

Nathalia Aparecida Santos Castilho

**INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE DNA E PROTEÍNA POR
NOVOS COMPLEXOS METÁLICOS**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-graduação em
Bioquímica da Universidade
Federal de Santa Catarina para
obtenção do Grau de mestre em
Bioquímica.

Orientador: Prof.Dr.Hernán
Terenzi.

Florianópolis

2015

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

Castilho, Nathalia Aparecida Santos
Interação e clivagem de DNA e proteínas por novos
complexos metálicos / Nathalia Aparecida Santos Castilho ;
orientador, Hernán Terenzi - Florianópolis, SC, 2015.
104 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Bioquímica.

Inclui referências

1. Bioquímica. 2. Complexos metálicos. 3. Nucleases . 4.
Proteases . I. Terenzi, Hernán . II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica.
III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais:
Sebastião e Juçara. Que me
ensinaram desde cedo o que
realmente importa na vida: o amor.

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Hernán Terenzi, pela oportunidade e confiança no meu trabalho, sempre dando suporte para o desenvolvimento científico de seus alunos.

Aos professores Ademir Neves e Elene Cristina Pereira Maia e aos doutorandos Alfredo Muxel, Priscila Pereira Silva e Tiago Pacheco por fornecerem os complexos analisados e pela atenção dedicada.

Aos colegas e amigos do Centro de Biologia Molecular e Estrutural: Angela, Alessandra, Carol, Deise, Douglas, Elis, Henrique, Henrique L, Jean, Leonardo, Martina, Pri e Vanessa e um agradecimento especial a “Feira do DNA”: Cris, Lilica e Ti, com os quais tive o prazer de conviver durante estes dois anos que se tornaram além de colegas de laboratório amigos para a vida. Sentirei saudade.

Aos meus pais, Sebastião e Juçara, pelo amor, apoio e dedicação constante em mais essa etapa da minha vida.

Ao meu irmão Murilo, por me receber sempre com tanto carinho, sorrisos, abraços e beijos.

A minha avó, Dona Chica, por me encher de mimos durante a vida, especialmente nestes dois anos. Com muita comida boa e amor no coração.

Ao meu namo Dani, mais um fruto maravilhoso desse mestrado. Muito obrigada por fazer a minha vida mais feliz. Amo-te.

À UFSC e ao programa de pós-graduação em Bioquímica e ao programa de pós-graduação em Química, pela estrutura e qualidade de ensino.

A CAPES pela concessão da bolsa e ao CNPq, MCT, FINEP, FAPESC e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB)

RESUMO

Nucleases e proteases são enzimas que possuem a capacidade de degradar hidroliticamente ligações fosfodiéster e peptídicas, respectivamente. Neste sentido, nas últimas décadas diversos modelos de nucleases e proteases sintéticas vêm sendo desenvolvidos a fim de mimetizar a função dessas proteínas. Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a atividade catalítica de complexos metálicos como modelo de hidrolases frente à clivagem de DNA ou proteína. Os complexos testados na clivagem de DNA foram os seguintes: complexo mononuclear de lantânio (III) $[\text{La}(\text{L1})(\text{NO}_3)_2] \cdot 0,25\text{H}_2\text{O}$ (**1**) e sua forma imobilizada em sílica 3-aminopropil (**APS-1**) e o complexo mononuclear de Cu(II) $[\text{Cu}(\text{LPurina})\text{Cl}]$ (**CuLPu**). Já na BSA foram testados dois complexos de Cu(II): **[Cu(Shyd)(byp)]** e **[Cu(Shyd)(phen)]**. Quando se comparou a atividade catalítica de **1** com sua forma imobilizada (**APS-1**) foi possível observar que ambas possuem a capacidade de clivar o DNA, sendo esta mais branda com o complexo imobilizado. Através de experimentos com sequestradores de espécies reativas de oxigênio é possível sugerir que estes atuam por uma via hidrolítica, como já demonstrado para diversos outros complexos de lantânio. Com relação ao complexo **CuLPu**, este mostrou-se capaz de clivar DNA plasmidial em condições brandas de pH e temperatura e em concentrações na escala de micromolar. O mecanismo de ação mostrou-se dependente de espécies reativas de oxigênio, sendo comprovadamente oxidativo pelo experimento em atmosfera de argônio, onde a atividade do complexo diminuiu drasticamente. Não há preferência por sulcos específicos do DNA, sugerindo que a interação ocorra por ambos, como mostrado pelo espectro de dicroísmo circular e o ensaio com inibidores de sulco. A influência da força iônica mostrou que o complexo também pode interagir com o DNA através de interações eletrostáticas, dado também corroborado pelo espectro de DC. O complexo mostrou-se capaz de acelerar a reação de clivagem de DNA em uma escala de 10^7 vezes quando comparado com a reação não catalisada, mostrando assim o importante papel da adição da purina para a eficiência catalítica. Os complexos **[Cu(Shyd)(byp)]** e **[Cu(Shyd)(phen)]** também se mostraram bastantes ativos na clivagem de BSA, interagindo com a proteína por interações eletrostáticas e atuando provavelmente por um mecanismo oxidativo. As constantes cinéticas de clivagem observadas mostram alta eficiência catalítica,

sendo **[Cu(Shyd)(phen)]** ($1,2790 \text{ h}^{-1}$) mais ativo que **[Cu(Shyd)(byp)]** ($0,7159 \text{ h}^{-1}$) efeito provavelmente causado pelo ligante de fenantrolina pertencente a **[Cu(Shyd)(phen)]**, demonstrando assim, o potencial destes complexos como miméticos de proteases.

Palavras chave: interação com DNA e BSA; clivagem de DNA e BSA; complexos miméticos de proteases/nucleases.

ABSTRACT

Nucleases and proteases are enzymes which are able to hydrolyze phosphodiester and peptide bonds, respectively. In this regard, the last decades many nucleases and synthetic proteases have been developed to mimic the function of these proteins. Thus, this study aimed to evaluate the catalytic activity of metal complexes model of hydrolases for cleavage of DNA or protein. The tested complexes in terms of DNA cleavage were: a mononuclear complex of lanthanum (III) $[\text{La}(\text{L1})(\text{NO}_3)_2] \cdot 0,25\text{H}_2\text{O}$ (**1**) and its immobilized form 3-aminopropyl silica (**APS-1**); and a mononuclear complex of Cu(II) $[\text{Cu}(\text{LPurina})\text{Cl}]$ (**CuLPu**). Protein (BSA) cleavage were investigated with two complexes of Cu (II) $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{bpy})]$ and $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{phen})]$. Comparing the catalytic activity of immobilized form (**APS-1**) with **1**, has been observed that both have the ability to cleave the DNA, which is more mild to the immobilized complex. Through experiments with reactive oxygen species scavengers, was possible to suggest that **1** and **APS-1** act by a hydrolytic pathway, as demonstrated for several other lanthanum complexes. Regarding **CuLPu** complex, this proved to be able of cleaving plasmid DNA under mild conditions and temperature and concentrations at the micromolar range. The mechanism of cleavage was dependent on reactive oxygen species proved by experiment in an argon atmosphere, where the activity of the complex decreases dramatically. There is no specific preference for DNA grooves which is also observed by circular dichroism studies. The influence of ionic strength showed that the complex may also interact with DNA through electrostatic interactions. The complex was shown to be able to accelerate DNA cleavage reaction on a scale 10^7 times when compared with the uncatalyzed reaction, thus showing the important role of purine addition to the catalytic efficiency. The complexes $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{bpy})]$ and $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{phen})]$ were also quite active in BSA cleavage, interacting with the protein by electrostatic interactions and with an oxidative mechanism. The observed cleavage rate constants show high catalytic efficiency, and $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{phen})]$ (1.2790 h^{-1}) was more active than $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{bpy})]$ (0.7159 h^{-1}) effect probably caused by the phenanthroline ligand belonging to $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{phen})]$, thereby demonstrating the potential mimetics such as proteases.

Keywords: DNA cleavage; Protein cleavage; DNA binding; BSA binding; Protease/Nuclease mimetics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Modelo estrutural proposto por Watson e Crick.(A) Representação esquemática, mostrando as dimensões da hélice; (B) Representação em bastão mostrando o esqueleto e as bases empilhadas; (C) Modelo de volume atômico..23
- Figura 2. A) Estrutura geral de um nucleotídeo B) Principais bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos.24
- Figura 3. Ligação fosfodiéster no esqueleto covalente do DNA. A ligação fosfodiéster (sombreada) liga unidades nucleotídicas sucessivas.25
- Figura 5. A) Representação do mecanismo de hidrólise de uma ligação fosfodiéster via ataque nucleofílico de um grupo hidróxido. B) Representação do mecanismo oxidativo, com o ataque de espécies de radicais livres à base nitrogenada e à pentose do nucleotídeo.28
- Figura 6. Estrutura geral de um aminoácido. O grupo R, ou cadeia lateral (em vermelho) ligado ao carbono α (em azul) é diferente em cada aminoácido.30
- Figura 7. Formação de uma ligação peptídica por condensação. O grupo α -amino de um aminoácido atua como nucleófilo para deslocar o grupo hidroxil de outro aminoácido, formando uma ligação peptídica (sombreada em cinza)..31
- Figura 8. Estrutura dos ligantes: A) byp (2'2-bipiridina) e B) [9]aneN₃ (1,4,7-triazaciclononano).34
- Figura 9. Estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2)(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ 35
- Figura 10. Exemplos de ligantes utilizados em complexos de lantanídeos com atividade na clivagem de DNA: (A) Bis-Tris; (B) esqueleto de azacoroa; (C) base de Schiff macrocíclica; (D) composto de azacoroa; (E) ligante DOTA-amida; (F) ligante intercalativo unido ao ácido hidroxâmico37

Figur Figura 11. Estrutura do ligante L ₁	38
Figura 12. Esquema estrutural do complexo [La(L ₁)(NO ₃) ₂].0,25H ₂ O (A) e este mesmo imobilizado em sílica 3-aminopropil (B)	42
Figura 13. Esquema estrutural do complexo [Cu(Lpurina)Cl].....	43
Figura 15. Ilustração das três formas do DNA plasmidial e sua separação em gel de agarose.	46
Figura 16. 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).....	48
Figura 17. Distamicina (A) e Netropsina (C) bloqueadores do sulco menor do DNA (A) e Verde de Metila, bloqueador do sulco maior (B).	50
Figura 18. Clivagem de DNA plasmidial com variação de pH ([Tampão] = 10 mM; MES pH 5.5 a 6.0; HEPES pH 7.0 a 8.0; e CHES a pH 9.0), através de 1 a 50°C por 16h. Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média ± DP.....	55
Figura 19. Clivagem de DNA plasmidial por 1, 16h a 50°C em tampão HEPES (10mM, pH 7,0) em diferentes concentrações do complexo (5 a 50µM). Dados representativos de dois experimentos diferentes, expressos em média ± DP.	56
Figura 20. Efeito da força iônica (NaCl) na clivagem de DNA plasmidial por 1 a 50µM durante 16 horas a 50 ° C em tampão HEPES (10 mM, pH 7,0). Antes da adição dos complexos, diferentes concentrações de NaCl (0,05 -1M) foram adicionadas ao meio de reação. Dados representativos	57
Figura 21. Efeito dos sequestradores de ERO na clivagem de DNA plasmidial por 1 a 50µM durante 16 horas a 50°C em tampão HEPES (10 mM, pH 7,0). Os sequestradores de ERO utilizados foram: DMSO	

(2 M), KI (0,5 mM) e a SOD (20 unidades). Os controles (sem complexo de reação) para cada inibidor de DNA mostraram uma clivagem semelhante ou ainda mais baixa do que a de controle apresentado na figura (dados não mostrados). Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média \pm DP.59

Figura 22. Efeito dos inibidores de sulco do DNA: distamicina (50 μ M) e verde de metila (50 μ M) sobre a clivagem de DNA plasmidial por 1 a 50 μ M durante 16h a 50 ° C em HEPES 10 mM (pH 7,0). Os controles (sem reação com complexos) de cada inibidor de sulco mostrou uma clivagem de DNA semelhante ou ainda mais baixa do que o controle apresentado na figura (dados não mostrados). Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos como média \pm DP.60

Figura 23. Comparação da atividade de clivagem de DNA, por 1 e APS-1 a 50 μ M durante até 24h a 50 ° C em HEPES 10 mM (pH 7,0). Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média \pm DP. ..62

Figura 24. Comparação da capacidade em clivar DNA de 1 e APS-1 a 50 μ M em até 8h a 50 ° C com dois pH diferentes (Tampão = 10 mM; HEPES a pH 7,0 [A] e CHES a pH 9,0 [B]).64

Figura 25. Clivagem de DNA plasmidial com variação de pH ([Tampão] = 10 mM; MES pH 5.5 a 6.0; HEPES pH 7.0 a 8.0; e CHES a pH 9.0), através de (CuLPu) a 37°C por 16h. Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média \pm DP.66

Figura 26. Clivagem de DNA plasmidial por (CuLPu) durante 16 horas a 37° C em tampão CHES (10 mM, pH 9,0) e diferentes concentrações do complexo (5 a 100 μ M). Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média \pm DP.67

Figura 27. Efeito dos sequestradores de ERO na clivagem de DNA plasmidial por (CuLPu) a 100 μ M durante 16 horas a 37°C em tampão CHES (10 mM, pH 9,0). Os sequestradores de ERO utilizados foram: DMSO (2 M), KI (0,5 mM), SOD (20 unidades) e a NaN₃(0,5mM). Os controles (sem complexo de reação) para cada inibidor de DNA mostraram uma clivagem semelhante ou ainda mais baixa do que a de controle apresentado na figura (dados não mostrados). Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média \pm DP. ..69

Figura 28. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo (CuLPu) em condições aeróbicas(atmosfera de oxigênio) (A) e anaeróbicas (atmosfera de argônio) (B) em tampão CHES (pH 9,0), na concentração de 100 μ M a 50°C, durante 4h. Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média \pm DP..... 72

Figura 29. Espectros de dicroísmo circular de CT-DNA (200 μ M) na ausência e na presença de concentrações variadas do complexo (CuLPu) (r=0,10; r=0,30; r=0,60;r=1,0), onde r=[complexo]/[CT-DNA]. 74

Figura 30. Influência dos ligantes específicos dos sulcos menor e maior do DNA, netropsina e verde de metila (50 μ M) na atividade de clivagem de DNA por (CuLPu) (100 μ M). As reações foram conduzidas em tampão CHES (10 mM pH 9,0), durante 16h a 37 °C. 75

Figura 31. Efeito da força iônica (NaCl) na clivagem do DNA plasmidial por (CuLPu), em 100 μ M por 16h a 37°C em tampão CHES (10mM, pH 9,0). Depois da adição dos complexos, diferentes concentração de NaCl(100 a 1250mM) foram adicionados as reações. Dados representativos de dois ensaios diferentes expresso em média \pm DP. 77

Figura 32. Gráfico de k_{obs} versus concentrações do complexo CuLPu, mostrando um comportamento de saturação. As reações foram realizadas em CHES (10 mM) pH 9,0 com concentrações crescentes do complexo (50-500 μ M). A incubação foi realizada a 37°C com retirada de alíquotas em diferentes intervalos de tempo(0-4h)...... 80

Figura 33. Clivagem da proteína BSA (15 μ M) em diferentes tampões: MES - 10mM (pH 5,5 e 6,0), HEPES - 10mM (pH 7,0 e 8,0) e CHES - 10mM (pH 9,0), frente a adição de 200 μ M de [Cu(Shyd)(bpy)] (A) e [Cu(Shyd)(phen)] (B), durante 4h a 50°C. Dados representativos de duplicatas \pm DP. 83

Figura 34. Clivagem da proteína BSA (15 μ M) com a adição de concentrações crescentes (10 a 500 μ M) do complexo [Cu(Shyd)(bpy)] (A) e [Cu(Shyd)(phen)] (B). As reações foram incubadas por 4h, a 50°C em tampão HEPES (10mM, pH 7,0). Dados representativos de duplicatas com média \pm DP..... 85

Figura 35. Espectros de dicroísmo circular de BSA (30 μ M) na ausência e na presença de concentrações variadas dos complexos [Cu(Shyd)(bpy)] (A) e [Cu(Shyd)(phen)] (B), ($r=0,25$; $r=0,5$; $r=1$ e $r=2$), onde $r= [\text{complexo } 1]/[\text{BSA}]$87

Figura 36. Plote da fração de BSA intacta (%) em função do tempo(h) após o tratamento com os complexos [Cu(Shyd)(bpy)] (A) e [Cu(Shyd)(phen)] (B) (100 μ M). As reações foram mantidas a 50°C, com retirada de alíquotas em diferentes intervalos de tempo. Dados representativos de dois ensaios com média \pm DP.89

Figura 37. Efeito dos sequestradores de espécies reativas de oxigênio na BSA (%) quando incubados com 200 μ M de [Cu(Shyd)(bpy)] (A) e [Cu(Shyd)(phen)] (B), durante 4h a 50°C. Dados representativos de dois ensaios diferentes \pm DP.....91

Figura 38. Efeito da adição de NaCl (50-200mM) sobre a atividade dos complexos [Cu(Shyd)(bpy)] (A) e [Cu(Shyd)(phen)] (B), incubados a 200 μ M, durante 4h a 50°C. Dados representativos de dois ensaios diferentes \pm DP.93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação das constantes de clivagem de DNA superenovelado (k_{obs}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para o complexo CuLPu..... 79

Tabela 2. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelo complexo CuLPu..... 81

LISTA DE ABREVIACÕES

2,4 BDNPP	Bis-(2,4-dinitrofenila)
AMPc	Monofostato cíclico de adenosina
BNPP	Dinitrofenilfosfato
BSA	Albumina do soro bovino
CHES	Ácido 2-(ciclohexilamino)etanossulfônico
CT-DNA	Do inglês: <i>calf thymus DNA</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FI	Forma superenovelada do DNA
FII	Forma circular aberta do DNA
FIII	Forma linear do DNA
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
HEPES	(<i>N</i> -(2-hidroxietil)piperazina- <i>N'</i> -(2-ácido etanossulfônico)
MES	Ácido 2-(<i>N</i> -morfolino) etanossulfônico monohidratado
RNA	Ácido ribonucleico
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
Si3AP	Sílica 3-aminopropil.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	23
1.1	DNA.....	23
1.2	Nucleases artificiais.....	26
1.3	Aminoácidos, peptídeos e proteínas.....	29
1.4	Proteases artificiais.....	32
1.4.1	Complexos de cobre.....	33
1.4.2	Complexos de Lantânio(III).....	36
2	Objetivos.....	40
2.1	Objetivo geral.....	40
2.2	Objetivos específicos.....	40
3	Materiais e métodos.....	42
3.1	Complexos em estudo	42
3.1.1	Complexo mononuclear de Lantânio (III).....	42
3.1.2	Complexos de cobre (II)	43
3.2	Amplificação, purificação e quantificação do DNA plasmidial 44	
3.3	Estudos de Clivagem dos complexos metálicos em DNA plasmidial.....	46
3.3.1	Efeito do pH na clivagem de DNA plasmidial.....	48
3.3.2	Influência da força iônica.....	49
3.3.3	Efeito dos inibidores de ERO.....	49
3.3.4	Efeito dos bloqueadores de sulco.....	49
3.3.5	Cinética de clivagem de DNA	50
3.3.6	Ensaio em atmosfera de argônio.....	51

3.4	Estudos de interação e clivagem de proteína por SDS-PAGE	52
3.5	Dicroísmo circular (DC).....	53
4	Resultados e discussão.....	54
4.1	Complexo mononuclear de Lantânio (III).	54
4.1.1	Interação e clivagem de DNA plasmidial.....	54
4.1.2	Comparação entre complexo mononuclear de La(III) imobilizado/ não imobilizado em sílica 3-aminopropil.....	61
4.2	Complexo mononuclear de Cobre (II).....	65
4.3	Clivagem e interação dos complexos monucleares de Cobre(II) com a proteína BSA.	81
5	Conclusões	95
6	Perspectivas	97
7	Referências bibliográficas.....	98

1 Introdução

1.1 DNA

Em 1953, James Watson e Francis Crick deduziram a estrutura tridimensional do DNA (Figura 1). Estes postularam que o modelo consiste de duas cadeias de polinucleotídeos helicoidais enovelados em torno do mesmo eixo para formar uma dupla hélice com orientação à direita.

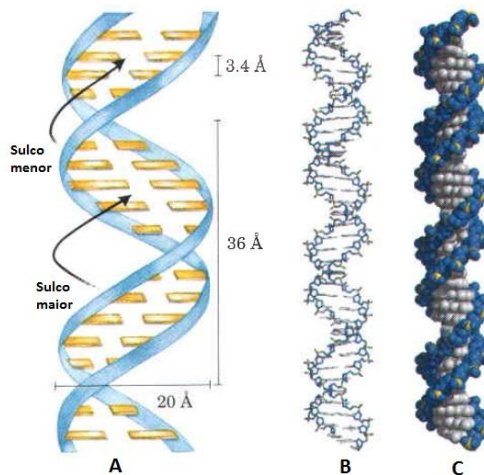


Figura 1. Modelo estrutural proposto por Watson e Crick.(A) Representação esquemática, mostrando as dimensões da hélice; (B) Representação em bastão mostrando o esqueleto e as bases empilhadas; (C) Modelo de volume atômico. Fonte: Nelson e Cox, 2011.

Os nucleotídeos apresentam três componentes característicos: uma base nitrogenada, uma pentose e um fosfato. As bases nitrogenadas pertencem a duas classes de compostos, pirimidinas e purinas (Figura 2A). Tanto o DNA quanto o RNA possuem duas bases púricas principais, a adenina (A) e a guanina (G) e duas pirimidinas. A citosina (C) é a pirimidina comum para RNA e DNA, e a segunda pirimidina, é a timina (T) para o DNA e a uracil (U) para o RNA (Figura 2B) (NELSON; COX, 2011)

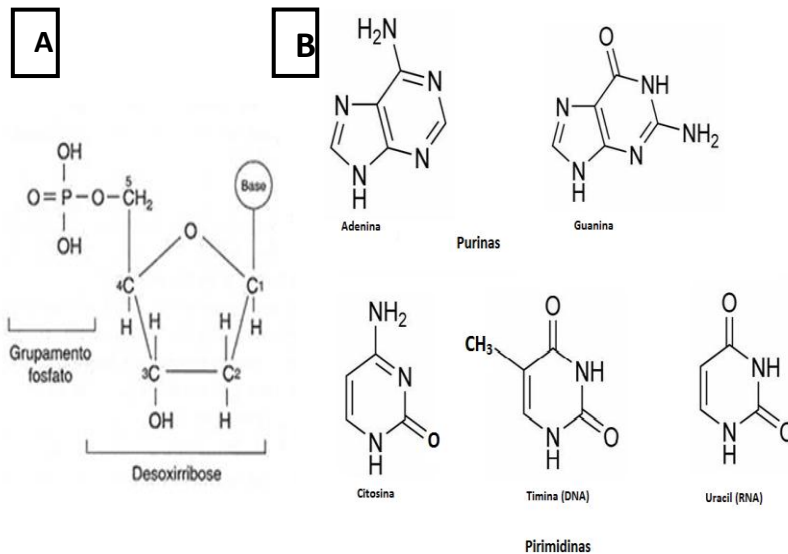


Figura 2. A) Estrutura geral de um nucleotídeo B) Principais bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos. Adaptado de Nelson e Cox, 2011.

Os nucleotídeos consecutivos são ligados covalentemente através de ligações fosfodiéster. Esta promove a ligação da extremidade 5'-fosfato de um nucleotídeo com a extremidade 3'-hidroxil do seguinte (Figura 3). Dessa forma, a espinha dorsal do DNA consiste em fosfatos ligados covalentemente com resíduos de pentose alternados, e as bases nitrogenadas podem ser consideradas cadeias laterais ligadas a essa espinha dorsal (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

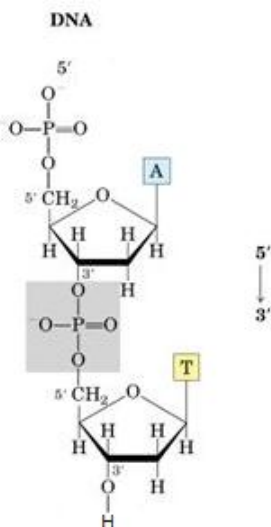


Figura 3. Ligação fosfodiéster no esqueleto covalente do DNA. A ligação fosfodiéster (sombreada) liga unidades nucleotídicas sucessivas. Adaptado de (LEHNINGER; COX, 2011).

Os grupos hidroxil dos resíduos de açúcar formam ligações de hidrogênio com a água e os grupos fosfato, são completamente ionizados e carregados negativamente em pH 7,0, o que inibe a hidrólise dessas ligações por ataque nucleofílico, garantindo assim, a estabilidade destas ligações em relação a hidrólise não enzimática (WOLFENDEN; RIDGWAY; YOUNG, 1998)

O DNA é uma molécula extremamente flexível, o que permite com que esta se apresente em muitas conformações possíveis, sendo que as mais comuns são: A-DNA, B-DNA e Z-DNA. A estrutura de Watson e Crick apresenta-se na forma B do DNA, sendo esta a conformação mais estável e mais abundante nas células vivas (Figura 4) (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

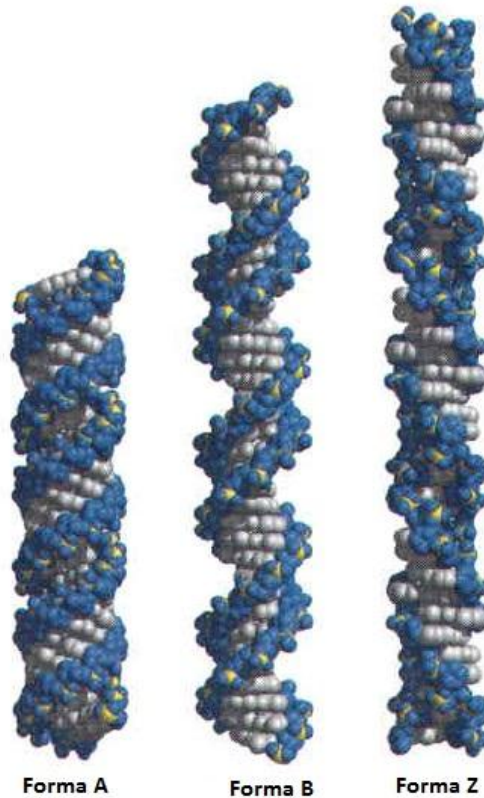


Figura 4. Comparação das formas A, B e Z do DNA. Fonte: Cox, 2011.

Apesar de a ocorrência da forma A do DNA no ambiente celular ainda ser duvidosa, existem algumas evidências que corroboram a hipótese de que a forma Z do DNA está presente em alguns trechos do material genético de bactérias e eucariotos. Estes trechos podem ter um papel na regulação da expressão de alguns genes ou na recombinação genética (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

1.2 Nucleases artificiais

A hidrólise não catalisada de ésteres de fosfato é favorecida termodinamicamente, mas em termos cinéticos é extremamente lenta, o

que particularmente favorece o papel estrutural destes na biologia (DESBOUIS et al., 2012). Isto é muito bem ilustrado pelo fato de as ligações de ésteres de fosfato de DNA possuírem um tempo de meia vida de aproximadamente 30000000 anos (pH 6,8, 25°C) (SCHROEDER et al., 2006).

Na natureza uma gama diversificada de enzimas é capaz de acelerar estas reações de hidrólise de ésteres de fosfato em até 10^{15} vezes em relação à hidrólise não catalisada (SERPERSU; SHORTLE; MILDVAN, 1987). Estas enzimas são classificadas de acordo com o tipo de fosfato que clivam. As fosfodiesterases promovem a clivagem de ligações fosfodiéster, fosfotriesterases a clivagem de ligações fosfotriéster e as fosfatases a desfosforilação de mono-ésteres de fosfato para a produção de fosfato inorgânico e álcoois. Geralmente, o termo fosfodiesterase é utilizado para descrever enzimas que tem a capacidade de clivar nucleotídeos cíclicos (AMPc e GMPc), mas existem diversas outras famílias desta enzima, tais como: fosfolipases, esfingomiolina fosfodiesterase, autotaxina e as nucleases, que tem a capacidade de promover a clivagem das ligações fosfodiéster do DNA e RNA (DESBOUIS et al., 2012). O sítio ativo da maioria das nucleases possui cátions bivalentes, como Mg^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} ou Zn^{2+} , os quais são essenciais para sua atividade catalítica (NISHINO; MORIKAWA, 2002).

Após a descoberta que muitas fosfatases e nucleases possuem em seu sítio ativo íons metálicos, essenciais para a atividade das mesmas, muitos pesquisadores focaram seus estudos em mimetizar a atividade destas enzimas através de complexos metálicos que possuam a capacidade de clivar ácidos nucléicos (VASCONCELOS; AZENHA; ALMEIDA, 1998; BÜNZLI; PIGUET, 2002; AN et al., 2006; MUXEL et al., 2014).

Essa escolha não é casual, estas enzimas são provavelmente as mais evoluídas na natureza em termos de aceleração da reação não catalisada (WOLFENDEN, 2006) e seu mecanismo de ação proposto frente à catálise enzimática é muito bem compreendido; portanto, de possível reprodução por síntese orgânica/bioinorgânica (MANCIN; SCRIMIN; TECILLA, 2012).

A clivagem do DNA por estas enzimas pode ocorrer por ao menos duas vias distintas: oxidativa ou hidrolítica (Figura 5). No mecanismo oxidativo ocorre a produção de radicais livres a partir de uma reação de oxi-redução entre o núcleo metálico e um co-reagente como oxigênio ou o nitrogênio. As espécies reativas produzidas podem se difundir e atacar preferencialmente as bases nitrogenadas e a desoxirribose do DNA (SIGMAN; MAZUMDER; PERRIN, 1993; ARMITAGE, 1998; POGOZELSKI; TULLIUS, 1998). A quebra da fita

do DNA ocorre pela abstração de um átomo de hidrogênio da desoxirribose, a qual produz um radical centrado no carbono do açúcar que pode sofrer rearranjo (POGOZELSKI; TULLIUS, 1998). O mecanismo de hidrólise geralmente envolve o ataque nucleofílico do oxigênio de uma molécula de água ao fosfato ligado à pentose do ácido nucléico, gerando um fosfato intermediário pentacoordenado. Em seguida ocorre uma ruptura da ligação fosfodiéster em P-O5' ou P-O3' dependendo do mecanismo de cada nuclease, gerando duas extremidades terminais religáveis pela enzima T4 DNA ligase (MANCIN et al., 2005).

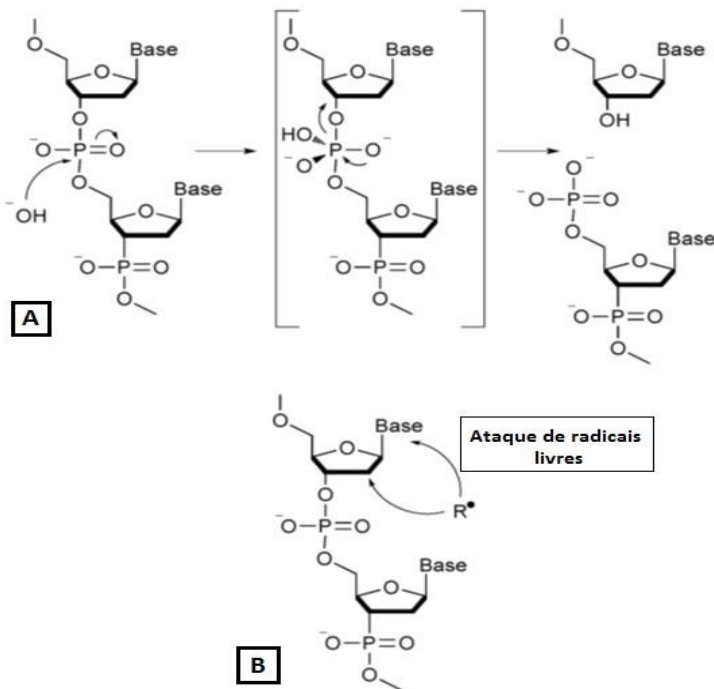


Figura 4. A) Representação do mecanismo de hidrólise de uma ligação fosfodiéster via ataque nucleofílico de um grupo hidróxido. B) Representação do mecanismo oxidativo, com o ataque de espécies de radicais livres à base nitrogenada e à pentose do nucleotídeo. Adaptado de: MANCIN; SCRIMIN; TECILLA, 2012.

O DNA é mais resistente à clivagem por hidrólise, mas relativamente fácil de clivar por meio da via oxidativa. Portanto, uma cuidadosa análise mecanística deve ser realizada quando forem utilizados complexos metálicos, com química redox, para o papel de nucleases. Por exemplo, complexos com metais de transição, como Fe, Cu, Ni, Pt, Ru, Rh, V, Cr, Co, Mn, e Pd, já foram reportados na clivagem de DNA pela via oxidativa na presença ou não de agentes redutores ou oxidantes (POGOZELSKI; TULLIUS, 1998; BURROWS; MULLER, 1998; COSTAS et al., 2004; MIRICA; OTTENWAELDER; STACK, 2004). Os mais conhecidos e bem caracterizados complexos que agem pela via oxidativa são: $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ (EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético) (POGOZELSKI; MCNEESE; TULLIUS, 1995), $[\text{Cu}(\text{OP})_2]^+$ (OP = 1,10-fenantrolina) (SIGMAN, 1986), Fe-BLM (BLM = bleomicina) (CLAUSSEN; LONG, 1999) e metaloporfirinas. Este processo é normalmente tão eficiente que compete com a clivagem hidrolítica.

A reação de oxidação geralmente necessita de cofatores para que ocorra, como a formação de espécies de radicais livres, oxigênio molecular ou agentes de redução/oxidação. Quando há ausência de co-reagentes externos adicionados, insensibilidade a sequestradores de espécies de radicais livres e preservação da atividade mesmo em condições anaeróbicas, pode-se considerar evidências suficientes para sugerir um mecanismo hidrolítico (MANCIN; SCRIMIN; TECILLA, 2012).

1.3 Aminoácidos, peptídeos e proteínas.

Proteínas mediam praticamente qualquer processo que ocorra em uma célula, exibindo uma diversidade de funções muito grande. Estas são compostas por subunidades monoméricas relativamente simples. Todas as proteínas, sejam das mais antigas linhagens de bactérias até das mais complexas formas de vida, são compostas a partir do mesmo conjunto de aminoácidos, covalentemente ligados em sequências planares lineares (NELSON E COX, 2011).

Todos os 20 aminoácidos comuns são α -aminoácidos, ou seja, possuem um grupo carboxil e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono. Para todos os 20 aminoácidos comuns, exceto a glicina, o carbono α está ligado a quatro grupos funcionais diferentes: um grupo carboxil, um grupo amino, um grupo R e um átomo de hidrogênio

(Figura 6); na glicina, o grupo R é outro átomo de hidrogênio (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

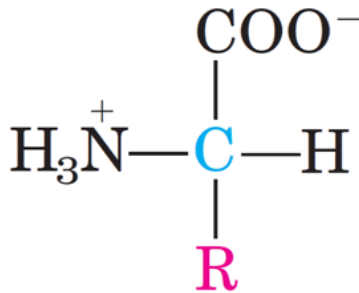


Figura 5. Estrutura geral de um aminoácido. O grupo R, ou cadeia lateral (em vermelho) ligado ao carbono α (em azul) é diferente em cada aminoácido. Fonte: NELSON e COX, 2011.

Quando duas moléculas de aminoácidos ligam-se covalentemente através de uma ligação amídica, esta denomina-se ligação peptídica. Essa ligação é formada pela remoção dos elementos da água (desidratação) de um grupo α -carboxil de um aminoácido e o grupo α -amino de outro (Figura 7). Alguns poucos aminoácidos unidos são chamados de oligopeptídeo, mas quando muitos aminoácidos são unidos, o produto é chamado de polipeptídeo. Embora os termos proteínas e polipeptídeos sejam utilizados muitas vezes intercambiavelmente, moléculas consideradas polipeptídeos possuem massas moleculares abaixo de 10.000 kDa, enquanto as proteínas possuem massas moleculares muito maiores (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

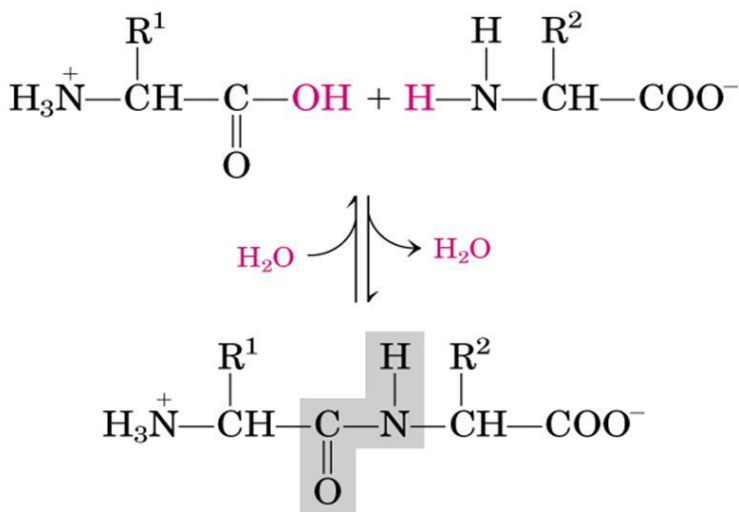


Figura 6. Formação de uma ligação peptídica por condensação. O grupo α -amino de um aminoácido atua como nucleófilo para deslocar o grupo hidroxil de outro aminoácido, formando uma ligação peptídica (sombreada em cinza). Fonte: NELSON e COX, 2011.

Os aminoácidos que compõe uma proteína e como eles estão dispostos uns em relação aos outros resultam na organização espacial de uma proteína. A sequência de aminoácidos irá determinar o tipo de interação possível entre as cadeias laterais. Assim, as proteínas podem assumir quatro tipos de estruturas, as quais são descritas em níveis estruturais crescentes (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

A estrutura primária é o nível estrutural mais simples e mais importante, pois dele deriva todo o arranjo espacial da molécula. Esta é definida pela sequência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. A estrutura primária da proteína resulta em uma longa cadeia de aminoácidos, com uma extremidade "amino terminal" e uma extremidade "carbóxi terminal".

A estrutura secundária descreve o arranjo espacial de seus átomos na cadeia principal. Os dois tipos mais comuns e abundantes em todas as proteínas são: as α -hélices, o esqueleto peptídico é enrolado em

torno de um eixo imaginário; e as conformações- β , onde ocorre a interação lateral de segmentos de uma cadeia polipeptídica ou de cadeias diferentes. Ambas conformações são estabilizadas através de ligações de hidrogênio (NELSON e COX, 2011).

O arranjo tridimensional total de todos os átomos de uma proteína é considerado sua estrutura terciária. Existem duas classes gerais de proteínas, com base na estrutura terciária: fibrosa e globular. As proteínas fibrosas são formadas pela repetição de um dos elementos da estrutura secundária, já as proteínas globulares geralmente contêm diversos tipos de estruturas secundárias na mesma cadeia polipeptídica (NELSON e COX, 2011).

Por fim, a estrutura quaternária descreve a associação de duas ou mais cadeias polipeptídicas (subunidades), para compor uma proteína funcional oligomérica. A estrutura quaternária é mantida por ligações não covalentes entre as subunidades, dos mesmos tipos que mantém a estrutura terciária (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011).

1.4 Proteases artificiais

Vários processos biológicos envolvem a clivagem hidrolítica de proteínas e peptídeos. As ligações peptídicas que fazem a ligação dos aminoácidos nas proteínas tem uma meia-vida de pelo menos 7 anos, a pH neutro e 25°C. Esta resistência à hidrólise é causada pela ressonância existente na ligação peptídica, o que torna o carbono carbonílico um pobre eletrófilo (HEGG; BURSTYN, 1998).

Ironicamente, a mesma propriedade que faz com que a ligação peptídica seja tão eficiente em sua função, sua estabilidade cinética também pode ser um problema, já que a clivagem de proteínas é de grande interesse para as funções vitais da célula (HEGG; BURSTYN, 1998). As enzimas que são capazes de hidrolisar estas ligações peptídicas são conhecidas como proteases. Algumas proteases, assim como as nucleases, utilizam íons metálicos como co-fatores essenciais e que estão diretamente ligados com a hidrólise desta ligação (KRÄMER, 1999).

Dessa maneira, há muito interesse na busca de novos complexos metálicos que tenham a capacidade de mimetizar a função destas proteases naturais. Com esse intuito, diversos autores já demonstraram a eficiência de diversas metaloproteases em clivar ligações peptídicas tanto pela via hidrolítica quanto pela via oxidativa

(JANG; SUH, 2008; YOO et al., 2005; LOGANATHAN et al., 2014; LU et al., 2014; GAO et al., 2012).

Um dos primeiros estudos realizados na busca por novos complexos metálicos para a clivagem interna seletiva de peptídeos e proteínas por coordenação de complexos como metalopeptidases artificiais foi realizado por um complexo de Paládio(III). Este complexo foi testado em diversos peptídeos e foi possível avaliar sua capacidade de se ligar a um íon de enxofre da metionina e assim clivar, com alguma seletividade, a ligação amida existente ali (ZHU; KOSTIC, 1993).

Mais tarde, os mesmos autores realizaram experimentos de clivagem de 3 albuminas diferentes (bovina, suína e de ovo de galinha) por outros quatro complexos de paládio, demonstrando que três complexos (*trans*-[Pd(py)₂(H₂O)₂]²⁺, *cis*-[Pd(en)(H₂O)₂]²⁺ e *cis*-[Pd(dach)(H₂O)₂]²⁺) são ativos e regioseletivos (ZHU; KOSTIĆ, 2002).

Em um trabalho mais recente, um complexo mononuclear de Ferro (III), Fe(tppz)Cl₃·2CHCl₃, onde tppz é (2,3,5,6-tetra(2-piridil)pirazina), demonstrou atividade sobre a proteína albumina bovina (BSA). Esta apresentou clivagem significativa na presença do complexo sob 40°C (BEHNAMFAR et al., 2015).

O complexo sintético Cu([9]aneN₃)Cl₂⁺, usualmente conhecido como “*bpmaff*”, possui um papel tanto de peptidase quanto de nuclease sintética. Este apresentou atividade catalítica quando testado em peptídeos e na proteína BSA, sendo o primeiro complexo metálico reportado na literatura capaz de hidrolisar tanto ligações peptídicas quanto ligações fosfodiéster (HEGG; BURSTYN, 1998).

A partir desta descoberta, diversos outros autores postularam novos complexos que tinham a capacidade de clivar tanto ligações fosfodiéster quanto ligações peptídicas (OLIVEIRA et al., 2009; ROY et al., 2009; GOSWAMI et al., 2009), estes servem como exemplo de promiscuidade catalítica de um complexo metálico.

Dessa forma, fica evidente a importância de desenvolvimento de novos complexos metálicos que tem a capacidade de clivar biomoléculas (DNA e proteínas), já que a aplicabilidade destes como ferramentas moleculares para a biologia molecular e biotecnologia é cada vez maior.

1.4.1 Complexos de cobre

Atualmente, o cobre é um dos metais mais utilizados no desenvolvimento de complexos que atuam como nucleases químicas,

isto porque este tem elevada acidez de Lewis, o que permite a polarização das ligações P-O em ésteres de fosfato, possibilitando a ativação do centro de fósforo em direção ao ataque nucleofílico. Além disso, os valores de pKa de moléculas ligadas a Cobre (II) geralmente se situam em torno de pH 7,0 a 9,0, permitindo assim que complexos deste íon metálico promovam a quebra sob ou próximo de condições fisiológicas (DESBOUIS et al., 2012).

Um dos primeiros complexos de Cobre (II) foi sintetizado a partir do ligante bpy (2'2'-bipiridina) (Figura 8A) em que este catalisou a hidrólise de DNA e do substrato dinitrofenilfosfato (BNPP) em solução aquosa, a 75°C em uma faixa de pH entre 5,8 e 8,3. Em pH 6,5, incrementos de velocidade de 150 e 2000 vezes foram encontrados para ENPP e BNPP, respectivamente, na presença de 1mM de complexo (MORROW; TROGLER, 1988).

O estudo com o complexo [Cu([9]aneN3)Cl₂], onde [9]aneN3 = 1,4,7-triazaciclono-nano (Figura 8B), demonstrou que este complexo (25µM) é capaz de clivar DNA plasmidial, a 50°C e pH 7,8, com uma constante de velocidade estimada de $1,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Ainda, experimentos em condições anaeróbias 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 (HEGG; BURSTYN, 1995).

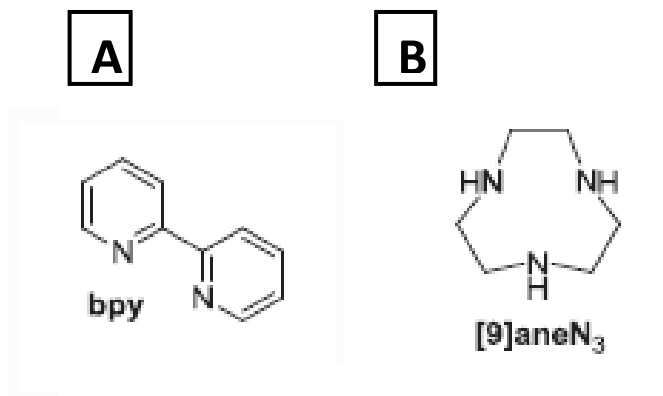


Figura 7. Estrutura dos ligantes: A) bpy (2'2'-bipiridina) e B) [9]aneN₃ (1,4,7-triazaciclono-nano). Fonte: DESBOUIS et al., 2012.

Outro complexo de Cobre (II), *cis*-dihalo, foi sintetizado e caracterizado por nosso grupo a partir do ligante HISMIMI, onde HISMIMI = [(2-(imidazol-4-il)etil)(1-metilimidazol-2-il)metil]imina). Este promoveu a clivagem hidrolítica de DNA de fita dupla em condições anaeróbicas e aeróbicas, com uma constante de velocidade de $0,28 \text{ h}^{-1}$, o que representa um aumento de cerca de 10^7 vezes em relação a taxa estimada de hidrólise da reação não catalisada (SCARPELLINI et al., 2003).

Uma abordagem interessante para complexos de Cobre(II), é a descrita para o complexo $[\text{Cu}(\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2)(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ (Figura 9), onde este além de apresentar atividade catalítica frente ao DNA, melhoria de 10^7 vezes na velocidade da reação catalisada para a não catalisada e uma meia-vida de 50 min, também demonstrou ser um excelente agente de clivagem para ligações peptídicas, sugerindo assim, a promiscuidade catalítica deste complexo (OLIVEIRA et al., 2009).

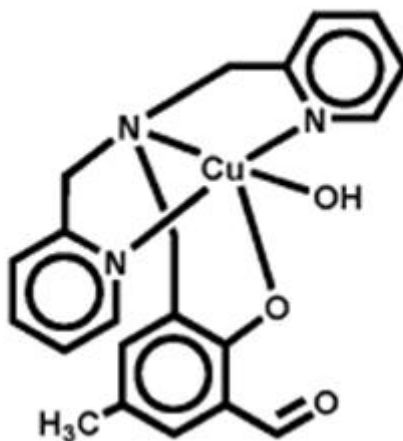


Figura 8. Estrutura do complexo $[\text{Cu}(\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2)(\text{OH}_2)_2]^{2+}$. Fonte: OLIVEIRA et al., 2009.

É possível perceber, dessa forma, a grande variedade de características e aplicações que complexos de cobre possuem. Podendo variar desde seu mecanismo de ação frente ao substrato e até mesmo o substrato sobre o qual atuam.

1.4.2 Complexos de Lantânio(III)

O potencial dos íons lantanídeos em promover a catálise hidrolítica do DNA é notável. Essa eficiência é resultado de diversos fatores, como: forte acidez de Lewis, altas densidades de carga, números de coordenação elevados, ausência de química redox e fortes labilidades; o que torna os íons lantanídeos excelentes centros metálicos para o uso na síntese de enzimas artificiais (FRANKLIN, 2001).

Apesar de todas as características que tornam estes íons promissores para o uso como nucleases sintéticas, algumas propriedades destes são inconvenientes para tal, tais como: possuem a tendência de precipitar em solução, na forma de hidróxidos, em torno de pH 9,0 e são tóxicos a sistemas biológicos. Portanto, a complexação destes íons é de extrema importância para modelar e direcionar sua reatividade (FRANKLIN, 2001).

Os complexos de lantanídeos que obtiveram sucesso como nucleases artificiais geralmente possuem como ligantes 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⁺) (Figura 10) (FRANKLIN, 2001).

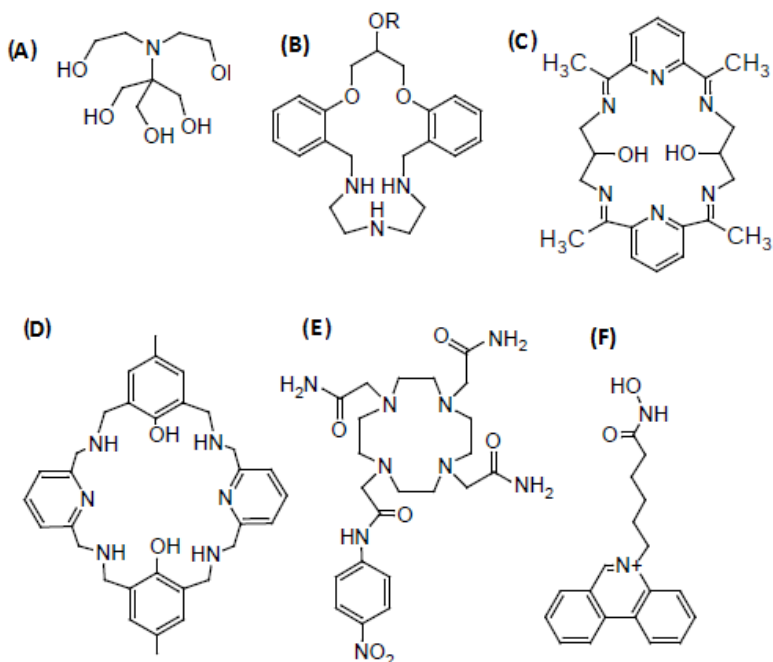


Figura 9. Exemplos de ligantes utilizados em complexos de lantanídeos com atividade na clivagem de DNA: (A) Bis-Tris; (B) esqueleto de azacoroa; (C) base de Schiff macrocíclica; (D) composto de azacoroa; (E) ligante DOTA-amida; (F) ligante intercalativo unido ao ácido hidroxâmico. Adaptado de FRANKLIN, 2001.

Os primeiros exemplos da eficiência catalítica de complexos de lantanídeos foram verificados na catalise hidrolítica de RNA, estes desenvolveram complexos a partir de ligantes macrocíclicos formados por bases de Schiff (MORROW et al., 1992; MORROW; AURES; EPSTEIN, 1995). Mais tarde, utilizando o mesmo princípio, dois complexos binucleares de íons lantanídeos, Ho_2L_1 e Er_2L_1 , onde L_1 representa o ligante mostrado na Figura 11 mostraram-se eficientes na clivagem hidrolítica do DNA plasmidial, convertendo a forma

superenovelada na forma linear do DNA, em pH 7,0 a 37°C (ZHU et al., 1998; ZHU et al., 1999).

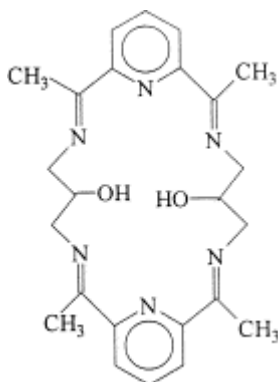


Figura 10. Estrutura do ligante L₁. Fonte: FRANKLIN, 2001.

Mais recentemente, foi reportada a atividade catalítica de complexos binucleares de lantanídeos: Térbio (III) e Európio (III), com o ligante polidentado H₂L. Estes apresentaram constante catalítica de $5,2 \times 10^{-6}$, para Térbio (III) e de $3,7 \times 10^{-5}$ para Európio (III), ou seja, uma aceleração de aproximadamente 2,5 e 2,0, respectivamente, vezes em comparação com a hidrólise do DNA não catalisada (CAMARGO, MARYENE A. et al., 2010). Um complexo trinuclear de Gadolínio (III) com o ligante polidentado H₃L, apresentou uma aceleração de 5 milhões de vezes na hidrólise do substrato 2,4 –BDNPP em relação a reação não catalisada. Quando este foi analisado frente à clivagem de DNA plasmidial a constante de velocidade de clivagem foi de $22,48 \text{ h}^{-1}$, o que representa uma aceleração de $6,24 \times 10^8$ vezes quando comparada com a velocidade da reação não catalisada (CAMARGO, M. A. et al., 2010).

Portanto, o desenvolvimento de eficientes complexos modelos para nucleases, derivados de íons lantanídeos, é de extrema importância. Entretanto, ainda há muito que aprimorar nesta área. Uma das técnicas que está sendo muito utilizada para a melhoria da atividade e seletividade destes complexos é a heterogeneização de catalisadores homogêneos. A imobilização destes complexos em suportes sólidos (sílica gel, argila, entre outros) ou biopolímeros (quitosana ou

ciclodextrina) apresenta inúmeras vantagens, como a: possibilidade de recuperação e reutilização por diversas vezes, maior atividade catalítica e seletividade. Uma vez que a matriz impõe uma barreira ao complexo, este pode promover um ambiente favorável para a aproximação do substrato com o complexo e também pode prevenir a destruição do catalisador durante a reação (BEDIOUI, 1995; BEDIOUI; DEVYNCK; BIED-CHARRETON, 1995).

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Analisar a interação e clivagem de DNA e BSA promovida pelos complexos mononucleares de lantânio (III) imobilizados ou não em sílica e pelos complexos de cobre (II).

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a capacidade dos complexos de lantânio (III) e cobre (II) com purina em clivar DNA.
- Avaliar a atividade dos complexos de cobre (II) bipyridina e fenantrolina frente à clivagem da proteína BSA.
- Determinar o efeito do pH da reação frente a clivagem de DNA e BSA quando expostos aos complexos metálicos.
- Verificar a capacidade de clivagem do complexo de lantânio (III) não imobilizado em sílica em relação ao mesmo imobilizado.
- Analisar o efeito da força iônica na clivagem de DNA e BSA através da adição de NaCl.
- Determinar o mecanismo de ação dos complexos pela adição às reações de sequestradores de radicais livres.
- Analisar o modo de clivagem de DNA pelos complexos de lantânio (III) e de cobre(II) com purina, na presença de inibidores específicos do sulco menor e maior.
- Calcular os parâmetros cinéticos para a reação de clivagem entre os complexos e o DNA plasmidial/BSA.
- Determinar o efeito do oxigênio molecular (O_2) na clivagem de DNA pelos complexos de cobre (II).

- Analisar a interação dos complexos de cobre (II) com DNA e BSA por meio de dicroísmo circular (DC).

3 Materiais e métodos

3.1 Complexos em estudo

3.1.1 Complexo mononuclear de Lantânio (III).

Neste trabalho foi utilizado o complexo de lantânio (III) $[La(L_1)(NO_3)_2] \cdot 0,25H_2O$ (**1**) sintetizado com o ligante 2-[N-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[N-(2-hidroxi-3-formil-5-metilbenzil)(2-piridilmetil)aminometil]fenol (H_2L_1) (Figura 12A). Para avaliar o efeito da heterogenização, este mesmo complexo foi imobilizado em 3-aminopropil sílica (Si3AP-1) (**APS-1**) (Figura 12B) e suas atividades foram testadas e comparadas frente a hidrólise de DNA. O complexo e sua forma imobilizada foram sintetizados pelo então aluno de doutorado Alfredo Muxel, orientado pelo Prof. Dr. Ademir Neves, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

O novo complexo foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, espectroscopia eletrônica, titulação potenciométrica, ESI-MS, TGA e DSC e difração de raios X em monocristal (MUXEL et al., 2014

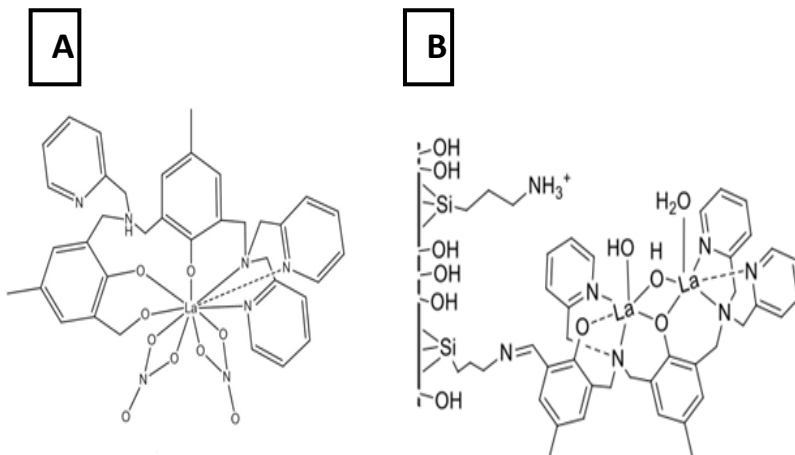


Figura 11. Esquema estrutural do complexo $[La(L_1)(NO_3)_2] \cdot 0,25H_2O$ (A) e este mesmo imobilizado em sílica 3-aminopropil (B) (MUXEL et al., 2014).

3.1.2 Complexos de cobre (II)

Duas classes de complexos de Cobre (II) foram analisadas: uma classe para os ensaios de interação/clivagem com DNA plasmidial e a outra para os ensaios de interação/clivagem em proteínas.

Para os testes com DNA plasmidial foi utilizado o complexo de cobre(II) [Cu(Lpurina)Cl] (**CuLPu**), que foi sintetizado pelo aluno de Pós-doutorado Tiago Pacheco de Camargo sob a supervisão do Prof. Dr. Ademir Neves, no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

O complexo **CuLPu** foi sintetizado a partir de uma modificação do complexo original, o *bpmamff* (OLIVEIRA et al., 2005) (Pag. 27) com a adição de uma purina: *N*-purinil-etilenodiamina (PANG et al., 2008), esta adição visava à melhoria do complexo original na função de nuclease. Este foi preparado adicionando lentamente uma solução metanólica contendo o CuCl_2 sobre uma solução metanólica contendo o ligante HLPurina. O complexo foi estudado via espectrometria de massa (Ion Trap ESI-MS), a fim de se obter informações sobre o composto em solução. As medidas foram feitas em acetonitrila (grau MS) com uma concentração de 500 nM. O pico majoritário foi encontrado em $m/z = 286.05$ (2+) referente à espécie contendo o ligante com o fenol protonado e o íon Cu^{2+} , conforme observado na Figura 13.

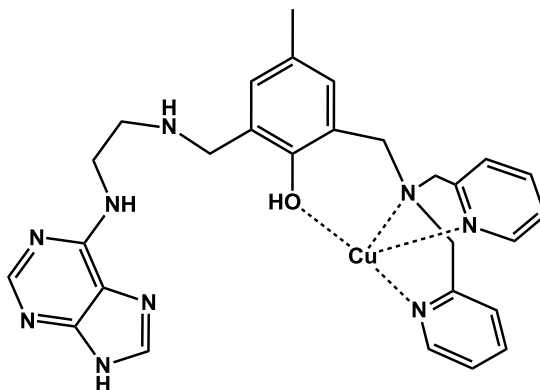


Figura 12. Esquema estrutural do complexo [Cu(Lpurina)Cl]. Figura fornecida pelo Pós-doutorando Tiago Pacheco.

Para os estudos de clivagem e interação com proteínas foram utilizados complexos de Cu(II) sintetizados pela aluna de doutorado em Química, Priscila Pereira da Silva, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Elene Cristina Pereira Maia, do Instituto de Ciências Exatas (ICEx), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os complexos são: [Cu(Shyd)(bpy)] e [Cu(Shyd)(phen)], em que: bpy e phen são os ligantes heterocíclicos 2,2'-bipiridina e 1,10-fenantrolina e Shyd é a hidrazida do ácido 2-tiofenocarboxílico.

Para prever as estruturas dos complexos, os responsáveis pela síntese utilizaram a técnica de Espectrometria de Massas e Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) (Figura 14) (SILVA et al., 2014).

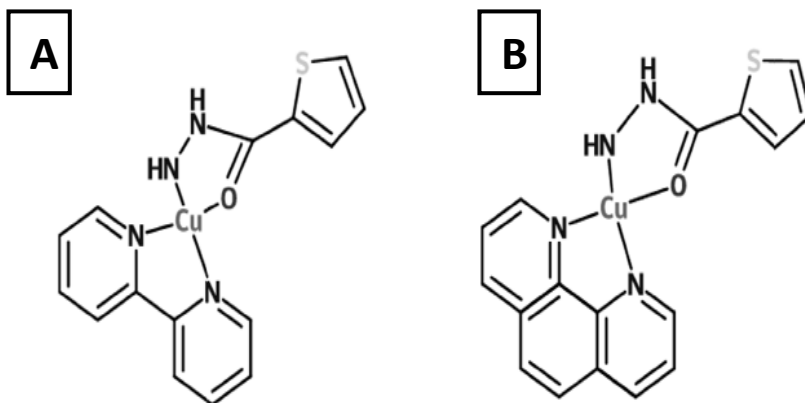


Figura 14. Esquema estrutural dos complexos [Cu(Shyd)(bpy)](A) e [Cu(Shyd)(phen)](B). Fonte: SILVA et al., 2014.

3.2 Amplificação, purificação e quantificação do DNA plasmidial

Para os ensaios de clivagem de DNA foi utilizado o plasmídeo pBSK-II (Stratagene, USA) com 2961 pares de base (pb). Devido à necessidade de grandes quantidades de DNA, o plasmídeo pBSK II foi transformado em células competentes de *Escherichia coli* DH5 utilizando-se o protocolo preconizado por Ausubel e colaboradores (1995) e descrito por Oliveira (2006). O DNA foi amplificado e isolado/purificado segundo o protocolo do kit de extração e purificação de DNA plasmidial HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen) que se baseia na extração do ácido nucléico por fase sólida em colunas de sílica. A

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

O DNA plasmidial encontra-se altamente compactado no interior das células de forma que o eixo da dupla hélice do DNA encontra-se enrolado ao redor de si mesmo originando uma super-hélice, a chamada forma superenovelada (FI). Nesta forma o DNA está tensionado e um corte em uma das fitas faz com que ele perca parte da tensão e desenrole a super-hélice adquirindo assim uma forma circular aberta (FII). Quando ocorre um segundo corte, agora na fita oposta, a forma circular se abre dando origem à forma linear do DNA plasmidial (FIII). Estas três diferentes formas do DNA plasmidial apresentam mobilidades distintas quando são submetidos à corrida em gel de agarose (Figura 15). Esta distinção de mobilidade ($F I > F III > F II$) torna possível a completa separação e posterior quantificação das formas do DNA plasmidial (OLIVEIRA, 2006).

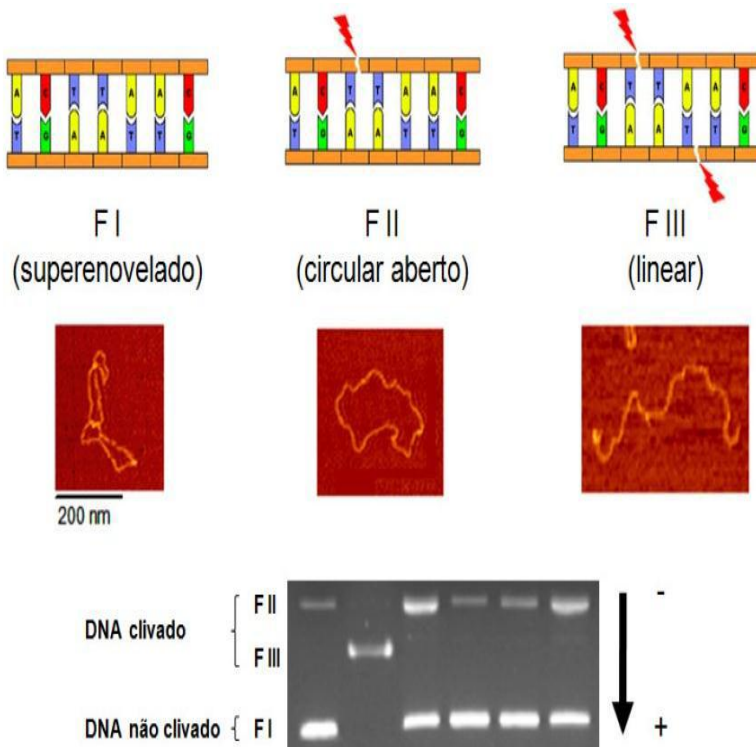


Figura 13. Ilustração das três formas do DNA plasmidial e sua separação em gel de agarose. Fonte: BORTOLOTTI, 2011.

3.3 Estudos de Clivagem dos complexos metálicos em DNA plasmidial

Foram realizados estudos de clivagem de DNA plasmidial frente aos complexos citados acima. As reações consistiram em tratar 330ng (~30 μM em pb) do plasmídeo pBSK II (supernovelado) com concentrações crescentes dos complexos tamponados em soluções específicas por 16 horas em temperatura controlada e ao abrigo da luz. As reações com o complexo mononuclear de lantânio (**1**) (5 a 50 μM) ocorreram em meio tamponado com 10 mM de HEPES pH 7,0 a 50 $^{\circ}\text{C}$

nas condições citadas acima. As reações com o complexo (**CuLPu**) (5 a 100 μM) foram tamponadas com 10 mM de CHES (pH 9,0) a 37 °C.

Para finalizar as reações de clivagem, foram adicionados às misturas reacionais 5 μL de tampão de corrida 6X concentrado (EDTA 0,25 M, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01% - pH 8,0), já que o EDTA presente no tampão quela os complexos em solução impedindo sua reação com o DNA. As amostras foram aplicadas em gel de agarose (1 %) contendo 0,3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de brometo de etídio e submetidas à eletroforese em tampão TBE 0,5X (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1mM - pH 8,0) por 1h40min com voltagem fixada em 90 V (Figura 16). Após a corrida os géis foram fotografados pelo sistema de fotodocumentação DigiDoc-It (UVP, USA) e as frações de cada forma de DNA plasmidial quantificadas por densitometria, utilizando o software KODAK Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health, USA). O brometo de etídio possui uma maior dificuldade para intercalar-se com a forma superenovelada do DNA plasmidial. Deste modo, há uma menor emissão de fluorescência dessa forma, precisando assim se corrigir a real quantidade de DNA superenovelado presente na amostra. Para este fim, deve-se multiplicar o valor encontrado por 1,42 e corrigir por proporcionalidade os valores obtidos para as demais formas.

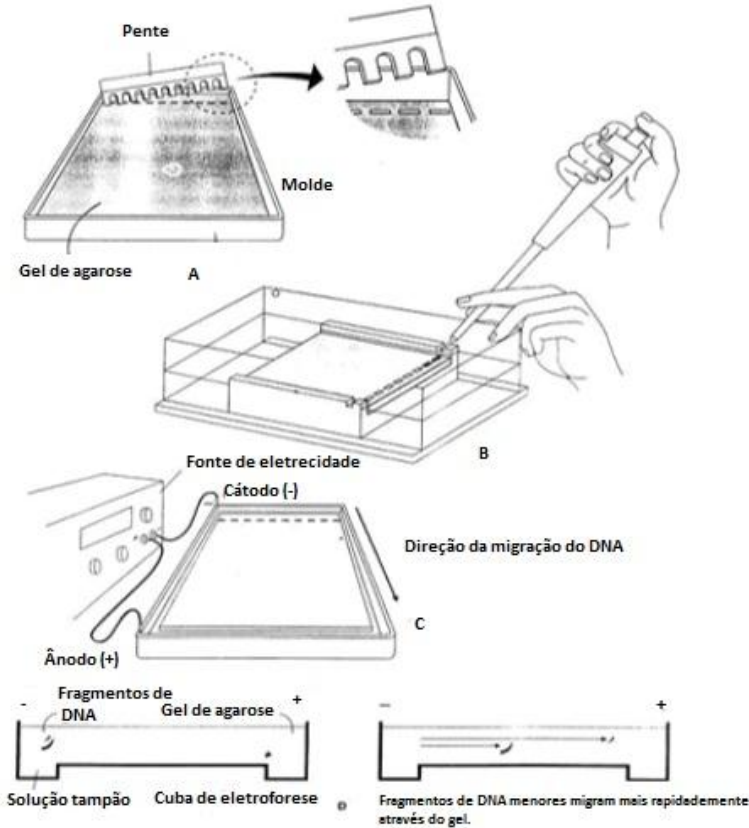


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose. A matriz é solidificada deixando-se formar poços (A) nos quais as amostras de DNA serão depositadas (B) e submetidas a um campo elétrico (C). Os fragmentos apresentam uma migração diferencial de acordo com o tamanho ou forma (D). Fonte: FARAH, 2007.

3.3.1 Efeito do pH na clivagem de DNA plasmidial

Para estudar a influência do pH nas reações de clivagem do plasmídeo pBSK II pelos complexos foi adicionado ao meio reacional tampões com diferentes pHs: MES 10 mM (pHs 5,5 e 6,0) , HEPES 10 mM (pHs 7,0 e 8,0) e CHES 10 mM (pH 9,0).

3.3.2 Influência da força iônica

O efeito da força iônica na clivagem de DNA foi verificado pela adição de concentrações crescentes de cloreto de sódio (NaCl) ao DNA antes do tratamento com os complexos. Estes ensaios foram realizados para o complexo de Lantânio(III) (**1**) seguindo as condições reacionais padrão (50 μ M, 16h, 50°C, HEPES 10mM e pH 7,0) na presença de 50, 100, 250, 500 e 1000 mM de NaCl e para o complexo de Cobre (II) (**CuLPu**) nas condições padrão de 100 μ M, 16h, 37°C, CHES 10 mM e pH 9,0) nas concentrações de 100, 200, 625, 1250 mM de NaCl.

Todas as concentrações de NaCl foram testadas na ausência dos complexos e não foi observada clivagem de DNA superior ao controle (contendo somente DNA).

3.3.3 Efeito dos inibidores de ERO

Para elucidar se o mecanismo de clivagem de DNA pelos complexos ocorre por via hidrolítica ou oxidativa, foram adicionados às reações já descritas anteriormente inibidores de radicais livres: 2 M de DMSO (dimetil-sulfóxido), sequestrador do radical hidroxila (OH^\bullet); 0,5 mM de KI (iodeto de potássio), inibidor da geração de peróxidos (R-O-OH); 20 U de enzima SOD (superóxido-dismutase), sequestrador do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet -}$); 0,5 mM de NaN_3 (azida de sódio), sequestrador de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Todos os inibidores foram testados na ausência dos complexos e ao abrigo de luz.

3.3.4 Efeito dos bloqueadores de sulco

Pequenas moléculas podem interagir com o DNA através da afinidade por um ou ambos os sulcos (maior e menor) formados pela torção da dupla hélice. Para determinar se os complexos teriam afinidade pelo sulco maior ou menor do DNA, o plasmídeo foi previamente tratado com bloqueadores de sulco e depois adicionado às reações de clivagem. Os bloqueadores utilizados foram a distamicina e a netropsina por possuir afinidade ao sulco menor (VAN DYKE; HERTZBERG; DERVAN, 1982) e o verde de metila, por interagir com o sulco maior (KIM; NORDEN, 1993).

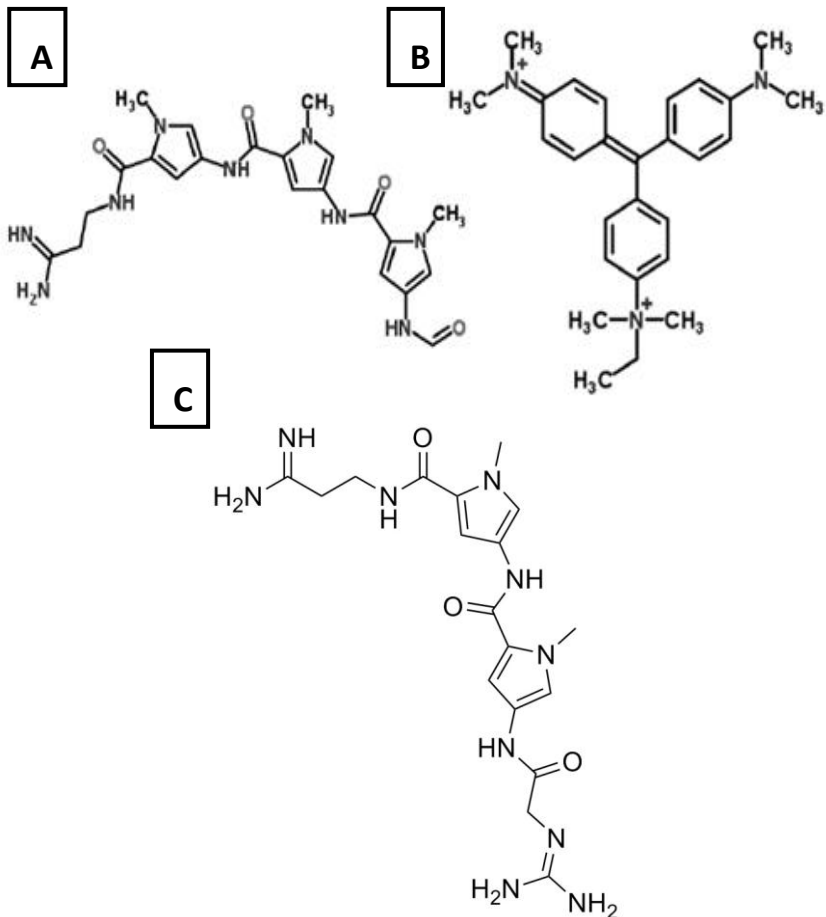


Figura 15. Distamicina (A) e Netropsina (C) bloqueadores do sulco menor do DNA (A) e Verde de Metila, bloqueador do sulco maior (B).

3.3.5 Cinética de clivagem de DNA

As reações de clivagem de DNA foram realizadas conforme descrito anteriormente: 330 ng de DNA em 10 mM de CHES (pH 9,0) foram tratados com diferentes concentrações do complexo (**CuLPu**) (50, 75, 100, 200, 300, 500 μ M) por até 4 h a 37 °C e ao abrigo de luz.

Após o início da reação, uma alíquota de amostra foi retirada a cada intervalo de tempo e submetida à eletroforese. Controles nas mesmas condições reacionais, mas na ausência dos complexos, foram realizados para observar a degradação espontânea do DNA.

As constantes cinéticas de clivagem (k_{obs}) foram calculadas para cada concentração do complexo, tomando estas reações como de pseudo primeira-ordem. O valor de k_{obs} foi obtido diretamente a partir do coeficiente angular das regressões lineares originadas do plote do logaritmo natural da quantidade da forma intacta de DNA em função do tempo de reação. Os valores de k_{obs} de cada concentração foram corrigidos subtraindo-se destes o valor do k_{obs} obtido do controle, que foi considerado equivalente à degradação espontânea do plasmídeo pBSK II. O gráfico dos valores de k_{obs} em função da concentração dos complexos apresenta um comportamento semelhante a uma cinética de saturação, há excesso de catalisador e não de substrato. Sendo, portanto conhecida por cinética de pseudo-Michaelis-Menten (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000).

Para cada complexo estudado foram calculados os seguintes parâmetros cinéticos: constante catalítica (k_{cat}); constante de Michaelis-Menten (K_M); eficiência catalítica (k_{cat}/K_M) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da forma intacta do plasmídeo pBSK II obtido pela fórmula: $t_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{cat}}$.

3.3.6 Ensaios em atmosfera de argônio

Utilizando a metodologia já descrita por nosso grupo (SCARPELLINI et al., 2003), foram realizados testes em atmosfera de argônio com o intuito de avaliar a influência do oxigênio molecular nas reações dos complexos metálicos estudados.

Para a realização dos ensaios todas as soluções foram preparadas com água desoxigenada: a água foi submetida à agitação sob vácuo até completa eliminação das bolhas de ar e em seguida foi equilibrada borbulhando gás argônio para auxiliar 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 uma câmara de polietileno ou “glove bag” (modelo X-27-27, I2R). As amostras foram incubadas dentro de dessecador selado e preenchido com argônio durante 4 horas a 50°C. Após este período as reações foram interrompidas e submetidas às mesmas condições e procedimentos das realizadas na presença de oxigênio. Como controle positivo, ou seja,

para assegurar que o ambiente de argônio foi mantido durante todo o ensaio, foi utilizada uma reação de Fe (EDTA)²⁻(100 µM)/DTT (10 mM) que somente cliva o plasmídeo na presença de oxigênio.

3.4 Estudos de interação e clivagem de proteína por SDS-PAGE

Para os estudos de interação complexo-proteína, os complexos [Cu(Shyd)(bpy)] e [Cu(Shyd)(phen)] tiveram sua atividade testada na proteína albumina do soro bovino (BSA). A albumina é uma proteína monomérica que atua como carreadora de substâncias e compõe 50% do conteúdo proteico do soro sanguíneo. Os estudos de clivagem de BSA pelos complexos em estudo foram realizados da mesma forma que os estudos de clivagem de DNA (15 µM BSA; 10 mM HEPES (pH 7.0); 50°C, 4h). Portanto, foram testados diferentes pHs, concentrações dos complexos, tempo de incubação, força iônica e cinética de clivagem. O mecanismo de ação também foi avaliado através do uso de inibidores de espécies reativas de oxigênio como descrito anteriormente.

As reações com proteína foram interrompidas pela adição do tampão de corrida 2x (Tris 100 mM, SDS 7%, glicerol 40%, β-mercaptoetanol 2% e azul de bromofenol 0,01% - pH 6,8), aplicadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida descontínuo (SDS-PAGE - 10 %) por 2 horas com amperagem constante em 20 mA. O desaparecimento da banda de BSA (degradação) foi quantificada por densitometria através do software KODAK Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health, USA). Em SDS-PAGE a migração é determinada pelo peso molecular da cadeia polipeptídica e não pela carga elétrica.

A metodologia empregada na preparação do gel é baseada no sistema descontínuo descrito por LAEMMLI, 1970. Neste sistema as amostras atravessam um gel que é formado por duas zonas de composições distintas, o gel de empilhamento e o gel de separação. No gel de empilhamento a amostra é concentrada em uma banda estreita, devido à baixa concentração de poliacrilamida (poros grandes) e ao pH 6,8, mas quando esta atinge o gel de separação, que possui poros menores (maior concentração de poliacrilamida) e pH 8,8, as cadeias polipeptídicas presentes na amostra começam a ser separadas de acordo com seu peso molecular, como descrito anteriormente. Após a corrida, o gel foi depositado em uma solução de fixação com o corante Coomassie Brilliant Blue (CBR-250). Esse método de coloração baseia-se na metodologia descrita por Morrissey (1981).

3.5 Dicroísmo circular (DC)

A espectroscopia de dicroísmo circular foi utilizada para avaliar as mudanças conformacionais causadas pela interação DNA-complexo ou BSA-complexo. Já foram relatados diversos estudos desta técnica na interação entre DNA e pequenas moléculas, ainda esta tem sido amplamente utilizada no estudo da conformação de proteínas e polipeptídios em solução (GHARAGOZLOU; BOGHAEI, 2008).

Para os ensaios em DC foi utilizado o DNA de timo de bezerro (CT-DNA). O CT-DNA possui componentes estruturais que conferem a esta molécula sinais de DC característicos: uma banda positiva em 275nm correspondente ao empilhamento de bases e uma banda negativa em 245nm devido à helicidade direita do DNA. Mudanças que alterem o sinal de DC do CT-DNA correspondem às conseqüentes alterações ocorridas devido à interação entre o ácido nucleico e a molécula (complexo) em estudo (CHEN, L.-M. et al., 2008).

A BSA possui em sua estrutura grande conteúdo de α -hélice e apresenta um sinal de DC bastante característico na região do UV-distante apresentando duas bandas fortemente negativas em 209 e 220nm (GHARAGOZLOU; BOGHAEI, 2008).

Os estudos de DC foram realizados em um espectropolarímetro Jasco J-815. Para os ensaios utilizou-se 200 μ M de CT-DNA, a 37°C, ou 30 μ M de BSA, a 25°C, os ensaios foram feitos em duplicatas, com ausência e presença de concentrações crescentes dos complexos em estudo.

4 Resultados e discussão.

4.1 Complexo mononuclear de Lantânio (III).

4.1.1 Interação e clivagem de DNA plasmidial.

Para a condução dos ensaios iniciais, foram testados diferentes tampões em diferentes pHs, tendo em vista que os ácidos nucléicos, por exemplo, desnaturam rapidamente em soluções aquosas de pHs extremados (BLACKBURN et al., 1997).

Para investigar o efeito do pH no meio reacional no processo de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo mononuclear de lantânio, foi realizado teste de clivagem de DNA plasmidial em diferentes tampões (MES, HEPES e CHES) em uma faixa de pH (5,5 a 9,0). Tais tampões foram escolhidos, pois se encontram entre os mais utilizados na literatura e são conhecidos como “Good buffers” por serem considerados inertes (VASCONCELOS; AZENHA; ALMEIDA, 1998; MASH et al., 2002; YU et al., 1997).

Na figura 18 é possível verificar a influência do pH e do tampão nas reações de clivagem. Nota-se que em meios mais básicos e mais ácidos a atividade do complexo é baixa (20% de DNA clivado), já em meios mais neutros a atividade aumenta, chegando ao topo de 80% em HEPES (pH 7,0). Esta dependência por pH é muito característica para complexos hidrolíticos, pois a formação do nucleófilo depende da deprotonação de moléculas de água (geralmente ligadas aos metais). Além disso, o perfil de sino (*bell-shaped*) indica a presença de duas espécies que possuem dois pKas distintos e que participam do mecanismo de reação o que concorda com o observado por Muxel (2014) na clivagem do substrato 2,4-BDNPP, para **1** quando imobilizado em 3-aminopropil sílica (**APS-1**), onde **1** encontra-se na forma binuclear. Isto sugere, que na catálise do DNA, o complexo **1** deve encontrar-se de forma binuclear mesmo sem o suporte heterogêneo (sílica). Este comportamento será melhor abordado ao final desta seção.

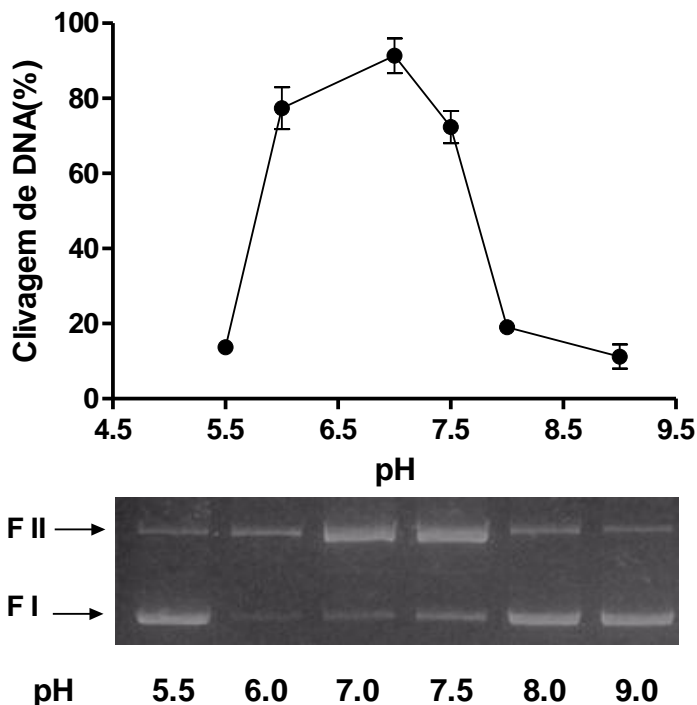


Figura 16. Clivagem de DNA plasmidial com variação de pH ([Tampão] = 10 mM; MES pH 5.5 a 6.0; HEPES pH 7.0 a 8.0; e CHES a pH 9.0), através de **1** a 50°C por 16h. Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média \pm DP.

A partir dos dados de atividade em diferentes pHs, ficou estabelecido que as próximas etapas do trabalho seriam realizadas em tampão HEPES (10mM pH 7,0), por este propiciar uma maior atividade catalítica do complexo.

Assim, o DNA plasmidial foi tratado com diferentes concentrações do complexo (5 a 50 μ M) e deixou-se reagir durante 16h a 50 °C. É possível observar que conforme aumenta a concentração do complexo também ocorre o aumento da clivagem do DNA, sendo esta de aproximadamente 80% em 50 μ M (Figura 19). Neste contexto o complexo de Lantânio (III) $[\text{LaL}(\text{H}_2\text{O})_3]\text{NO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ também apresentou

uma clivagem de DNA plasmidial de 80% em pH 7,0, mas em temperatura mais baixa (37°C) (WANG et al., 2014). Outros complexos binucleares com os lantanídeos Érbio (Er) e Hólmio (Ho) também foram capazes de converter a forma superenovelada na forma linear do DNA, em condições fisiológicas (37 °C e pH 7,0). No entanto, utilizaram concentrações dos complexos de 250 μM (ZHU et al., 1998).

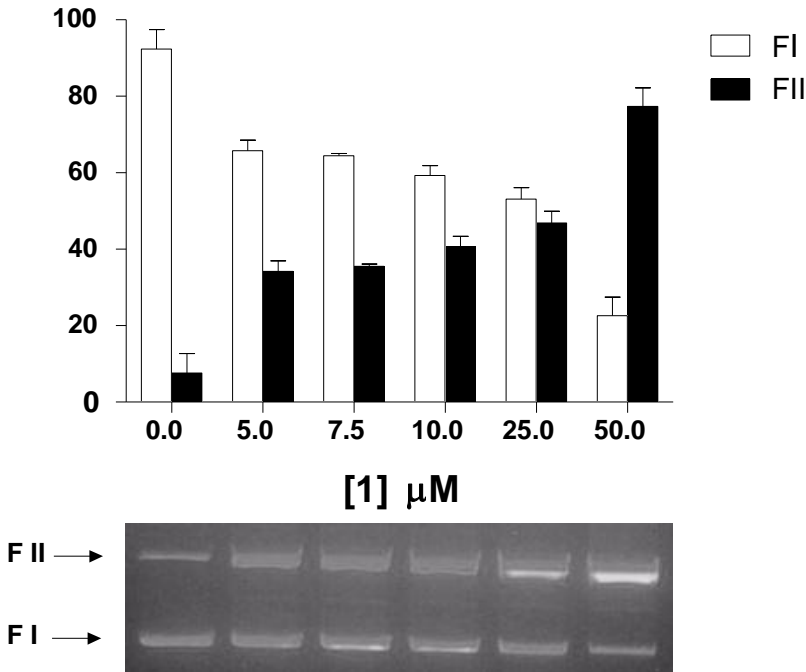


Figura 17. Clivagem de DNA plasmidial por **1**, 16h a 50°C em tampão HEPES (10mM, pH 7,0) em diferentes concentrações do complexo (5 a 50 μM). Dados representativos de dois experimentos diferentes, expressos em média \pm DP.

Os grupos fosfatos presentes nos nucleotídeos do DNA são negativamente carregados a pH 7,0, por esta razão é razoável acreditar que as ligações eletrostáticas entre o complexo e o DNA poderiam favorecer a interação destes e conseqüente clivagem do mesmo. Para

confirmar esta hipótese, as reações de clivagem de DNA foram realizadas com concentrações crescentes de NaCl (50 a 1000 mM) para modular a força iônica do meio de reação (Figura 20).

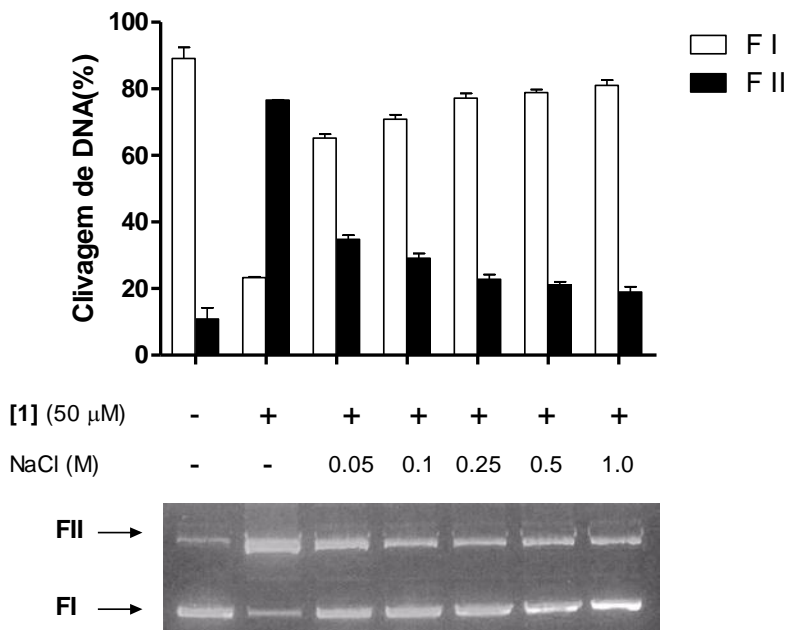


Figura 18. Efeito da força iônica (NaCl) na clivagem de DNA plasmidial por **I** a 50μM durante 16 horas a 50 ° C em tampão HEPES (10 mM, pH 7,0). Antes da adição dos complexos, diferentes concentrações de NaCl (0,05 -1M) foram adicionadas ao meio de reação. Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média ± DP.

Os resultados mostram claramente que com o aumento gradativo de NaCl de 50mM a 1M no meio reacional, há uma diminuição na fração de DNA clivado pelo complexo. Mesmo na presença da concentração mais baixa ensaiada de NaCl (50mM) a atividade do complexo já foi bastante inibida e com o aumento da concentração do sal esta inibição permanece praticamente constante (~30%). Os íons de sódio podem ser eletrostaticamente atraídos para a

porção aniônica do DNA, bloqueando a interação entre o complexo e o DNA impedindo assim a clivagem (DE ALMEIDA et al., 2013; DESBOUIS et al., 2012; TAN; WANG; ZHU, 2009; SILVA et al., 2011).

Para elucidar se o mecanismo de clivagem de DNA realizada por **1** poderia ser oxidativo ou hidrolítico, inibidores de diferentes espécies reativas de oxigênio (ROS) foram adicionados ao meio de reação (Figura 21). As adições de DMSO (2M), KI (0,5 mM) ou SOD (20 unidades) não reduziram significativamente a atividade do complexo, que se manteve em aproximadamente 70% de clivagem. Este fato reforça a hipótese de que este complexo tenha uma ação através de um mecanismo hidrolítico, visto que grande parte dos complexos de lantanídeos descritos na literatura atuam hidroliticamente na clivagem de ésteres de fosfato (FRANKLIN, 2001; ZHU et al., 1999; BERG; SIMEONOV; JANDA, 1999; JIANG et al., 2013).

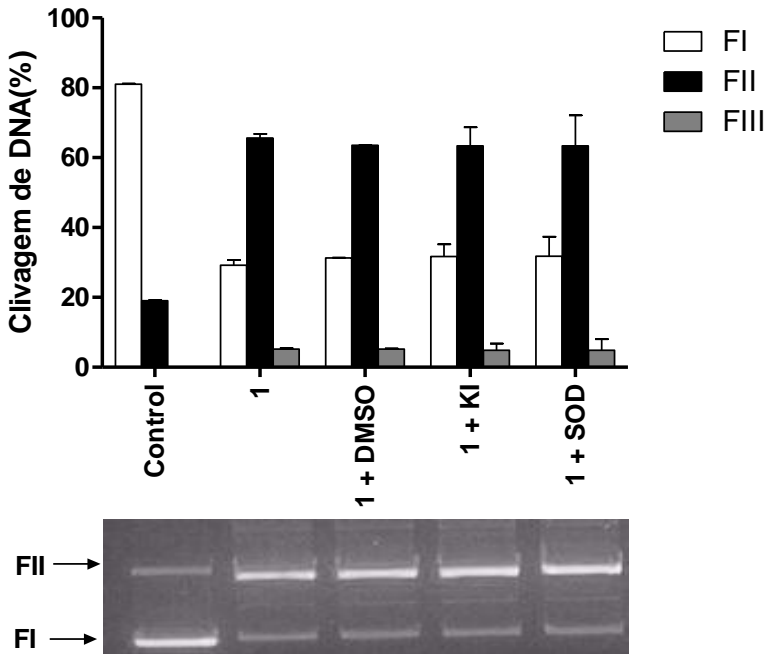


Figura 19. Efeito dos sequestradores de ERO na clivagem de DNA plasmidial por **1** a 50 μ M durante 16 horas a 50°C em tampão HEPES (10 mM, pH 7,0). Os sequestradores de ERO utilizados foram: DMSO (2 M), KI (0,5 mM) e a SOD (20 unidades). Os controles (sem complexo de reação) para cada inibidor de DNA mostraram uma clivagem semelhante ou ainda mais baixa do que a de controle apresentado na figura (dados não mostrados). Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média \pm DP.

Com o intuito de verificar por qual meio o complexo interage com o DNA, foram adicionados as misturas reacionais dois ligantes dos sulcos maior e menor do DNA, verde de metila e distamicina, respectivamente.

Na figura 22, é possível verificar que o complexo **1** tem sua atividade diminuída tanto na presença de distamicina quanto verde de metila (desaparecimento da Forma III). Dessa forma, não é possível determinar por qual sulco se dá a interação, o que nos leva a acreditar que ambos estejam envolvidos no processo. Esse efeito é muito similar aos já analisados por diversos trabalhos envolvendo interações entre complexos metálicos e DNA (HEGG; BURSTYN, 1995; CAMARGO et al., 2008).

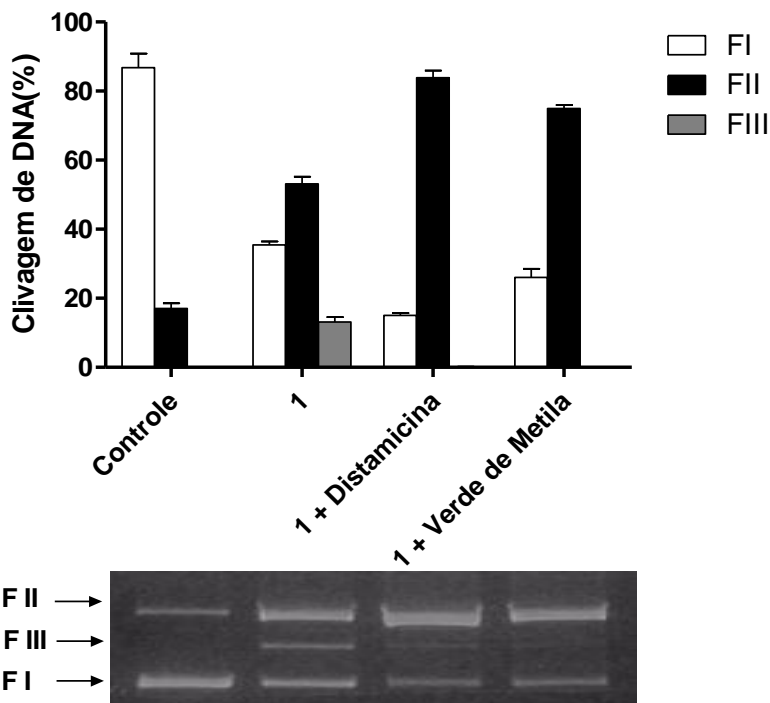


Figura 20. Efeito dos inibidores de sulco do DNA: distamicina ($50 \mu\text{M}$) e verde de metila ($50 \mu\text{M}$) sobre a clivagem de DNA plasmidial por **1** a $50 \mu\text{M}$ durante 16h a 50°C em HEPES 10 mM (pH 7,0). Os controles (sem reação com complexos) de cada inibidor de sulco mostrou uma clivagem de DNA semelhante ou ainda mais baixa do que o controle apresentado na figura (dados não mostrados). Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos como média \pm DP.

Com os dados obtidos através destes experimentos é possível verificar um comportamento tipicamente hidrolítico para o complexo **1**, tanto pelo perfil sigmoidal para a análise de pH, quanto pela não participação de espécies reativas de oxigênio nas reações de clivagem. A clivagem por mecanismo hidrolítico costuma ser preferível ao oxidativo. Uma vez que a clivagem oxidativa do DNA produz radicais livres e

estes tem a capacidade de impedir a religação das fitas de DNA enzimaticamente, promovem danos periféricos consideráveis às células e a difusão destes radicais também podem interferir na especificidade dos complexos nas clivagens de interesse (CHEN, Z. et al., 2008).

4.1.2 Comparação entre complexo mononuclear de La(III) imobilizado/ não imobilizado em sílica 3-aminopropil.

Finalmente a atividade catalítica frente ao DNA de **APS-1** foi realizada e comparada com **1** (Figura 23). É possível verificar que **APS-1** também possui atividade e esta aumenta com o passar do tempo, semelhante ao que foi observado para **1**, porém com rendimentos mais baixos (~80% para **1** e ~50% para **APS-1**). Este mesmo comportamento já foi relatado por nosso grupo em um complexo heterodinuclear de $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ também imobilizado em Sílica 3-aminopropil, onde quando este era imobilizado em sílica sua atividade na concentração de $10\mu\text{M}$ diminuía de 47% para 33% (PIOVEZAN et al., 2010).

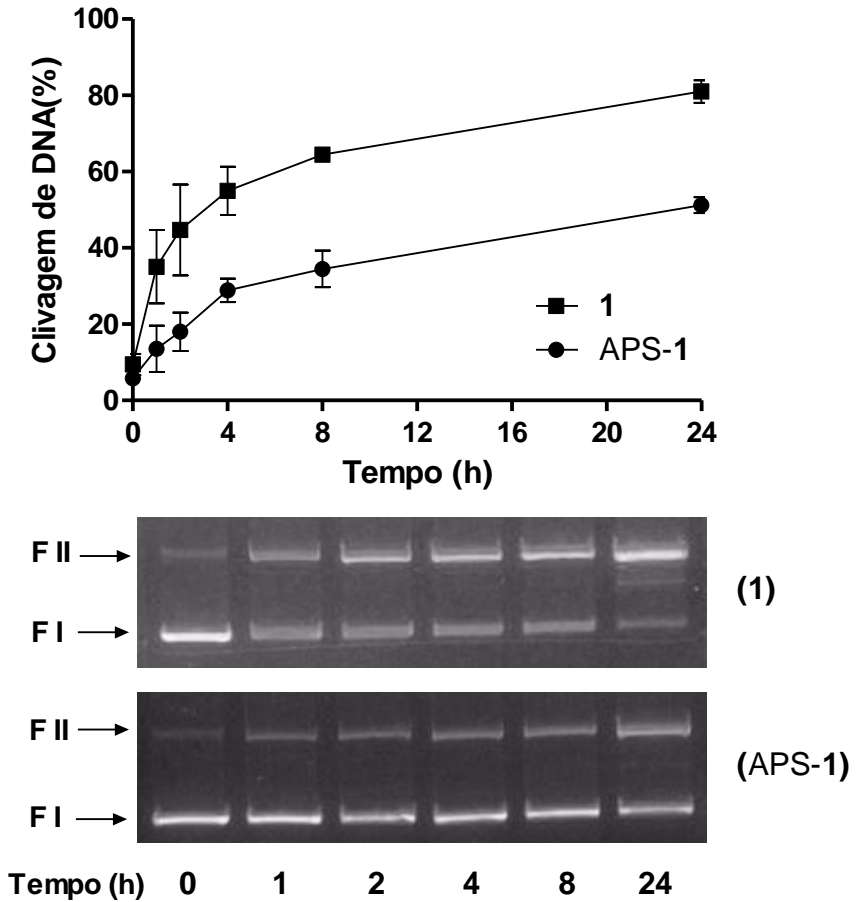


Figura 21. Comparação da atividade de clivagem de DNA, por **1** e **APS-1** a $50\mu\text{M}$ durante até 24h a 50°C em HEPES 10 mM (pH 7,0). Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média \pm DP.

Além disso, o perfil de pH apresentado por **APS-1** também concorda com o de **1**, uma vez que sob pH 7,0 mostrou maior capacidade de clivagem (~80%), em comparação com pH 9,0 (~40%) (Figura 24).

Quando estes dados são comparados com o que foi obtido para a hidrólise do substrato 2,4-BDNPP, já publicados, percebe-se que sob condições de reação de clivagem de DNA, tanto **1** quanto **APS-1** atuam como espécies binucleares (MUXEL et al., 2014). Isto pode ser sugerido, pois quando **1** é imobilizado em sílica (**APS-1**), este torna-se uma espécie binuclear com atividade catalítica, frente ao 2,4-BDNPP, ótima em pH 7,0. Este mesmo fato é observado também para **1** na hidrólise do DNA, o que nos leva a crer que na reação de clivagem o DNA faça o papel da sílica e dê suporte para **1** também atuar como uma espécie binuclear, com atividade catalítica ótima em pH 7,0.

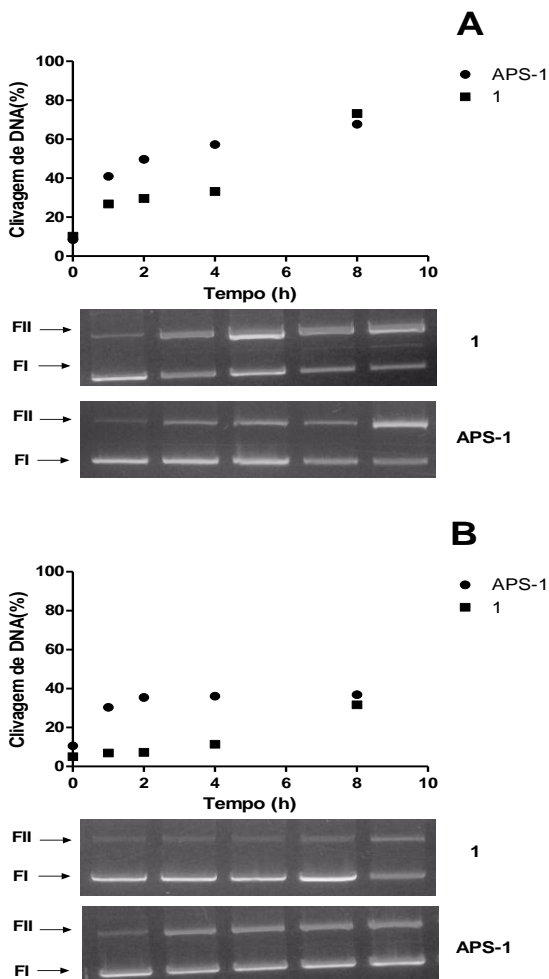


Figura 22. Comparação da capacidade em clivar DNA de **1** e **APS-1** a $50\mu\text{M}$ em até 8h a 50°C com dois pH diferentes (Tampão = 10 mM; HEPES a pH 7,0 [A] e CHES a pH 9,0 [B]).

Supõe-se, neste caso, que uma amina livre nas bases nitrogenadas do DNA possa reagir com um equivalente do complexo, desproporcionando-o e permitindo a formação de uma espécie binuclear, de modo similar a que ocorre com os grupos aminínicos da 3-aminopropil sílica que permitem a formação do complexo **APS-1**. Sendo

assim, tanto **1** quanto **APS-1** atuariam da mesma maneira frente à hidrólise do DNA.

4.2 Complexo mononuclear de Cobre (II)

Primeiramente foram ensaiados para o complexo [Cu(Lpurina)Cl] (**CuLPu**) testes para verificar em qual pH havia uma maior atividade catalítica do complexo. Para tal foram utilizados os seguintes tampões em seus respectivos pHs: [MES (10mM pH 5,5 e 6,0) –HEPES (10mM pH 7,0 e 8,0 e CHES (10mM pH 9,0)].

A figura 25 ilustra o resultado obtido para este ensaio, onde a clivagem por **CuLPu** aumenta gradativamente em relação ao pH. Esta é relativamente baixa em pH 5,5 e 6,0 (~35%) mas aumenta consideravelmente em pH 7,0, 8,0 e 9,0 (~60%), onde nestes se mantém constante. Diversos complexos de cobre (II) possuem comportamento semelhante, sendo mais ativos em pHs mais básicos. Um exemplo é o complexo [Cu([9]aneN₃)²⁺] (onde [9]aneN₃ = 1,4,7-triazaciclonano) com uma acridina conjugada, o qual possui maior atividade em pH 9,0, onde há inclusive a formação da forma III do plasmídeo (FIII) após 48 horas de incubação a 37°C (HIROHAMA; ARII; CHIKIRA, 2004).

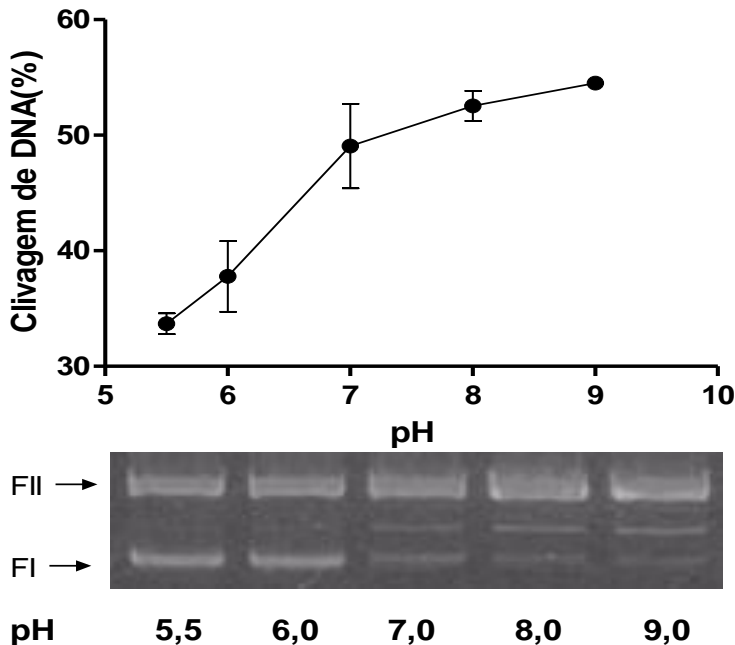


Figura 23. Clivagem de DNA plasmidial com variação de pH ([Tampão] = 10 mM; MES pH 5.5 a 6.0; HEPES pH 7.0 a 8.0; e CHES a pH 9.0), através de (CuLPu) a 37°C por 16h. Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média \pm DP.

Posteriormente, foram realizados ensaios para averiguar a influência da concentração do complexo na eficiência catalítica, estes foram realizados no pH de maior atividade [CHES 10mM (pH 9,0)].

Conforme observado na Figura 26, o aumento da atividade do complexo frente ao DNA é proporcional ao aumento da concentração do mesmo. É possível visualizar que com 10 μ M do complexo há uma conversão de apenas 20% da forma superenovelada (FI) na forma circular aberta (FII) do DNA. No entanto, com aumento da concentração, a clivagem também aumenta, sendo de aproximadamente 50% em 25 μ M e chegando a 80% em 100 μ M do complexo.

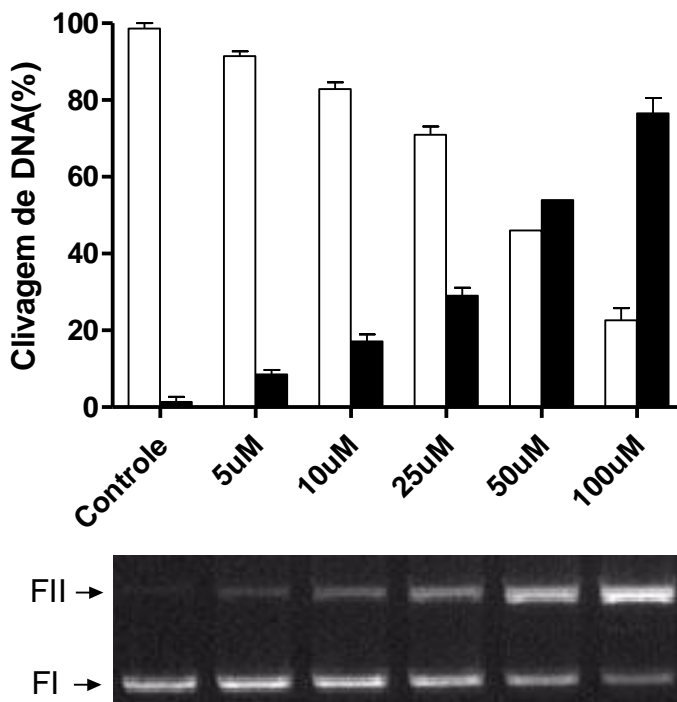


Figura 24. Clivagem de DNA plasmidial por (**CuLPu**) durante 16 horas a 37° C em tampão CHES (10 mM, pH 9,0) e diferentes concentrações do complexo (5 a 100 μM). Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média ± DP.

Em estudos anteriores, uma série de compostos de Cu(II) que possuem em sua estrutura compostos aromáticos heterocíclicos, como a piridina e o imidazol, tiveram sua atividade testada frente ao DNA. Os compostos derivados do imidazol obtiveram altas taxas de clivagem da forma superenovelada (FI) do ácido nucleico (95 – 100%), enquanto que para os compostos com a piridina a clivagem foi inferior (60%) (RAJARAJESWARI et al., 2013). Vale destacar que estes compostos ativos são semelhantes ao anel aromático das purinas. Estas por sua vez, junto com as pirimidinas, são as bases nitrogenadas do DNA, as quais

estão sendo cada vez mais utilizadas na síntese conjunta com íons metálicos, como uma estratégia para potencializar o efeito destes sobre biomoléculas.

A atividade catalítica para este estudo apenas foi visualizada quando se adicionou a mistura reacional um co-reagente, o peróxido de hidrogênio. Este fato já foi relatado para diversos outros complexos de Cu(II) como Cu(II) dipirido-quinoxalina (SANTRA et al., 2002) e piridilmetil-etilenediamina (RAJA et al., 2005), que utilizaram como um redutor o ácido ascórbico. Uma vez que todas as reações do presente trabalho não contem co-reagentes, estas são compostas dos mesmos componentes: DNA plasmidial, complexo e solução tampão, apenas poderiam estar atuando como co-reagentes o tampão CHES ou o próprio DNA plasmidial.

Alguns estudos já demonstraram que complexos de cobre (II) tem a capacidade de oxidar aminas terciárias, como os tampões MES, HEPES e PIPES (WANG; SAYRE, 1992). Dessa forma, para verificar se o tampão CHES estaria atuando como um agente redutor, pois possui uma amina secundária em sua estrutura, foram realizados testes de clivagem em outros tampões, também em pH 9,0 (dados não mostrados). Apesar disto não houve alterações significativas na atividade dos complexos, o que sugere que a própria molécula de DNA esteja atuando como agente redutor de cobre(II)-cobre(I).

Com o intuito de determinar qual o mecanismo de ação do complexo **CuLPu** na clivagem de DNA plasmidial (oxidativo/hidrolítico), este foi incubado com sequestradores de espécies de radicais livres (EROS): DMSO, sequestrador do radical hidroxila (OH^\bullet); KI, inibidor da geração de peróxidos (R-O-OH); SOD, sequestrador do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$); NaN_3 , sequestrador de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Na figura 27, é possível observar que todos os sequestradores de espécies de radicais livres diminuíram a atividade do complexo, sendo ela mais drástica com o DMSO e o KI (menos de 20% de clivagem).

Dessa forma, é possível sugerir que todas as espécies de radicais livres testadas, principalmente os radicais hidroxila e peróxidos, estejam envolvidas no ataque ao ácido nucleico, seja pela base nitrogenada ou pela desoxirribose do DNA, sendo este provavelmente um mecanismo oxidativo.

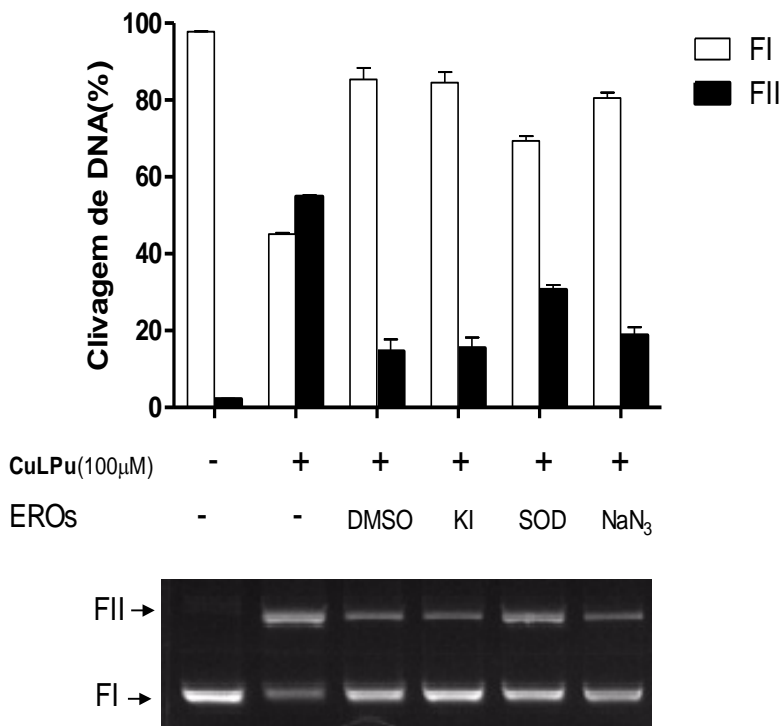
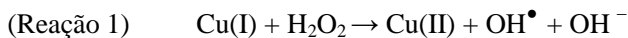
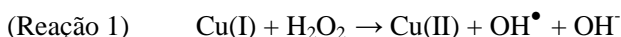
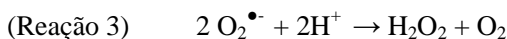
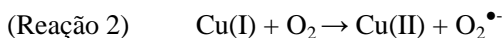


Figura 25. Efeito dos sequestradores de ERO na clivagem de DNA plasmidial por (**CuLPu**) a 100 μM durante 16 horas a 37°C em tampão CHES (10 mM, pH 9,0). Os sequestradores de ERO utilizados foram: DMSO (2 M), KI (0,5 mM), SOD (20 unidades) e a NaN₃(0,5mM). Os controles (sem complexo de reação) para cada inibidor de DNA mostraram uma clivagem semelhante ou ainda mais baixa do que a de controle apresentado na figura (dados não mostrados). Dados

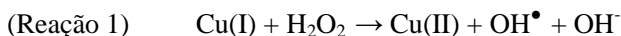
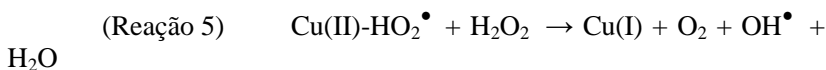
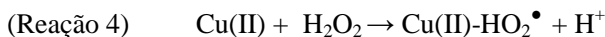
Metais de transição como o Cu(II) podem gerar ERO por meio de uma reação do tipo Fenton (reação 1), onde o metal reduzido reage com H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) gerando OH[•].



Quando há a presença de um agente redutor como o ascorbato, ácido 3- mercaptopropiônico ou ditiotreitól e um agente oxidante como o H_2O_2 , esta é a principal via utilizada para a clivagem oxidativa por complexos de Cu(II) . Já na presença de somente um agente redutor, ocorrem algumas modificações no mecanismo de reação, onde o metal reduzido reage com o oxigênio molecular gerando $\text{O}_2^{\bullet-}$ (reação 2) que rapidamente dismuta a H_2O_2 (reação 3) e participa na geração de OH^{\bullet} (reação 1).



Também pode ocorrer a formação de ERO mesmo somente na presença de H_2O_2 (PECCI; MONTEFOSCHI; CAVALLINI, 1997), onde Cu(II) reage com o H_2O_2 , gerando uma espécie tipo metal-peróxido (reação 4). Esta espécie reage com outra molécula de H_2O_2 formando Cu(I) e o próprio radical OH^{\bullet} (reação 5). Quando há excesso de H_2O_2 , o Cu(I) pode seguir reação tipo-Fenton (reação 1).



Sendo assim, pode-se sugerir que na presença de um agente redutor/oxidante Cu(II) pode gerar ERO, o que poderia explicar o comportamento do complexo **CuLPu**. Mas, como já explicado anteriormente, para estas condições reacionais não foi utilizado nenhum co-reagente.

Dessa forma, é possível sugerir que o complexo cliva oxidativamente o DNA, mesmo sem a presença de um co-reagente. Este mesmo resultado já foi obtido para o complexo Cu(II)_2 -BMXD, onde “BMXD” é o ligante 3,6,9,17,20,23- hexaazatriciclo[23.3.1.1^{11,15}]-triaconta-1(29),11(30),12,14,25,27-hexano, em que este sofre redução pelo próprio DNA em solução. O complexo no estado de Cu(I) gera ERO possivelmente pelas reações 2, 3 e 1 clivando o DNA (OLIVEIRA

et al., 2009), o que corrobora com a hipótese de que este complexo de Cu(II) também aja pelo mesmo princípio.

Para dar maior credibilidade à hipótese de que **CuLPu** age pelo mecanismo oxidativo, foram realizados testes para analisar a influência do oxigênio molecular (O_2) no processo de clivagem. Foram testadas, paralelamente, reações em condições aeróbias e anaeróbias (atmosfera de argônio) em pH 9,0. Para tanto, o sistema $[Fe(EDTA)]_2^-/DTT$ foi utilizado como controle positivo, uma vez que este sistema é capaz de gerar radicais hidroxila (OH^\bullet), os quais oxidam o DNA através da reação de Fenton (POGOZELSKI; TULLIUS, 1998).

A Figura 28 demonstra a diferença de clivagem em condições aeróbicas (A) e anaeróbicas(B) pelo complexo **CuLPu**. É notório que a atividade do mesmo em anaerobiose diminui drasticamente, visto que na presença do oxigênio havia a formação da forma linear do DNA (FIII) e quando este é testado em condições anaeróbicas sua atividade diminui para aproximadamente 40%. Vale destacar que a clivagem por $FeEDTA/DTT$ também diminuiu em condições anaeróbicas, o que garante a veracidade do método, já que este somente tem a capacidade de clivar o DNA na presença de oxigênio molecular.

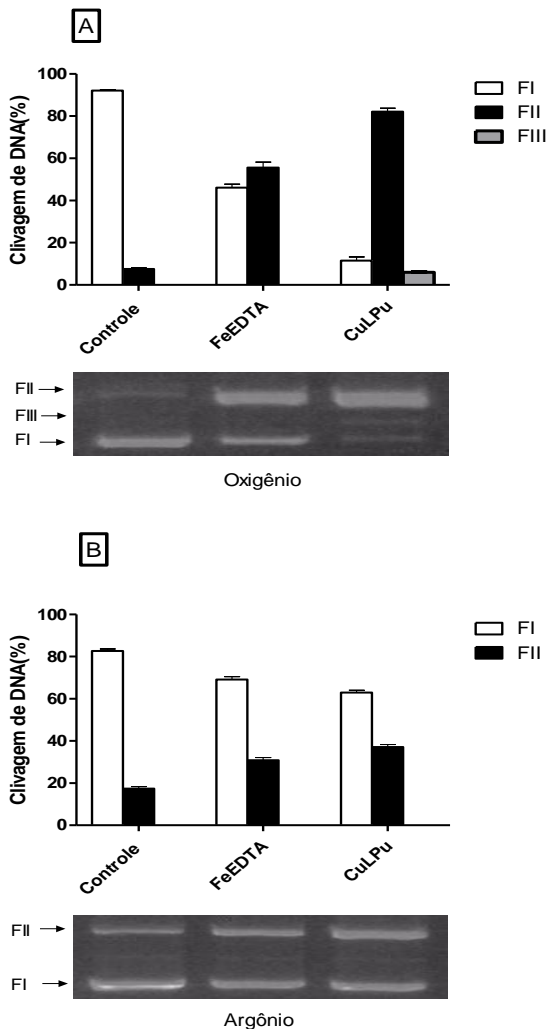


Figura 26. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo (**CuLPu**) em condições aeróbicas(atmosfera de oxigênio) (A) e anaeróbicas (atmosfera de argônio) (B) em tampão CHES (pH 9,0), na concentração de $100\mu\text{M}$ a 50°C , durante 4h. Dados representativos de dois ensaios diferentes expressos em média $\pm\text{DP}$.

Este mesmo comportamento já foi observado para complexos binucleares de cobre: $[\text{Cu}_2(\text{HLdtb})(\mu\text{-OCH}_3)(\text{ClO}_4)_2]$ e $[\text{Cu}_2(\text{Ldtb})(\mu\text{-OCH}_3)(\text{BPh}_4)]$ (sintetizados a partir do ligante H2Ldtb – {2-[N,N-Bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[N',N'-(3,5-di-tert-butilbenzil-2-hidroxi)(2-piridilmetil)]aminometil-4 metilfenol}), onde em pH 7,9 a atividade dos complexos em condições aeróbicas era reduzida de 75% para aproximadamente 36% com restrição de oxigênio (PERALTA et al., 2006).

Com mais esse dado corroborando com a hipótese que **CuLPu** age na clivagem de DNA por um mecanismo oxidativo, foram testados também mecanismos que comprovam por qual via ocorre a interação destes com o DNA. Normalmente, essa interação ocorre por três principais modos: intercalação, ligação nos sulcos do DNA ou interações eletrostáticas (BLACKBURN et al., 1997).

Dessa forma, para determinar de que forma o complexo mononuclear de cobre interage com o DNA foram realizados diferentes testes, como a espectroscopia de dicroísmo circular (DC). Esta técnica é muito utilizada para diagnosticar mudanças na estrutura do DNA quando este interage com outras moléculas (GARBETT; RAGAZZON; CHAIRES, 2007). Para este ensaio foi utilizado o CT-DNA, que possui um espectro composto por uma banda positiva em 275nm, devido ao empilhamento entre as bases nitrogenadas e uma banda negativa em 245nm, devido à helicidade direita da forma B do DNA (CHEN et al., 2008). Com a adição do complexo **CuLPu** (Figura 29) à solução de CT-DNA (200 μM), a intensidade de ambas as bandas diminuíram significativamente, isto significa que o complexo altera a conformação do DNA. O declínio da banda em 245nm sugere que o complexo interaja a modo de mudar a conformação do DNA de B-DNA para Z-DNA (CHEN, Z. et al., 2008). Já, a diminuição da intensidade da banda de 275nm, indica que pode estar havendo um relaxamento da dupla hélice do DNA (HE et al., 2009). Este não é um comportamento do tipo intercalante, em que haveria o aumento da intensidade das bandas (CHEN, L.-M. et al., 2008), o que corrobora com a hipótese de que este complexo aja ou através dos sulcos do DNA ou por interações eletrostáticas (DHAR; NETHAJI; CHAKRAVARTY, 2005; SHAHABADI; HEIDARI, 2014; THAMILARASAN; JAYAMANI; SENGOTTUVELAN, 2015).

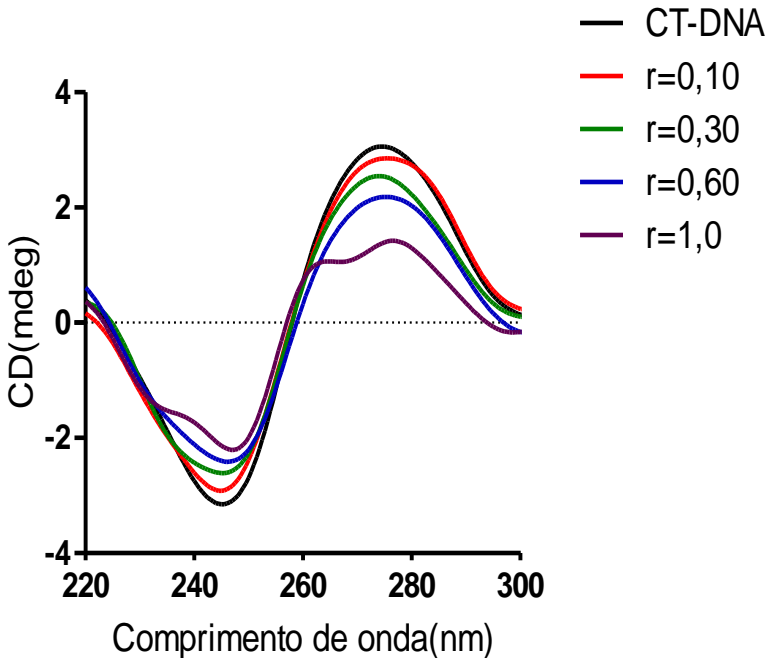


Figura 27. Espectros de dicroísmo circular de CT-DNA (200 μM) na ausência e na presença de concentrações variadas do complexo (**CuLPu**) ($r=0,10$; $r=0,30$; $r=0,60$; $r=1,0$), onde $r=[\text{complexo}]/[\text{CT-DNA}]$.

Para confirmar se realmente a interação do complexo **CuLPu** ocorre através dos sulcos do DNA, foi realizado um experimento com a utilização da netropsina e do verde de metila, bloqueadores do sulco maior e menor do DNA, respectivamente. Na figura 30, é possível observar que não houve diminuição da atividade do complexo quando se bloquearam os sulcos. Com isso, sugere-se que a interação do complexo **CuLPu** ou não depende da ligação do complexo com os sulcos do DNA ou que o complexo tem a habilidade de acessar ambos os sulcos do mesmo, não demonstrando preferência por nenhum.

Este dado ratifica os resultados obtidos nos espectros de dicroísmo circular, evidenciando mais uma vez que o acesso ao DNA se dá por ambos os sulcos do DNA e a interação com o mesmo seja mediada por interações eletrostáticas. Este mesmo resultado foi obtido

para um complexo binuclear de cobre(II), $[\text{Cu}(\mu\text{-RSSR})]_2$, em que a atividade de clivagem no DNA era foto-induzida e a interação deste com o complexo também não era evidenciada nos experimentos com bloqueadores de sulco, sendo portanto muito provavelmente induzida por interações eletrostáticas (LAHIRI et al., 2010).

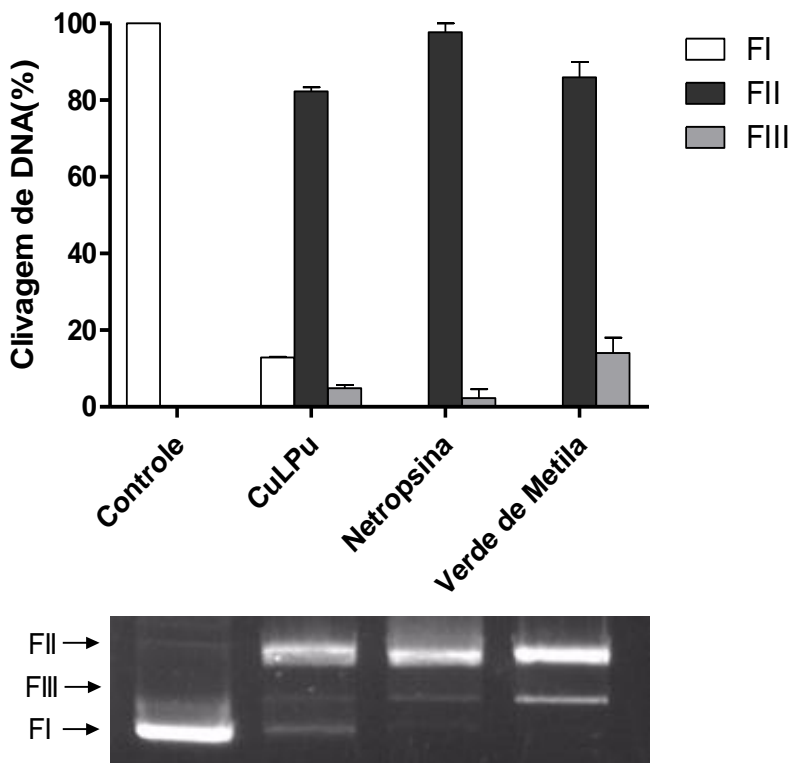


Figura 28. Influência dos ligantes específicos dos sulcos menor e maior do DNA, netropsina e verde de metila ($50\mu\text{M}$) na atividade de clivagem de DNA por (**CuLPu**) ($100\mu\text{M}$). As reações foram conduzidas em tampão CHES (10 mM pH 9,0), durante 16h a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Por fim, segundo os espectros de DC, a interação de **CuLPu** com o DNA aconteceria também através de interações eletrostáticas. Para ratificar esta hipótese, foram adicionados às misturas reacionais concentrações crescentes de NaCl (100 a 1250 mM) para avaliar a força iônica da reação. Sabendo que os grupos fosfatos encontram-se carregados negativamente nas condições testadas e que os complexos em estudo possuem cargas positivas é plausível acreditar que as interações eletrostáticas entre os complexos e o DNA possam auxiliar na interação e consequente clivagem do mesmo.

Assim é possível observar na Figura 31 que com a adição de NaCl (aumento da força iônica) ocorre uma diminuição drástica na atividade do complexo **CuLPu**, sendo que esta reduziu de aproximadamente 80%, na ausência de NaCl, para 30% na presença de 200mM de NaCl. Estes resultados sugerem que as interações eletrostáticas contribuem no processo de clivagem de DNA, uma vez que a molécula de DNA é negativamente carregada e o complexo **CuLPu** é positivamente carregado. Muitos outros autores já demonstraram este mesmo comportamento, como por exemplo, para um complexo binuclear de Zinco. Sua força iônica foi testada com a adição tanto de cloreto de sódio (NaCl), quanto de nitrato de sódio (NaNO₃), nas concentrações crescentes de 10 a 100mM, e ambos diminuíram a atividade do complexo demonstrando a interação eletrostática do complexo frente ao DNA (PANJA et al., 2011).

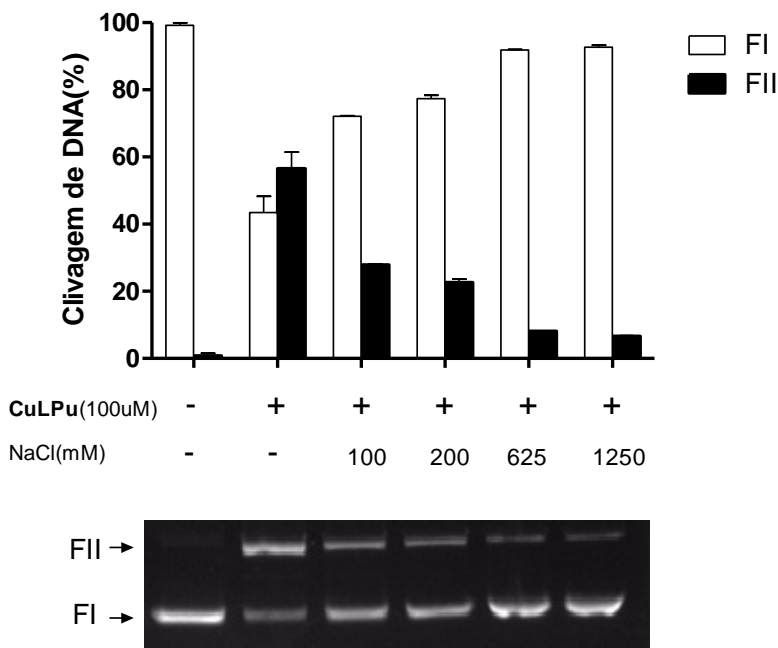


Figura 29. Efeito da força iônica (NaCl) na clivagem do DNA plasmidial por (**CuLPu**), em 100 μ M por 16h a 37°C em tampão CHES (10mM, pH 9,0). Depois da adição dos complexos, diferentes concentração de NaCl(100 a 1250mM) foram adicionados as reações. Dados representativos de dois ensaios diferentes expresso em média \pm DP.

Através dos resultados obtidos até o momento, algumas conclusões já podem ser explicitadas. O complexo **CuLPu** possui atividade apenas oxidativa, como demonstrado pelos testes de espécies sequestradoras de radicais livres e em atmosfera de argônio, por este motivo é bastante plausível acreditar que ele interaja com o DNA eletrostaticamente por atração de cargas e acesse o DNA ligando-se a ambos os sulcos do mesmo, para que então haja a formação e difusão dos radicais livres e conseqüente clivagem do DNA.

Com o intuito de avaliar o perfil cinético de clivagem do complexo **CuLPu**, este foi incubado em diferentes concentrações e tempos. Tratando os dados como uma cinética de pseudo-primeira ordem, onde há um excesso de catalisador frente ao substrato (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000), observou-se na tabela 1 as diferentes constantes de clivagem de DNA (k_{obs}) e o tempo de meia-vida para o DNA superenovelado ($t_{1/2}$), para cada concentração de complexo testada. O cálculo de $t_{1/2}$ é feito, segundo uma cinética de primeira ordem (excesso de substrato) usando a fórmula $\ln(2)/k_{\text{cat}}$.

É possível perceber que conforme aumenta a concentração do complexo também ocorre um aumento na velocidade de reação. Observou-se que com $50\mu\text{M}$ do complexo o k_{obs} era de $0,11\text{ h}^{-1}$, o que representa um $t_{1/2}$ de $\sim 6,44\text{h}$ para o DNA superenovelado, quando ocorre um aumento na concentração do complexo para $200\mu\text{M}$ o k_{obs} também aumenta, chegando a $0,49\text{ h}^{-1}$, com uma meia-vida de $1,40\text{h}$. Quando comparamos estes dados com os existentes na literatura para este mesmo complexo, sem a adição da purina, podemos perceber o quanto essa adição incrementou a velocidade de reação do complexo frente a clivagem de DNA (OLIVEIRA et al., 2009). O complexo $[\text{Cu}(\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2)(\text{OH}_2)_2]^{2+}$ (Figura 9–Pag 27) obteve seu ápice de constante de clivagem de DNA ($0,78\text{ h}^{-1}$) com $3,0\text{mM}$ de complexo, sendo que com $500\mu\text{M}$ de **CuLPu**, seis vezes menor a concentração, já era possível obter um k_{obs} de $0,54\text{ h}^{-1}$.

Outro complexo binuclear de cobre(II), conjugado com uma base púrica (adenina) obteve em uma cinética de pseudo-primeira ordem um k_{obs} de aproximadamente $0,141\text{min}^{-1}$, com $t_{1/2}$ de $4,9\text{ min}$ (GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2007). Demonstrando assim o potencial deste novo complexo (**CuLPu**) e de como a adição da purina foi eficiente para o aumento da clivagem do ácido nucléico.

Tabela 1. Comparação das constantes de clivagem de DNA superenovelado (k_{obs}) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para o complexo **CuLPu**.

[CuLPu] μM	k_{obs} (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
50	0,11 h^{-1}	6,44h
75	0,14 h^{-1}	5,11h
100	0,20 h^{-1}	3,40h
200	0,49 h^{-1}	1,40h
300	0,51 h^{-1}	1,36h
500	0,54 h^{-1}	1,29h

Na figura 32, as constantes de clivagem (k_{obs}) calculadas em cada concentração do complexo, mostram a variação dessas constantes em função do aumento da concentração dos complexos, onde se observa um comportamento de saturação.

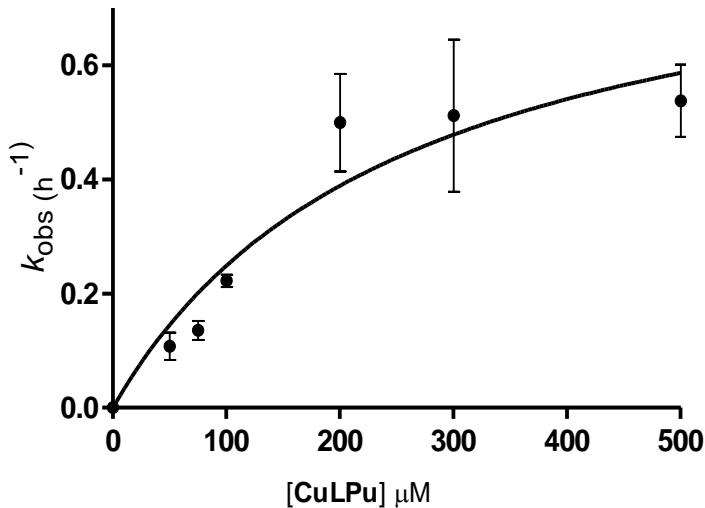


Figura 30. Gráfico de k_{obs} versus concentrações do complexo **CuLPu**, mostrando um comportamento de saturação. As reações foram realizadas em CHES (10 mM) pH 9,0 com concentrações crescentes do complexo (50-500 μM). A incubação foi realizada a 37°C com retirada de alíquotas em diferentes intervalos de tempo(0-4h).

Assim, assumindo que o DNA é o substrato e o que complexo metálico atua como um catalisador foi possível extrair da curva, segundo formalismo de pseudo-Michaelis Menten, constantes cinéticas como mostradas na Tabela 2. Esta indica que o complexo **CuLPu** apresenta valor de k_{cat} de $0,8873\text{h}^{-1}$, e valor de aceleração da degradação em relação ao DNA não catalisado de $2,4 \times 10^7$ vezes, estes dados estão de acordo com os apresentados na literatura atualmente (DE ALMEIDA et al., 2013; CHEN et al., 2012; ROY et al., 2011; YANG; WANG; YANG, 2011), demonstrando mais uma vez a eficiência deste complexo em atuar como um mimético de nuclease.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelo complexo CuLPu.

$k_{\text{cat}}(\text{h}^{-1})^{\text{a}}$	$K_{\text{M}}(\mu\text{M})$	$k_{\text{cat}}/k_{\text{ncatalisada}}^{\text{b}}$	$t_{1/2}(\text{h})^{\text{c}}$
0,8873	0,25	$2,4 \times 10^7$	0,78

^a Constante de catálise. ^b Aceleração da degradação em relação ao DNA não catalisado ($k_{\text{nc}}=3,6 \times 10^{-8}\text{h}^{-1}$). ^c Tempo de meia vida do DNA na forma superenovelada ($t_{1/2}=\ln(2)/k_{\text{cat}}$).

Estes dados também corroboram com os já apresentados por outro grupo de pesquisa, onde a adição de uma adenina ao complexo $\text{Cu}(\text{bpy})\text{Cl}_2$, fez com que a constante de catálise do complexo aumentasse de $0,50\text{h}^{-1}$ para $40,4\text{h}^{-1}$, ou seja, um incremento de 80 vezes na velocidade da reação. Vale destacar que a enzima de restrição *EcoRI* possui um k_{cat} de $43,2\text{h}^{-1}$, demonstrando assim o importante papel desempenhado pelas bases nitrogenadas em promover interações entre complexos metálicos e seus alvos, bem como a facilitação para a clivagem do mesmo (WANG et al., 2010).

4.3 Clivagem e interação dos complexos mononucleares de Cobre(II) com a proteína BSA.

O desenho de metaloproteases sintéticas que clivam proteínas em um sítio específico tem levantado muito interesse nos últimos anos (RAJENDIRAN et al., 2007). Dessa forma, com o intuito de desenvolver além de nucleases potentes, dois complexos de cobre (II), foram testados como agentes de clivagem para proteínas.

Tendo em vista o efeito que diferentes tampões e pHs podem trazer para a atividade catalítica de complexos metálicos, foram testados diferentes condições a fim de se estabelecer a que mais potencializa o efeito do complexo sobre a biomolécula. Dessa forma, na figura 40 é possível verificar o efeito do pH frente as reações de clivagem, para $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{bpy})]$ e $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{phen})]$. Fica evidente

que o comportamento de **[Cu(Shyd)(bpy)]** (A) e **[Cu(Shyd)(phen)]** (B) quando expostos a diferentes condições é semelhante, ou seja, apresentam maior atividade catalítica em pH 7,0 e 9,0 (Figura 33), apresentando uma porcentagem de BSA intacta de aproximadamente 40% e 20% para **[Cu(Shyd)(bpy)]** e **[Cu(Shyd)(phen)]**, respectivamente, em ambos os pHs. Este comportamento não é característico para um complexo hidrolítico, pois para este é retratado uma dependência sigmoidal entre o pH e a atividade do complexo metálico (MUXEL, 2014).

Esta falta de perfil dependente de pH nos leva à hipótese de que tanto **[Cu(Shyd)(bpy)]** quanto **[Cu(Shyd)(phen)]** ajam na proteína pelo mecanismo oxidativo. Visto que este tem por base o ataque à biomolécula única e exclusivamente pela formação de espécies de radicais livres e que a formação destas não está diretamente ligada ao pH adotado durante a reação de clivagem, é plausível crer na ação destes complexos por esta via.

Como a atividade para ambos os complexos foi relativamente a mesma nos pH 7,0 e 9,0, os ensaios subsequentes foram realizados em HEPES (10mM) pH 7,0, pois este melhor mimetiza o pH fisiológico, o que corroborará para posteriores perspectivas para uso deste complexos frente a outros matérias biológicos, como as células.

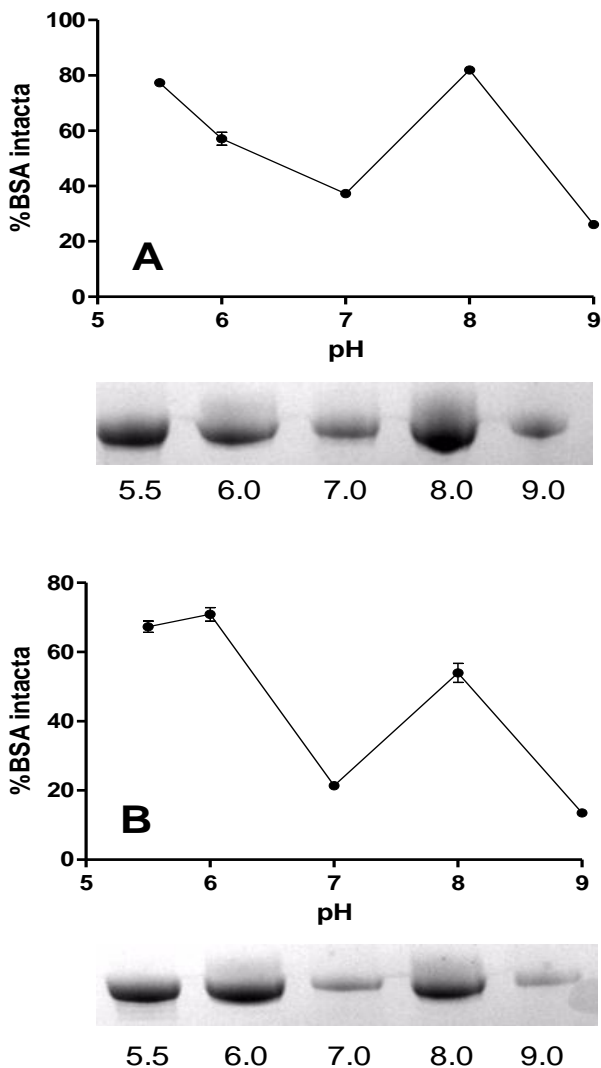


Figura 31. Clivagem da proteína BSA (15 μ M) em diferentes tampões: MES - 10mM (pH 5,5 e 6,0), HEPES - 10mM (pH 7,0 e 8,0) e CHES - 10mM (pH 9,0), frente a adição de 200 μ M de [Cu(Shyd)(bpy)] (A) e [Cu(Shyd)(phen)] (B), durante 4h a 50°C. Dados representativos de duplicatas \pm DP.

Na figura 34, podemos observar a atividade catalítica frente à proteína BSA de **[Cu(Shyd)(bpy)]** (A) e **[Cu(Shyd)(phen)]** (B), respectivamente. Quando comparado com a reação controle, contendo apenas acetonitrila e BSA, fica evidente o aumento da clivagem conforme ocorre o aumento da concentração do complexo, tanto por **[Cu(Shyd)(bpy)]** quando por **[Cu(Shyd)(phen)]**. Este comportamento proteolítico de alguns complexos metálicos, já foi relatado por diversos autores na literatura (RAJENDIRAN et al., 2007, JANG; SUH, 2008, DE OLIVEIRA et al., 2005, BURANAPRAPUK et al., 1998, KATKAR et al., 2014).

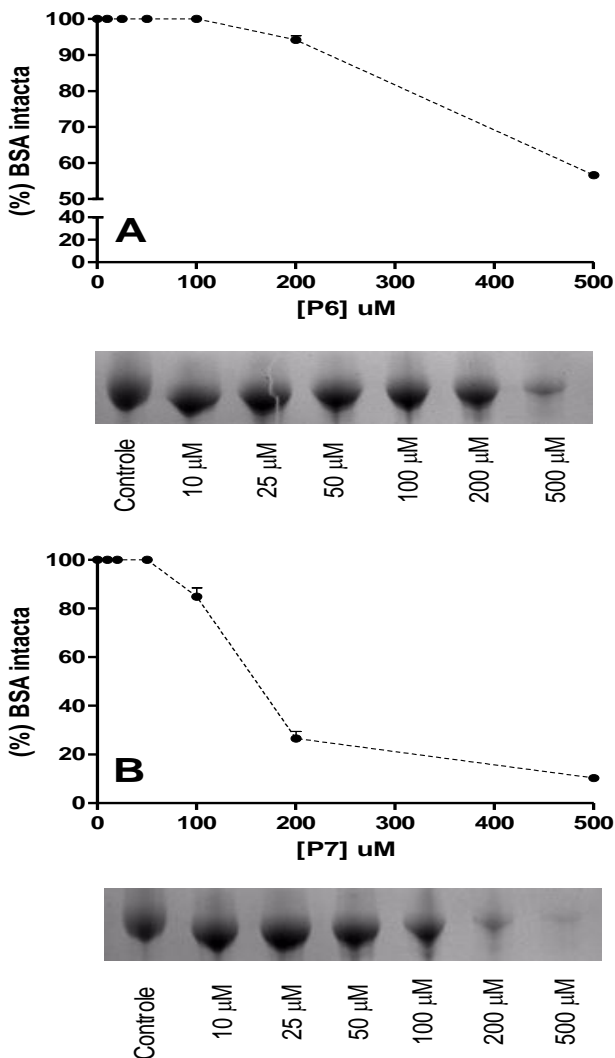


Figura 32. Clivagem da proteína BSA (15 μM) com a adição de concentrações crescentes (10 a 500 μM) do complexo [Cu(Shyd)(bpy)] (A) e [Cu(Shyd)(phen)] (B). As reações foram incubadas por 4h, a 50°C em tampão HEPES (10mM, pH 7,0). Dados representativos de duplicatas com média $\pm\text{DP}$.

É notório também que a clivagem por **[Cu(Shyd)(phen)]** é muito mais eficiente, sendo que aproximadamente 10% da proteína ainda está intacta na concentração de 500 μ M, enquanto que para **[Cu(Shyd)(bpy)]** na mesma concentração esta não chega a 50%, esse dado sugere que a modificação feita pela troca da bipyridina presente em **[Cu(Shyd)(bpy)]** pela fenatronila em **[Cu(Shyd)(phen)]** favorece de alguma forma a clivagem da proteína. Alguns complexos que sofreram esta mesma modificação, ou seja, troca do ligante bipyridina por fenatrolina também demonstraram os mesmos efeitos sobre a BSA (LOGANATHAN et al., 2014; GANESHPANDIAN et al., 2013).

Com o intuito de avaliar as mudanças estruturais causadas na BSA pelos complexos de cobre, foi realizada a técnica de espectroscopia de dicroísmo circular. Os espectros foram realizados utilizando uma concentração constante de BSA (30 μ M) variando a de complexo ($r=0,10$ a $r=1,0$), como mostrado na Figura 35.

A BSA é uma proteína apropriada para estes estudos, pois devido à alta porcentagem de α -hélices em sua estrutura possui um sinal de DC bastante característico na região do UV – distante, o qual apresenta duas bandas fortemente negativas, devido à sua helicidade, em 209 e 220 nm.

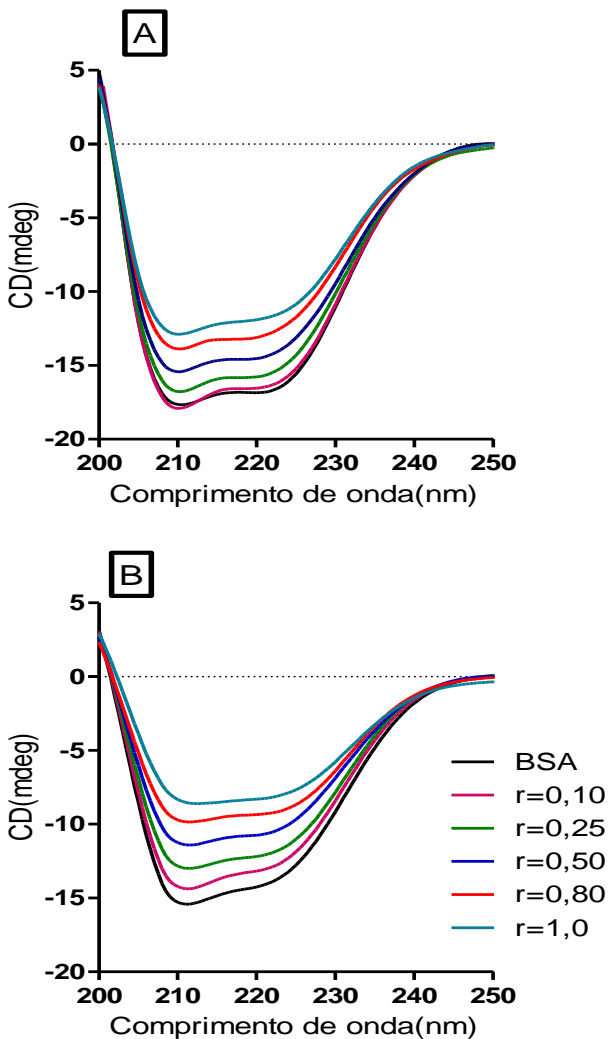


Figura 33. Espectros de dicroísmo circular de BSA (30 μ M) na ausência e na presença de concentrações variadas dos complexos [Cu(Shyd)(bpy)] (A) e [Cu(Shyd)(phen)] (B), ($r=0,25$; $r=0,5$; $r=1$ e $r=2$), onde $r=$ [complexo 1]/[BSA].

Em ambos os espectros de dicroísmo circular observa-se que tanto com a adição de **[Cu(Shyd)(bpy)]** (A) quanto **[Cu(Shyd)(phen)]** (B) ocorreu uma diminuição da intensidade das bandas da BSA. Assim, a ligação do complexo de cobre (II) à BSA induziria alterações na sua estrutura secundária, fato já demonstrado por diversos autores (SUNDARAVADIVEL et al., 2014; WU et al., 2014; SHAHABADI; MAGHSUDI, 2009).

Podemos perceber também que mesmo com a adição e aumento da concentração dos complexos os espectros continuam similares em forma, quando comparados aquele que contem somente BSA, o que provavelmente nos leva a crer que a ligação complexo-BSA apenas induza mudanças na estrutura da proteína, e não afete a porcentagem de α -hélices presente na mesma (SHAHABADI; MAGHSUDI, 2009). Além disso, os espectros mostram que as mudanças causadas pelo complexo **[Cu(Shyd)(phen)]** são muito mais expressivas do que as causadas pelo complexo **[Cu(Shyd)(bpy)]**, o que sugere que **[Cu(Shyd)(phen)]** esteja interagindo mais fortemente com a proteína.

Para determinar qual o efeito da concentração e do tempo de incubação na velocidade de clivagem da proteína, foi incubada uma concentração constante de BSA (15 μ M), 100 μ M de complexo, com retirada de alíquotas em diferentes intervalos de tempo (0-4h). Tratando os dados com uma cinética de pseudo-primeira-ordem, onde há um excesso de catalisador em relação ao substrato, estimou-se um k_{obs} de 0,7159h⁻¹ com o complexo **[Cu(Shyd)(bpy)]**, o que representa um tempo de meia vida de ~58min para a BSA intacta. Nas mesmas condições, o k_{obs} da reação com o complexo **[Cu(Shyd)(phen)]** foi de 1,279h⁻¹ e um $t_{1/2}$ de ~33 min para a BSA intacta (Figura 36). Analisando o comportamento cinético dos complexos, é possível verificar que o complexo **[Cu(Shyd)(phen)]** é mais veloz na clivagem da proteína BSA quando comparado com **[Cu(Shyd)(bpy)]**, o que corrobora com o já visto nos ensaios de clivagem e interação.

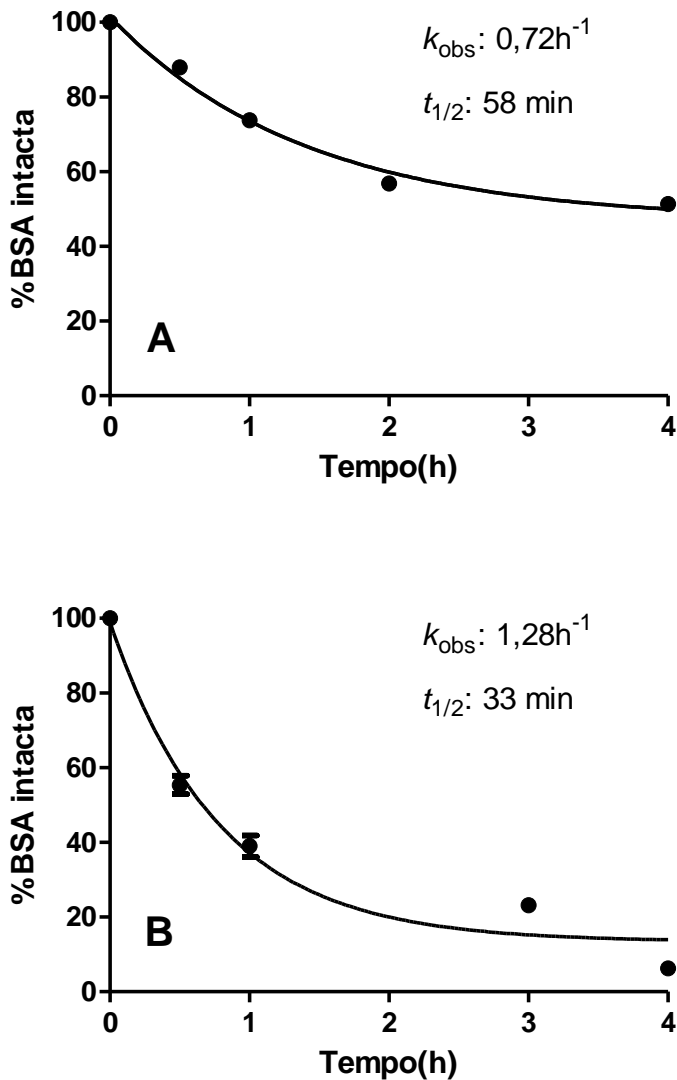


Figura 34. Plote da fração de BSA intacta (%) em função do tempo(h) após o tratamento com os complexos $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{bpy})]$ (A) e $[\text{Cu}(\text{Shyd})(\text{phen})]$ (B) ($100\mu\text{M}$). As reações foram mantidas a 50°C ,

com retirada de alíquotas em diferentes intervalos de tempo. Dados representativos de dois ensaios com média \pm DP.

Este fato nos levar a acreditar, analisando a estrutura dos complexos, que a troca da bipyridina presente no complexo **[Cu(Shyd)(bpy)]** pela fenantrolina pertencente ao **[Cu(Shyd)(phen)]** favorece a interação com a BSA e consequente clivagem da mesma, sugerindo que esse ligante afetaria o equilíbrio eletroquímico facilitando assim a reação de oxidação das ligações peptídicas mais fortemente por **[Cu(Shyd)(phen)]**.

Para dar embasamento à hipótese de que **[Cu(Shyd)(bpy)]** e **[Cu(Shyd)(phen)]** clivam a BSA por um mecanismo oxidativo, a mesma foi incubada com dois sequestradores de espécies reativas de oxigênio: DMSO, sequestrador do radical hidroxila (OH^\bullet) e SOD, sequestrador do radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). Analisando a figura 37, é possível perceber que ambos os sequestradores diminuam relativamente a atividade dos complexos na BSA, corroborando com a hipótese de que estes atuam por um mecanismo oxidativo. Apesar desta diminuição ter sido pequena, aproximadamente 20%, estes mesmos complexos já foram testados por nosso grupo tendo como substrato o DNA e o mesmo resultado foi obtido (comunicação pessoal Tiago Bortolotto).

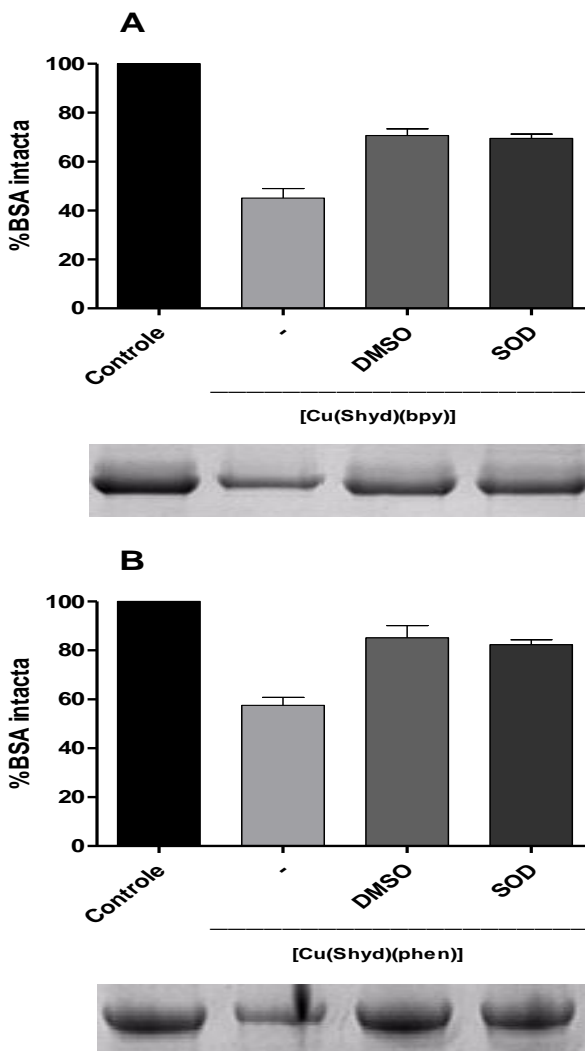


Figura 35. Efeito dos sequestradores de espécies reativas de oxigênio na BSA (%) quando incubados com 200 μ M de [Cu(Shyd)(bpy)] (A) e [Cu(Shyd)(phen)] (B), durante 4h a 50°C. Dados representativos de dois ensaios diferentes \pm DP.

Estudos de outro grupo de pesquisa também sugerem um mecanismo oxidativo mesmo quando há pouca inibição de clivagem, isto porque as espécies reativas de oxigênio seriam geradas muito próximas ao alvo, clivando-o rapidamente. Dessa forma, o sequestro das espécies geradas seria dificultado ou até mesmo impossibilitado (TAN; WANG; ZHU, 2009).

É muito bem esclarecida a presença de interações eletrostáticas quando se trata de complexos metálicos e DNA. Como já mencionado anteriormente (Figura 31), isto ocorre porque o grupamento fosfato do DNA lhe oferece carga negativa sendo assim muito provavelmente atraído pelos complexos, com carga positiva. As proteínas não sofrem tanto com a ação da força iônica, já que seus aminoácidos apresentam tanto carga negativa quanto positiva (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011). Dessa forma, a fim de esclarecer o efeito da força iônica sobre os complexos em estudo, foram adicionados a mistura reacional NaCl (0-200 μ M) e os resultados são apresentados na figura 38.

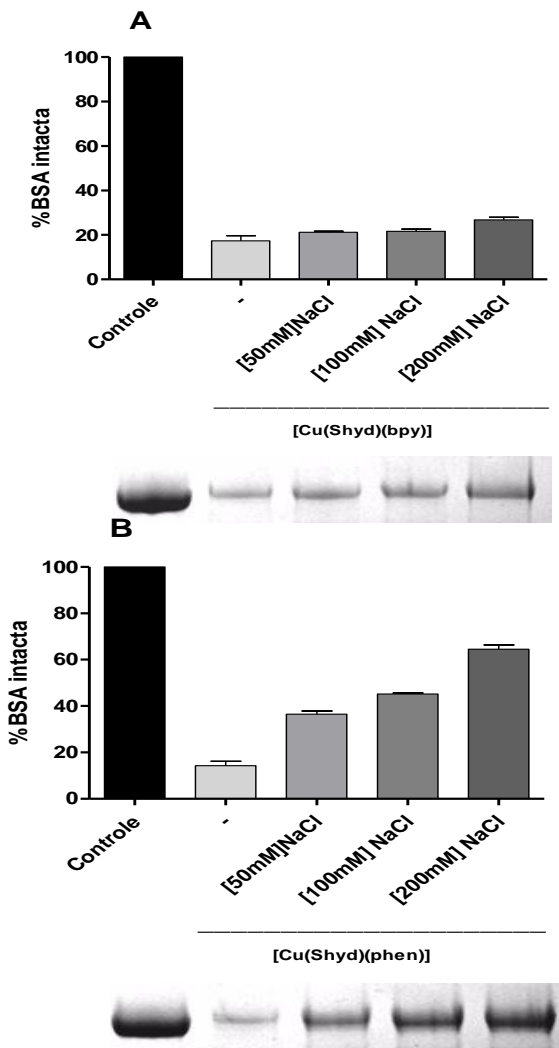


Figura 36. Efeito da adição de NaCl (50-200mM) sobre a atividade dos complexos **[Cu(Shyd)(bpy)]** (A) e **[Cu(Shyd)(phen)]** (B), incubados a 200 μ M, durante 4h a 50°C. Dados representativos de dois ensaios diferentes \pm DP.

Quando analisamos o efeito da força iônica frente a atividade dos complexos **[Cu(Shyd)(bpy)]** e **[Cu(Shyd)(phen)]** é notório que esta afeta mais **[Cu(Shyd)(phen)]**, tendo uma inibição de clivagem de aproximadamente 50% quando comparado com P6 que quase não é inibido pela adição do sal. Dessa forma, é possível sugerir que o ligante fenentrolina colabore para que ocorram mais interações eletrostáticas entre **[Cu(Shyd)(phen)]** e a BSA, dando mais uma vez suporte a hipótese que o ligante fenantrolina auxilia na interação e clivagem da proteína.

5 Conclusões

- Complexo mononuclear de Lantânio (III) – Interação de clivagem de DNA.

O complexo mononuclear de Lantânio(III) não imobilizado mostrou-se mais eficiente na clivagem de DNA plasmidial sob a condição de clivagem em pH 7,0, 50°C e 50µM do complexo, apresentando uma clivagem de aproximadamente 80% nesta condição. A interação com o DNA acontece via interações eletrostáticas e por ambos os sulcos do mesmo, evidenciada pelos experimentos de força iônica e inibidores dos sulcos do DNA. A clivagem do ácido nucleico ocorre via mecanismo hidrolítico, visto que quando este foi incubado com os sequestradores de espécies reativas de oxigênio não houve diminuição da atividade em nenhuma condição testada.

Quando a atividade do complexo não imobilizado foi comparada com o mesmo imobilizado em Sílica 3-aminopropil, foi possível observar que ambos possuem atividade frente ao DNA, sendo esta mais evidenciada no complexo não imobilizado. O que sugere o desproporcionamento, promovido pelo DNA, do complexo mononuclear de lantânio, semelhante ao que a sílica promove, onde uma base de azoto do DNA (A, C ou G) doaria uma amina primária e formaria uma base de Schiff com o complexo não imobilizado.

- Complexo mononuclear de Cobre (II) – Interação e clivagem de DNA

O complexo mononuclear de Cu(II) foi capaz de clivar DNA com concentrações em µM, em uma ampla faixa de pHs (6,0 a 9,0) a 37°C, sendo em pH 9,0 a maior atividade.

Visto que ocorre diminuição da intensidade de ambas as bandas do DNA (275 e 245 nm) no espectro de dicroísmo circular, é possível sugerir que a interação entre complexo e ácido nucleico ocorra via sulcos do DNA e interações eletrostáticas. Este dado foi ratificado com os experimentos subsequentes, com os quais foi possível sugerir que o acesso ao DNA dá-se por ambos os sulcos.

O mecanismo pelo qual ocorre a clivagem parece ser oxidativo, havendo principalmente a formação de duas espécies reativas de oxigênio: os radicais hidroxil ($\cdot\text{OH}$) e derivados de peróxidos (R-O-OH),

fato corroborado pelo teste em atmosfera de argônio que diminuiu drasticamente a atividade do complexo sob estas condições.

Analisando a constante de catálise do complexo ($0,887 \text{ h}^{-1}$) fica evidente o papel de nuclease deste e de como a adição da purina foi relevante para o aumento da atividade e interação deste com o DNA.

- Complexos mononucleares de Cobre (II) – Interação e clivagem de proteína.

Estes complexos mostraram-se bastante ativos na clivagem de BSA em concentrações micromolares e pH 7,0 e 9,0. Testes na presença de inibidores de espécies reativas de oxigênio indicaram a ocorrência de um mecanismo oxidativo, envolvendo os radicais hidroxila (OH) e ânion superóxido (O_2^-), via interações eletrostáticas. Sendo o complexo **[Cu(Shyd)(phen)]** mais eficiente na clivagem de BSA que **[Cu(Shyd)(bpy)]**, muito provavelmente devido ao seu ligante fenantrolina.

6 Perspectivas

- Determinar o(s) sítio(s) de clivagem de DNA e BSA utilizados pelos complexos **CuLPu**, [**Cu(Shyd)(bpy)**] e [**Cu(Shyd)(phen)**] através de espectrometria de massas por Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser, com detecção por Tempo de Voo (MALDIToF- MS, do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization with Time of Flight Mass Spectrometry*) e por *DNA footprinting*.
- Determinar os parâmetros termodinâmicos da interação entre os complexos e o DNA por meio de calorimetria de titulação isotérmica (ITC, do inglês, *Isothermal Titration Calorimetry*) e cinéticos por ressonância plasmônica de superfície (SPR, do inglês, *Surface Plasmon Resonance*).
- Verificar por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS, do inglês, *Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) produtos de oxidação do DNA e BSA gerados pelo tratamento com os complexos.
- Verificar a potencial atividade do complexo **CuLPu** frente à clivagem de proteínas de baixa massa molecular.

7 Referências bibliográficas

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

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

BEDIOUI, F. Zeolite-encapsulated and clay-intercalated metal porphyrin, phthalocyanine and Schiff-base complexes as models for biomimetic oxidation catalysts: an overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 144, n. 0, p. 39-68, 1995.

BEDIOUI, F.; DEVYNCK, J.; BIED-CHARRETON, C. Immobilization of metalloporphyrins in electropolymerized films: design and applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 28, n. 1, p. 30-36, 1995.

BEHNAMFAR, M. T. et al. Experimental and molecular modeling studies of the interaction of the polypyridyl Fe(II) and Fe(III) complexes with DNA and BSA. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 134, n. 0, p. 502-516, 2015.

BLACKBURN, M. et al. **Nucleic Acids in Chemistry and Biology**. New York: Oxford University Press, 1997.

BÜNZLI, J.-C. G.; FIGUET, C. Lanthanide-Containing Molecular and Supramolecular Polymetallic Functional Assemblies. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 6, p. 1897-1928, 2002.

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.

BURROWS, C. J.; MULLER, J. G. Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1109-1152, 1998.

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

CAMARGO, M. A. et al. New gadolinium complex with efficient hydrolase-like activity: A 100-million-fold rate enhancement in diester hydrolysis. **Inorganic Chemistry**, v. 47, n. 8, p. 2919-2921, 2008.

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

CHEN, J.-X. et al. Synthesis, characterization and potent DNA-cleaving activity of copper(II)-complexed berberine carboxylate. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 23, p. 7056-7059, 2012.

CHEN, L.-M. et al. Experimental and theoretical studies on the DNA-binding and spectral properties of water-soluble complex [Ru(MeIm)₄(dpq)]²⁺. **Journal of Molecular Structure**, v. 881, n. 1–3, p. 156-166, 2008.

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

CLAUSSEN, C. A.; LONG, E. C. Nucleic Acid Recognition by Metal Complexes of Bleomycin. **Chemical Reviews**, v. 99, n. 9, p. 2797-2816, 1999.

COSTAS, M. et al. Dioxygen Activation at Mononuclear Nonheme Iron Active Sites: Enzymes, Models, and Intermediates. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 939-986, 2004.

DE ALMEIDA, V. R. et al. In vitro and in vivo activity of a new unsymmetrical dinuclear copper complex containing a derivative ligand of 1,4,7-triazacyclononane: catalytic promiscuity of [Cu₂(L)Cl₃]. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 19, p. 7059-7073, 2013.

DE OLIVEIRA, M. C. B. et al. Hydrolytic Protein Cleavage Mediated by Unusual Mononuclear Copper(II) Complexes: X-ray Structures and Solution Studies. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 921-929, 2005.

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

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.

FRANKLIN, S. J. Lanthanide-mediated DNA hydrolysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 2, p. 201-208, 2001.

GANESHPANDIAN, M. et al. Interaction of mixed ligand copper(II) complexes with CT DNA and BSA: Effect of primary ligand hydrophobicity on DNA and protein binding and cleavage and anticancer activities. **Polyhedron**, v. 52, n. 0, p. 924-938, 2013.

GAO, C. Y. et al. Synthesis, characterization, DNA binding and cleavage, BSA interaction and anticancer activity of dinuclear zinc complexes. **Dalton Transactions**, v. 41, n. 39, p. 12220-12232, 2012.

GARBETT, N. C.; RAGAZZON, P. A.; CHAIRES, J. B. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions. **Nat. Protocols**, v. 2, n. 12, p. 3166-3172, 2007.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J. L. et al. A Dinuclear Copper(II) Complex with Adeninate Bridge Ligands and Prominent DNA Cleavage Activity. Structural and Spectroscopic Characterization and Magnetic Properties. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 17, p. 7178-7188, 2007.

GHARAGOZLOU, M.; BOGHAEI, D. M. Interaction of water-soluble amino acid Schiff base complexes with bovine serum albumin: Fluorescence and circular dichroism studies. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 71, n. 4, p. 1617-1622, 2008.

GOSWAMI, T. K. et al. Photoinduced DNA and Protein Cleavage Activity of Ferrocene-Appended L-Methionine Reduced Schiff Base Copper(II) Complexes of Phenanthroline Bases. **Organometallics**, v. 28, n. 7, p. 1992-1994, 2009.

HE, J. et al. Phosphodiester hydrolysis and specific DNA binding and cleavage promoted by guanidinium-functionalized zinc complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, n. 5, p. 851-858, 2009.

HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Hydrolysis of Unactivated Peptide Bonds by a Macrocyclic Copper(II) Complex: Cu([9]aneN3)Cl2 Hydrolyzes Both Dipeptides and Proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 117, n. 26, p. 7015-7016, 1995.

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.

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.

JANG, S. W.; SUH, J. Proteolytic Activity of Cu(II) Complex of 1-Oxa-4,7,10-triazacyclododecane. **Organic Letters**, v. 10, n. 3, p. 481-484, 2008.

JIANG, B. et al. DNA-binding and hydrolytic cleavage promoted by tetraazamacycle La(III) and Ce(III) complexes. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 7, p. 3398-3404, 2013.

KATKAR, P. et al. Effect of oxindolimine copper(ii) and zinc(ii) complexes on human topoisomerase I activity. **Metallomics**, v. 6, n. 1, p. 117-125, 2014.

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

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAHIRI, D. et al. Anaerobic DNA cleavage in red light by dicopper(II) complexes on disulphide bond activation. **Journal of Chemical Sciences**, v. 122, n. 3, p. 321-333, 2010.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. v. 5, 2011.

LOGANATHAN, R. et al. Mixed ligand μ -phenoxo-bridged dinuclear copper(ii) complexes with diimine co-ligands: Efficient chemical nuclease and protease activities and cytotoxicity. **Dalton Transactions**, v. 43, n. 16, p. 6177-6194, 2014.

LU, J. et al. Synthesis, crystal structure, DNA cleavage properties, and protein binding activities of an unsymmetrical dinuclear copper(II) complex. **Journal of Coordination Chemistry**, v. 67, n. 2, p. 300-314, 2014.

MANCIN, F.; SCRIMIN, P.; TECILLA, P. Progress in artificial metallonucleases. **Chemical Communications**, v. 48, n. 45, p. 5545-5559, 2012.

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

MASH, H. E. et al. Complexation of Copper by Zwitterionic Aminosulfonic (Good) Buffers. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 3, p. 671-677, 2002.

MIRICA, L. M.; OTTENWAELDER, X.; STACK, T. D. P. Structure and Spectroscopy of Copper–Dioxygen Complexes. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 2, p. 1013-1046, 2004.

MORROW, J. R.; AURES, K.; EPSTEIN, D. Metal ion promoted attack of an alcohol on a phosphate diester: modelling the role of metal ions in RNA self-splicing reactions. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 23, p. 2431-2432, 1995.

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.

MORROW, J. R.; TROGLER, W. C. Hydrolysis of phosphate diesters with copper(II) catalysts. **Inorganic Chemistry**, v. 27, n. 19, p. 3387-3394, 1988.

MUXEL, A. **SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDOS DE REATIVIDADE DE NOVOS COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO DE LANTÂNIO E TÉRBIO: RELEVÂNCIA COMO HIDROLASES SINTÉTICAS**. 2014. (Doutor). Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina

MUXEL, A. A. et al. New La(III) Complex Immobilized on 3-Aminopropyl-Functionalized Silica as an Efficient and Reusable Catalyst for Hydrolysis of Phosphate Ester Bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2943-2952, 2014.

NISHINO, T.; MORIKAWA, K. Structure and function of nucleases in DNA repair: shape, grip and blade of the DNA scissors. **Oncogene**, v. 21, p. 9022-9032, 2002.

OLIVEIRA, M. C. B. **Nucleases Sintéticas: Caracterização bioquímica e mecanismo de ação sobre DNA**. 2006. 119 p (Tese de doutorado em Química). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

OLIVEIRA, M. C. B. et al. Mononuclear CuII-Phenolate Bioinspired Complex is Catalytically Promiscuous: Phosphodiester and Peptide Amide Bond Cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 48, n. 7, p. 2711-2713, 2009.

PANG, R. et al. Design and SAR of new substituted purines bearing aryl groups at N9 position as HIV-1 Tat-TAR interaction inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 16, n. 17, p. 8178-8186, 2008.

PANJA, A. et al. DNA Cleavage by the Photocontrolled Cooperation of ZnII Centers in an Azobenzene-Linked Dizinc Complex. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 22, p. 11437-11445, 2011.

PECCI, L.; MONTEFOSCHI, G.; CAVALLINI, D. Some New Details of the Copper-Hydrogen Peroxide Interaction. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 235, n. 1, p. 264-267, 1997.

PERALTA, R. A. et al. New unsymmetric dinuclear CuIICuII complexes and their relevance to copper(II) containing metalloenzymes and DNA cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, n. 5-6, p. 992-1004, 2006.

PIOVEZAN, C. et al. Heterodinuclear FeIIIZnII-Bioinspired Complex Supported on 3-Aminopropyl Silica. Efficient Hydrolysis of Phosphate Diester Bonds. **Inorganic Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 2580-2582, 2010.

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

POGOZELSKI, W. K.; TULLIUS, T. D. Oxidative Strand Scission of Nucleic Acids: Routes Initiated by Hydrogen Abstraction from the Sugar Moiety. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 3, p. 1089-1108, 1998.

RAJA, A. et al. Copper(II) complexes of tridentate pyridylmethylethylenediamines: Role of ligand steric hindrance on DNA binding and cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, n. 8, p. 1717-1732, 2005.

RAJARAJESWARI, C. et al. Copper(ii) complexes with 2NO and 3N donor ligands: synthesis, structures and chemical nuclease and anticancer activities. **Dalton Transactions**, v. 42, n. 23, p. 8347-8363, 2013.

RAJENDIRAN, V. et al. Cleavage of Proteins by a Mixed-Ligand Copper(II) Phenolate Complex: Hydrophobicity of the Diimine Coligand Promotes Cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 46, n. 25, p. 10446-10448, 2007.

ROY, M. et al. Photo-induced double-strand DNA and site-specific protein cleavage activity of l-histidine (μ -oxo)diiron(III) complexes of heterocyclic bases. **Dalton Transactions**, n. 24, p. 4671-4682, 2009.

ROY, M. et al. Dicopper(II) complexes showing DNA hydrolase activity and monomeric adduct formation with bis(4-nitrophenyl)phosphate. **Inorganica Chimica Acta**, v. 375, n. 1, p. 173-180, 2011.

SANTRA, B. K. et al. Oxidative cleavage of DNA by a dipyridoquinoxaline copper(II) complex in the presence of ascorbic acid. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 89, n. 3-4, p. 191-196, 2002.

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.

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

SERPERSU, E. H.; SHORTLE, D.; MILDVAN, A. S. Kinetic and magnetic resonance studies of active-site mutants of staphylococcal nuclease: factors contributing to catalysis. **Biochemistry**, v. 26, n. 5, p. 1289-1300, 1987.

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

SHAHABADI, N.; MAGHSUDI, M. Binding studies of a new copper (II) complex containing mixed aliphatic and aromatic dinitrogen ligands with bovine serum albumin using different instrumental methods. **Journal of Molecular Structure**, v. 929, n. 1–3, p. 193-199, 2009.

SIGMAN, D. S. Nuclease activity of 1,10-phenanthroline-copper ion. **Accounts of Chemical Research**, v. 19, n. 6, p. 180-186, 1986.

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

SILVA, P. P. et al. Correlation between DNA interactions and cytotoxic activity of four new ternary compounds of copper(II) with N-donor heterocyclic ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 132, n. 0, p. 67-76, 2014.

SILVA, P. P. et al. Two New Ternary Complexes of Copper(II) with Tetracycline or Doxycycline and 1,10-Phenanthroline and Their Potential as Antitumoral: Cytotoxicity and DNA Cleavage. **Inorganic Chemistry**, v. 50, n. 14, p. 6414-6424, 2011.

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.

SUNDARAVADIVEL, E. et al. DNA/BSA binding, DNA cleavage and electrochemical properties of new multidentate copper(ii) complexes. **RSC Advances**, v. 4, n. 77, p. 40763-40775, 2014.

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

THAMILARASAN, V.; JAYAMANI, A.; SENGOTTUVELAN, N. Synthesis, molecular structure, biological properties and molecular docking studies on MnII, CoII and ZnII complexes containing bipyridine–azide ligands. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 89, n. 0, p. 266-278, 2015.

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

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 Vitro Studies. **Analytical Biochemistry**, v. 265, n. 2, p. 193-201, 1998.

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.

WANG, J.-T. et al. An effective approach to artificial nucleases using copper(ii) complexes bearing nucleobases. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 8, p. 2128-2136, 2010.

WANG, Q. et al. Synthesis, characterization, DNA interaction, and antitumor activities of Ia (III) complex with schiff base ligand derived from kaempferol and diethylenetriamine. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2014, 2014.

WOLFENDEN, R. Degrees of Difficulty of Water-Consuming Reactions in the Absence of Enzymes. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 8, p. 3379-3396, 2006.

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.

WU, H. et al. Effects of Cu²⁺ and pH on the binding of alizarin red S to bovine serum albumin based on the analysis of protein conformation. **Analytical Methods**, v. 6, n. 13, p. 4729-4733, 2014.

YANG, Z.; WANG, Y.; YANG, G. Copper (II) complex of 1,10-phenanthroline and l-tyrosine with DNA oxidative cleavage activity in the gallic acid. **BioMetals**, v. 24, n. 4, p. 737-745, 2011.

YOO, S. H. et al. Artificial Metalloprotease with Active Site Comprising Aldehyde Group and Cu(II)Cyclen Complex. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 26, p. 9593-9602, 2005.

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.

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.

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.

ZHU, L.; KOSTIĆ, N. M. Selective hydrolysis of peptides, promoted by palladium aqua complexes: kinetic effects of the leaving group, pH, and inhibitors. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 11, p. 4566-4570, 1993.

ZHU, L.; KOSTIĆ, N. M. Sequence-dependent cleavage of albumins with palladium(II) complexes: role of serine residue in controlling the high regioselectivity of protein cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 339, n. 0, p. 104-110, 2002.