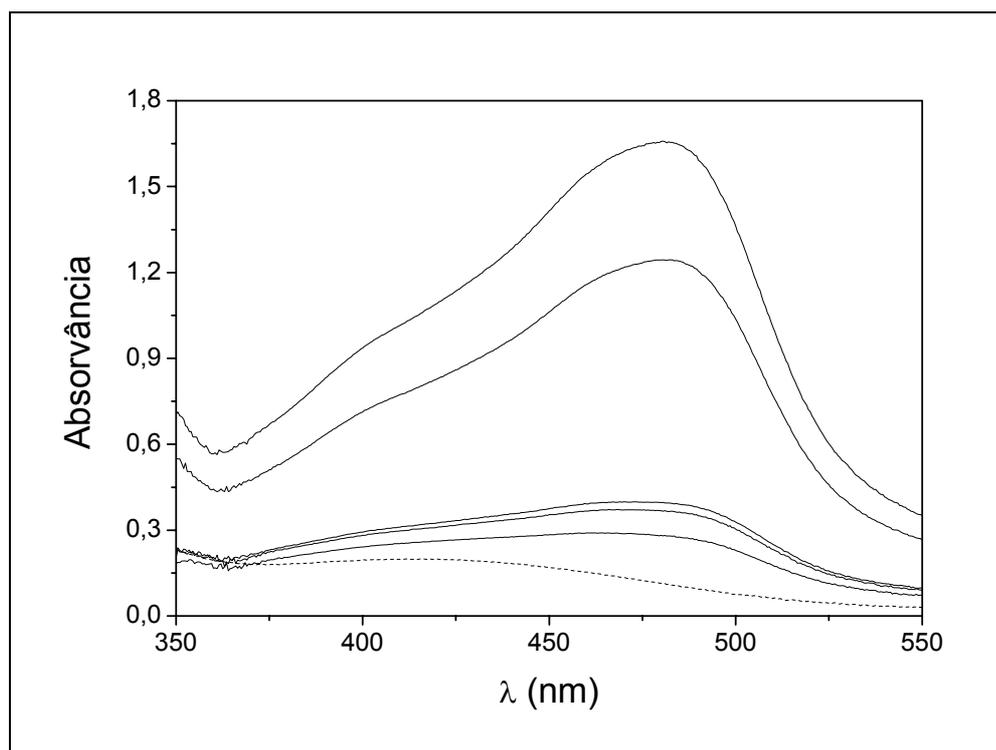
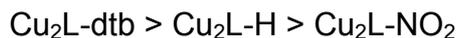


FIGURA 4.38 – Espectro eletrônico do complexo $\text{Cu}_2\text{L-H}$ ($250 \mu\text{M}$) na ausência (---) e na presença (—) de BC (2 mM), em tampão PIPES 10 mM $\text{pH} = 7,4$ com $I = 0,1 \text{ M}$ (NaCl) + acetonitrila 25% (v/v) + CT-DNA $31 \mu\text{M}$. Os espectros foram obtidos após incubação de 10, 20 e 25 minutos a temperatura ambiente ($24 \text{ }^\circ\text{C}$), e 30 e 60 minutos a $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Da mesma forma, o espectro eletrônico do complexo $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ na presença de DNA e na ausência (linha tracejada) ou na presença (linha cheia) de BC é mostrado pela Figura 4.39. Para este complexo pode ser notado um efeito hipocrômico juntamente com um deslocamento batocrômico ($\lambda_{\text{máx}} = 398 \rightarrow 407 \text{ nm}$), sugerindo uma ligação da BC ao complexo, como o que foi sugerido para o complexo CuMFF . Também foi notado um aumento da absorção na região de 480 nm após apenas 10 minutos de incubação a temperatura ambiente. Com a incubação a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, a absorção em 480 nm é aumentada, mas sem alterações na absorção em 407 nm . A concentração de Cu^+ formado após 10 e 25 minutos de incubação a temperatura ambiente é de 19 e $24 \mu\text{M}$, respectivamente, e após 30 e 60 minutos de incubação a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ essa concentração aumenta para 51 e $63 \mu\text{M}$. Apesar da formação de Cu^+ inicial, a temperatura ambiente, ser praticamente a mesma encontrada para o complexo $\text{Cu}_2\text{L-H}$, o aumento causado pela incubação a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ foi bem menor. Desta forma, observou-se uma menor tendência para a redução de Cu^{2+} a Cu^+ para o complexo $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ do que para $\text{Cu}_2\text{L-H}$. Pode-se, então, sugerir a seguinte ordem em termos de formação de Cu^+ :



o que estaria de acordo com a tendência encontrada por Peralta [86] para os valores dos potenciais redox dos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ (Tabela 4.6).

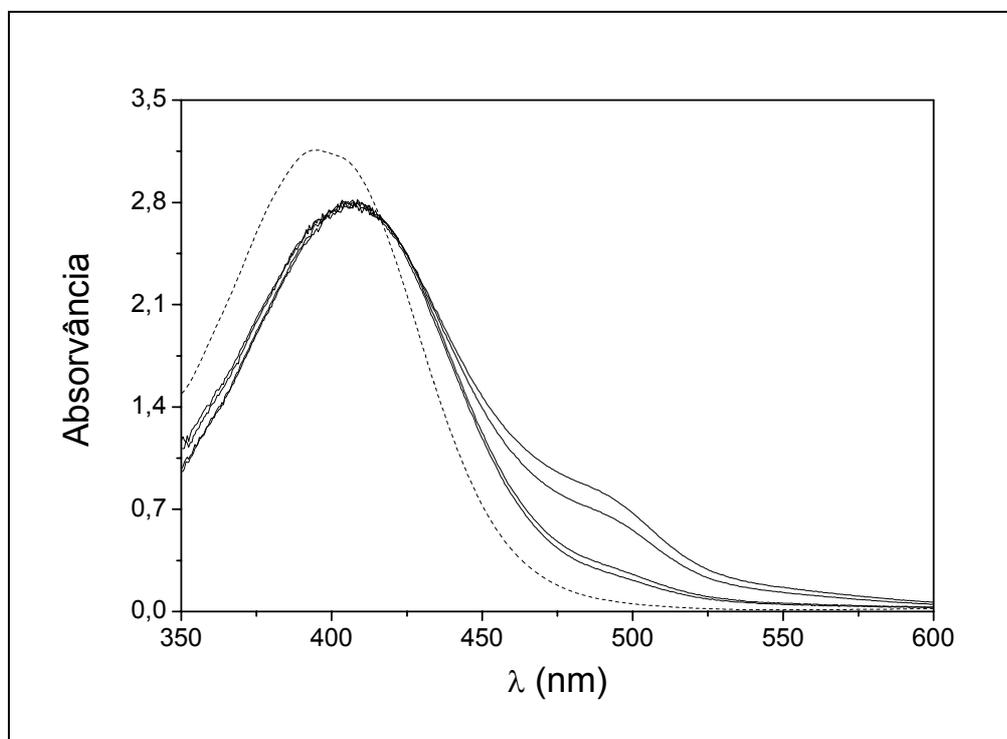


FIGURA 4.39 – Espectro eletrônico do complexo $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ ($250 \mu\text{M}$) na ausência (---) e na presença (—) de BC (2 mM), em tampão PIPES 10 mM $\text{pH} = 7,4$ com $I = 0,1 \text{ M}$ (NaCl) + acetonitrila 25% (v/v) + CT-DNA $31 \mu\text{M}$. Os espectros foram obtidos após incubação de 10 e 25 minutos a temperatura ambiente ($24 \text{ }^\circ\text{C}$), e 30 e 60 minutos a $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

TABELA 4.6 – Dados de eletroquímica^a para os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ [86].

| Complexo | E_{pc1} mV contra ENH | E_{pc2} mV contra ENH |
|--|--------------------------------|--------------------------------|
| $\text{Cu}_2\text{L-dtb}_{\text{prot}}$ | -392 | -682 |
| $\text{Cu}_2\text{L-dtb}_{\text{desprot}}$ | -- | -712 |
| $\text{Cu}_2\text{L-H}$ | -542 | -827 |
| $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ | -592 | -762 |

^a Voltametria cíclica em CH_2Cl_2 .

Comparativamente ao complexo CuMFF , há uma maior tendência para os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ na redução de Cu^{2+} para Cu^+ . Este resultado concorda com a proposta do complexo CuMFF ter preferencialmente uma atividade hidrolítica, enquanto que os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ clivam DNA por um mecanismo misto.

A interação dos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ com moléculas de DNA foi estudada por espectroscopia eletrônica, e pela reação de clivagem na presença de distamicina. Os espectros eletrônicos para os complexos $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$, $\text{Cu}_2\text{L-H}$ e $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ são apresentados nas Figuras 4.40, 4.41 e 4.42, respectivamente.

Não foi possível a realização da titulação espectrofotométrica do complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$, bem como a determinação do seu valor de K_b , uma vez que este complexo possui apenas uma pequena absorção na região de 400 – 450 nm (gráfico menor inserido na Figura 4.40), que sofre grande interferência pela adição de CT-DNA.

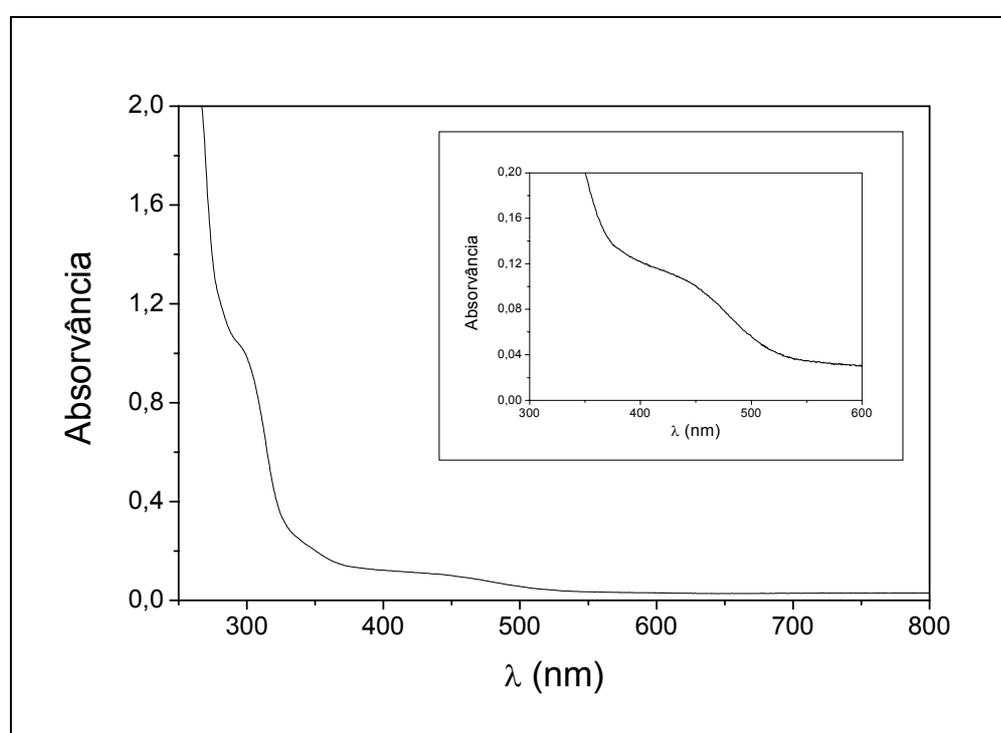


FIGURA 4.40 – Espectro eletrônico do complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ (250 μM), em tampão PIPES 10 mM pH = 7,4 com $I = 0,1$ M (NaCl) + acetonitrila 25 % (v/v). Gráfico menor inserido na figura – ampliação da região de absorção do complexo.

Já para o complexo $\text{Cu}_2\text{L-H}$, é notado pela Figura 4.41 um nítido efeito hipocrômico, juntamente com um deslocamento batocrômico ($\lambda_{\text{máx}} = 416 \rightarrow 416 \rightarrow 423 \rightarrow 429$, para $[\text{DNA}]/[\text{Cu}_2\text{L-H}] = 0, 0,5, 1,5$ e 4). Como já discutido anteriormente, estes efeitos são classicamente atribuídos à intercalação dos pares de bases da molécula de DNA pelo complexo. Entretanto, o valor de K_b determinado para este complexo é de $1,9 \pm 0,3 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, um valor que é menor tanto em comparação ao complexo Cu_2BMXD ($7,0 \pm 0,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), como para o complexo

CuMFF ($1,5 \pm 0,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$). Indicando uma fraca ligação do complexo com as moléculas de DNA.

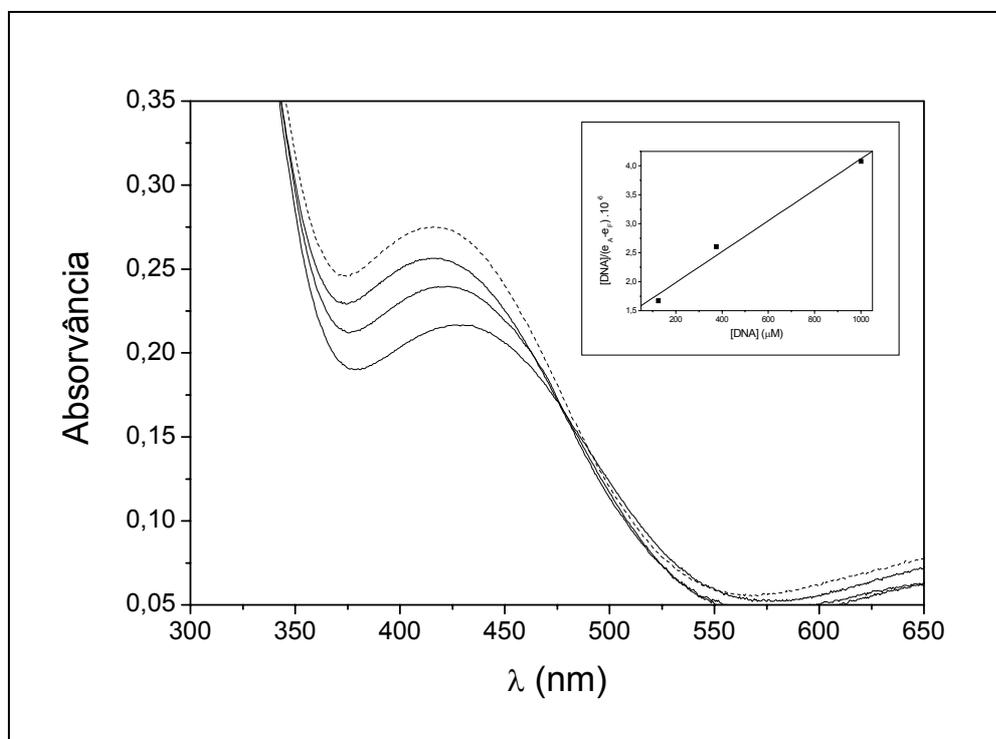


FIGURA 4.41 – Titulação espectrofotométrica do complexo $\text{Cu}_2\text{L-H}$ com CT-DNA. Espectroscopia eletrônica do complexo $\text{Cu}_2\text{L-H}$ ($250 \mu\text{M}$) na ausência (---) e na presença (—) de quantidades crescentes de CT-DNA ($[\text{DNA}]/[\text{Cu}_2\text{L-H}] = 0 - 0,5 - 2,0 - 4,0$), em tampão PIPES 10 mM $\text{pH} = 7,4$ com $\text{I} = 0,1 \text{ M}$ (NaCl) + acetonitrila 25% (v/v). Gráfico menor inserido na figura – gráfico de $[\text{DNA}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_F) \times [\text{DNA}]$.

Para o complexo $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$, a titulação espectrofotométrica (Figura 4.42) mostrou um efeito hipocrômico, mas sem alterações no $\lambda_{\text{máx}}$ (398 nm). O valor de K_b determinado para este complexo foi de $4,7 \pm 1,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, que apesar de ser inferior aos complexos Cu_2BMXD e CuMFF , é $\approx 2,5$ vezes o valor de K_b para o complexo $\text{Cu}_2\text{L-H}$. Esta relação entre os valores de K_b para os complexos $\text{Cu}_2\text{L-H}$ e $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ é, aproximadamente a mesma encontrada nos experimentos de dependência da concentração do complexo e na velocidade da reação. Este fato sugere que a atividade destes dois complexos está relacionada com a força da ligação com as moléculas de DNA.

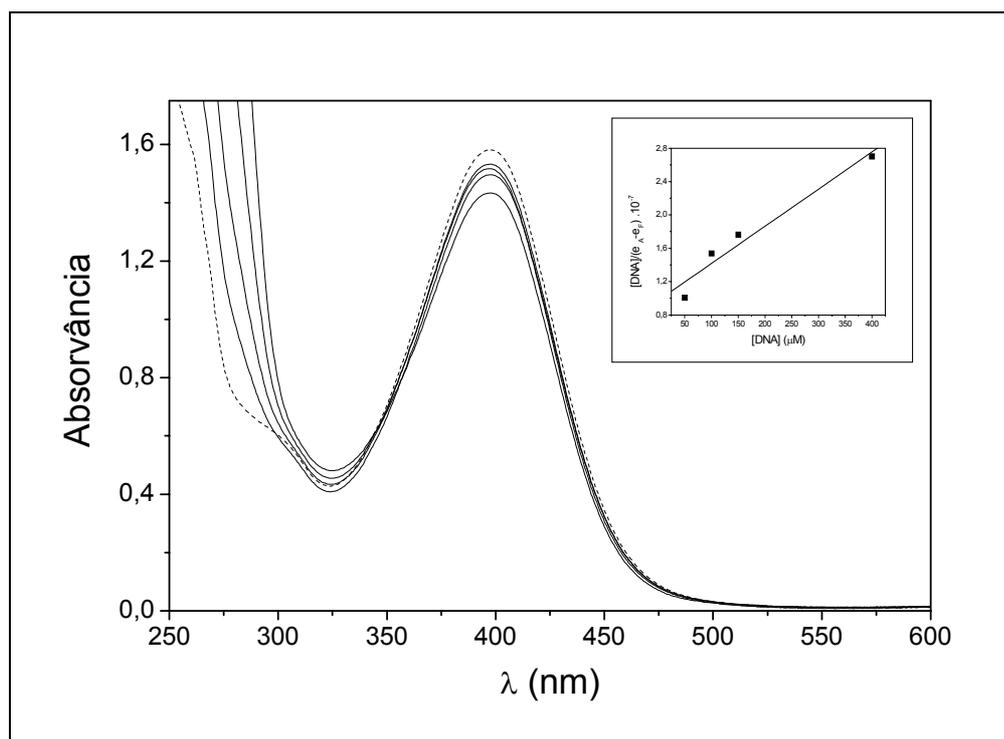


FIGURA 4.42 – Titulação espectrofotométrica do complexo $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ com CT-DNA. Espectroscopia eletrônica do complexo $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ ($100 \mu\text{M}$) na ausência (---) e na presença (—) de quantidades crescentes de CT-DNA ($[\text{DNA}]/[\text{Cu}_2\text{L-NO}_2] = 0 - 0,5 - 1,0 - 1,5 - 4,0$), em tampão PIPES 10 mM $\text{pH} = 7,4$ com $I = 0,1 \text{ M}$ (NaCl) + acetonitrila 25% (v/v). Gráfico menor inserido na figura – gráfico de $[\text{DNA}]/(\varepsilon_A - \varepsilon_F) \times [\text{DNA}]$.

O efeito da presença de distamicina na reação de clivagem de DNA pelos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ é apresentado na Figura 4.43. Pode ser notado que para os complexos $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ e $\text{Cu}_2\text{L-H}$ houve uma clara inibição na clivagem de DNA, enquanto que para o complexo $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ a clivagem praticamente não foi alterada. Como para o complexo CuMFF , a inibição parcial da reação indica que o sulco menor não é o único sítio de ação dos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ na clivagem de moléculas de DNA. No caso do complexo $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ o resultado indica que este complexo pouco interage com as moléculas de DNA pelo sulco menor.

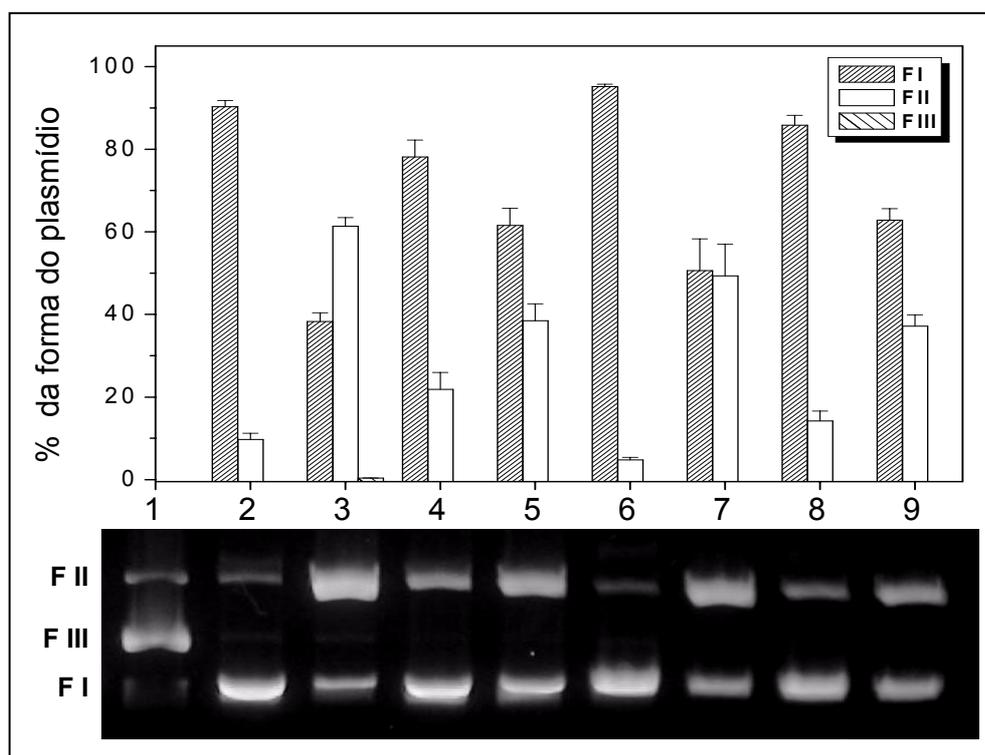


FIGURA 4.43 – Clivagem de DNA plasmidial por $\text{Cu}_2\text{L-X}$ na presença de distamicina. Poço 1: pBSK-II digerido com *Bam*HI; poços 2 – 5: sem distamicina; poços 6 – 9: com distamicina 12,5 μM ; poços 2 e 6: controle – somente DNA (pBSK-II 26 μM pb); poços 3 e 7: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ 250 μM ; poços 4 e 8: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-H}$ 500 μM ; poços 5 e 9: DNA + $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ 500 μM . Todas as amostras foram incubadas por 4 horas a 50°C em tampão PIPES 10 mM pH = 7,4 com I = 0,1 M (NaCl) + acetonitrila 25 % (v/v). Acima da foto do gel é mostrado um gráfico com a quantificação das diferentes formas do DNA plasmidial de cada amostra.

Contudo, um outro fator pode estar contribuindo, ou até ser o responsável pelo resultado encontrado para o complexo $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$. A ligação das moléculas de distamicina ao sulco menor do DNA ocorre preferencialmente através da formação de ligações de hidrogênio em regiões ricas em A-T [12; 117]. A formação destas ligações de hidrogênio, não só com a distamicina, mas também com outras moléculas, é possível uma vez que o par de base A-T forma tal ligação pelo oxigênio carbonílico de T (C-2) ou pelo nitrogênio (N-3) de A [12]. Apesar de grupos similares estarem presentes no par de bases C-G, eles estão impedidos de formarem ligações de hidrogênio com uma outra molécula, em razão de estarem comprometidos pelo pareamento C-G. Desta forma, para se favorecer a ligação de alguma molécula em regiões ricas em C-G é sugerido que ela tenha a capacidade de formar ligações de hidrogênio com o grupo G-NH_2 [12]. Assim, uma vez que os átomos de oxigênio do grupo $-\text{NO}_2$ do complexo $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ poderiam formar ligações com o grupo G-NH_2 ,

este complexo poderia estar sendo dirigido para regiões ricas em C-G podendo, portanto, interagir com o DNA mesmo na presença da distamicina.

Assim sendo, após os resultados que foram apresentados para a clivagem de DNA pelos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ é possível se fazer algumas considerações. Os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ clivam moléculas de DNA provavelmente por um mecanismo misto (oxidativo e hidrolítico). A clivagem hidrolítica é favorecida com o aumento do pH, em razão do aumento da fração da espécie **D** dos complexos, que provavelmente é a espécie responsável por este tipo de ataque. O complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ é o mais ativo na clivagem de DNA entre os complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$, mas parece ter uma maior tendência para um mecanismo oxidativo. Entre os complexos $\text{Cu}_2\text{L-H}$ e $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$, a maior atividade do último parece ser devida pela sua maior interação com as moléculas de DNA. Interação esta que pode estar relacionada com a formação de ligações de hidrogênio entre o grupo $-\text{NO}_2$ e as bases do DNA.

5 CONCLUSÕES

- Cu₂BMXD

O complexo Cu₂BMXD é capaz de clivar moléculas de DNA de maneira dependente da sua concentração, do tempo e da temperatura de incubação.

A clivagem de DNA por Cu₂BMXD ocorre por um mecanismo oxidativo, envolvendo a formação de Cu⁺ e do radical HO·. A formação destas espécies é resultado de um ciclo catalítico onde o centro metálico do complexo (um ou os dois Cu²⁺) é reduzido pelo próprio DNA, sendo posteriormente reoxidado pelo O₂.

A interação entre o complexo Cu₂BMXD e as moléculas de DNA é relativamente forte ($K_b = 7,0 \pm 0,9 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$), e deve ter relação direta com a redução do complexo pelo DNA.

- CuMFF

O complexo CuMFF é ativo na clivagem de moléculas de DNA, de maneira dependente da concentração do complexo e do pH da solução, sendo a espécie **2** a mais ativa neste processo de clivagem.

O complexo CuMFF apresenta atividade hidrolítica sobre as moléculas de DNA. Provavelmente atuando como um ácido de Lewis na aceleração da hidrólise das ligações fosfodiéster. Entretanto, na presença de um agente redutor externo a clivagem de DNA por este complexo é estimulada, agora por um mecanismo oxidativo.

A ligação do complexo CuMFF ao DNA é relativamente fraca ($K_b = 1,5 \pm 0,3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1}$), sendo que o complexo deve interagir tanto pelo sulco menor quanto pelo sulco maior do DNA.

- Cu₂L-X

Os complexos Cu₂L-X são ativos na clivagem de moléculas de DNA, mas apresentam atividades diferentes.

A clivagem de DNA pelos complexos Cu₂L-X deve ocorrer por um misto de hidrólise e clivagem oxidativa, a última com envolvimento das espécies Cu⁺ e HO·. A porção hidrolítica é favorecida pelo aumento do pH, indicando a espécie **D** como sendo a mais ativa.

O complexo Cu₂L-dtb parece ser o que apresenta a maior tendência para a clivagem oxidativa, seguido do complexo Cu₂L-H e do Cu₂L-NO₂.

Os complexos Cu₂L-H e Cu₂L-NO₂ apresentam uma fraca ligação às moléculas de DNA, com os valores de K_b sendo $1,9 \pm 0,3 \cdot 10^3$ e $4,7 \pm 1,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$, respectivamente.

A interação dos complexos Cu₂L-X com moléculas de DNA ocorre, mas não somente, pelo sulco menor do DNA. A interação do complexo Cu₂L-NO₂ com DNA pode envolver a formação de ligações de hidrogênio entre o grupo -NO₂ do complexo e as bases da molécula de DNA.

Os experimentos de dependência da concentração do complexo e do tempo de incubação, bem como os valores de K_b , sugerem a seguinte relação entre as atividades globais dos complexos Cu₂L-X:



A diferença de atividade entre Cu₂L-H e Cu₂L-NO₂ parece estar relacionada com a força da ligação dos complexos às moléculas de DNA.

- Geral

Ao longo deste trabalho foram descritas as interações de cinco complexos de cobre(II) com o DNA, do ponto de vista do tipo de ligação ao DNA, mecanismo de quebra das ligações fosfodiéster, e correlações estruturais entre o modo de clivagem e a estrutura dos complexos. Todos os complexos foram capazes de clivar a fita dupla do DNA superenovelado plasmidial. Apesar de apresentarem grandes diferenças de atividade (modo e eficiência na quebra do DNA), todos os complexos foram ativos em concentrações bastante baixas (μM). Isto atrai a atenção para estes complexos como nucleases sintéticas, para eventualmente serem utilizados em aplicações como as que já foram citadas neste trabalho.

Pode-se ainda observar como bastante inovador o fato de ter sido descrito o complexo CuMFF como um dos únicos modelos de hidrolase sintética de cobre, capaz de clivar moléculas de DNA (este trabalho) e de proteínas [85], por mecanismo hidrolítico, um claro fenômeno de 'promiscuidade catalítica', observado em enzimas, mas escassamente descrito em sistemas modelo sintéticos.

6 PERSPECTIVAS

A identificação da formação de Cu^+ com BC no sistema com o complexo Cu_2BMXD ainda se faz necessária. Vale ressaltar que esta identificação não foi realizada durante o desenvolvimento deste trabalho, em razão de ter havido problemas na preparação de novas soluções estoque deste complexo. Além da confirmação da formação de Cu^+ , a identificação de produtos de reação em condições anaeróbias poderia trazer informações relevantes para um melhor entendimento do mecanismo de ação deste complexo sobre moléculas de DNA.

Uma vez que não foi possível a determinação do valor de K_b para o complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ por espectroscopia eletrônica, a utilização da titulação eletroquímica pode ser uma alternativa para se conseguir uma estimativa da força de ligação/interação deste complexo com moléculas de DNA. Esta técnica, bem como medidas de viscosidade e de fluorescência na presença de brometo de etídio, pode ser empregada não só para o complexo $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$, mas também para todos os outros. Estas outras duas técnicas citadas são geralmente empregadas para avaliação do grau de intercalação de pequenas moléculas à fita dupla do DNA.

A utilização de complexos que possuam os mesmos ligantes dos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$, mas com centros de Zn^{2+} , pode trazer informações relevantes para o entendimento do mecanismo de ação dos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$ na clivagem de moléculas de DNA. Da mesma forma, a comparação da atividade de reações realizadas em H_2O ou D_2O também pode contribuir para este objetivo.

O dicróismo circular é uma técnica que também pode fornecer informações relevantes sobre a interação de pequenas moléculas com o DNA, através da avaliação de alterações estruturais e/ou conformacionais desta molécula. Alguns resultados já estão sendo obtidos por esta técnica para os complexos apresentados neste trabalho. Eles estão sendo realizados por Guilherme Razzera, ex-aluno do nosso laboratório e agora doutorando do laboratório da Prof^a Ana Paula Valente – UFRJ. Contudo, estes resultados não foram apresentados neste trabalho, pois ainda é necessária uma melhor avaliação, e confirmação, dos mesmos.

Estudos de identificação de uma possível especificidade na clivagem de DNA e identificação de seus produtos de clivagem, por espectrometria de massa, também podem contribuir muito para a elucidação do mecanismo de ação dos complexos metálicos apresentados neste trabalho.

Adicionalmente a tudo o que já foi apresentado sobre o complexo CuMFF, a presença de um grupo aldeído na estrutura do seu ligante torna este complexo ainda mais interessante, uma vez que pode ser utilizado para ligação a outras moléculas. Exemplo disto é a ligação deste ligante à quitosana [131] onde, inclusive, alguns experimentos preliminares já estão sendo feitos na clivagem de DNA pelo sistema quitosana-CuMFF.

Além disso, já foi adquirido por nosso laboratório um oligonucleotídeo modificado (grupo $-NH_2$ na extremidade 5') que permitirá, a princípio, a ligação do complexo CuMFF, sendo que a seqüência deste oligonucleotídeo é reconhecida pela proteína HNF3. Deste modo, esperamos obter agora um sistema capaz de ser dirigido ao reconhecimento e hidrólise de uma determinada proteína (HNF3).

A clivagem de proteínas também representa uma linha de pesquisa extremamente relevante no que se refere às interações de biomoléculas com pequenas moléculas sintéticas. Na verdade, boa parte do período destinado à realização do trabalho de doutorado aqui apresentado foi utilizado em experimentos envolvendo a clivagem de proteínas pelos complexos CuMFF e Cu_2L -dtb. O principal foco foi a identificação dos sítios de cortes destes complexos sobre a BSA, uma vez que ambos os complexos apresentam certa especificidade na clivagem. Entretanto, poucos resultados relevantes foram conseguidos, na sua maioria, em razão de problemas para se trabalhar com uma proteína do tamanho da BSA (66,4 kDa – 583 aminoácidos).

Contudo, com a utilização de peptídeos fluorescentes, conseguidos junto ao Prof. Luis Juliano Neto da UNIFESP, em substituição a BSA será possível desenvolver estudos sobre a clivagem da ligação peptídica pelos complexos metálicos de uma maneira muito mais adequada. Os produtos de reação dos peptídeos com os complexos metálicos poderão, também ser identificados por espectrometria de massa.

REFERÊNCIAS

- 1 SIGMAN, D. S. Chemical nucleases. **Biochemistry**, v. 29, n. 39, p. 9097-105, 1990.
- 2 SIGMAN, D. S. et al. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-phenanthroline-cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 24, p. 12269-12272, 1979.
- 3 SIGMAN, D. S. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper ion. **Accounts of Chemical Research**, v. 19, n. 6, p. 180-186, 1986.
- 4 DHAR, S.; NETHAJI, M.; CHAKRAVARTY, A. R. Synthesis, crystal structure and photo-induced DNA cleavage activity of ternary copper(II) complexes of NSO-donor Schiff bases and NN-donor heterocyclic ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 7, p. 2437-2444, 2005.
- 5 TRENZI, H.; ALZARI, P. M.; ZAKIN, M. M. Structural features involved in the formation of a complex between the monomeric or the dimeric form of the Rev-erb β DNA-binding domain and its DNA reactive sites. **Biochemistry**, v. 37, n. 33, p. 11488-11495, 1998.
- 6 KELLY, J. J. et al. Radical-generating coordination complexes as tools for rapid and effective fragmentation and fluorescent labeling of nucleic acids for microchip hybridization. **Analytical Biochemistry**, v. 311, n. 2, p. 103-118, 2002.
- 7 FRANKLIN, S. J. Lanthanide-mediated DNA hydrolysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 2, p. 201-208, 2001.
- 8 HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Toward the development of metal-based synthetic nucleases and peptidases: a rationale and progress report in applying the principles of coordination chemistry. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 173, n. 1, p. 133-165, 1998.
- 9 GONZALEZ-ALVAREZ, M. et al. Oxidative cleavage of DNA by a new ferromagnetic linear trinuclear copper(II) complex in the presence of H₂O₂/sodium ascorbate. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 9, p. 2992-2998, 2003.
- 10 LIU, C. et al. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 248, n. 1-2, p. 147-168, 2004.
- 11 COWAN, J. A. Chemical nucleases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 6, p. 634-42, 2001.
- 12 BLACKBURN, G. M.; GAIT, M. J. **Nucleic Acids in Chemistry and Biology**. segunda ed. New York: Oxford University Press, 1997. 528 p.

- 13 NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 3 ed. ed. New York: Worth Publishers, 2000. 1152 + Apendices p.
- 14 WOLFENDEN, R.; RIDGWAY, C.; YOUNG, G. Spontaneous hydrolysis of ionized phosphate monoesters and diesters and the proficiencies of phosphatases and phosphodiesterases as catalysts. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 4, p. 833-834, 1998.
- 15 SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 337-47, 2001.
- 16 WILLIAMS, N. H. et al. Structure and nuclease activity of simple dinuclear metal complexes: quantitative dissection of the role of metal ions. **Accounts of Chemical Research**, v. 32, n. 6, p. 485-493, 1999.
- 17 WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids. **Nature**, v. 171, p. 737-738, 1953.
- 18 FIFE, T. H.; PRZYSTAS, T. Effects of divalent metal ions on the hydrolysis of esters of 2-(hydroxyethyl)-picolinic acid. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 2251-, 1982.
- 19 JOU, R.; COWAN, J. A. Ribonuclease-H activation by inert transition-metal complexes - mechanistic probes for metal cofactors - insights on the metallochemistry of divalent magnesium-ion. **Journal of the American Chemical Society**, v. 113, p. 6685-, 1991.
- 20 YE, G. C.; BEATTY, A. M.; BASHKIN, J. K. Synthesis and characterization of cobalt-cage complexes with pendant phenol groups. **Inorganic Chemistry**, v. 35, p. 3828-, 1996.
- 21 SCHENK, G. et al. Phosphate forms an unusual tripodal complex with the Fe-Mn center of sweet potato purple acid phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v. 102, n. 2, p. 273-278, 2005.
- 22 HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Copper(II) macrocycles cleave single-stranded and double-stranded DNA under both aerobic and anaerobic conditions. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 26, p. 7474-7481, 1996.
- 23 HIROHAMA, T.; ARII, H.; CHIKIRA, M. Effect of a conjugated acridine moiety on the binding and reactivity of Cu(II)[9-acridinylmethyl-1,4,7-triazacyclononane] with DNA. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 11, p. 1778-1786, 2004.
- 24 NAVARRO, M. et al. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)₂]BF₄. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, n. 4, p. 364-369, 2003.
- 25 ZHU, L. et al. Geometry-dependent phosphodiester hydrolysis catalyzed by binuclear copper complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 7912-7920, 2003.

- 26 REN, R. et al. A simple copper(II)-L-histidine system for efficient hydrolytic cleavage of DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 24, p. 5454-63, 2000.
- 27 DECK, K. M.; TSENG, T. A.; BURSTYN, J. N. Triisopropyltriazacyclononane copper(II): an efficient phosphodiester hydrolysis catalyst and DNA cleavage agent. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 669-677, 2002.
- 28 SREEDHARA, A.; FREED, J. D.; COWAN, J. A. Efficient inorganic deoxyribonucleases. greater than 50-million-fold rate enhancement in enzyme-like DNA cleavage. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 37, p. 8814-8824, 2000.
- 29 KORUPOJU, S. R. et al. Synthesis, structure, and DNA cleavage activity of new trinuclear Zn₃ and Zn₂Cu complexes of a chiral macrocycle: structural correlation with the active center of P1 nuclease. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 41, n. 16, p. 4099-4101, 2002.
- 30 BRANUM, M. E.; QUE, L. J. Double-strand DNA hydrolysis by dilanthanide complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 4, n. 5, p. 593-600, 1999.
- 31 ZHU, B. et al. Binuclear lanthanide complexes as catalysts for the hydrolysis of double-stranded DNA. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 2, n. 8, p. 351-353, 1999.
- 32 NEVES, A. et al. Hydrolytic DNA cleavage promoted by a dinuclear iron(III) complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 4, n. 8, p. 388-391, 2001.
- 33 ROELFES, G. et al. Efficient DNA cleavage with an iron complex without added reductant. **Journal of the American Chemical Society**, v. 122, n. 46, p. 11517-11518, 2000.
- 34 BRANUM, M. E. et al. Double-strand hydrolysis of plasmid DNA by dicerium complexes at 37° C. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 9, p. 1898-1904, 2001.
- 35 SISSI, C. et al. Dinuclear Zn²⁺ complexes of synthetic heptapeptides as artificial nucleases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 13, p. 3169-3170, 2001.
- 36 ROSSI, L. M. et al. Hydrolytic activity of a dinuclear copper(II,II) complex in phosphate diester and DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 337, p. 366-370, 2002.
- 37 SCARPELLINI, M. et al. Phosphate diester hydrolysis and DNA damage promoted by new *cis*-aqua/hydroxy copper(II) complexes containing tridentate imidazole-rich ligands. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 25, p. 8353-8365, 2003.

- 38 BATISTA, S. C. et al. Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical FeIIINiII model complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 6, n. 8, p. 1161-1165, 2003.
- 39 HORN, J. A. et al. Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H₂O/OH⁻ groups as models for purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 2, p. 339-351, 2005.
- 40 LANZMASTER, M. et al. A new heterobinuclear FeIIICuII complex with a single terminal FeIII-O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 10, n. 4, p. 319-32, 2005.
- 41 ROSSI, L. M. et al. Synthesis, structure and properties of unsymmetrical [μ]-alkoxo-dicopper(II) complexes: biological relevance to phosphodiester and DNA cleavage and cytotoxic activity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 6, p. 1807-1822, 2005.
- 42 KIRIN, S. I. et al. Synthesis, structure and comparison of the DNA cleavage ability of metal complexes M(II)L with the N-(2-ethoxyethanol)-bis(2-picoly)amine ligand L (M = Co, Ni, Cu and Zn). **Dalton Trans**, n. 8, p. 1201-1207, 2004.
- 43 SCHNAITH, L. M. T.; HANSON, R. S.; QUE, L., JR. Double-stranded cleavage of pBR322 by a diiron complex via a "hydrolytic" mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v. 91, n. 2, p. 569-573, 1994.
- 44 LIU, C. et al. DNA hydrolytic cleavage by the diiron(III) complex Fe₂(DTPB)(μ-O)(μ-Ac)Cl(BF₄)₂: comparison with other binuclear transition metal complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 913-922, 2002.
- 45 BALDINI, M. et al. Cu(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: the case of 5-formyluracil. Synthesis, characterization, X-ray structures, DNA interaction studies, and biological activity. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 2049-2055, 2003.
- 46 GONZALEZ-ALVAREZ, M. et al. DNA cleavage studies of mononuclear and dinuclear copper(II) complexes with benzothiazolesulfonamide ligands. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 644-652, 2003.
- 47 LI, L.-Z. et al. Synthesis, crystal structure and nuclease activity of a Schiff base copper(II) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 5, p. 1076-1082, 2005.
- 48 XU, X.-M. et al. DNA cleavage by a novel acyclic copper(II) complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 7, n. 6, p. 803-805, 2004.
- 49 WANG, X.-L. et al. Synthesis, crystal structure and DNA cleavage activities of copper(II) complexes with asymmetric tridentate ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 3, p. 423-429, 2004.

- 50 PATEL, R. N. et al. Characterization and biological activities of two copper(II) complexes with diethylenetriamine and 2,2'-bipyridine or 1,10-phenanthroline as ligands. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 62, n. 1-3, p. 261-268, 2005.
- 51 AFRASIABI, Z. et al. Synthesis and characterization of copper(II) complexes of 4-alkyl/aryl-1,2-naphthoquinones thiosemicarbazones derivatives as potent DNA cleaving agents. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 6, p. 2023-2030, 2005.
- 52 PITIE, M.; BURROWS, C. J.; MEUNIER, B. Mechanisms of DNA cleavage by copper complexes of 3-Clip-Phen and of its conjugate with a distamycin analogue. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 24, p. 4856-4864, 2000.
- 53 FREY, S. T. et al. A new trinuclear copper complex and its reactions with plasmid DNA. **Inorganica Chimica Acta**, v. 242, n. 1-2, p. 329-338, 1996.
- 54 ZHANG, S. et al. A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1,10-phenanthroline and l-threonine with DNA nuclease activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 12, p. 2099-2106, 2004.
- 55 LIU, C. et al. DNA damage by copper (II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 75, p. 233-240, 1999.
- 56 FERRER, S. et al. Syntheses, crystal structures, and oxidative DNA cleavage of some Cu(II) complexes of 5-amino-3-pyridin-2-yl-1,2,4-triazole. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 8, p. 1436-1446, 2004.
- 57 JIMENEZ-GARRIDO, N. et al. Antibacterial studies, DNA oxidative cleavage, and crystal structures of Cu(II) and Co(II) complexes with two quinolone family members, ciprofloxacin and enoxacin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 3, p. 677-689, 2005.
- 58 LAMOUR, E. et al. Oxidation of Cu^{II} to Cu^{III}, free radical production, and DNA cleavage by hydroxy-salen-copper complexes. isomeric effects studied by ESR and electrochemistry. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, n. 9, p. 1862-1869, 1999.
- 59 HUMPHREYS, K. J.; KARLIN, K. D.; ROKITA, S. E. Targeted strand scission of DNA substrates by a tricopper(II) coordination complex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 124, n. 27, p. 8055-8066, 2002.
- 60 ITO, K.; YAMAMOTO, K.; KAWANISHI, S. Manganese-mediated oxidative damage of cellular and isolated DNA by isoniazid and related hydrazines: non-Fenton-type hydroxyl radical formation. **Biochemistry**, v. 31, n. 46, p. 11606-11613, 1992.
- 61 HERTZBERG, R. P.; DERVAN, P. B. Cleavage of double helical DNA by methidium-propyl-EDTA-iron(II). **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 1, p. 313-315, 1982.

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

63 VIJAYALAKSHMI, R. et al. Interaction of DNA with [Cr(Schiff base)(H₂O)₂]ClO₄. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1475, n. 2, p. 157-162, 2000.

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

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

66 MANCIN, F. et al. Artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, n. 20, p. 2540-2548, 2005.

67 MOLENVELD, P.; ENGBERSEN, J. F. J.; REINHOUDT, D. N. Dinuclear metallo-phosphodiesterase models: application of calix[4]arenes as molecular scaffolds. **Chemical Society Reviews**, v. 29, n. 2, p. 75-86, 2000.

68 OTT, R.; KRÄMER, R. DNA hydrolysis by inorganic catalysts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 6, p. 761 - 767, 1999.

69 KOMIYAMA, M.; SUMAOKA, J. Progress towards synthetic enzymes for phosphoester hydrolysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, n. 6, p. 751-757, 1998.

70 CHIN, J. Artificial dinuclear phosphoesterases. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 1, n. 4, p. 514-521, 1997.

71 MORROW, J. R. et al. Efficient catalytic cleavage of RNA by lanthanide(III) macrocyclic complexes: toward synthetic nucleases for in vivo applications. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 5, p. 1903-1905, 1992.

72 ZHU, B. et al. Lanthanide binuclear macrocyclic complexes as synthetic enzymes for the cleavage of DNA. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 135, n. 1, p. 107-110, 1998.

73 JUREK, P. E.; JUREK, A. M.; MARTELL, A. E. Phosphate diester hydrolysis by mono- and dinuclear lanthanum complexes with an unusual third-order dependence. **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 1016-1020, 2000.

74 BERG, T.; SIMEONOV, A.; JANDA, K. D. Combined parallel synthesis and screening of macrocyclic lanthanide complexes for the cleavage of phospho di- and triesters and double-stranded DNA. **Journal of Combinatorial Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 96-100, 1999.

75 BAYKAL, U.; AKKAYA, E. U. Synthesis and phosphodiester transesterification activity of the La^{3+} -complex of a novel functionalized octadentate ligand.

Tetrahedron Letters, v. 39, n. 32, p. 5861-5864, 1998.

76 HASHIMOTO, S.; NAKAMURA, Y. Characterization of lanthanide-mediated DNA cleavage by intercalator-linked hydroxamic acids: comparison with transition

systems. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 21, p. 2623-2628, 1996.

77 MENIF, R. et al. New hexaaza macrocyclic binucleating ligands: oxygen insertion with a dicopper (II) schiff base macrocyclic complex. **Inorganic Chemistry**, v. 29, p. 4723-4729, 1990.

78 NATION, D. A. et al. Host-guest interactions of inorganic phosphates with the copper(II) complexes of the hexaaza macrocyclic ligand 3,6,9,17,20,23-hexaazatricyclo[23.3.1.1^{11,15}]triaconta-1(29),11(30),12,14,25,27-hexaene. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 25, p. 7246-7252, 1996.

79 NATION, D. A.; REIBENSPIES, J.; MARTELL, A. E. Anion binding of inorganic phosphates by the hexaaza macrocyclic ligand 3,6,9,17,20,23-hexaazatricyclo[23.3.1.111,15]triaconta-1(29),11(30),12,14,25,27-hexaene. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 16, p. 4597-4603, 1996.

80 ROSS, E.; MOTEKAITIS, R. J.; MARTELL, A. E. The interaction of BMXD and its copper(II) complexes with glycine, aspartic acid, and histidine. **Inorganica Chimica Acta**, v. 286, n. 1, p. 55-61, 1999.

81 PAUWELS, T. F. et al. The dinuclear copper(II) complex of the hexaaza macrocyclic ligand 3,6,9,17,20,23-hexaaza-tricyclo[23.3.1.111,15]triaconta-1(29),11(30),12,14,25,27-hexaene as a host for alanine, valine, leucine, norleucine, norvaline and serine anions. **Polyhedron**, v. 18, n. 7, p. 1029-1037, 1999.

82 PAUWELS, T. F. et al. Host-guest interaction between the dinuclear copper(II) complex of the hexaaza macrocyclic ligand 3,6,9,17,20,23-hexaazatricyclo[23.3.1.111,15]triaconta-1(29),11(30),12,14,25,27-hexaene and malonate, maleate, fumarate, pyrophosphate and orthophosphate anions. **Polyhedron**, v. 17, n. 10, p. 1715-1723, 1998.

83 STEIN MARTINS, G. T. et al. Equilibrium and kinetic studies of ligand BMXD complexation with copper(II) and glycyglycine. **Inorganica Chimica Acta**, v. 357, n. 8, p. 2261-2268, 2004.

84 NATION, D. A.; LU, Q.; MARTELL, A. E. Molecular recognition of nucleotides by the protonated macrocyclic ligand 3,6,9,17,20,23-hexaazatricyclo[23.3.1.111,15]triaconta-1(29),11(30),12,14,25,27-hexaene and by its Cu(II) complexes; catalysis of the conversion of ATP to ADP. **Inorganica Chimica Acta**, v. 263, n. 1-2, p. 209-217, 1997.

- 85 OLIVEIRA, M. C. B. et al. Hydrolytic protein cleavage mediated by unusual mononuclear copper(II) complexes: x-ray structures and solution studies. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 921-929, 2005.
- 86 PERALTA, R. A. Novos complexos binucleares de cobre(II) e de Ferro(III) zinco(II): biomiméticos sintéticos para catecol oxidase e para fosfatases ácidas púrpuras. **Tese de doutorado**, Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005, 266p.
- 87 AUSUBEL, F. M. et al. **Short Protocols in Molecular Biology**. 3rd ed.: John Wiley & Sons, Inc., 1995.
- 88 QIAGEN. **HiSpeed™ Plasmid Purification Handbook**. 2001. 46 p.
- 89 WESTERMEIER, R. **Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice**. New York: VCH Publishers, Inc., 1993. 277 p.
- 90 SAMBROOK, S.; FRITISCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning – a laboratory manual**. 2nd ed.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 91 DHAR, S.; NETHAJI, M.; CHAKRAVARTY, A. R. Effect of charge transfer bands on the photo-induced DNA cleavage activity of [1-(2-thiazolylazo)-2-naphtholato]copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 3, p. 805-812, 2005.
- 92 FARAH, S. B. **DNA Segredos e Mistérios**. São Paulo: Sarvier, 1997.
- 93 ANNARAJ, J. et al. Mixed ligand copper(II) complexes of phenanthroline/bipyridyl and curcumin diketimines as DNA intercalators and their electrochemical behavior under Nafion[trademark] and clay modified electrodes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 3, p. 669-676, 2005.
- 94 MAHADEVAN, S.; PALANIANDAVAR, M. Spectroscopic and voltammetric studies on copper complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolines bound to calf thymus DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 693-700, 1998.
- 95 DENG, H. et al. Synthesis, characterization, DNA-binding and cleavage studies of [Ru(bpy)₂(actatp)]²⁺ and [Ru(phen)₂(actatp)]²⁺ (actatp=acenaphthereno[1,2-b]-1,4,8,9-tetraazariphenylene). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, n. 2, p. 207-214, 2003.
- 96 OLIVEIRA, M. C. B. et al. Nucleic acid cleavage by a Cu(II) polyaza macrocyclic complex. **Polyhedron**, v. 24, n. 4, p. 495-499, 2005.
- 97 BURANAPRAPUK, A. et al. Protein cleavage by transition metal complexes bearing amino acid substituents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1387, n. 1-2, p. 309-316, 1998.
- 98 NETTO, L. E. S.; STADTMAN, E. R. The iron-catalyzed oxidation of dithiothreitol is a biphasic process: hydrogen peroxide is involved in the initiation of a free radical

chain of reactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, n. 1, p. 233-242, 1996.

99 SPEAR, N.; AUST, S. D. The effects of different buffers on the oxidation of DNA by thiols and ferric iron. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 12, n. 2, p. 125-132, 1998.

100 WANG, F.; SAYRE, L. M. Kinetics and mechanism of aliphatic amine oxidation by aqueous (batho)2CuII. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 1, p. 248-255, 1992.

101 WANG, F.; SAYRE, L. M. Oxidation of tertiary amine buffers by copper(II). **Inorganic Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 169-170, 1989.

102 STEENKEN, S.; JOVANOVIC, S. V. How easily oxidizable is DNA? one-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, n. 3, p. 617-618, 1997.

103 SEIDEL, C. A. M.; SCHULZ, A.; SAUER, M. H. M. Nucleobase-specific quenching of fluorescent dyes. 1. nucleobase one-electron redox potentials and their correlation with static and dynamic quenching efficiencies. **Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 13, p. 5541-5553, 1996.

104 LIU, J. et al. DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 91, p. 269-276, 2002.

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

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

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

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

109 WILKINS, R. G. **Kinetics and mechanism of reactions of transition metal complexes**. 2nd ed. Nova York: 1991.

110 NAUSER, T.; SCHONEICH, C. Thiyl radical reaction with thymine: absolute rate constant for hydrogen abstraction and comparison to benzylic C-H bonds. **Chemical Research in Toxicology**, v. 16, n. 9, p. 1056-1061, 2003.

111 JAIN, A. et al. Oxygen is not required for degradation of DNA by glutathione and Cu(II). **Mutation Research**, v. 357, p. 83-88, 1996.

112 POGOCKI, D.; SCHONEICH, C. Thiyl radicals abstract hydrogen atoms from carbohydrates: reactivity and selectivity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 31, n. 1, p. 98-107, 2001.

113 HUANG, X. et al. Cu(II) potentiation of alzheimer Ab neurotoxicity: correlation with cell-free hydrogen peroxide production and metal reduction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 52, p. 37111-37116, 1999.

114 PATTERSON, R. A.; HORSLEY, E. T. M.; LEAKE, D. S. Prooxidant and antioxidant properties of human serum ultrafiltrates toward LDL: important role of uric acid. **Journal of Lipid Research**, v. 44, p. 512-521, 2003.

115 RAPISARDA, V. A. et al. Quenching of bathocuproine disulfonate fluorescence by Cu(I) as a basis for copper quantification. **Analytical Biochemistry**, v. 307, n. 1, p. 105-109, 2002.

116 SMITH, G. F.; WILKINS, D. H. New colorimetric reagent specific for copper: determination of copper in iron. **Analytical Chemistry**, v. 25, n. 3, p. 510-511, 1953.

117 UYTTERHOEVEN, K.; SPONER, J.; VAN MEERVELT, L. Two 1: 1 binding modes for distamycin in the minor groove of d(GGCCAATTGG). **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 12, p. 2868-2877, 2002.

118 PERALTA, R. A. et al. New unsymmetric dinuclear Cu^{II}Cu^{II} complexes and their relevance to copper(II) containing metalloenzymes and DNA cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2006 - in press.

119 FERGUSON, W. J. et al. Hydrogen ion buffers for biological research. **Analytical Biochemistry**, v. 104, p. 300-310, 1980.

120 GOOD, N. E.; IZAWA, S. Hydrogen ion buffers. **Methods in Enzymology**, v. 24, p. 53-68, 1972.

121 GOOD, N. E. et al. Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, v. 5, n. 2, p. 467-477, 1966.

122 HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The chemistry of free radicals and related 'reactive species'. In: **Free Radicals in Biology and Medicine**. New York: Oxford University Press, 1999. p. 36-104.

123 GRADY, J. K.; CHASTEEN, N. D.; HARRIS, D. C. Radicals from "Good's" buffers. **Analytical Biochemistry**, v. 173, p. 111-115, 1988.

124 HABIB, A.; TABATA, M. Oxidative DNA damage induced by HEPES (2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid) buffer in the presence of Au(III). **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, p. 1696-1702, 2004.

- 125 HEGETSCHWEILER, K.; SALTMAN, P. Interaction of copper(II) with N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-ethanesulfonic acid (HEPES). **Inorganic Chemistry**, v. 25, n. 1, p. 107-109, 1986.
- 126 VASCONCELOS, M. T. S. D.; AZENHA, M. A. G. O.; ALMEIDA, C. M. R. Copper(II) complexation properties and surfactant activity of 3-[N,N-bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-hydroxypropanesulfonic acid and N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-hydroxypropanesulfonic acid pH buffers which may affect trace metal speciation in in vitro studies. **Analytical Biochemistry**, v. 265, p. 193-201, 1998.
- 127 MASH, H. E. et al. Complexation of copper by zwitterionic aminosulfonic (good) buffers. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 671-677, 2003.
- 128 VASCONCELOS, M. T. S. D.; AZENHA, M. A. G. O.; LAGE, O. M. Electrochemical evidence of surfactant activity of the HEPES pH buffer which may have implications on trace metal availability to cultures in vitro. **Analytical Biochemistry**, v. 241, p. 248-253, 1996.
- 129 WENNER, J. R.; BLOOMFIELD, V. A. Buffer effects on EcoRV kinetics as measured by fluorescent staining and digital imaging of plasmid cleavage. **Analytical Biochemistry**, v. 268, n. 2, p. 201-212, 1999.
- 130 YU, Q. et al. Avoiding interferences from Good's buffers: a contiguous series of noncomplexing tertiary amine buffers covering the entire range of pH 3-11. **Analytical Biochemistry**, v. 253, n. 1, p. 50-56, 1997.
- 131 JUSTI, K. C. et al. Chitosan functionalized with 2[-bis-(pyridylmethyl)aminomethyl]4-methyl-6-formyl-phenol: equilibrium and kinetics of copper (II) adsorption. **Polymer**, v. 45, n. 18, p. 6285-6290, 2004.
- 132 ZSOLNAI, L. ZORTEP: an interactive ORTEP program. **University of Heidelberg**, Germany, 1997.

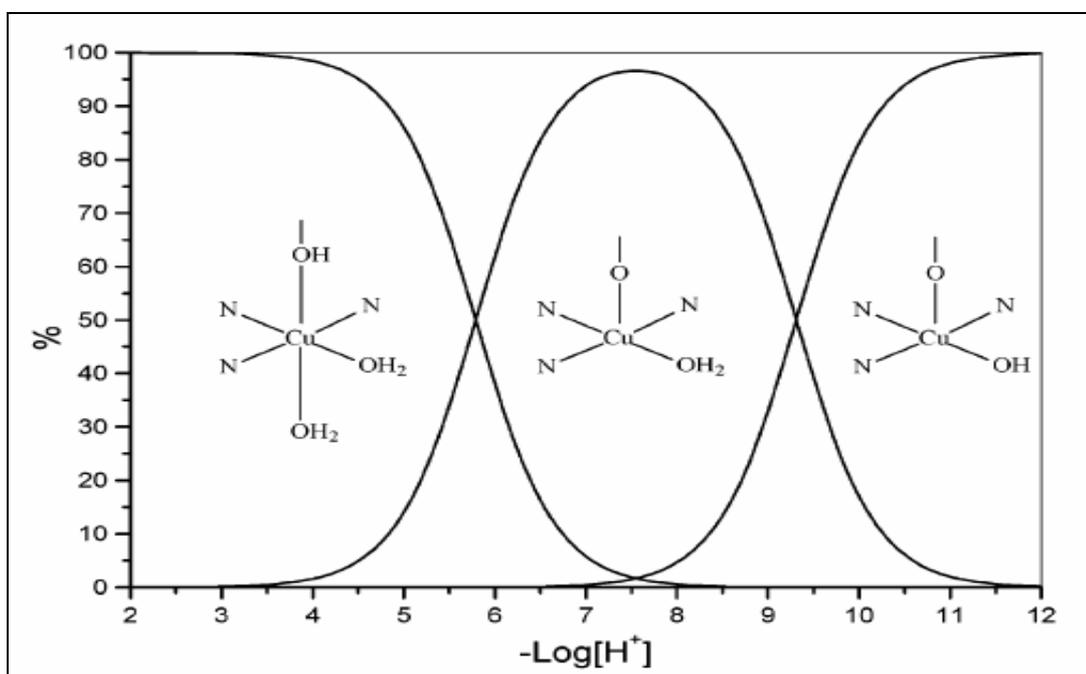
ANEXOS

Parâmetros de hélice médios para as principais conformações do DNA (adaptado de Blackburn e Galet [12])

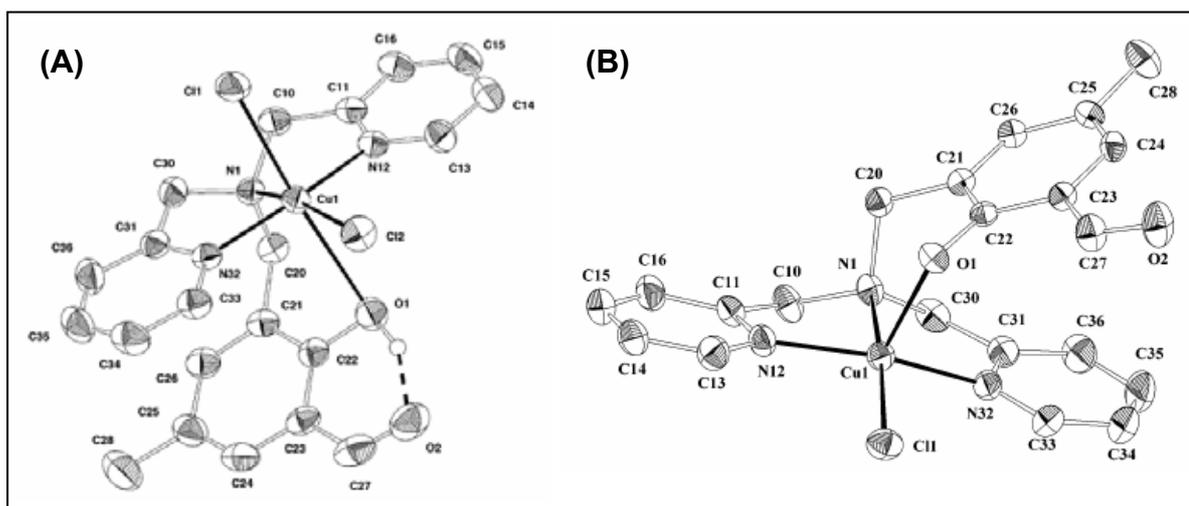
| Tipo de estrutura | Sentido da hélice | Resíduos por volta | Torção por pb Ω° | Deslocamento pb Da | Ascensão por pb/A | Inclinação da base τ° | Conformação do açúcar | Largura do sulco/A | | Profundidade do sulco/A | |
|-------------------|-------------------|--------------------|------------------------------|--------------------|-------------------|---------------------------------|-----------------------|--------------------|-------|-------------------------|-------|
| | | | | | | | | Menor | Maior | Menor | Maior |
| A-DNA | R | 11 | 32,7 | 4,5 | 2,9 | 20 | C3'-endo | 11,0 | 2,7 | 2,8 | 13,5 |
| dGGCCGGCC | R | 11 | 32,6 | 3,6 | 3,03 | 12 | C3'-endo | 9,6 | 7,9 | ----- | ----- |
| B-DNA | R | 10 | 36 | -0,2 a -1,8 | 3,3-3,4 | -6 | C2'-endo | 5,7 | 11,7 | 7,5 | 8,8 |
| dCGCGAATTCGCG | R | 9,7 | 37,1 | ----- | 3,34 | -1,2 | C2'-endo | 3,8 | 11,7 | ----- | ----- |
| C-DNA | R | 9,33 | 38,5 | -1,0 | 3,31 | -8 | C3'-exo | 4,8 | 10,5 | 7,9 | 7,5 |
| D-DNA | R | 8 | 45 | -1,8 | 3,03 | -16 | C3'-exo | 1,3 | 8,9 | 6,7 | 5,8 |
| T-DNA | R | 8 | 45 | -1,43 | 3,4 | -6 | C2'-endo | Estreito | Largo | Fundo | Raso |
| Z-DNA | L | 12 | -9, -51 | -2 a -3 | 3,7 | -7 | C3'-endo(sin) | 2,0 | 8,8 | 13,8 | 3,7 |
| A-RNA | R | 11 | 32,7 | 4,4 | 2,8 | 16-19 | C3'-endo | | | | |
| A'-RNA | R | 11 | 30 | 4,4 | 3,0 | 10 | C3'-endo | | | | |

ANEXO A

ANEXO B

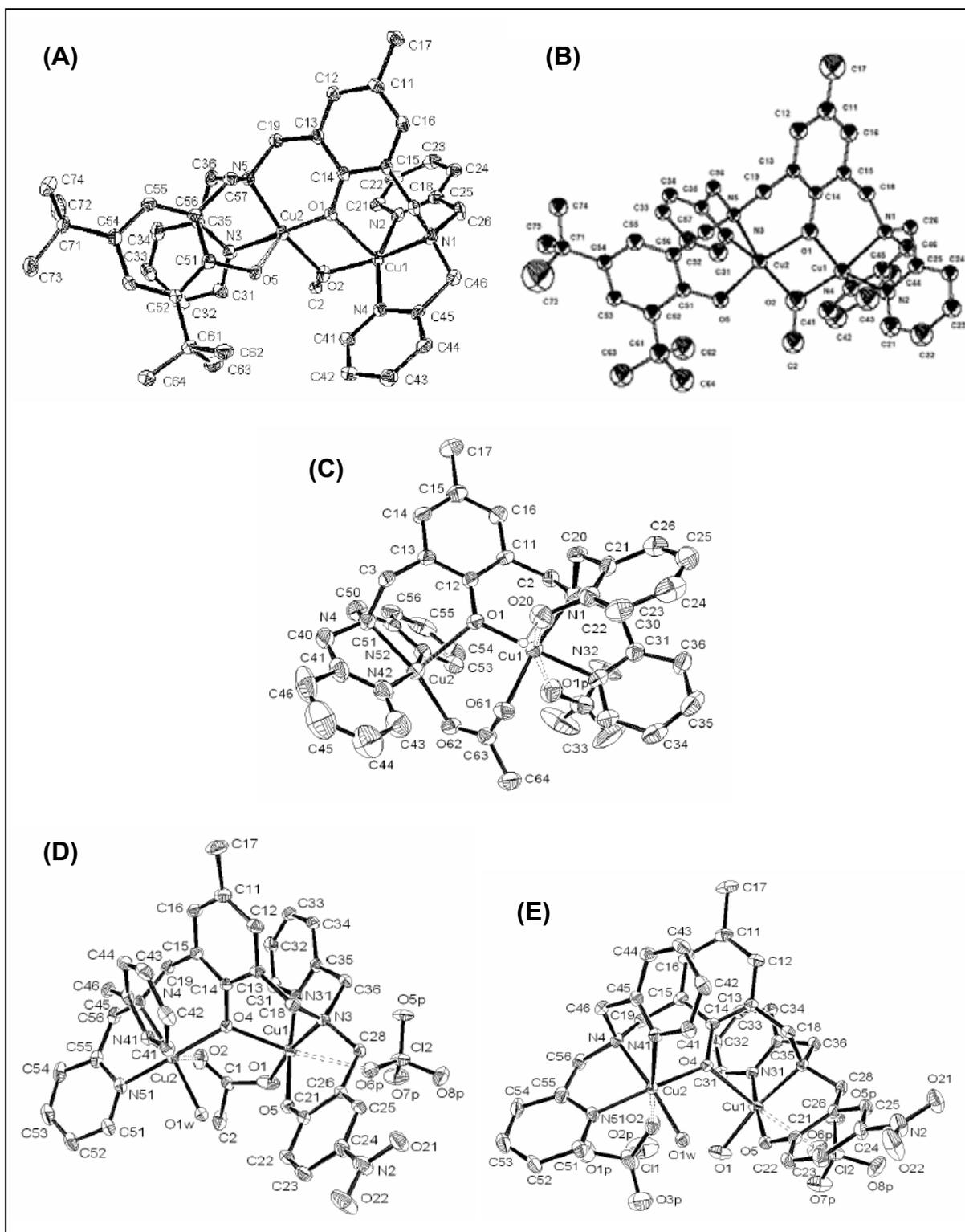


Curva de distribuição de espécies em função do pH para o complexo CuMFF [85].



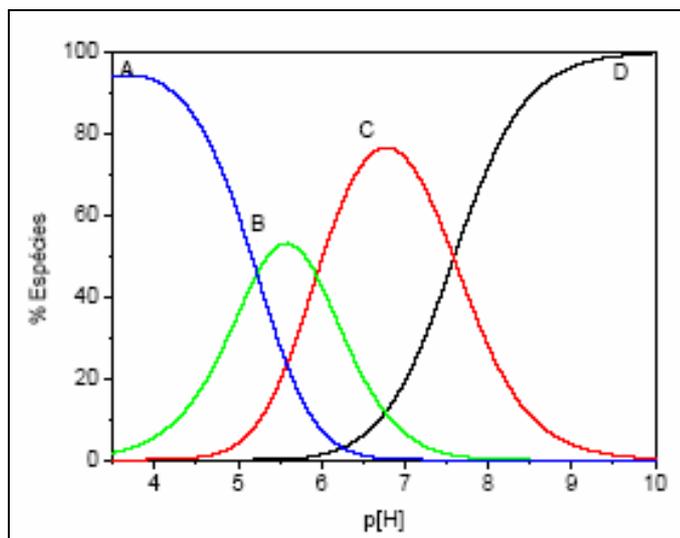
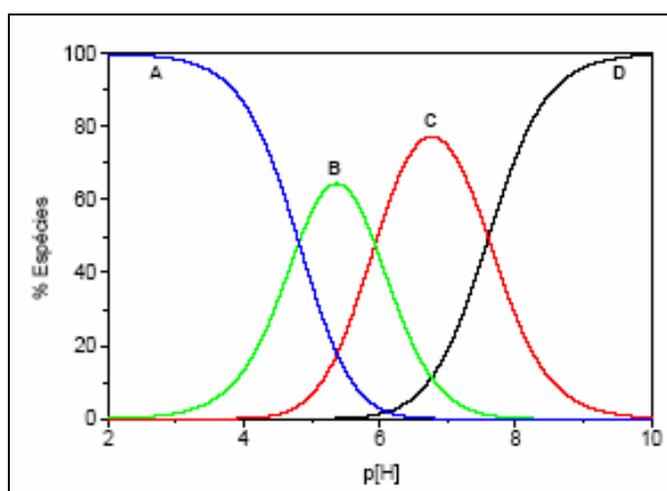
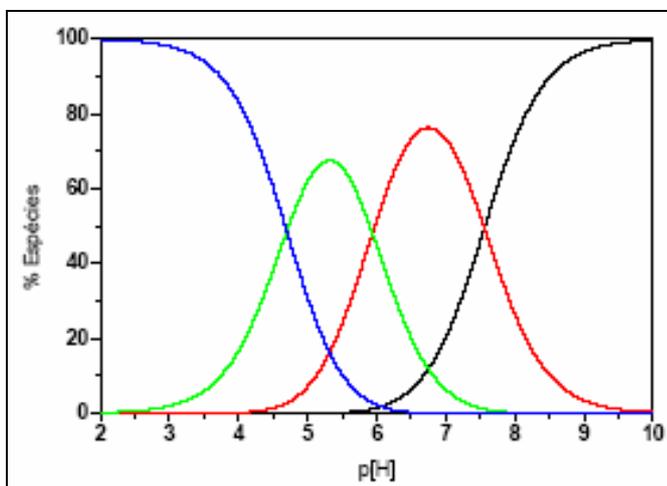
ZORTEP [132] do complexo CuMFF: (A) espécie 1; (B) espécie 2 [85].

ANEXO C



ZORTEP [132] dos complexos $\text{Cu}_2\text{L-X}$: **(A)** $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ – protonado; **(B)** $\text{Cu}_2\text{L-dtb}$ – desprotonado; **(C)** $\text{Cu}_2\text{L-H}$; **(D)** $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ – estrutura com ponte acetato e ocupação de 70 % na célula unitária; **(E)** $\text{Cu}_2\text{L-NO}_2$ – estrutura sem ponte exógena e ocupação de 30 % na célula unitária [86].

ANEXO D

Curva de distribuição de espécies em função do pH para o complexo Cu₂L-dtb [86].Curva de distribuição de espécies em função do pH para o complexo Cu₂L-H [86].Curva de distribuição de espécies em função do pH para o complexo Cu₂L-NO₂ [86].

Artigos publicados

Phosphate Diester Hydrolysis and DNA Damage Promoted by New *cis*-Aqua/Hydroxy Copper(II) Complexes Containing Tridentate Imidazole-rich Ligands

Marciela Scarpellini,[†] Ademir Neves,^{*†} Rosmari Hörner,[†] Adailton J. Bortoluzzi,[†] Bruno Szpoganics,[†] César Zucco,[†] René A. Nome Silva,[†] Valderes Drago,[†] Antonio S. Mangrich,[‡] Wilson A. Ortiz,[‡] Wagner A. C. Passos,[‡] Mauricio C. B. de Oliveira,[‡] and Hernan Terenzi[‡]

Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil, Departamento de Física, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 81531-970, Curitiba, PR, Brazil, Grupo de Supercondutividade e Magnetismo, Universidade Federal de São Carlos, 13565-900, São Carlos, SP, Brazil, and Laboratório de Expressão Gênica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

Received December 17, 2002

The tridentate Schiff base [(2-(imidazol-4-yl)ethyl)(1-methylimidazol-2-yl)methyl]imine (HISMIMI) and its reduced form HISMIMA were synthesized and characterized, as well their mononuclear *cis*-dihalo copper(II) complexes **1** and **2**, respectively. In addition, the dinuclear $[\text{Cu}^{\text{II}}(\mu\text{-OH})_2\text{Cu}^{\text{II}}]^{2+}$ complexes (**3**) and (**4**) obtained from complexes **1** and **2**, respectively, were also isolated and characterized by several physicochemical techniques, including magnetochemistry, electrochemistry, and EPR and UV–vis spectroscopies. The crystal structures of **1** and **2** were determined by X-ray crystallography and revealed two neutral complexes with their tridentate chelate ligands meridionally coordinated. Completing the coordination spheres of the square-pyramidal structures, a chloride ion occupies the apical position and another is bonded in the basal plane. In addition, complexes **1** and **2** were investigated by infrared, electronic, and EPR spectroscopies, cyclic voltammetry, and potentiometric equilibrium studies. The hydrolytic activity on phosphate diester cleavage of **1** and **2** was investigated utilizing 2,4-BDNPP as substrate. These experiments were carried out at 50 °C, and the data treatment was based on the Michaelis–Menten approach, giving the following kinetic parameters (complex **1**/complex **2**): v_{max} ($\text{mol L}^{-1} \text{s}^{-1}$) = $16.4 \times 10^{-9}/7.02 \times 10^{-9}$; K_{M} (mol L^{-1}) = $17.3 \times 10^{-3}/3.03 \times 10^{-3}$; k_{cat} (s^{-1}) = $3.28 \times 10^{-4}/1.40 \times 10^{-4}$. Complex **1** effectively promoted the hydrolytic cleavage of double-strand plasmid DNA under anaerobic and aerobic conditions, with a rate constant of 0.28 h^{-1} for the decrease of form I, which represents about a 10^7 rate increase compared with the estimated uncatalyzed rate of hydrolysis.

Introduction

Much information about the metal roles in natural systems is currently provided by comparative studies on metalloenzymes and metal compounds. Thus, metalloenzymes such as purple acid phosphatases^{1,2} and alkaline phosphatases,^{3,4}

for which mechanistic studies are available, have been used as a successful starting point in the development of a class of synthetic metal complexes known as synthetic hydrolases and/or chemical nucleases. In the past decade, bioinorganic chemists have been engaged in metallic ion studies related to medical matters, such as the excess or the lack of metal

* Author to whom correspondence should be addressed. Tel: 55-48-331-9219 R226. Fax: 55-48-331-9711. E-mail: ademir@qmc.ufsc.br.

[†] Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina.

[‡] Universidade Federal do Paraná.

[§] Universidade Federal de São Carlos.

[¶] Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina.

^{||} Departamento de Física, Universidade Federal de Santa Catarina.

(1) Klabunde, T.; Sträter, N.; Fröhlich, R.; Witzel, H.; Krebs, B. *J. Mol. Biol.* **1996**, *259*, 737–748.

(2) Lindqvist, Y.; Johansson, E.; Kaija, H.; Vihko, P. *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 135–147.

(3) Holtz, K. M.; Kantrowitz, E. R. *FEBS Lett.* **1999**, *462*, 7–11.

(4) Stee, B.; Hehir, M. J.; Brennan, C.; Nolte, M.; Kantrowitz, E. R. *J. Mol. Biol.* **1998**, *277*, 647–662.

Hydrolytic Protein Cleavage Mediated by Unusual Mononuclear Copper(II) Complexes: X-ray Structures and Solution Studies

Mauricio C. B. de Oliveira,[†] Marciela Scarpellini,[‡] Ademir Neves,^{*,†} Hernán Terenzi,^{*,†} Adailton J. Bortoluzzi,[‡] Bruno Szpoganics,[‡] Alessandra Greatti,[‡] Antônio S. Mangrich,[§] Emanuel M. de Souza,^{||} Pablo M. Fernandez,[⊥] and Marcia R. Soares[¶]

Laboratório de Expressão Gênica, Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil, Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia-LABINC, Departamento de Química-CFM, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brazil, Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, 81531-970 Curitiba, PR, Brazil, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, 81531-970 Curitiba, PR, Brazil, Unité de Biochimie Structurale, Institut Pasteur, 75724 Paris, France, and Laboratório de Espectrometria de Massas, Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, 13083-100 Campinas, SP, Brazil

Received October 8, 2004

The crystal structures and redox and UV–vis/EPR spectroscopic properties of two new mononuclear copper(II) complexes, $[\text{Cu}(\text{HL})\text{Cl}_2]$ (1) and $[\text{Cu}(\text{L})\text{Cl}]$ (2), prepared through the reaction between copper(II) chloride and the ligand 2-[[bis(pyridylmethyl)amino]methyl]-4-methyl-6-formylphenol (HL^1) under distinct base conditions, are reported along with solution studies. Also, we demonstrate that these Cu^{II} complexes are able to cleave unactivated peptide bonds from bovine serum albumin (BSA) and the thermostable enzyme Taq DNA polymerase at micromolar concentration, under mild pH and temperature conditions. The cleavage activity seems to be specific with defined proteolytic fragments appearing after protein treatment. The location of the specific cleavage sites was tentatively assigned to solvent-accessible portions of the protein. These are two of the most active $\text{Cu}(\text{II})$ complexes described to date, since their cleavage activity is detected in minutes and evidence is here presented for a hydrolytic mechanism mediating protein cleavage by these complexes.

Introduction

The half-life of a peptide bond is estimated to be 7–600 years at neutral pH and ambient temperature, and these are one of the most stable chemical bonds in nature.^{1–3} Typical biological catalysts such as carboxypeptidase A contains a zinc ion in their active sites, thus suggesting that small metal

coordination complexes may play the role of a protease.⁴ Because of the extreme stability of peptide bonds, their hydrolysis is often studied using activated amides. In fact there are few examples of the metal-promoted hydrolysis of peptide bonds in proteins; for a review, see refs 5–9 $\text{Cu}[\text{9-aneN}_3]\text{Cl}_2$ ($[\text{9-aneN}_3] = 1,4,7\text{-triazacyclononane}$) is an example of a metal complex able to hydrolyze the unactivated dipeptide glycyl–glycine and also the protein BSA, at near physiological pH.¹⁰ This was the first complex able to cleave not only peptide bonds but also phosphodiester bonds,

* Authors to whom correspondence should be addressed. E-mail: ademir@qmc.ufsc.br (A.N.); Tel.: 55-48-331-9219 R226 (A.N.); Fax: 55-48-3319711 (A.N.).

[†] Departamento de Bioquímica-CCB, Universidade Federal de Santa Catarina.

[‡] Departamento de Química-CFM, Universidade Federal de Santa Catarina.

[§] Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná.

^{||} Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná.

[⊥] Unité de Biochimie Structurale, Institut Pasteur.

[¶] Laboratório de Espectrometria de Massas, Laboratório Nacional de Luz Sincrotron.

(1) Kahne, D.; Still, W. C. *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, *110*, 7529–7534.

(2) Bryant, R. A. R.; Hansen, D. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 5498–5499.

(3) Radzika, A.; Wolfenden, R. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 6105–6109.

(4) Christianson, D. W.; Lipscomb, W. N. *Acc. Chem. Res.* **1989**, *22*, 62–69.

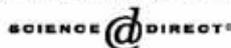
(5) Zhu, L.; Kostic, N. M. *Inorg. Chim. Acta* **2002**, *339*, 104–110.

(6) Polzin, G. M.; Burstyn, J. N. *Metal Ions in Biological Systems*; Marcel Dekker: New York, 2001; pp 104–143.

(7) Kaminskaiia, N. V.; Kostic, N. M. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 2368–2377.

(8) Hegg, E. L.; Burstyn, J. N. *Coord. Chem. Rev.* **1998**, *173*, 133–165.

(9) Milovic, N. M.; Kostic, N. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4759–4769.

Available online at www.sciencedirect.com

Polyhedron 24 (2005) 495–499



POLYHEDRON

www.elsevier.com/locate/poly

Nucleic acid cleavage by a Cu(II) polyaza macrocyclic complex

M.C.B. Oliveira^a, M.S.R. Couto^a, P.C. Severino^a, T. Foppa^a, G.T.S. Martins^b,
B. Szpoganicz^b, R.A. Peralta^c, A. Neves^c, H. Terenzi^{a,*}

^a Laboratório de Expressão Gênica, Departamento de Bioquímica, CCB, UFSC, Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

^b Laboratório de Equilíbrio Químico, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil

^c Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil

Received 13 April 2004; accepted 8 December 2004

Abstract

The search for efficient artificial nucleases is a consequence of the huge efforts towards DNA sequencing by genome projects around the world. In the present study, we describe the activity of the Cu(II)-BMXD complex (BMXD = 3,6,9,17,20,23-hexaazatri-cyclo[23.3.1.1^{11,13}]triaconta-1(29),11(30),12,14,25,27-hexaene) as a DNA cleavage agent. The rate constant for the DNA backbone cleavage reaction at room temperature (25 °C) and pH 7.0 was estimated to be $1.1 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, which corresponds, approximately, to a half-life ($t_{1/2}$) of one week. We demonstrated that the DNA cleavage reaction promoted by the Cu₂BMXD complex may occur via an oxidative pathway through performing reactions in the presence of free-radical acceptors and comparing the activity under aerobic and anaerobic conditions. The Cu₂BMXD complex reported here is established as a novel artificial nuclease.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: DNA cleavage; Polyaza ligand; Binuclear copper complex; BMXD; Chemical nuclease; DNA–drug interaction

1. Introduction

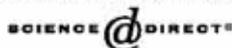
Drugs or molecules that interact with nucleic acids have been the subject of great interest because they serve as tools in molecular biology and biochemistry, as well as therapeutics [1], especially those capable of nucleic acid cleavage [2]. Chemical nucleases are compounds that mimic the action of enzymatic nucleases [3] and can be alternatively used in biochemical and biotechnological processes. They are smaller than enzymes, which allows them to attack macromolecular regions that are inaccessible to enzymes [4] and also their specificity and efficiency may be modulated [5]. These properties have turned chemical nucleases into useful tools as adjuvants in PCR diagnostics [6], nucleic acid attacking

agents [7], nucleic acid structural probes [4], DNA cleaving and marking agents for microarrays [8], controlling agents for fungal diseases [9] and antitumor drugs [10–13]. Chemical nucleases have also been used in studies on the interactions between nucleic acids and proteins [14,15] and on the mode of action of some metalloproteins [16,17]. The polyaza macrocyclic ligand 3,6,9,17,20,23-hexaazatri-cyclo[23.3.1.1^{11,13}] triaconta-1(29),11(30),12,14,25,27-hexaene (BMXD) (Fig. 1) was first synthesized in 1990 [18].

This ligand consists of a macrocycle formed by two diethylenetriamine moieties separated by two *m*-xylyl bridges, and is capable of coordinating one or two Cu(II) centers via its diethylenetriamine moieties [18]. In aqueous medium, depending on the pH, the metal centers of the dinuclear copper(II) complex (Cu₂BMXD) can, in turn, coordinate hydroxide anions (Fig. 1) as suggested by Martell et al. [18,19], as well as other anions, some of them of biological relevance

* Corresponding author. Tel: +55 48 331 9589; fax: +55 48 331 9672.

E-mail address: hterenzi@ccb.ufsc.br (H. Terenzi).

Available online at www.sciencedirect.com

Inorganica Chimica Acta 358 (2005) 339–351

**Inorganica
Chimica Acta**
www.elsevier.com/locate/ica

Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H₂O/OH[−] groups as models for purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage

Adolfo Horn Jr.^a, Ivo Vencato^b, Adailton J. Bortoluzzi^b, Rosmari Hörner^b,
René A. Nome Silva^b, Bruno Spoganicz^c, Valderes Drago^d, Hernán Terenzi^e,
Maurício C.B. de Oliveira^e, Rüdiger Werner^f, Wolfgang Haase^f, Ademir Neves^{b,*}

^a Laboratório de Ciências Químicas, Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes-RJ, Brazil^b LABINC – Laboratório de Química Bioinorgânica e Cristalografia, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil^c Laboratório de Equilíbrio Químico, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil^d Laboratório de Efeito Mössbauer, Departamento de Física, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil^e Laboratório de Expressão Gênica, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis-SC, Brazil^f Institut für Physikalische Chemie, Technische Universität Darmstadt, Petersenstraße 20, D-64287-Darmstadt, Germany

Received 21 July 2004; accepted 6 September 2004

Available online 18 October 2004

Abstract

We present here the syntheses of two dinuclear iron(III) complexes with the polydentate N,O-donor ligand H₂BPCINOL (*N*-(2-hydroxybenzyl)-*N*-(2-pyridylmethyl)((3-chloro)(2-hydroxy)propyl)amine). The reaction between Fe^{III}(ClO₄)₃·9H₂O, the title ligand and two equivalents of NaOAc·3H₂O resulted in the complex [Fe₂^{III}(BPCINOL)₂(OAc)]ClO₄ (**1**). When the synthesis was performed with a lesser amount of NaOAc·3H₂O (half equivalent), the complex without bridging acetate, [Fe₂^{III}(BPCINOL)₂(H₂O)₂](ClO₄)₂·4H₂O (**2**) was obtained. The complexes were characterized by X-ray structural analysis, magnetochemistry, Mössbauer and UV-Vis spectroscopies, and electrochemistry. Complex **2** was also characterized in solution through potentiometric titration. Both complexes crystallize in the monoclinic system. Complex **2** has one water molecule coordinated to each iron centre. Their p*K*_a values are 5.00 and 7.03 for the first protonation/deprotonation equilibrium of each coordinated water molecule. The UV-Vis and electrochemical techniques showed that the absence of an acetate bridge in **2** results in a significant difference in the Lewis acidity of both iron centres, when compared with **1**. The lack of an acetate bridge in **2** also results in changes in the *anti*-ferromagnetic coupling as revealed by magnetic measurements. Complex **2** is an interesting structural model for the active site of iron containing PAPs, since it has an Fe(alkoxo)₂Fe core with an Fe^{III}...Fe^{III} distance of 3.122(1) Å, containing phenolate and water molecules coordinated to the iron centres and is soluble in aqueous solutions. Furthermore, the UV-Vis properties of **2** are similar to those of PAPs, since the complex absorbs at 580 nm in the oxidized form (550–570 nm for PAPs) and at 499 nm in the mixed-valence form (505–510 nm for PAPs) as revealed through spectroelectrochemical studies. Finally, complex **2** successfully promoted the hydrolytic cleavage of plasmid DNA under aerobic and anaerobic conditions, producing single and double DNA strand breaks at biological pH values.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Diron(III) complexes; Models for PAPs; Nuclease activity

* Corresponding author. Tel.: +55 48 331 9219 R226; fax: +55 48 331 9711.

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