



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

**ATIVIDADE DE COMPLEXOS METÁLICOS SOBRE
BIOMOLÉCULAS: INTERAÇÃO E CLIVAGEM**

FRANCIELE LUANE FISCHER

Florianópolis
2010

FRANCIELE LUANE FISCHER

**ATIVIDADE DE COMPLEXOS METÁLICOS SOBRE
BIOMOLÉCULAS: INTERAÇÃO E CLIVAGEM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química, sob orientação do Prof. Dr. Hernán Terenzi e co-orientação do Prof. Dr. Ademir Neves.

Área de concentração: Química Orgânica

Florianópolis
2010

FRANCIELE LUANE FISCHER

**ATIVIDADE DE COMPLEXOS METÁLICOS SOBRE
BIOMOLÉCULAS: INTERAÇÃO E CLIVAGEM**

Esta dissertação foi julgada e aprovada para a obtenção do título de Mestre em Química no Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 24 de fevereiro de 2010.

Prof. Dr. Ademir Neves
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hernán Terenzi
Orientador

Prof. Dr. Ademir Neves
Co-Orientador

Prof. Dr. Antônio Carlos Joussef
(UFSC-SC)

Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Cardoso
Severino
(UFSC-SC)

Prof^ª. Dr^ª. Rosely A. Peralta
(UFSC-SC)

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios... Por isso, cante, ria, dance, chore e viva intensamente cada momento de sua vida, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos...”

Charles Chaplin

“Ainda bem que chegamos a um paradoxo. Agora, há esperança de conseguirmos algum progresso.”

Niels Bohr

*Aos meus pais Inilson e Emir, à minha irmã
Jéssica e ao meu noivo Carlos Eduardo.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida e saúde.

Aos meus pais Inilson e Emir pelo amor incondicional, pela dedicação, pelo apoio e por sempre acreditarem em mim e estarem presentes nos momentos mais difíceis.

À minha mana “Carola” pela paciência, por atender aos meus pedidos e por me aturar *quase* sempre.

Ao meu noivo por me compreender como ninguém, por me incentivar a todo o momento, pelo companheirismo, carinho, críticas, sugestões, conversas, brincadeiras, pela paciência, atenção e ajuda. Enfim, por ser essa pessoa única e maravilhosa que tornou a minha vida mais colorida.

À minha avó Trude, quem eu considero minha segunda mãe, por estar sempre preocupada com minha felicidade, saúde e segurança; ao meu avô, Zézinho, por me ensinar que basta ter fé, basta acreditar e, então, tudo é possível.

À minha prima Ana pelo grande exemplo de força, esperança e coragem.

À minha grande amiga Angi por tantos bons momentos vividos e por sempre acreditar na minha capacidade.

Ao professor Hernán Terenzi pela oportunidade e confiança no meu trabalho. Por estar sempre disposto a resolver os meus problemas e sanar minhas dúvidas.

À Patrícia, pela amizade, pela paciência e pelas horas de dedicação àquela menina da segunda fase que nem sabia usar uma pipeta.

Ao professor Ademir, à Renata e à Maryene por fornecerem os complexos analisados e pela atenção dedicada.

Aos colegas de laboratório Javier, Carol, Angela, Priscila, Gabi 1, Gabi 2, Camila, Claus, Tiago, Jean, Manuel pelos imprescindíveis momentos de descontração, pela ajuda e amizade. Em especial à Gisa por aturar minhas loucuras pacientemente.

Ao programa CNPq-PIBIC pelo suporte financeiro.

À UFSC e aos professores do curso pelo ensino diferenciado e de qualidade.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	v
SUMÁRIO	vi
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 DNA	1
1.1.1 Estrutura Química	1
1.1.2 DNA Plasmidial	4
1.2 Nucleases Químicas	6
1.2.1 Complexos de Cobre.....	8
1.2.2 Complexos de Lantanídeos	10
1.3 Aminoácidos e proteínas.....	13
1.4 Proteases Químicas	18
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 METODOLOGIA.....	23
3.1 Complexos em estudo	23
3.1.1 Complexos binucleares de cobre(II)	23
3.1.1.1 $[\text{Cu}_2(\text{HL1})(\text{OAc})](\text{ClO}_4)_2 \cdot (\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ - Complexo 1..	23
3.1.1.2 $[\text{Cu}_2(\text{HL2})(\text{OAc})](\text{ClO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot (\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ - Complexo	26
2.....	
3.1.2 Complexo trinuclear de gadolínio(III)	28

3.2 DNA plasmidial	31
3.2.1 Extração de DNA plasmidial	31
3.3 Estudos de clivagem de DNA plasmidial.....	32
3.3.1 Eletroforese em gel de agarose	33
3.3.2 Efeito do PH e da concentração dos complexos	36
3.3.3 Teste em atmosfera de Argônio	37
3.3.4 Estudos Mecanísticos	37
3.3.5 Efeito da força iônica	38
3.3.6 Cinética de clivagem de DNA plasmidial	38
3.4 Estudos de clivagem de proteína.....	39
3.4.1 SDS-PAGE.....	39
3.5 Estudos de interação dos complexos com DNA e BSA.....	40
3.5.1 Dicroísmo Circular.....	40
3.5.2 Espectroscopia Eletrônica	41
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 Complexos binucleares de cobre(II)	42
4.1.1 Interação e clivagem de DNA plasmidial	42
4.1.2 Interação e clivagem de BSA	63
4.2 Complexo trinuclear de gadolínio(III)	79
4.2.1 Interação e clivagem de DNA plasmidial	79
5 CONCLUSÕES	86
6 PERSPECTIVAS	88
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura em dupla hélice do DNA.	1
Figura 2. Estrutura de um nucleotídeo.....	2
Figura 3. Estrutura das bases nitrogenadas do DNA.	2
Figura 4. O pareamento de bases da dupla-fita de DNA.	3
Figura 5. Representação das conformações das formas A, B e Z do DNA.....	4
Figura 6. As três diferentes formas do DNA plasmidial	6
Figura 7. Representação do mecanismo de hidrólise de uma ligação fosfodiéster via ataque nucleofílico de um grupo hidróxido	8
Figura 8. Estrutura do ligante [9]aneN ₃	9
Figura 9. Estrutura da neamina.....	9
Figura 10. Estrutura dos ligantes H ₃ bbppnol e H ₂ btppnol.....	10
Figura 11. O ligante binucleante L ₁	11
Figura 12. Estrutura do ligante HXTA.	12
Figura 13. O ligante tampão BTP (bis-tris-propano).....	12
Figura 14. Exemplos de ligantes utilizados em complexos de lantanídeos com atividade na clivagem de DNA.....	13
Figura 15. Estrutura geral de um aminoácido.....	14
Figura 16. Representação das duas formas de ressonância observadas em uma ligação peptídica	15
Figura 17. Esquema mostrando a disposição em um plano dos quatro átomos que compõem a unidade peptídica.	16
Figura 18. Representação dos quatro tipos de estruturas das proteínas	17
Figura 19. Mecanismo de hidrólise de uma ligação peptídica via ataque nucleofílico de um grupo hidróxido.....	19
Figura 20. Estruturas dos complexos de Pd ²⁺ estudados por Zhu e Kostic (2002)	20
Figura 21. Estrutura do ligante HL.....	21

Figura 22. Estrutura do ligante H ₂ L1	23
Figura 23. Projeção da estrutura molecular do cátion [Cu ₂ (HL1)(OAc)] ²⁺	24
Figura 24. Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o complexo 1	25
Figura 25. Proposta para os equilíbrios observados para o complexo 1 em solução	25
Figura 26. Estrutura do ligante H ₃ L2	26
Figura 27. Projeção da estrutura molecular do cátion [Cu ₂ (HL2)(OAc)] ⁺	27
Figura 28. Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o complexo 2	27
Figura 29. Proposta para os equilíbrios observados para o complexo 2 em solução	28
Figura 30. Estrutura do ligante H ₃ L3	29
Figura 31. ORTEP do complexo 3	30
Figura 32. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema Gd ₃ L3 ³⁺	30
Figura 33. Mapa do plasmídeo pBSK II	31
Figura 34. Esquema representativo do princípio do método utilizado pelo kit comercial HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN	32
Figura 35. Estrutura da agarose	33
Figura 36. Eletroforese em gel de agarose	35
Figura 37. Estrutura Química dos tampões PIPES, HEPES e CHES. ...	36
Figura 38. Clivagem de DNA pelo complexo 1 em diferentes pHs	43
Figura 39. Clivagem de DNA pelo complexo 2 em diferentes pHs.	44
Figura 40. Clivagem de DNA plasmidial em diferentes concentrações de 1 e 2	45
Figura 41. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 1 em condições aeróbicas e anaeróbicas em pHs 8,0 e 9,0	47

Figura 42. Clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 2 em condições aeróbicas e anaeróbicas em pHs 8,0 e 9,0.....	47
Figura 43. Efeito da batocuproína na clivagem de DNA pelos complexos 1 e 2	48
Figura 44. Clivagem de DNA pelos complexos 1 e 2 na presença de diferentes inibidores de espécies reativas de oxigênio	51
Figura 45. Espectros de dicroísmo circular de CT-DNA na ausência e na presença de concentrações variadas do complexo 1	52
Figura 47. Estrutura química do verde de metila e da distamicina.....	54
Figura 48. Influência dos ligantes específicos dos sulcos menor e maior do DNA, distamicina e verde de metila, na atividade de clivagem de DNA dos complexos 1 e 2	55
Figura 49. Efeito da força iônica na clivagem de DNA pelo complexo 1	56
Figura 50. Efeito da força iônica na clivagem de DNA pelo complexo 2	57
Figura 51. Titulação espectrofotométrica do complexo 1 na ausência e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA.....	59
Figura 52. Titulação espectrofotométrica do complexo 2 na ausência e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA.....	60
Figura 53. Gráfico de k_{obs} versus concentrações do complexo 1, mostrando um comportamento de saturação	61
Figura 54. Gráfico de k_{obs} versus concentrações do complexo 2, mostrando um comportamento de saturação	62
Figura 55. Clivagem de BSA em diferentes pHs e concentrações do complexo 1.....	64
Figura 56. Clivagem de BSA em diferentes pHs e concentrações do complexo 2.....	65
Figura 57. Gráfico das % de BSA clivada após a incubação com diferentes concentrações do complexo 1 em pH 8,0	66
Figura 58. Gráfico das % de BSA clivada após a incubação com diferentes concentrações do complexo 2 em pH 8,0.	67

Figura 59. Gráfico das % de BSA não clivada em condições aeróbias (oxigênio) e anaeróbias (argônio) após incubação durante 6 horas a 37 °C na presença do complexo 1	68
Figura 60. Gráfico das % de BSA não clivada em condições aeróbias (oxigênio) e anaeróbias (argônio) após incubação durante 6 horas a 37 °C na presença do complexo 2	69
Figura 61. Espectros de dicroísmo circular de BSA na ausência e na presença de concentrações variadas do complexo 1	71
Figura 62. Espectros de dicroísmo circular de BSA na ausência e na presença de concentrações variadas do complexo 2	72
Figura 63. Efeito da força iônica na clivagem de BSA pelo complexo 1	74
Figura 64. Efeito da força iônica na clivagem de BSA (15 µM) pelo complexo 2	75
Figura 65. Clivagem de BSA em diferentes tempos de incubação e concentrações do complexo 1 , onde se observa o desaparecimento da banda de BSA.....	76
Figura 66. Variação das constantes de velocidade de clivagem (k_{obs}) em função da concentração do complexo 1 , mostrando um comportamento de saturação.....	77
Figura 67. Variação das constantes de velocidade de clivagem (k_{obs}) em função da concentração do complexo 2 , mostrando um comportamento de saturação.....	77
Figura 68. Clivagem de DNA plasmidial em diferentes pHs e concentrações do complexo 3	79
Figura 69. Experimento utilizando DMSO como captador de radicais livres nas reações do complexo 3	81
Figura 70. Análise de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo 3 na ausência (controles) e na presença da distamicina e do verde de metila.....	83
Figura 71. Variação das constantes de velocidade de clivagem (k_{obs}) em função da concentração do complexo 3 , mostrando um comportamento de saturação.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelos complexos **1** e **2**. 63

Tabela 2. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem de BSA catalisadas pelos complexos **1** e **2**. 78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Adenina
BSA	Albumina do soro bovino “ <i>Bovine Serum Albumin</i> ”
C	Citosina
CH₃CN	Acetonitrila
CHES	Ácido etanosulfônico 2-(ciclohexilamino)
Complexo 1	[Cu ₂ (HL1)(OAc)](ClO ₄) ₂ ·(CH ₃) ₂ CHOH
Complexo 2	[Cu ₂ (HL2)(OAc)](ClO ₄)·H ₂ O·(CH ₃) ₂ CHOH
Complexo 3	Gd ₃ (L3) ₂ (NO ₃) ₂ (H ₂ O) ₄]NO ₃ ·8H ₂ O
CT-DNA	DNA de timo de bezerro “ <i>Calf Thimus DNA</i> ”
DC	Dicroísmo circular
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FI	Forma superenovelada do plasmídeo
FII	Forma circular aberta do plasmídeo
FIII	Forma linear do plasmídeo
G	Guanina
HEPES	Ácido 1-etanosulfônico 4-(2-hidróxietil) piperazina
H₂L1	<i>N,N',N'</i> -[tris-(2-piridilmetil)]- <i>N</i> -[(2-hidróxi-3,5-di- <i>terc</i> -butilbenzil)]-1,3-propanodiamina-2-ol
H₃L2	<i>N,N</i> -[bis-(2-piridilmetil)]- <i>N',N'</i> -[(2-hidróxibenzil)(2-hidróxi-3,5-di- <i>terc</i> butilbenzil)] 1,3-propano diamina-2-ol
H₃L3	2-[<i>N</i> -bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[<i>N'</i> -bis(2-hidroxi-2-oxoetil) aminometil]fenol
pBSK II	Plasmídeo Bluescript SK II
pb	Pares de bases de DNA
PIPES	Ácido dietanosulfônico 1,4-piperazina
T	Timina

RESUMO

Nucleases e proteases são enzimas da classe das hidrolases. As primeiras são capazes de clivar ligações fosfodiéster na molécula de DNA. As proteases, por sua vez, atuam na hidrólise de ligações peptídicas nas proteínas. Em função disso, essas enzimas têm inúmeras aplicações, principalmente, em processos bioquímicos e biotecnológicos. Nesse sentido, nas últimas décadas têm sido desenvolvidos diversos modelos de nucleases artificiais e, mais recentemente, de proteases artificiais. Estes são basicamente complexos mono, di ou multi metálicos que incluem metais como Fe, Zn, Cu, Co, lantanídeos, entre outros. Muitos destes complexos não só ajudaram a entender os mecanismos envolvidos em reações catalisadas por enzimas, mas também demonstraram possuir propriedades antitumorais e antimicrobianas, além de auxiliarem no seqüenciamento e elucidação de estruturas de proteínas.

Neste trabalho, foi avaliada a atividade de novos complexos metálicos na clivagem de DNA plasmidial e de uma proteína, a albumina do soro bovino (BSA). Para tanto, os complexos metálicos testados foram os seguintes: os complexos binucleares de cobre(II) – $[\text{Cu}_2(\text{HL1})(\text{OAc})](\text{ClO}_4)_2 \cdot (\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ (**1**), sintetizado a partir do ligante não simétrico, binucleante $\text{H}_2\text{L1}$ (*N,N',N'*-[tris-(2-piridilmetil)]-*N*-[(2-hidróxi-3,5-di-*terc*-butilbenzil)]-1,3-propanodiamina-2-ol) e $[\text{Cu}_2(\text{HL2})(\text{OAc})](\text{ClO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot (\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ (**2**), sintetizado a partir do ligante não simétrico, binucleante $\text{H}_3\text{L2}$ (*N,N*-[bis-(2-piridilmetil)]-*N',N'*-[(2-hidróxibenzil)(2-hidróxi-3,5-di-*terc*butilbenzil)] 1,3 propano diamina-2-ol) – e o complexo trinuclear de gadolínio(III) – $\text{Gd}_3(\text{L3})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_4 \cdot \text{NO}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**3**), sintetizado a partir do ligante $\text{H}_3\text{L3}$ (2-[*N*-bis-(2-piridilmetil)aminometil]-4-metil-6-[*N'*-bis(2-hidroxi-2-oxoetil) aminometil]fenol).

Para avaliar a clivagem foram realizados testes em diferentes pHs, tempos de incubação e concentrações dos complexos. O mecanismo de ação foi determinado através de experimentos em atmosfera de argônio, testes na presença de inibidores de espécies reativas de oxigênio, de ligantes dos sulcos menor e maior do DNA e do agente quelante de cobre I (batocuproína). A interação foi observada através de titulações espectrofotométricas, espectros de dicroísmo circular e do efeito da força iônica na clivagem.

Os resultados obtidos mostram que todos os complexos são capazes de clivar o DNA plasmidial em baixas concentrações (μM) e pHs próximos ao fisiológico, com uma aceleração na casa de 10^6 - 10^7 vezes em relação à hidrólise espontânea do DNA. O mesmo foi observado para os complexos dinucleares de cobre na degradação de BSA. Ainda, a utilização de diferentes substratos (DNA ou BSA) provocou mudanças significativas no mecanismo de clivagem promovido pelos complexos **1** e **2**. Assim, quando o substrato é o DNA plasmidial, **1** atua através de um mecanismo oxidativo e **2** age por meio de um mecanismo misto (hidrolítico e oxidativo); nessas circunstâncias, **2** possui maior atividade e afinidade pelo DNA. Por outro lado, com a utilização da proteína como substrato, ambos os complexos procedem através de um mecanismo hidrolítico; nessas condições, **1** é o complexo mais efetivo e de maior interação com a proteína. Com relação ao complexo **3**, o mecanismo de clivagem de DNA plasmidial é hidrolítico, como observado para grande parte dos complexos de lantanídeos descritos na literatura.

Palavras-chave: Clivagem de DNA/proteínas, nucleases/proteases químicas.

ABSTRACT

Nucleases and proteases are hydrolase's class enzymes. The first ones are able to cleave phosphodiester bonds in the DNA molecules. On the other hand, proteases act in the hydrolysis of protein's peptide bonds. Because of this, these enzymes have several applications, mainly, in biochemical and biotechnological processes. Accordingly, in the last decades several artificial nucleases models have been developed. Recently, artificial proteases models have been developed too. These are, basically, mono, di or multi metallic complexes that include metals like Fe, Zn, Cu, Co, lanthanides, and others. Many of these complexes aided the understanding of mechanisms involved in enzymes catalyzed reactions and revealed to have antitumor and antimicrobial properties, in addition to help in the sequencing and elucidation of protein structures.

In this work, the activity of new metallic complexes on cleavage of plasmid DNA and a protein, the bovine serum albumin (BSA), has been evaluated. The analyzed metallic complexes were: the binuclear copper(II) complexes - $[\text{Cu}_2(\text{HL1})(\text{OAc})](\text{ClO}_4)_2 \cdot (\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ (**1**), synthesized from the non symmetrical ligand $\text{H}_2\text{L1}$ ($\text{N}',\text{N}',\text{N}$ - tris-(2-pyridylmethyl)- N -(2-hydroxy-3,5-di-tert-butylbenzyl)-1,3-propanodiamine-2-ol) and $[\text{Cu}_2(\text{HL2})(\text{OAc})](\text{ClO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot (\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ (**2**), synthesized from the non symmetrical ligand $\text{H}_3\text{L2}$ (N',N' - bis-(2-pyridylmethyl)- N , N - (2-hydroxybenzyl)(2-hydroxy-3,5-di-tert-butylbenzyl)-1,3-propanodiamine-2-ol) - and the trinuclear gadolinium(III) complex - $\text{Gd}_3(\text{L3})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_4] \text{NO}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**3**), synthesized from the ligand $\text{H}_3\text{L3}$ (2-[N -bis-(2-pyridylmethyl)aminomethyl]-4-methyl-6-[N' -bis(2-hydroxy-2-oxoethyl)aminomethyl]phenol).

In order to evaluate the cleavage, assays have been performed in different pH conditions, incubation times and complexes concentration. The mechanism of action was determined through experiments in argon atmosphere and also tests in presence of different reactive oxygen species scavengers, DNA minor and major groove binders and bathocuproine (a copper I stabilizer). The interaction has been observed through spectrophotometric titrations, circular dichroism and influence of ionic strength on DNA cleavage.

The results obtained show that all complexes are able to cleave plasmid DNA at low concentrations (μM) and pHs near to physiological, with a rate enhancement in the range of 10^5 - 10^7 fold. The same was observed on BSA degradation by binuclear copper(II) complexes. In addition, the use of different substrates (DNA or BSA)

induced significant changes on cleavage mechanism of the complexes **1** and **2**. Thus, when the substrate is the plasmid DNA, **1** act through an oxidative mechanism and **2** cleaves DNA by a mixed mechanism (hydrolytic and oxidative). In this case, **2** has higher activity and affinity by DNA. On the other hand, when the substrate is the BSA, both complexes behave via a hydrolytic pathway. In these conditions, **1** is the more active complex and has higher interaction with the protein. Concerning to complex **3**, the plasmid DNA cleavage mechanism is hydrolytic, like observed to majority of lanthanide complexes reported in the literature.

Key words: DNA/proteins cleavage, artificial nucleases/proteases.

1 INTRODUÇÃO

1.1 DNA

1.1.1 Estrutura Química

As moléculas de DNA são as mais longas das células vivas. Uma célula de *Escherichia coli*, por exemplo, contém uma molécula de DNA que, quando completamente estendida, possui cerca de 1000 vezes o tamanho da célula (PELCZAR et al., 1997).

A estrutura tridimensional do DNA foi resolvida e publicada por Watson e Crick em 1953 (WATSON; CRICK, 1953), mostrando que o DNA é composto por duas cadeias de polinucleotídeos enoveladas em torno de um eixo, formando uma dupla-hélice (Figura 1).

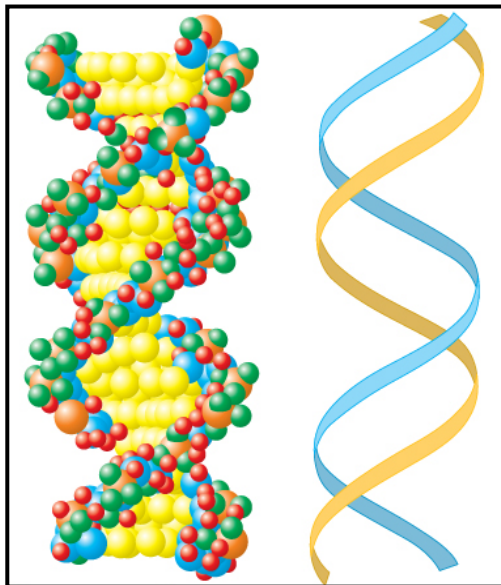


Figura 1. Estrutura em dupla hélice do DNA.

Os nucleotídeos são constituídos por uma base nitrogenada heterocíclica, uma pentose e um grupo fosfato (Figura 2). As seqüências de bases contêm a informação genética, enquanto o açúcar e o fosfato têm um papel estrutural (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

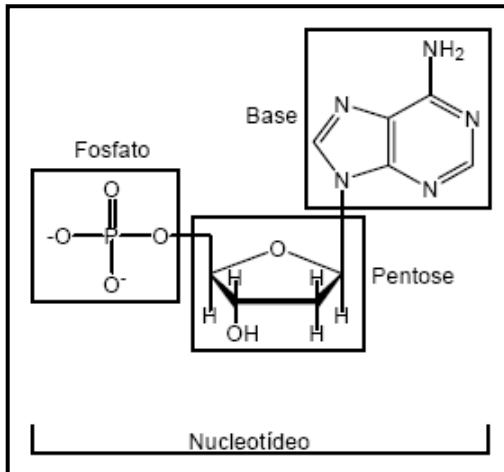


Figura 2. Estrutura de um nucleotídeo.

As bases nitrogenadas são derivadas de anéis de purinas e pirimidinas. No DNA, as purinas são adenina (A) e guanina (G) e as pirimidinas são citosina (C) e timina (T) (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995) (Figura 3).

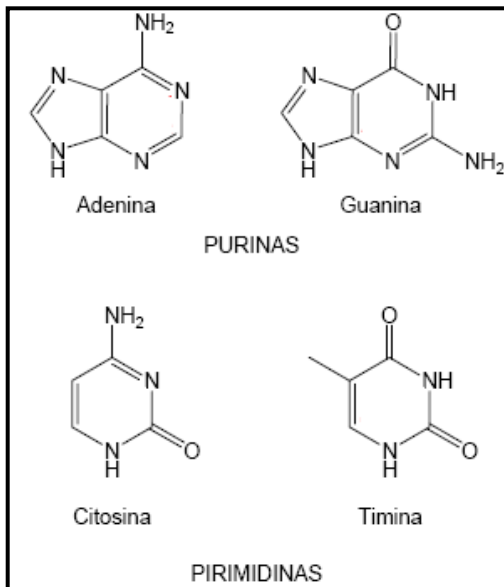


Figura 3. Estrutura das bases nitrogenadas do DNA.

A presença dos grupos carbonílico (C=O) e amino (C-NH₂) nas bases nitrogenadas permite a formação de ligações de hidrogênio entre elas. Assim, T pode parear com A através de duas ligações de hidrogênio; C e G, por sua vez, podem formar três ligações de hidrogênio entre si (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; HORNER, 2003) (Figura 4).

Ainda, os nucleotídeos estão ligados covalentemente uns aos outros através de grupos fosfato. Estas ligações são formadas pela junção do grupo 5'-fosfato de um nucleotídeo com o grupo 3'-OH de outro nucleotídeo, criando ligações fosfodiéster (Figura 4).

As ligações fosfodiéster que formam o esqueleto covalente do DNA são extremamente estáveis com relação à hidrólise não-enzimática. Isso acontece, pois em pH fisiológico as moléculas de DNA estão negativamente carregadas, o que inibe a hidrólise dessas ligações pelo ataque de nucleófilos. Este comportamento revela o porquê da escolha, pela natureza, do DNA como forma de armazenamento do material genético (WOLFENDEN; RIDGWAY; YOUNG, 1998).

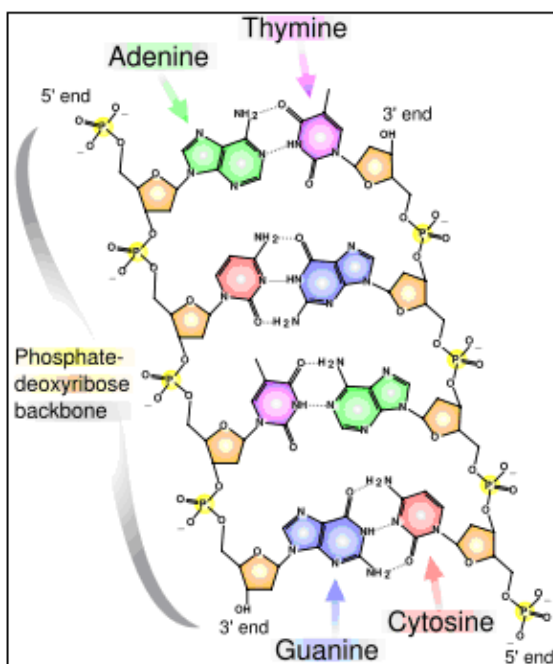


Figura 4. O pareamento de bases da dupla-fita de DNA (Disponível em: <<http://pt.Wikipedia.org/wiki/DNA>>. Acesso em: 10/01/2010).

O DNA existe em muitas conformações possíveis, sendo que as mais comuns são: A-DNA, B-DNA e Z-DNA (Figura 5). A dupla hélice proposta por Watson e Crick (Figura 1) apresenta-se na forma B do DNA, já que esta é a conformação mais abundante nas células vivas (LESLIE et al., 1980).

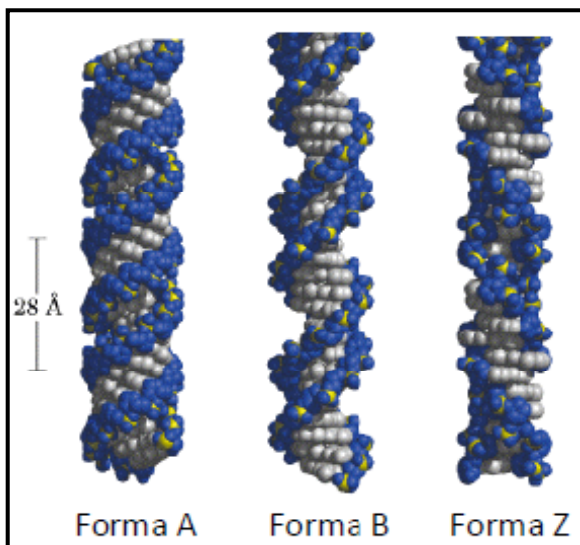


Figura 5. Representação das conformações das formas A, B e Z do DNA (Disponível em: < <http://www.bbioo.com/blife/UploadFiles/200511/20051113143400400.gif> >. Acesso em 20/01/2010).

Vários fatores podem influenciar no tipo de conformação adotado pelo DNA, entre eles: o nível de hidratação, a seqüência de DNA, o tipo e a concentração de íons metálicos em solução, etc (BASU et al., 1988).

Assim, a conformação A-DNA é favorecida em soluções com altas concentrações salinas (baixa hidratação). Já a forma B do DNA é mais estável em condições mais brandas (baixa concentração de sal).

1.1.2 DNA Plasmidial

Além do DNA cromossômico, bactérias e alguns fungos podem apresentar uma ou mais moléculas circulares de DNA dupla fita muito menores que o DNA cromossômico. Essas moléculas ficam livres no citoplasma e recebem o nome de plasmídios (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995). Podem existir até cinquenta cópias de um mesmo

plasmídeo em uma única célula (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995; HORNER, 2003).

Os plasmídios podem carregar genes capazes de conferir à célula hospedeira resistência a antibióticos como penicilina, amoxicilina e ampicilina. São facilmente extraídos intactos de bactérias, e podem ser geneticamente modificados, o que os torna uma ferramenta básica amplamente utilizada em processos biotecnológicos que envolvem manipulação gênica (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Além disso, as propriedades das diferentes formas do DNA plasmidial tornam os plasmídios excelentes modelos para estudos de interação e clivagem do DNA. Primeiramente, o superenovelamento faz com que a molécula de DNA esteja tensionada e que ao sofrer um corte em uma das fitas tende a perder esta tensão, “desenrolando” a superhélice e passando para a forma circular aberta (forma II ou F II). Um segundo corte, agora na fita oposta, leva à abertura do DNA circular, gerando a forma linear do plasmídeo (forma III ou F III). Em segundo lugar, as três diferentes formas do DNA plasmidial (F I, F II e F III) apresentam mobilidades distintas umas das outras, quando submetidas a uma diferença de potencial numa eletroforese em gel de agarose. Esta distinção de mobilidade ($F I > F III > F II$), devido ao diferente grau de compactação das moléculas, torna possível a completa separação, e posterior quantificação, das formas do DNA plasmidial (Figura 6) (OLIVEIRA, 2006; NAVARRO et al., 2003).

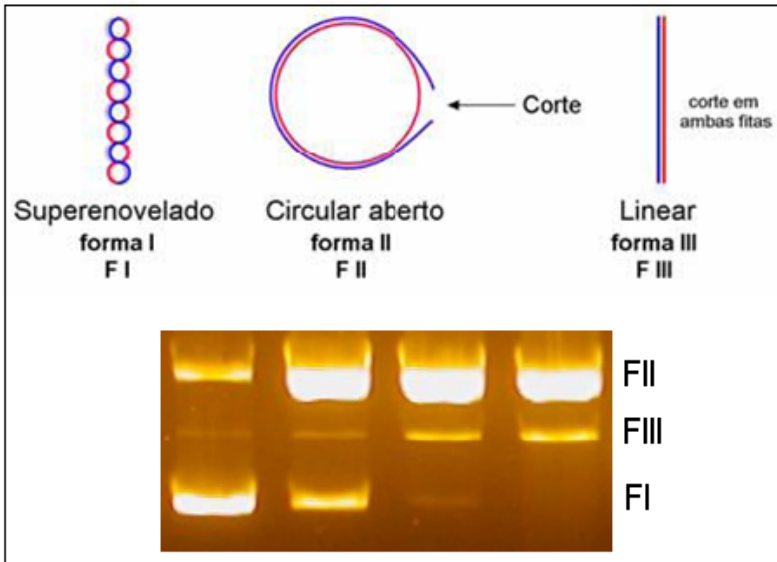


Figura 6. As três diferentes formas do DNA plasmidial. Na parte superior: representação esquemática das três diferentes formas das moléculas de DNA plasmidial. Na parte inferior: foto ilustrativa de um gel de agarose de amostras do plasmídeo pBSK-II, expostas a um complexo metálico capaz de gerar cortes nas fitas do DNA (OLIVEIRA, 2006).

1.2 NUCLEASES QUÍMICAS

Nucleases são enzimas capazes de clivar, ou cortar, as ligações fosfodiéster na molécula de ácido nucléico (DNA), normalmente, com alta especificidade (RANGARAJAN; SHANKAR, 2001). Assim, atuam sempre através de um mecanismo hidrolítico e possuem constantes de aceleração na faixa de 10^{12} a 10^{16} vezes em relação à hidrólise espontânea do DNA (KRAMER, 1999; SIGMAN; MAZUNDER; PERRIN, 1993). Em função disso, são de importância fundamental e grande utilidade por apresentarem um amplo espectro de aplicações em processos bioquímicos e biotecnológicos, como: o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante e a utilização em técnicas de seqüenciamento de DNA, técnicas de mapeamento genético e de mapeamento de cromossomos humanos (BASHKIN, 1999; MISHRA, 2002; MUTH; HENNELLY; HILL, 2000; OTT; KRAMER, 1999).

Nesse sentido, o desenvolvimento de novos modelos de nucleases (nucleases químicas ou nucleases artificiais), baseados em nucleases naturais, pode contribuir para o entendimento nos mecanismos de ação dessas enzimas, bem como esses novos modelos podem assumir o “papel” daquelas, atuando como catalisadores (BASHKIN, 1999).

Pelo fato de muitas enzimas possuírem íons metálicos no sítio ativo, atualmente existe cada vez mais nucleases químicas baseadas em complexos mono, di ou multi metálicos que incluem metais como Fe, Zn, Cu, Co, lantanídeos, entre outros (BRANUM et al., 2001; LIU et al., 2002; NEVES et al., 2001; ZHU et al., 2003; ROSSI et al., 2002; JEUNG et al., 2001). Muitos destes complexos ajudaram não só a entender os mecanismos envolvidos em reações catalisadas por enzimas, mas também demonstraram possuir propriedades antitumorais (CHAO et al., 2002; NOVAKOVA et al., 2003; WHITTAKER et al., 2001; ZHANG et al., 2005), antimicrobianas (NAVARRO et al., 2003) e de nucleases e peptidases (ZHU; KOSTIC, 2002; KAMINSKAIA; KOSTIC, 2001; MILOVIC; KOSTIC, 2002; RANA; MEARES, 1991; BURANAPRAPUK et al., 2008). Além disso, existem técnicas, como *footprinting*, que utilizam enzimas para clivar ácidos nucleicos e que, visando otimizar sua realização, poderiam ser substituídas por complexos metálicos, já que estes (por serem menores) podem clivar regiões do DNA não alcançadas por enzimas quando este está ligado a uma proteína, por exemplo.

Com relação ao mecanismo de ação, complexos metálicos podem clivar DNA essencialmente via dois processos: hidrolítico e/ou oxidativo.

O mecanismo de hidrólise envolve geralmente o ataque nucleofílico do oxigênio de uma molécula de água (ou de um grupo hidróxido) ao fosfato ligado à pentose do ácido nucleico, 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 re-ligáveis: R-OH e R-O-PO₃H₂ (LIU et al., 2004; MANCIN et al., 2005) (a Figura 7 representa o mecanismo geral de hidrólise de uma ligação fosfodiéster).

Geralmente, complexos metálicos que possuem mecanismo hidrolítico possuem centros metálicos capazes de coordenar moléculas de água em posição *cis*, o que facilita a ligação com a ponte fosfodiéster do DNA e o ataque nucleofílico ao átomo de fósforo (OTT; KRAMER, 1999; LIU et al., 2004; LIU; WANG, 2009).

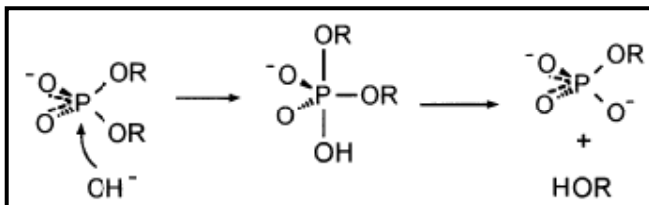


Figura 7. Representação do mecanismo de hidrólise de uma ligação fosfodiéster via ataque nucleofílico de um grupo hidróxido (KRAMER, 1999).

O processo oxidativo, por sua vez, tem como fundamento a produção de radicais livres a partir de uma reação de oxi-redução entre o centro metálico e um co-reagente como o oxigênio ou o nitrogênio. As espécies radiculares geradas podem se difundir no meio reacional e atacar preferencialmente as bases nitrogenadas e a desoxirribose do DNA (SIGMAN; MAZUMDER; PERRIN, 1993; POGOZELSKI; TULLIUS, 1998; ARMITAGE, 1998). Geralmente neste processo as fitas de DNA clivadas apresentam extremidades não regulares, impedindo sua re-ligação enzimática (HEGG; BURSTYN, 1998).

1.2.1 Complexos de Cobre

Atualmente, o cobre é um dos metais mais utilizados no desenvolvimento de complexos que atuam como nucleases químicas. Um dos primeiros complexos descritos nesta área foi o complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$, o qual é capaz de clivar DNA plasmidial por um mecanismo oxidativo na presença de H_2O_2 (MACIAS et al., 2003). Desta forma, estes complexos atraem grande atenção devido, principalmente, às suas propriedades redox e sua considerável afinidade por nucleobases (CHEN et al., 2008).

No entanto, também há vários exemplos de complexos de cobre(II) que clivam DNA por um mecanismo hidrolítico (NAVARRO et al., 2003; ZHU et al., 2003; HEGG; BURSTYN, 1996; HIRIHAMA; ARII; CHIKIRA, 2004), sendo que o primeiro deles, $[\text{Cu}(\text{[9]aneN}_3)\text{Cl}_2]$ (onde $[\text{9]aneN}_3$ = 1,4,7-triazaciclononano – Figura 8), foi descrito por Hegg e Burstyn (1996). Este estudo mostrou que este complexo (25 μM) é capaz de clivar DNA plasmidial, a 50 °C e $\text{pH} = 7,8$, com uma constante de velocidade estimada de $1,5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$. Ainda, experimentos em condições anaeróbicas mostraram que a atividade na ausência de oxigênio é reduzida em 30 %, indicando a ocorrência simultânea de uma clivagem hidrolítica preferencial e de uma clivagem oxidativa.

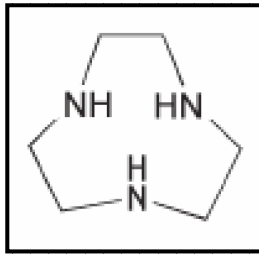


Figura 8. Estrutura do ligante [9]aneN₃.

Cowan e colaboradores (2000) mostraram uma eficiente clivagem de DNA pelo complexo Cu²⁺-neamina, onde neamina é um aminoglicosídeo natural (Figura 9). Neste caso, foi observada uma constante de velocidade máxima de $5,2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ e uma constante de ligação ao DNA de $2,4 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$. A alta afinidade do complexo pelo DNA foi atribuída à forte ligação do ligante aminoglicosídeo carregado positivamente, pois aparentemente isto torna o sistema muito eficiente mesmo em concentrações baixas (o tempo de meia vida para a forma superenovelada, na presença de 25 μM do complexo, é de 26 minutos). A clivagem de DNA não foi inibida pela presença de captadores de radicais livres e nem pela realização de reações em condições anaeróbias. Estes fatos evidenciam claramente um mecanismo de clivagem hidrolítico, além de também ter sido identificada a geração de terminais 5'-OPO₃ e 3'-OH.

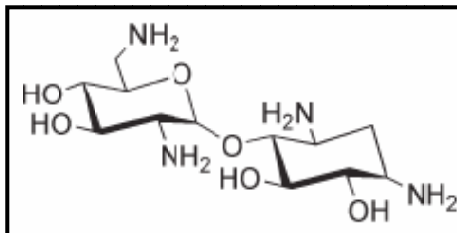


Figura 9. Estrutura da neamina.

Peralta (2006) e Rossi (2002, 2005) reportaram uma série de complexos binucleares de cobre(II), sintetizados a partir de ligantes simétricos e não simétricos, capazes de clivar DNA e hidrolisar o substrato bis-2,4-dinitrofenilfosfato (2,4-BDNPP). São exemplos o complexo $[\text{Cu}_2(\text{H}_2\text{bbppnol})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})(\text{H}_2\text{O})_2]\text{Cl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (sintetizado a partir do ligante H₃bbppnol - Figura 10(A)), o qual atua na clivagem de DNA através de um mecanismo hidrolítico com uma constante de

velocidade de $0,24 \text{ h}^{-1}$ em pH 6,6 a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e o complexo $[\text{Cu}_2(\text{Hbtppnol})(\mu\text{-CH}_3\text{COO})](\text{ClO}_4)_2$ (sintetizado a partir do ligante $\text{H}_2\text{btppnol}$ -Figura 10(B)), que promove a hidrólise do DNA em pH fisiológico com uma constante de velocidade de $0,022 \text{ h}^{-1}$.

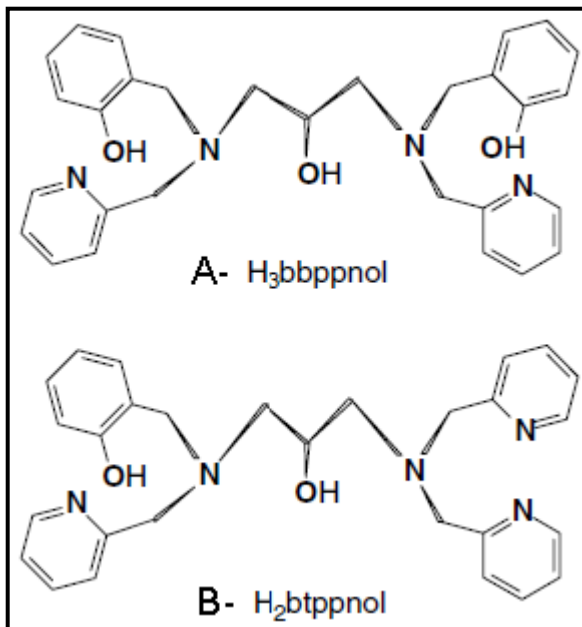


Figura 10. (A) Estrutura do ligante $\text{H}_3\text{bbppnol}$; (B) Estrutura do ligante $\text{H}_2\text{btppnol}$.

1.2.2 Complexos de Lantanídeos

Íons hidratados (livres) de lantanídeos (Ln^{III}) mostram-se bastante efetivos na clivagem de DNA. No entanto, há vários inconvenientes com relação ao seu uso, pois além de possuírem a tendência de precipitar na solução, na forma de hidróxidos, em torno de pH 9,0, são tóxicos a sistemas biológicos. Desta forma, é necessário a complexação desses íons com o intuito de direcionar e modelar sua reatividade (FRANKLIN, 2001).

Há quase meio século sabe-se que complexos de lantanídeos atuam ativamente na clivagem de ésteres de fosfato, porém somente na última década, essa reatividade foi demonstrada na molécula do DNA (HETTICH; SCHNEIDER, 1997). Algumas das características que

tornam os íons lantanídeos potenciais constituintes no desenvolvimento de nucleases químicas são: forte acidez de Lewis, altas densidades de carga, altos números de coordenação, ausência de química redox e fortes labilidades (FRANKLIN, 2001).

Um dos primeiros exemplos de complexos de lantanídeos como modelos para nucleases foram os macrociclos formados por bases de Schiff, proporcionando complexos neutros ou positivamente carregados com sítios de coordenação abertos. Os complexos binucleares Ho_2L_1 e Er_2L_1 , onde L_1 representa o ligante mostrado na Figura 11, mostraram-se eficientes na clivagem hidrolítica da dupla fita do DNA plasmidial, e foram capazes de converter a forma superenovelada na forma linear do DNA, em condições fisiológicas (37 °C e pH 7,0) (ZHU et al., 1998; ZHU et al., 1999) .

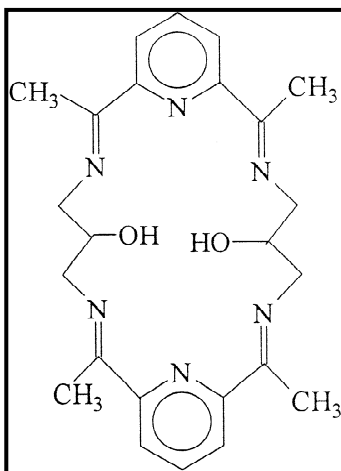


Figura 11. O ligante binucleante L_1 .

Branun e Que (2001) mostraram a grande eficiência do complexo $\text{Ce}_2(\text{HXTA})$ (onde $\text{HXTA} = 5$ -metil-2-hidroxil-1,3-xileno- α,α -diamina- N,N,N',N' -ácido tetracético – Figura 12) na clivagem hidrolítica de moléculas de DNA. A uma concentração de 10 μM , pH 8,0 e 37 °C o complexo cliva DNA plasmidial com uma constante de velocidade de $1,4 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$, o que corresponde a uma meia vida de 1,4 horas. Foi mostrado também que o complexo causa um corte de fita dupla a cada dez cortes de fita simples, indicando que a forma linear do DNA plasmidial que é gerada não é resultado de dois eventos de cortes de fita simples aleatórios. Apesar de o rendimento dos produtos lineares ser baixo (~20 %), o complexo apresentou alta regioesletividade, gerando

produtos com os terminais 5'-OPO₃ e 3'-OH com alto rendimento (> 90 %), como os produtos de enzimas que hidrolisam o DNA.

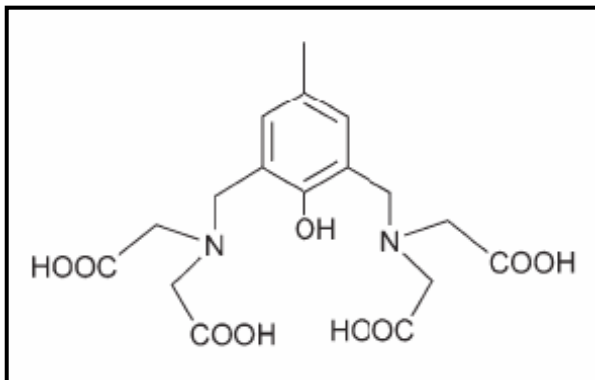


Figura 12. Estrutura do ligante HXTA.

Gomes-Tagle e Yatsimirsky (2001) avaliaram a atividade catalítica na hidrólise de ésteres de fosfato ao longo da série lantanídea, para complexos onde o ligante é o tampão BTP, cuja estrutura está representada na Figura 13. Os resultados mostraram que a atividade catalítica cresce com o aumento do raio iônico ao longo da série, pois, ao se tratar de um íon lantanídeo coordenado, deve-se levar em conta que um aumento na eletrofilicidade do cátion (crescimento da densidade de carga) pode levar a um decréscimo na basicidade dos hidróxidos ligados. Dessa forma, complexos com cátions mais eletrofilicos e ligados a ânions OH menos básicos possuem menores reatividades.

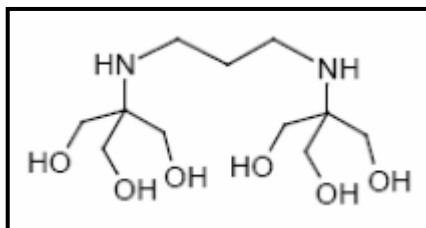


Figura 13. O ligante tampão BTP (bis-tris-propano).

De maneira geral, complexos de lantanídeos bem sucedidos incluem bases de Schiff macrocíclicas, ligantes polihidroxílicos, éteres coroa e azacoroas, derivados de poliaminocarboxilatos, derivados de DOTA (1,4,7,10-tetraazaciclododecano-*N,N,N',N'*-ácido tetracético), ácidos hidroxâmicos, polissacarídeos, micelas e vários sistemas mistos

Ln-M (onde M = metal de transição ou outro Ln³⁺) (FRANKLIN, 2001). Na Figura 14 estão representados alguns exemplos destes ligantes utilizados em complexos de lantanídeos com atividade na clivagem de DNA.

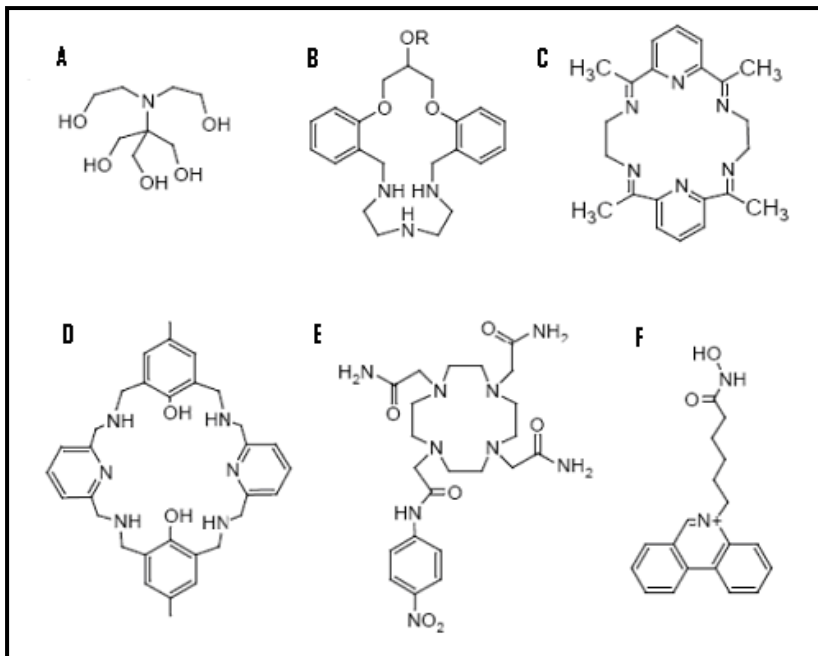


Figura 14. Exemplos de ligantes utilizados em complexos de lantanídeos com atividade na clivagem de DNA: **(A)** Bis-Tris; **(B)** esqueleto azacoroa de Janda e colaboradores (1999); **(C)** base de Schiff macrocíclica de Morrow e colaboradores (1992); **(D)** composto azacoroa de Martell e colaboradores (2000); **(E)** ligante DOTA-amida de Akkaya e colaboradores (1998); **(F)** ligante intercalativo unido ao ácido hidroxâmico (HASHIMOTO; NAKAMURA, 1996). Figura adaptada de Franklin (2001).

1.3 AMINOÁCIDOS E PROTEÍNAS

As proteínas são as macromoléculas mais abundantes nas células vivas. Elas ocorrem em todas as células em grandes quantidades e variedades. Além disso, são as moléculas mais diversificadas quanto à forma e função. As funções que desempenham são estruturais e dinâmicas. Formam os componentes do esqueleto celular e de estruturas

de sustentação, como, por exemplo, o colágeno e a elastina. Participam de quase todos os processos biológicos, já que incluem as enzimas, que catalisam as milhares de reações químicas extraordinariamente diversas que ocorrem nos organismos. Até mesmo a atividade dos genes é controlada por proteínas: proteínas reguladoras ligam-se ao DNA em sítios específicos, localizados próximo aos genes, alterando a sua expressão. Estas proteínas, no genoma de mamíferos, são capazes de reconhecer o sítio regulador de um determinado gene, dentre dezenas de milhares de genes diferentes (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Apesar de apresentarem estruturas e funções tão diversificadas, as proteínas são sintetizadas a partir de apenas 20 monômeros diferentes: os aminoácidos. Estes são compostos que apresentam, na sua molécula, um grupo amino (-NH₂) e um grupo carboxila (-COOH) ligados ao mesmo átomo de carbono (o carbono α) (Figura 15). Assim, diferem uns dos outros através de suas cadeias laterais ou grupos R, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, e influenciam a solubilidade do aminoácido em água (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

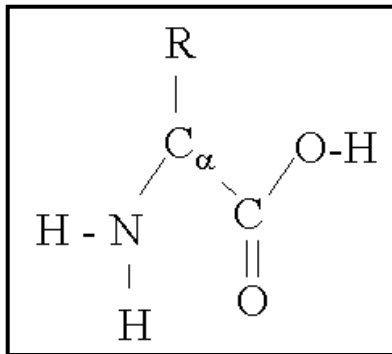


Figura 15. Estrutura geral de um aminoácido.

O carbono α de todos os aminoácidos, com exceção da glicina, é assimétrico, já que está ligado a quatro grupos diferentes (-NH₂, -COOH, -H e -R). Em função disso, os aminoácidos apresentam dois isômeros opticamente ativos: formas D e L. A grande maioria das proteínas encontradas nos seres vivos são formadas por L-aminoácidos (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

Os aminoácidos podem formar polímeros através da ligação do grupo carboxila de um aminoácido com o grupo amino de outro, havendo a eliminação de uma molécula de água. Esta ligação carbono-nitrogênio chama-se ligação peptídica. As suas propriedades impõem

restrições ao dobramento do polímero formado, pois apesar de ser representada por um único traço, tem características intermediárias entre uma ligação simples e uma dupla ligação, devido às interações entre duas formas de ressonância (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995), segundo a Figura abaixo.

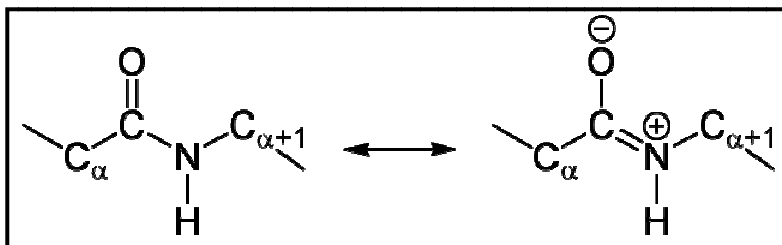


Figura 16. Representação das duas formas de ressonância observadas em uma ligação peptídica (Disponível em: < http://en.Wikipedia.org/wiki/Peptide_bond >. Acesso em: 20/01/2010).

A consequência desse caráter parcial de dupla ligação é que a rotação em torno da ligação peptídica é extremamente restrita. Assim sendo, os quatro átomos dos grupamentos que participam da ligação peptídica (C, O, N, H) ficam dispostos em um plano rígido, constituindo o que se costuma chamar de unidade peptídica. Assim, o polímero formado pode ser visualizado como uma cadeia polipeptídica constituída por unidades planares (unidades peptídicas) unidas entre si por uma articulação flexível, o carbono α , conforme mostra a Figura 17 (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

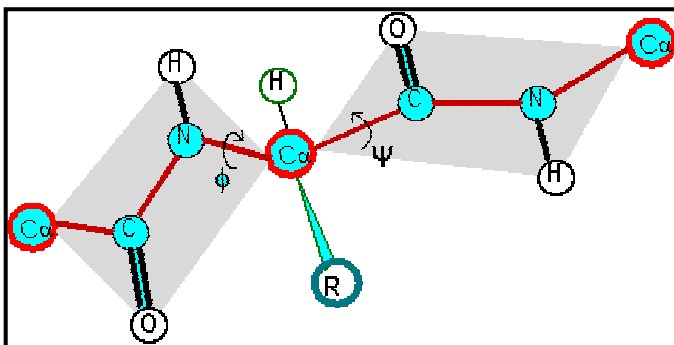


Figura 17. Esquema mostrando a disposição em um plano dos quatro átomos que compõem a unidade peptídica. As setas indicam as ligações em torno das quais a rotação é possível (Disponível em: <<http://disciplinas.ist.utl.pt/qgeral/biomedica/aminoacidos.html>>. Acesso em: 20/01/2010).

A organização espacial da proteína é resultante do tipo de aminoácidos que a compõem e de como eles estão dispostos uns em relação aos outros. A sequência de aminoácidos irá determinar o tipo de interação possível entre as cadeias laterais, que, como já exposto, apresentam características bastante variáveis. Assim, as proteínas podem apresentar 4 tipos de estruturas (Figura 18), as quais são descritas em níveis estruturais de complexidade crescente (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

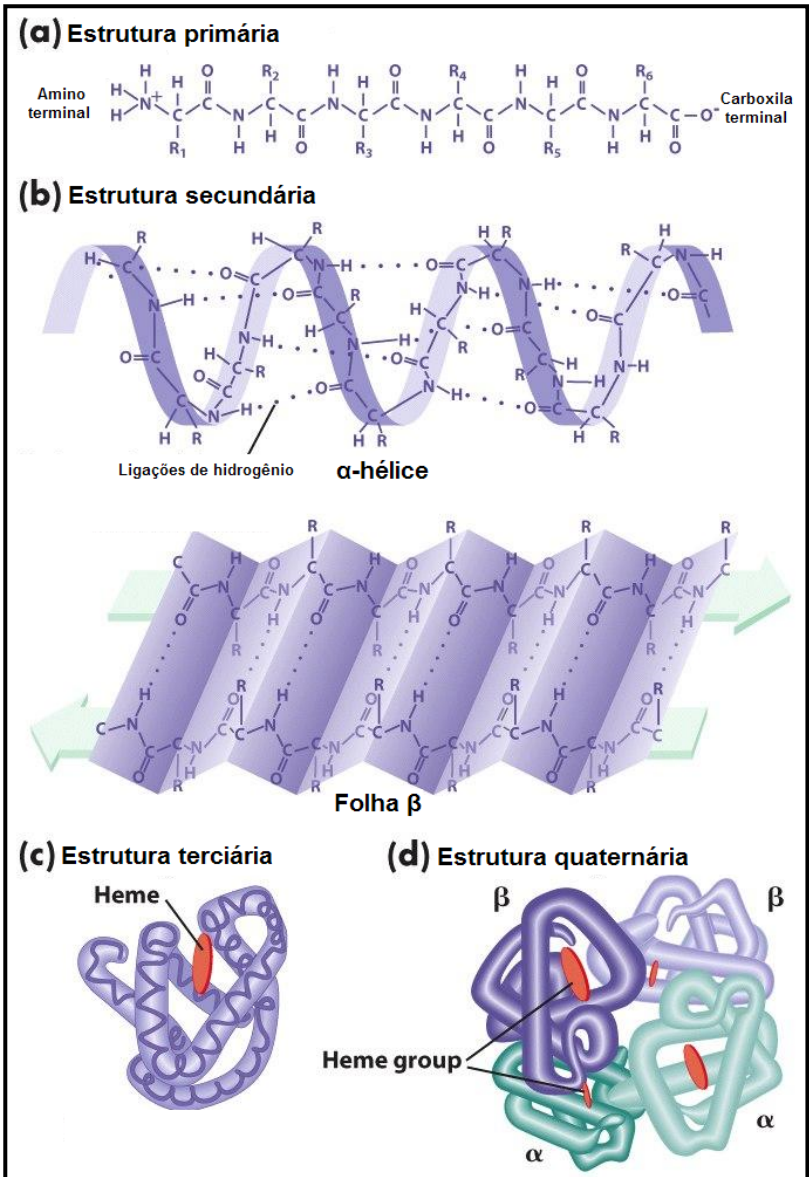


Figura 18. Representação dos quatro tipos de estruturas das proteínas: da estrutura primária à estrutura quaternária (Disponível em: <http://barleyworld.org/css430_09/lecture%209-09/figure-09-03.JPG>. Acesso em: 20/01/2010).

A estrutura primária é dada pela seqüência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. É o nível estrutural mais simples e mais importante, pois dele deriva todo o arranjo espacial da molécula. São específicas para cada proteína, sendo, geralmente, determinadas geneticamente. A estrutura primária da proteína resulta em uma longa cadeia de aminoácidos, com uma extremidade "amino terminal" e uma extremidade "carboxila terminal" (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

A estrutura secundária descreve as estruturas regulares bidimensionais formadas por segmentos da cadeia polipeptídica. Duas organizações são particularmente estáveis: o enrolamento da cadeia ao redor de um eixo e a interação lateral de segmentos de uma cadeia polipeptídica ou de cadeias diferentes. Estas conformações são denominadas, respectivamente, de α -hélice e folha β pregueada. Estas se estabilizam por ligações de hidrogênio com o nitrogênio e o oxigênio dos grupos $-NH$ e $-C=O$, que constituem as unidades peptídicas (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

A estrutura terciária descreve o dobramento final da cadeia polipeptídica por interações de regiões com estrutura regular (α -hélice e folha β pregueada) ou de regiões sem estrutura definida. As interações ocorrem por meio de ligações não-covalentes (ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, ligações eletrostáticas e iônicas) e ligações dissulfeto (-S-S-) entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

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 mantêm a estrutura terciária (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

1.4 PROTEASES QUÍMICAS

As ligações peptídicas são extremamente estáveis, com $t_{1/2}$ estimado entre 7 e 600 anos em pH neutro e temperatura ambiente (BRYANT; HANSEN, 1996; CHRISTIANSON; LIPSCOMB, 1989; KAHNE; STILL, 1988). Isto se deve principalmente à ressonância existente na ligação peptídica, o que torna o carbono carbonílico um pobre eletrófilo (HEGG; BURSTYN, 1998) (a Figura 19 mostra um mecanismo genérico de hidrólise de uma ligação peptídica).

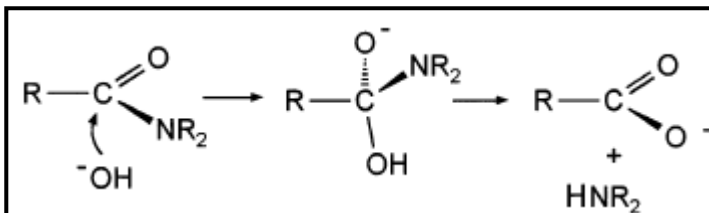


Figura 19. Mecanismo de hidrólise de uma ligação peptídica via ataque nucleofílico de um grupo hidróxido (KRAMER, 1999).

Ironicamente esta propriedade, ou seja, a estabilidade cinética das ligações peptídicas pode se tornar um problema, já que a clivagem de proteínas é extremamente útil no desenvolvimento de várias tecnologias, como: seqüenciamento e elucidação de estruturas de proteínas, aplicações em biologia molecular (HEGG; BURSTYN, 1998), etc.

Desta maneira, igualmente às nucleases químicas, há um grande interesse em se buscar proteases químicas. Nesse sentido, diversos complexos metálicos capazes de atacar sítios específicos em proteínas e promover a sua fragmentação via oxidação ou hidrólise, vêm sendo desenvolvidos (YOO et al., 2005; ZHANG et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005; RAJENDIRAN et al., 2007; CHEI; SUH, 2007; JANG; SUH, 2008).

Neste contexto, Bordignon Luiz, Spoganics e colaboradores (1999) propuseram a formação de um complexo entre o complexo dinuclear Zn^{2+} OBISDIEN (1,4,7,13,16,19-hexaaza-10,22-dioxaciclo tetracosano) e o dipeptídeo glicilglicina para explicar a hidrólise do dipeptídeo através de um ataque nucleofílico à carbonila da ligação peptídica, por um íon hidróxido coordenado a um dos átomos de Zn^{2+} .

Ainda, Zhu e Kostic (2002) realizaram experimentos de clivagem em 3 diferentes albuminas (bovina, suína e de ovo de galinha) por quatro complexos de Pd^{2+} (Figura 20), demonstrando que três complexos (*trans*- $[Pd(py)_2(H_2O)_2]^{2+}$, *cis*- $[Pd(en)(H_2O)_2]^{2+}$ e *cis*- $[Pd(dach)(H_2O)_2]^{2+}$) são ativos e regioesletivos.

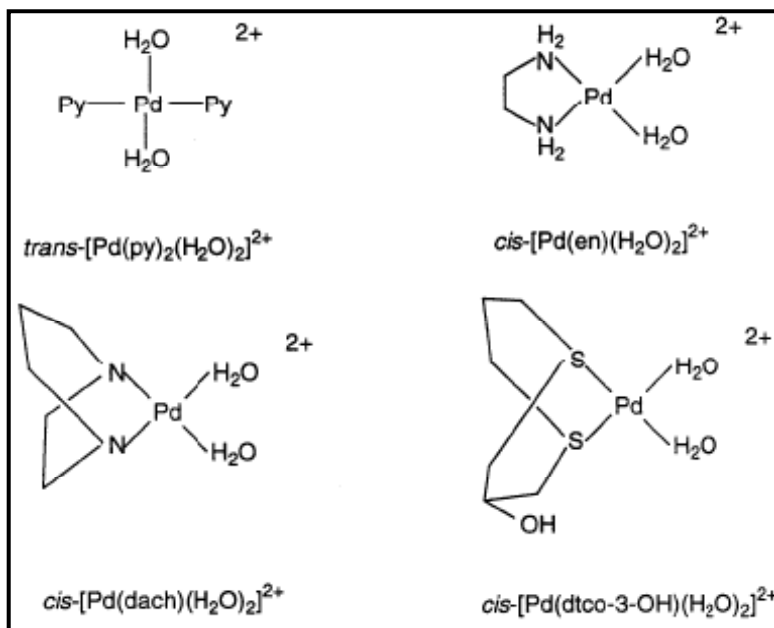


Figura 20. Estruturas dos complexos de Pd²⁺ estudados por Zhu e Kostic (2002).

Além disso, alguns trabalhos (HEGG; BURSTYN, 1995; GOSWAMI et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009; ROY et al., 2009) demonstraram que um mesmo complexo pode ter atividade nucleolítica e proteolítica, o que expande o rol de habilidades destes complexos e serve como exemplo de promiscuidade catalítica de um complexo metálico.

Nesse diapasão, Hegg e Burstyn (1996) mostraram que o complexo [Cu([9]aneN₃)Cl₂], já citado anteriormente, além de clivar DNA plasmidial, é também capaz de clivar peptídeos e proteínas como a BSA (“*Bovine Serum Albumin*”). Este foi o primeiro complexo metálico reportado na literatura capaz de hidrolisar tanto ligações peptídicas quanto ligações fosfodiéster.

Oliveira e colaboradores (2005) reportaram dois complexos mononucleares de cobre(II) sintetizados a partir do ligante 2-[(bis(piridilmetil)amino)metil]-4-metil-6-formilfenol (HL-Figura 21) capazes de clivar DNA e ligações peptídicas em substratos com BSA e Taq DNA polimerase. Os complexos são ativos em temperaturas

moderadas (37-70⁰C), sendo que a reação de clivagem possui uma vida média de 30 min. em pH 7,2.

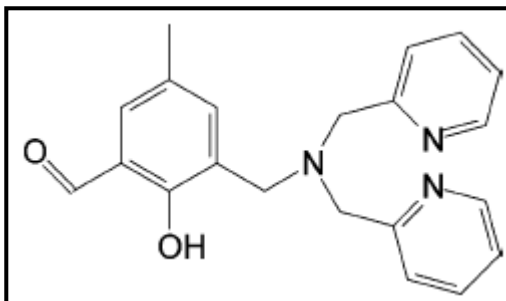


Figura 21. Estrutura do ligante HL (OLIVEIRA, 2005).

Em suma, fica evidente a importância de estudos de interação e clivagem de biomoléculas (como DNA e proteínas) por complexos metálicos, já que estes têm ampla aplicabilidade no desenvolvimento de novas ferramentas moleculares para a biologia molecular e biotecnologia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a interação de dois complexos binucleares de cobre(II) e um complexo trinuclear de gadolínio(III) com biomoléculas como DNA e proteínas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar a capacidade dos complexos de clivar moléculas de DNA plasmidial e de proteínas como a BSA.

Determinar o efeito da concentração dos complexos e do pH da solução na reação de clivagem de DNA e de BSA.

Determinar o efeito do oxigênio (O_2) na clivagem de DNA/BSA pelos complexos através da realização de reações em condições aeróbias (atmosfera de oxigênio) e anaeróbias (atmosfera de argônio).

Mapear o mecanismo de ação dos complexos através do uso de diferentes inibidores como: DMSO (captador de radicais $OH\cdot$); superóxido dismutase (SOD), uma enzima que catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-); azoteto de sódio (NaN_3), o qual atua na captura de oxigênio singlete (1O_2); batocuproína (agente quelante de Cu^+); distamicina (ligante do sulco menor do DNA) e verde de metila (ligante do sulco maior do DNA).

Analisar o efeito da força iônica (através da adição de NaCl) nas reações complexo-DNA ou complexo-BSA.

Determinar as constantes de ligação intrínseca (K_b) dos complexos binucleares de cobre(II) ao DNA plasmidial através de titulações espectrofotométricas.

Analisar o modo de interação nas reações complexo-DNA ou complexo-BSA através de estudos de dicroísmo circular, força iônica e titulações espectrofotométricas.

Calcular os parâmetros cinéticos para a reação de clivagem entre os complexos e o DNA plasmidial ou a BSA.

3 METODOLOGIA

3.1 COMPLEXOS EM ESTUDO

3.1.1 Complexos binucleares de cobre(II)

Os complexos binucleares de cobre(II) foram sintetizados por Osório (2007), no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Prof. Dr. Ademir Neves.

A caracterização desses complexos foi realizada via análise elementar de C,H,N, IV, Uv-Visível, eletroquímica, titulação potenciométrica, titulação espectrofotométrica, EPR, magnetoquímica e difratometria de Raio X (OSÓRIO, 2007).

3.1.1.1 $[Cu_2(HL1)(OAc)](ClO_4)_2 \cdot (CH_3)_2CHOH$ - Complexo 1

O complexo **1** foi sintetizado a partir do ligante não simétrico, binucleante H_2L1 (*N,N',N'*-[tris-(2-piridilmetil)]-*N*-[(2-hidróxi-3,5-di-*tert*-butilbenzil)]-1,3-propano diamina-2-ol) representado na Figura 22 (OSÓRIO, 2007).

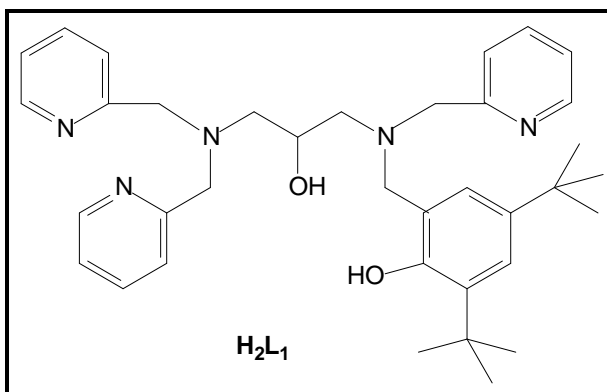


Figura 22. Estrutura do ligante H_2L1 (OSÓRIO, 2007).

Os dados obtidos da resolução da estrutura por raios X revelam que o complexo **1** é constituído por uma unidade do ligante coordenada a dois centros de cobre(II) ligados entre si pelo átomo de oxigênio da ponte endógena alcóxido e por mais um ligante exógeno acetato, além de dois ânions perclorato como contra-íons. A assimetria do ligante leva

a um complexo binuclear onde os dois centros de cobre estão coordenados por diferentes grupos doadores e diferentes geometrias. Uma projeção da estrutura molecular do cátion complexo $[\text{Cu}_2(\text{HL1})(\text{OAc})]^{2+}$ é apresentada na Figura 23 (OSÓRIO, 2007).

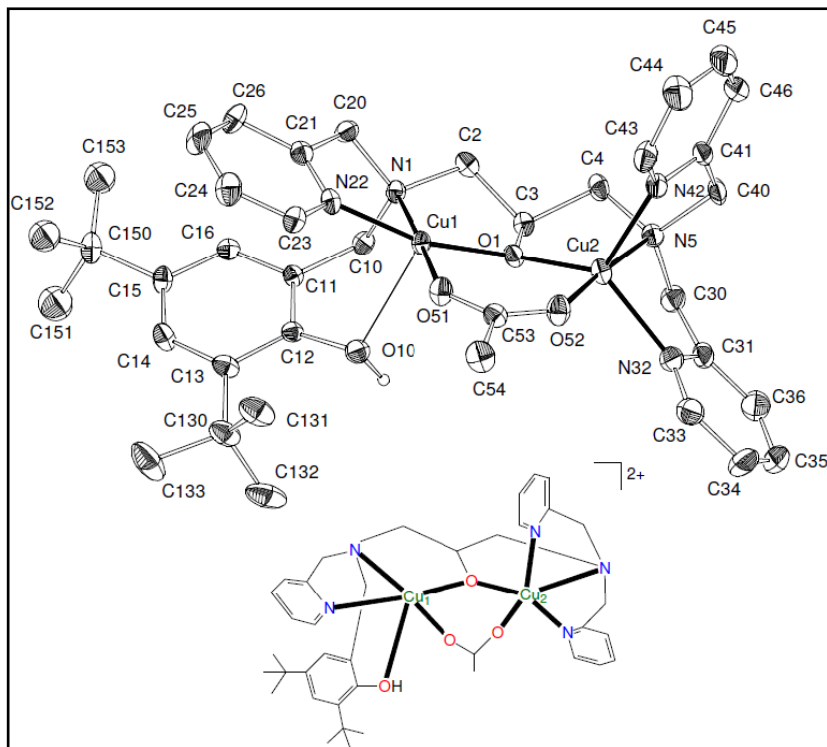


Figura 23. Projeção da estrutura molecular do cátion $[\text{Cu}_2(\text{HL1})(\text{OAc})]^{2+}$ (OSÓRIO, 2007).

Através de estudos de titulação potenciométrica foram obtidas as constantes de desprotonação e a curva de distribuição das espécies para o complexo **1** (Figura 24). Através desses dados foram determinados os equilíbrios em solução para este complexo (Figura 25). A primeira constante de equilíbrio pode ser atribuída à hidrólise do grupo acetato ponte, a qual está associada à sua labilidade. Acredita-se que a segunda constante pertença à desprotonação de uma molécula de água coordenada a um dos centros de cobre(II), uma vez que estudos preliminares da dependência de pH do complexo **1** na hidrólise de fosfatos apresentaram uma atividade catalítica ótima em torno desse

valor de pKa. A terceira constante é atribuída, por conseguinte, à desprotonação da segunda molécula de água coordenada ao outro centro de cobre. O quarto próton titulado refere-se à desprotonação do grupo fenol terminal, sugerido por estudos de titulação espectrofotométrica (OSÓRIO, 2007).

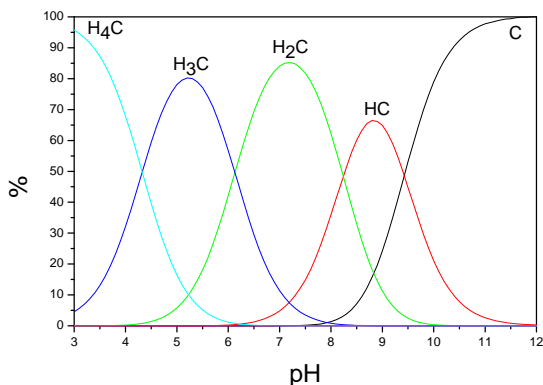


Figura 24. Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o complexo **1**. H₄C representa a espécie completamente protonada, C é a espécie completamente desprotonada e HC, H₂C e H₃C representam as espécies mono, di e triprotonadas, respectivamente (OSÓRIO, 2007).

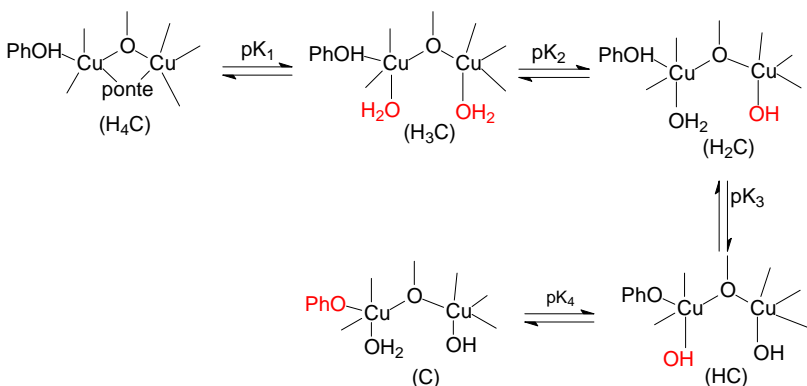


Figura 25. Proposta para os equilíbrios observados para o complexo **1** em solução (OSÓRIO, 2007).

3.1.1.2 $[\text{Cu}_2(\text{HL2})(\text{OAc})](\text{ClO}_4)\cdot\text{H}_2\text{O}\cdot(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$ - Complexo 2

O complexo **2** foi sintetizado a partir do ligante não simétrico, binucleante H_3L_2 (*N,N*-[bis-(2-piridilmetil)]-*N',N'*-[(2-hidróxibenzil)(2-hidróxi-3,5-di-*terc*butilbenzil)] 1,3 propano diamina-2-ol) representado na Figura 26.

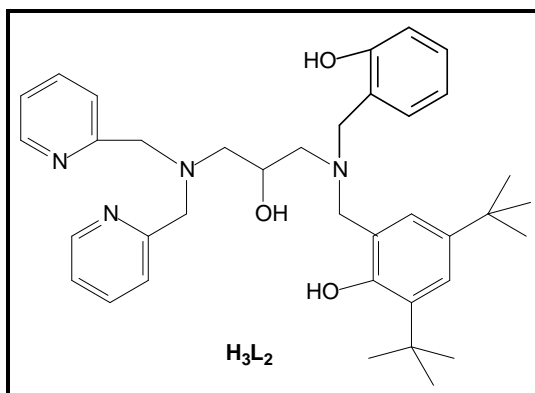


Figura 26. Estrutura do ligante H_3L_2 (OSÓRIO, 2007).

Os dados obtidos da resolução da estrutura do complexo **2** revelam uma unidade assimétrica constituída de um cátion complexo $[\text{Cu}_2(\text{HL2})(\text{OAc})]^+$ e um ânion perclorato como contra-íon (Figura 27) (OSÓRIO, 2007).

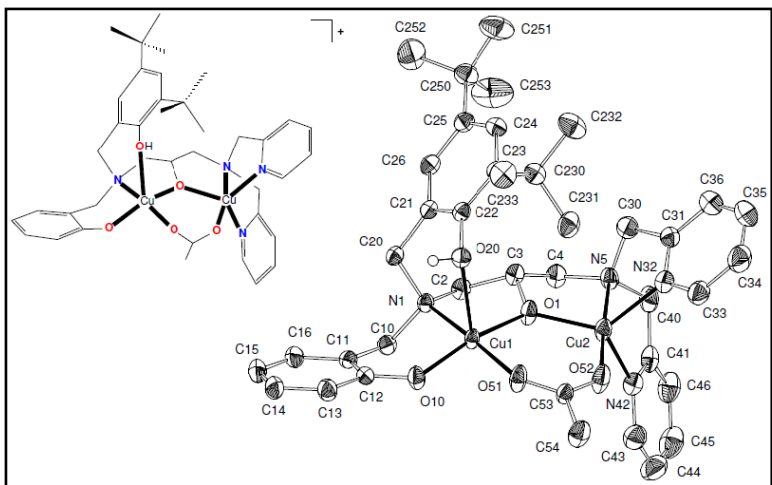


Figura 27. Projeção da estrutura molecular do cátion $[\text{Cu}_2(\text{HL}_2)(\text{OAc})]^+$ (OSÓRIO, 2007).

Através de estudos de titulação potenciométrica foram obtidas as constantes de desprotonação e a curva de distribuição das espécies para o complexo **2** (Figura 28). Através desses dados foram determinados os equilíbrios em solução para este complexo (Figura 29).

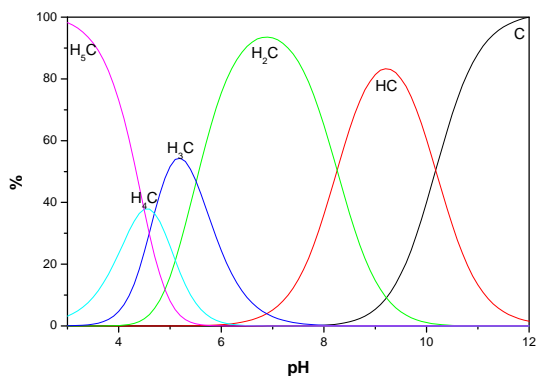


Figura 28. Diagrama de distribuição das espécies em função do pH para o complexo **2**. H₅C representa a espécie completamente protonada, C é a espécie completamente desprotonada e HC, H₂C, H₃C e H₄C representam as espécies mono, di, tri e tetraprotonadas, respectivamente (OSÓRIO, 2007).

Assim, a primeira constante de desprotonação é atribuída para a hidrólise do grupo acetato ponte, devido a sua grande labilidade quando em solução. O segundo pKa está sendo tentativamente atribuído à desprotonação do grupo fenol coordenado na posição equatorial ao centro de cobre(II), enquanto os valores de pKa encontrados em 5,50 e 8,25 correspondem à desprotonação das moléculas de água coordenadas aos centros metálicos. Estes valores estão em concordância com os valores descritos por Neves e colaboradores (2002), onde apenas a desprotonação das moléculas de água é observada na titulação destes complexos. Além disso, estudos preliminares da dependência de pH do complexo **2** na hidrólise de fosfatos apresentaram uma atividade catalítica ótima em 7,70, confirmando que este pKa (8,25) corresponde à desprotonação da segunda molécula de água para gerar um nucleófilo e ocorrer o ciclo catalítico. A quinta constante de desprotonação refere-se à desprotonação do grupo fenol axial, sugerido por estudos de titulação espectrofotométrica (OSÓRIO, 2007).

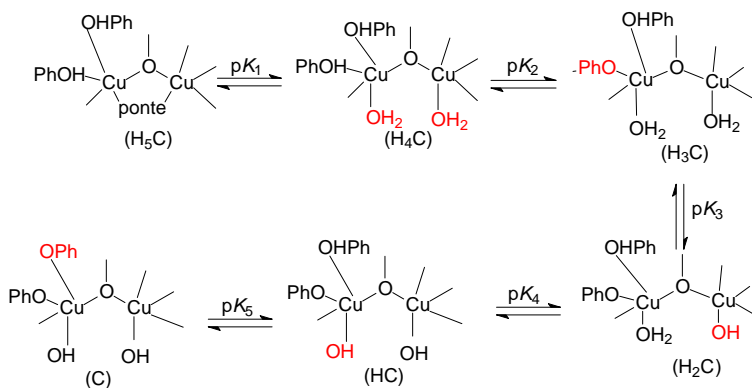


Figura 29. Proposta para os equilíbrios observados para o complexo **1** em solução (OSÓRIO, 2007).

3.1.2 Complexo trinuclear de gadolínio(III)

O complexo $\text{Gd}_3(\text{L3})_2(\text{NO}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_4][\text{NO}_3 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (**3**) foi sintetizado por Camargo (2008), no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Prof. Dr. Ademir Neves.

A caracterização do complexo foi realizada através de diversas técnicas físico-químicas como: análise elementar de CHN,

espectroscopia UV-Vis, espectroscopia de infravermelho, potenciometria, condutivimetria e análise por difração de raios X.

O complexo **3** foi sintetizado a partir do ligante H₃L3, cuja estrutura química está disposta na Figura 30.

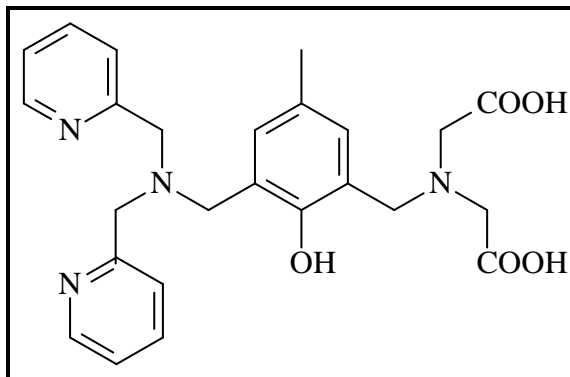


Figura 30. Estrutura do ligante H₃L3 (CAMARGO, 2008).

A estrutura cristalina do complexo **3** foi resolvida por difratometria de Raio X. Os dados obtidos revelam uma unidade assimétrica constituída de um cátion complexo [Gd₃(H₃L3)₂(NO₃)₂(H₂O)₄]⁺ e um ânion nitrato como contra-íon, além de oito moléculas de água como solvente de cristalização. Uma visão ORTEP do ambiente de coordenação do complexo **3** é apresentada na Figura 31. Este é um complexo monocatiônico trinuclear, apresenta três íons gadolínio(III), dois ligantes H₃L3³⁻ (com os seus fenolatos e dois grupos carboxilatos formando pontes), quatro moléculas de água, além de dois nitratos coordenados de maneira bidentada (CAMARGO, 2008).

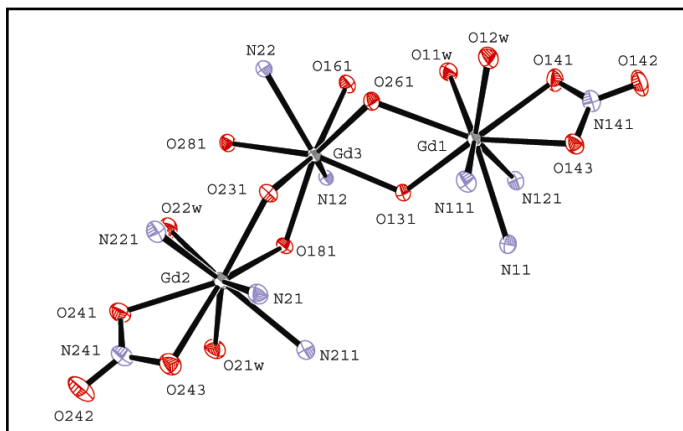


Figura 31. ORTEP do complexo 3 ^[68].

A Figura 32 mostra o diagrama de distribuição das espécies formadas em solução para o complexo **3**, o qual foi obtido por meio das constantes de equilíbrio dos estudos potenciométricos realizados por Camargo (2008).

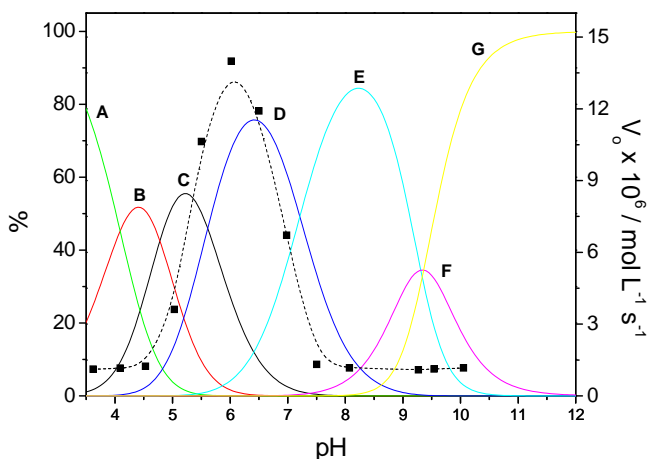


Figura 32. Diagrama de distribuição de espécies em função do pH para o sistema $Gd_3L_3^{3+}$, onde: A = $[Gd_3H_2(L_3)_2]^{5+}$, B = $[Gd_3H(L_3)_2]^{4+}$, C = $[Gd_3(L_3)_2]^{3+}$, D = $[Gd_3(OH)(L_3)_2]^{2+}$, E = $[Gd_3(OH)_2(L_3)_2]^{1+}$, F = $[Gd_3(OH)_3(L_3)_2]$ e G = $[Gd_3(OH)_4(L_3)_2]^{1-}$. Linha pontilhada: Variação nas velocidades iniciais (V_0) observadas para a hidrólise do BDNPP em função do pH (CAMARGO, 2008).

Observa-se, então, que em pHs baixos ocorrem protonações do complexo **3**, formando as espécies $[\text{Gd}_3\text{H}(\text{L3})_2]^{4+}$ e $[\text{Gd}_3\text{H}_2(\text{L3})_2]^{5+}$. Já acima de pH 5,0, ocorrem dissociações de moléculas de água coordenadas ao centro metálico, formando as correspondentes espécies: $[\text{Gd}_3(\text{OH})(\text{L3})_2]^{2+}$, $[\text{Gd}_3(\text{OH})_2(\text{L3})_2]^{1+}$, $[\text{Gd}_3(\text{OH})_3(\text{L3})_2]$ e $[\text{Gd}_3(\text{OH})_4(\text{L3})_2]^{1-}$.

3.2 DNA PLASMIDIAL

Neste trabalho foi utilizado como modelo de molécula de DNA o plasmídeo pBluescript® II SK(+) (pBSK II), Stratagene. Este plasmídeo é derivado do pUC19, possui 2961 pares de bases e contém um gene que confere resistência à ampicilina (Figura 33).

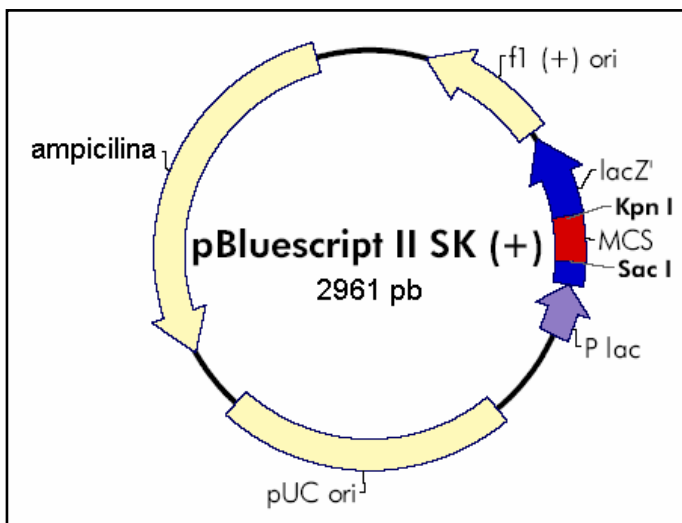


Figura 33. Mapa do plasmídeo pBSK II (OLIVEIRA, 2006).

3.2.1 Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi realizada com o kit comercial HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN, seguindo protocolo padrão do fabricante (QIAGEN, 2001). A Figura 34 mostra um esquema das etapas do processo de extração de DNA plasmidial onde utiliza-se o referido kit.

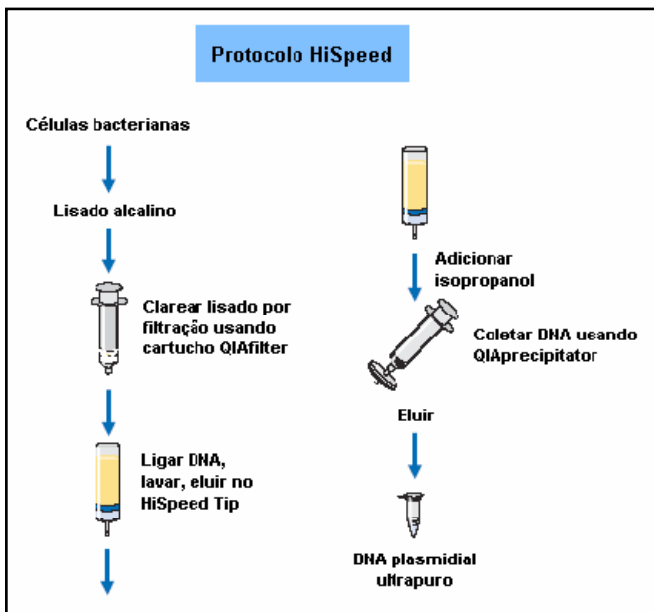


Figura 34. Esquema representativo do princípio do método utilizado pelo kit comercial HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN (QIAGEN, 2001).

As amostras foram observadas em gel de agarose 0,8%. O DNA foi quantificado em um espectrofotômetro (Ultrospec 2100 pro, Amersham Bioscience) e congelado até o uso.

3.3 ESTUDOS DE CLIVAGEM DE DNA PLASMIDIAL

A metodologia empregada na avaliação da clivagem, ou quebra das fitas, de moléculas de DNA baseia-se nas propriedades das diferentes formas do DNA plasmidial, que apresentam mobilidades diferentes quando submetidas a uma eletroforese em um gel de agarose, podendo então, serem separadas e quantificadas.

Neste estudo as reações de clivagem de DNA foram realizadas em misturas reacionais de 20 μL contendo: 400 ng do plasmídeo pBSK II superenovelado ($\sim 30 \mu\text{M}$ de DNA em pb); tampão para biologia molecular (25 mM); e os complexos em diferentes concentrações. Todas as reações foram realizadas em uma concentração final de 25% de acetonitrila (CH_3CN), sendo que a incubação foi de 6 horas a 37°C para os complexos 1 e 2 e de 7 horas a 50°C para o complexo 3.

Ao final da reação, esta foi interrompida pela adição do tampão de corrida 6x (EDTA 0,25 M, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01% - pH 8,0) e as misturas reacionais submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8%).

3.3.1 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é um método padrão usado para separar, identificar e até purificar ácidos nucleicos (DNA ou RNA) e seus fragmentos, especialmente por ser uma técnica simples e relativamente rápida (OLIVEIRA, 2006).

A agarose é um polissacarídeo extraído de certos gêneros de algas vermelhas do gênero *Rhodophyceae*. Este polissacarídeo consiste na repetição do dissacarídeo formado entre os resíduos de β -D-galactose (ligado pelas posições 1,3) e 3,6-anidro- α -L-galactose (ligado pelas posições 1,4), como representado na Figura 35 (A). A agarose quando dissolvida em água fervente e depois resfriada, forma um gel com o aspecto representado na Figura 35 (B). Neste processo são formadas duplas hélices que se unem lateralmente para formar filamentos relativamente finos, formando, assim, poros. Estes poros têm seu tamanho variado de acordo com a concentração do gel, ou seja, quanto mais concentrado em agarose, menor o tamanho dos poros. Devido a esta característica é possível relacionar o tamanho das moléculas de DNA (linear) com a concentração do gel de agarose, de maneira que se consiga uma separação eficiente (WESTERMEIER, 1993).

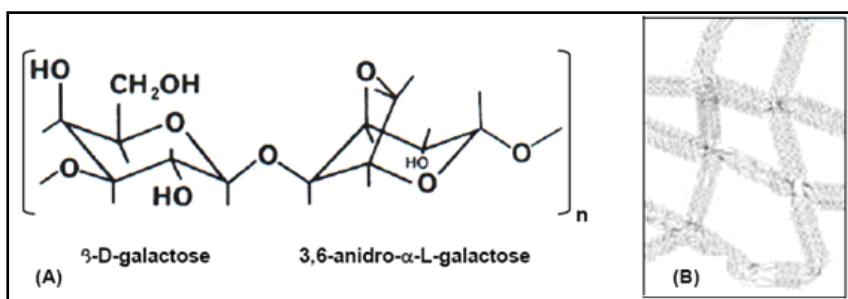


Figura 35. Estrutura da agarose. (A) Estrutura química da unidade de repetição da agarose; (B) Morfologia do polímero durante a formação do gel (WESTERMEIER, 2003).

Entretanto, além do tamanho da molécula de DNA a sua forma também é importante para que ocorra a separação num gel de agarose.

As formas **F I**, **F II** e **F III** do DNA plasmidial possuem o mesmo tamanho, porém migram com velocidades distintas quando submetidas a uma diferença de potencial, devido a diferenças na sua conformação ou compactação (OLIVEIRA, 2006).

A preparação dos géis de agarose foi feita a partir da dissolução, sob aquecimento em forno de microondas, da quantidade necessária de agarose para um gel com concentração de 0,8 % (m/v), em tampão TBE 0,5 X (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM – pH 8,0). A solução resultante foi despejada numa forma adequada para dar formato ao gel e aos poços onde serão aplicadas as amostras. Após o resfriamento total, os géis resultantes foram levados para uma cuba de eletroforese horizontal (modelo Horizon® 11-14, Life Technologies™ ou Sub-Cell® GT, BioRad) contendo tampão TBE 0,5 X. As misturas reacionais foram então submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8%) por 1 h a 90 V em tampão TBE 0,5x (Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1 mM - pH 8,0). A Figura 36 mostra de maneira ilustrativa a realização deste tipo de eletroforese.

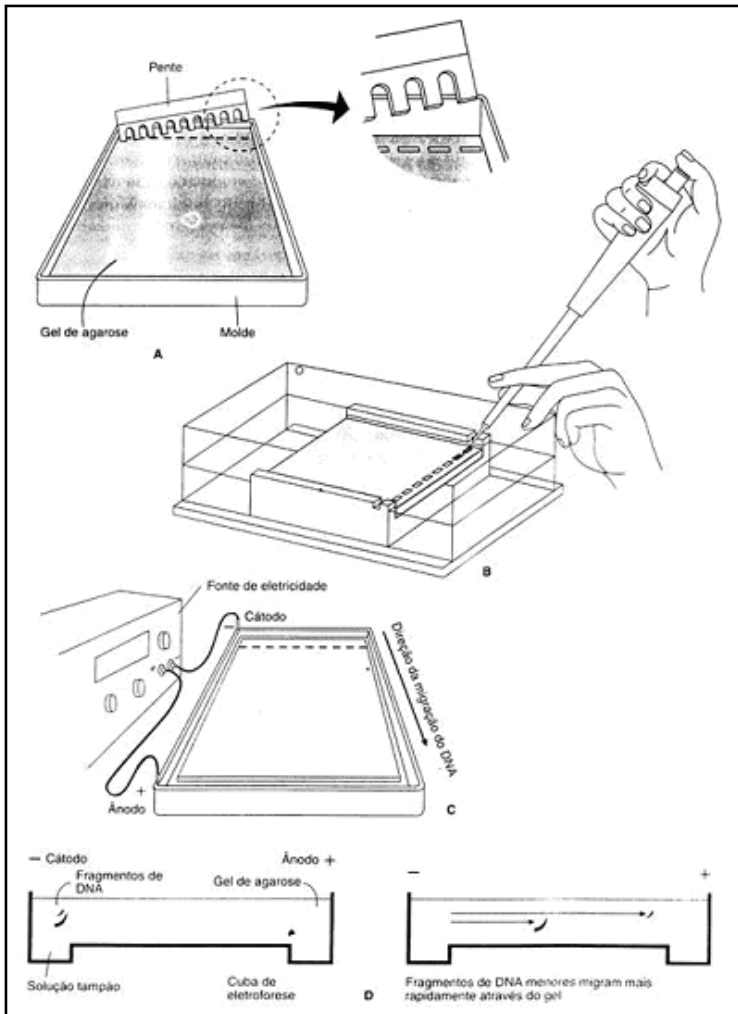


Figura 36. Eletroforese em gel de agarose. A matriz é solidificada deixando-se formar poços (A) nos quais as amostras de DNA serão depositadas (B) e submetidas a um campo elétrico (C). Os fragmentos apresentam uma migração diferencial de acordo com o tamanho ou forma (D) (FARAH, 2007).

Os géis resultantes foram corados com brometo de etídio ($0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$), fotografados pelo sistema de fotodocumentação Gel Logic 200 (Carestream Health, USA) e as frações de cada forma foram quantificadas por densitometria utilizando o software KODAK Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health, USA). Todas as reações de clivagem contaram com um controle negativo em condições iguais às misturas reacionais com o complexo, diferenciando-se apenas pela ausência do mesmo.

3.3.2 Efeito do PH e da concentração dos complexos

O efeito do pH na clivagem do plasmídeo pBSK II pelos complexos foi observado pela adição de diferentes tampões em diferentes pHs às misturas reacionais. Para tanto, foram utilizados os seguintes tampões de acordo com o pH: PIPES 25 mM (pHs 6,0, 6,5, 7,0 e 7,5), HEPES 25 mM (pH 8,0) e CHES 25 mM (pH 9,0) (Figura 37).

Da mesma forma, o efeito da concentração foi avaliado utilizando-se diferentes concentrações finais dos complexos na mistura reacional, as quais variaram entre 2,0 e 500 μM .

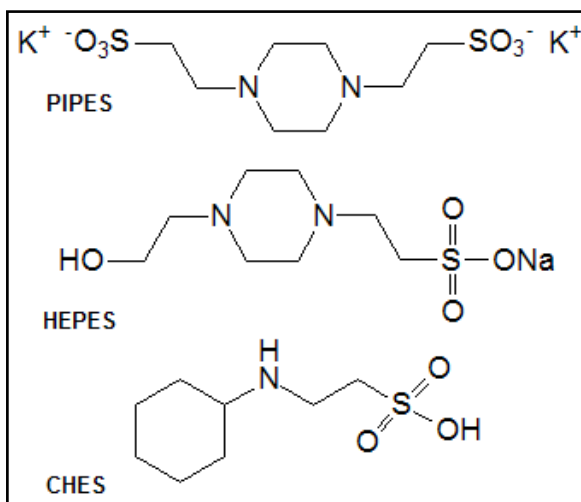


Figura 37. Estrutura Química dos tampões PIPES, HEPES e CHES.

3.3.3 Teste em atmosfera de Argônio

Esta metodologia foi empregada com a finalidade de avaliar a influência do oxigênio molecular (O_2) nas reações de clivagem de DNA pelos complexos metálicos em estudo, como previamente descrito em trabalhos do nosso grupo (SCARPELLINI et al., 2003; HORN, et al., 2005).

Todas as soluções foram preparadas com água desoxigenada. Esta foi preparada através de um procedimento formado por duas etapas: primeiro, a água foi submetida à agitação sob vácuo, até completa eliminação das bolhas de ar; em seguida foi equilibrada com argônio (borbulhando argônio através da água) para ajudar no processo de desoxigenação. Esta água foi mantida sob atmosfera de argônio até o momento do uso. Todas as soluções e misturas reacionais foram preparadas dentro de uma câmara de polietileno ou “glove bag” (modelo X-27-27, I2R). As amostras foram, então, incubadas dentro de um dessecador selado e preenchido com argônio, durante 4 horas a 37 °C (complexos **1** e **2**) e 4 horas a 50 °C (complexo **3**). Após o término deste período, as reações foram interrompidas e submetidas às mesmas condições e procedimentos das realizadas na presença de oxigênio.

Para assegurar que o ambiente de argônio foi mantido durante os ensaios, foi adicionado à série de reações um controle de $Fe(EDTA)^{2-}$ (100 μM)/DTT (10 mM) que corta o plasmídeo somente em presença de oxigênio.

3.3.4 Estudos Mecanísticos

As reações de clivagem de DNA foram analisadas na presença de vários inibidores e ligantes dos sulcos do DNA para mapear o mecanismo de ação e determinar as espécies ativas envolvidas no processo de clivagem^[35]. Para tanto, foram utilizados os seguintes reagentes: DMSO, o qual atua no seqüestro de radicais hidroxila (OH \cdot); superóxido dismutase (SOD), uma enzima que catalisa a dismutação do radical superóxido ($O_2\cdot^-$); azoteto de sódio (NaN_3), a qual atua na captura de oxigênio singlete (1O_2); batocuproína (agente quelante de Cu^+); distamicina (ligante do sulco menor do DNA) e verde de metila (ligante do sulco maior do DNA).

Desta forma, as reações foram preparadas com adição prévia dos inibidores ao DNA plasmidial, sendo que os complexos em concentrações variadas foram adicionados por último. Em seguida, as reações foram incubadas (condições já mencionadas). Por último, as

amostras foram congeladas e submetidas à eletroforese em gel de agarose.

3.3.5 Efeito da força iônica

O efeito da força iônica na clivagem do plasmídeo pBSK II pelos complexos foi observada pela adição de concentrações crescentes (0 a 200 mM) de cloreto de sódio (NaCl) às misturas reacionais. O tempo e a temperatura de reação foram os mesmos descritos anteriormente. Com este ensaio foi possível inferir qual a importância de interações eletrostática no potencial nucleolítico dos complexos.

3.3.6 Cinética de clivagem de DNA plasmidial

A fim de verificar a velocidade de degradação do DNA plasmidial promovida pelos complexos foram realizados experimentos cinéticos, onde se observou o desaparecimento das formas intactas do plasmídeo pBSK II ao longo do tempo em diferentes concentrações dos complexos. Em determinados intervalos de tempo foram retiradas alíquotas das misturas reacionais em várias concentrações de complexo em condições ótimas.

As constantes de clivagem de (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 do plasmídeo pBSK II num determinado tempo dividido pela quantidade desta mesma forma no tempo zero 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 mostrou um comportamento típico de uma cinética de saturação que é também conhecida por cinética de pseudo-Michaelis-Menten (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000).

Assumindo este comportamento foram calculados alguns parâmetros cinéticos para cada complexo como: constante catalítica (k_{cat}); constante de Michaelis-Menten (K_M); eficiência catalítica (k_{cat}/K_M); a aceleração da reação não-catalisada, o “enhancement” ($f = k_{cat}/k_{não\ catalisada}$), definido pela razão entre a constante catalítica e a

constante de hidrólise não catalisada; e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) da forma intacta do plasmídeo pBSK II obtido pela fórmula: $t_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{cat}}$.

3.4 ESTUDOS DE CLIVAGEM DE PROTEÍNA

Para os estudos de degradação protéica foi utilizada a BSA da SIGMA (A-4503) por se tratar de uma proteína bastante estudada e já caracterizada, além de ser comercialmente barata. A albumina é uma proteína monomérica que atua como carregadora de substâncias e compõe cerca de 50% do conteúdo protéico do soro sanguíneo. Além da albumina do soro bovino, existem também albuminas comerciais de outras fontes, como a humana (HSA – “*Human Serum Albumin*”).

Os estudos de clivagem de BSA pelos complexos em estudo foram realizados da mesma forma que os estudos de clivagem de DNA. Portanto, foram testados diferentes pHs, concentrações dos complexos, condições de temperatura, tempo de incubação e força iônica. O mecanismo de ação também foi avaliado através do uso de inibidores. O procedimento já foi descrito no item Estudos mecanísticos.

Após a incubação dos testes, um tampão de amostra 4X concentrado (2X – tampão Tris-Cl 100 mM, SDS 7%, glicerol 20%, β -mercaptoetanol 2% e azul de bromofenol 0,02%) foi adicionado às amostras que foram então congeladas a -20°C . Estas foram submetidas à SDS-PAGE e os géis resultantes foram digitalizados e suas bandas quantificadas utilizando-se o programa LabWorks™ 4.0, UVP.

3.4.1 SDS-PAGE

Os géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) são fisicamente mais rígidos do que os géis de agarose. O gel é formado pela copolimerização radicalar da acrilamida com N,N'-metilenobisacrilamida (ou somente bisacrilamida), que é um agente de ligação cruzada. Os radicais livres são gerados pela decomposição química do persulfato de amônio (APS), sendo então estabilizados pela adição de N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED).

Em separações por SDS-PAGE a migração é determinada não pela carga elétrica intrínseca da cadeia polipeptídica, mas sim pelo peso molecular. Através de sua calda hidrofóbica, o SDS envolve a cadeia polipeptídica e desta maneira quebra as ligações de hidrogênio, cancela as interações hidrofóbicas, previne a agregação das proteínas e ainda causa o desdobramento da estrutura tridimensional (estruturas terciária e secundária). Desta maneira o SDS confere, à cadeia polipeptídica, uma

forma elipsóide com uma rede de carga negativa que é proporcional ao seu comprimento (cerca de 1,4g de SDS é ligado a cada grama de proteína, neste processo). Então, como o peso molecular das proteínas é diretamente proporcional ao comprimento da cadeia, a separação das proteínas ocorre pelo seu peso molecular.

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 ESTUDOS DE INTERAÇÃO DOS COMPLEXOS COM DNA E BSA

3.5.1 Dicroísmo Circular

Para avaliar as mudanças estruturais causadas no DNA/BSA com a adição dos complexos, utilizou-se a espectroscopia de dicroísmo circular. Esta técnica, além de ser útil na análise da interação entre DNA e pequenas moléculas, também tem sido amplamente utilizada no estudo da conformação de proteínas e polipeptídios em solução (GHARAGOZLOU; BOGHAEI, 2008).

O espectro de DC da dupla hélice direita na forma B do DNA consiste de duas bandas: uma positiva (275 nm) devido ao empilhamento das bases do DNA e uma negativa (245 nm) devido à helicidade direita do DNA. Desta forma, as mudanças observadas nos sinais dos espectros de DC do DNA correspondem a mudanças ocorridas na estrutura do mesmo quando há interações com outras moléculas (CHEN et al., 2007).

A BSA, por sua vez, é uma proteína apropriada para estes estudos, pois possui uma alta porcentagem de α -hélices em sua estrutura, apresentando um sinal de DC bastante característico na região do UV-distante, o qual apresenta duas bandas fortemente negativas em

209 e 220 nm (GHARAGOZLOU; BOGHAEI, 2008). A intensidade destas diz respeito à helicidade da proteína.

Os estudos de DC foram realizados em um espectropolarímetro Jasco (modelo J-815), em temperatura ambiente. Para confecção dos espectros, utilizou-se 200 μM de DNA do timo de bezerro (CT-DNA) ou 10 μM de BSA na ausência e na presença de concentrações crescentes dos complexos em estudo.

3.5.2 Espectroscopia Eletrônica

Para analisar a ligação dos complexos com CT-DNA foram realizadas titulações espectrofotométricas.

Neste experimento foi utilizado um espectrofotômetro Lambda-19 (Perkin-Elmer) para obtenção de espectros na faixa de 300 a 800 nm, termostatizado. A reação foi preparada no pH de maior atividade e com uma concentração fixa dos complexos em uma cubeta, onde foram adicionadas quantidades crescentes de DNA. Após um minuto de cada adição foi feita a medida espectral. Esta técnica permite, além de mostrar o tipo de interação, o cálculo da constante de associação intrínseca (K_b) do complexo com o DNA (BATISTA et al., 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPLEXOS BINUCLEARES DE COBRE(II)

4.1.1 Interação e clivagem de DNA plasmidial

Em estudos que envolvem interação entre moléculas de DNA e complexos metálicos, a faixa de pH e o tampão a ser utilizado são fatores cruciais. Os ácidos nucleicos, por exemplo, desnaturam rapidamente em soluções aquosas de pHs extremados (BLACKBURN; GAIT, 1997). Com efeito, para investigar o efeito do pH do meio reacional no processo de clivagem de DNA plasmidial pelos complexos binucleares de cobre, foram realizados testes de clivagem de DNA com diferentes tampões (PIPES, HEPES e CHES) em uma faixa de pH de 6,0 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 bastante inertes (VASCONCELOS; AZENHA; ALMEIDA, 1998; MASH et al., 2003; YU et al., 1997).

As Figuras 38 e 39 ilustram os resultados obtidos para os complexos **1** e **2**, respectivamente. Ambos apresentam um perfil de clivagem semelhante, sendo que o aumento do pH leva ao aumento da atividade dos complexos. Esta é relativamente baixa nos pHs 6,0, 7,0 e 8,0, onde houve a formação de apenas 20% da forma II do plasmídio, mas aumenta consideravelmente em pH 9,0, onde **1** e **2** atingem sua atividade máxima, degradando 70% e 90% do DNA plasmidial, respectivamente.

Diversos complexos de cobre(II) possuem comportamento semelhante, sendo mais ativos em pHs mais básicos. Um exemplo é o complexo $[\text{Cu}([\text{9}] \text{aneN}_3)_2]^{2+}$ (onde $[\text{9}] \text{aneN}_3 = 1,4,7\text{-triazaciclonano}$) com uma acridina conjugada, o qual possui maior atividade em pH 9,0, onde há inclusive a formação da forma III do plasmídio (FIII) após 48 horas de incubação a 37°C (HIROHAMA; ARII; CHIKIRA, 2004).

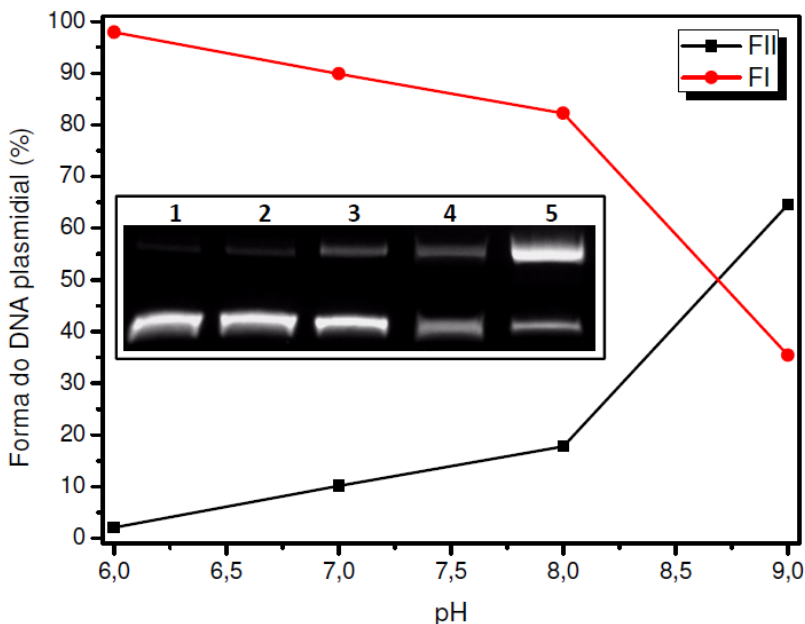


Figura 38. Gráfico das % das formas do DNA plasmidial (FI e FII) após a incubação com uma concentração de 20 μM do complexo **1** em diferentes pHs por 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. A foto menor inserida na Figura mostra o gel de agarose obtido no teste, onde: poço 1: controle (somente DNA); poços 2-5: reações de DNA + complexo **1** em pHs 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0, respectivamente. Diferentes tampões (25 mM) foram utilizados de acordo com o pH: PIPES (pHs 6,0 e 7,0), HEPES (pH 8,0) e CHES (pH 9,0).

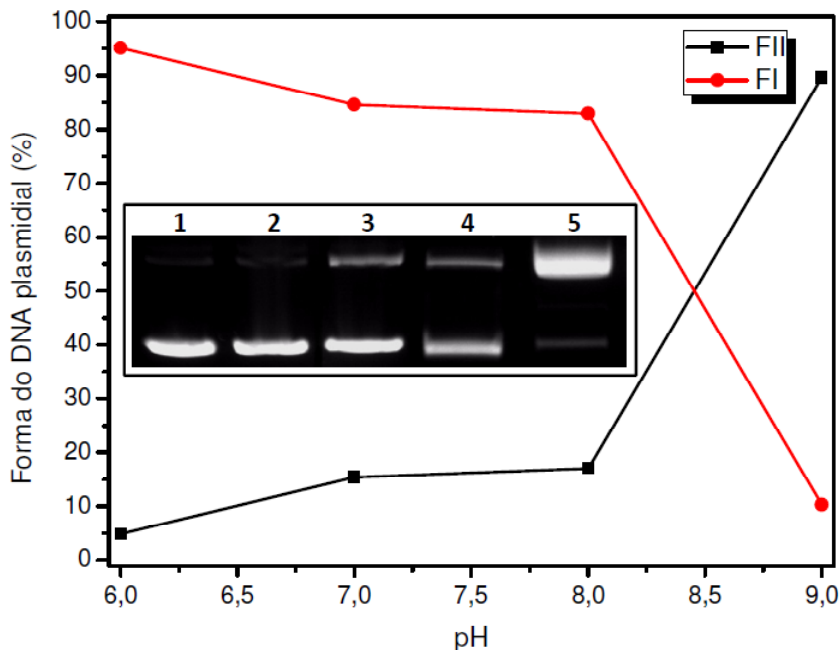


Figura 39. Gráfico das % das formas do DNA plasmidial (FI e FII) após a incubação com uma concentração de 20 μM do complexo **2** em diferentes pHs por 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. A foto menor inserida na Figura mostra o gel de agarose obtido no teste, onde: poço 1: controle (somente DNA); poços 2-5: reações de DNA + complexo **2** em pHs 6,0, 7,0, 8,0 e 9,0, respectivamente. Diferentes tampões (25 mM) foram utilizados de acordo com o pH: PIPES (pHs 6,0 e 7,0), HEPES (pH 8,0) e CHES (pH 9,0).

O efeito da concentração dos complexos na clivagem de DNA plasmidial foi analisado em seu pH de maior atividade (pH 9,0 – tampão CHES 25 mM). Como pode ser observado na Figura 40, a extensão da clivagem varia em função da concentração dos complexos.

Assim, o complexo **1**, na concentração 10 μM , converteu apenas 21,2% da forma superenovelada (FI) na forma circular aberta (FII) do DNA. No entanto, com o aumento da concentração, a clivagem aumenta rapidamente, sendo de 63,9% em 20 μM e chegando a 71,8% em 50 μM do complexo **1**, onde já se observam indícios de saturação da atividade (Figura 40 (A)).

O complexo **2**, por sua vez, já apresenta uma atividade bastante expressiva na concentração de 10 μM , na qual há a formação de 69,8%

da forma II do DNA. A partir da concentração de 30 μM , inclusive, começa haver a formação de DNA linear (FIII), que chega a 15,3% em 50 μM do complexo **2** (Figura 40 (B)).

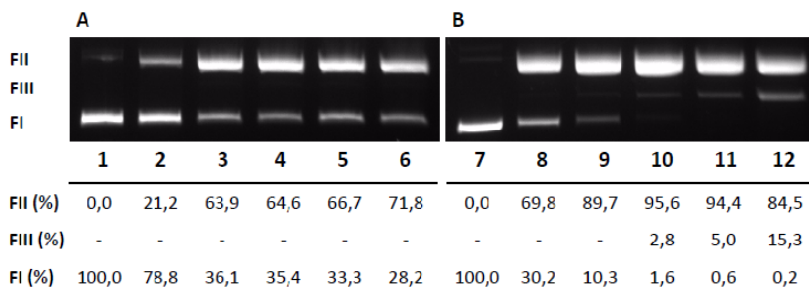
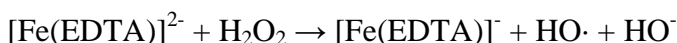
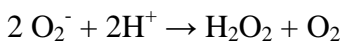
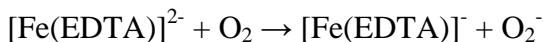


Figura 40. Clivagem de DNA plasmidial em diferentes concentrações dos complexos **1** (A) e **2** (B) no pH de maior atividade (pH 9,0 - tampão CHES 25 mM). Poços 1 e 7: controles (somente DNA); poços 2-6: reações de DNA + **1** (10, 20, 30, 40 e 50 μM , respectivamente). Poços 8-12: reações de DNA + **2** (10, 20, 30, 40 e 50 μM , respectivamente). Incubação: 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Com o intuito de analisar a influência de oxigênio molecular (O_2) e, conseqüentemente, identificar o tipo de mecanismo (hidrolítico ou oxidativo) envolvido no processo de clivagem de DNA plasmidial pelos complexos **1** e **2**, foram realizadas, paralelamente, reações em condições aeróbias e anaeróbias (atmosfera de argônio) em pHs 8,0 e 9,0. Para tanto, o sistema $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}/\text{DTT}$ foi utilizado como controle positivo, uma vez que este sistema é capaz de gerar radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$), os quais oxidam o DNA através da reação de Fenton (POGOZELSKI; TULLIUS, 1998; NETTO; STADTMAN, 1996; SPEAR; AUST, 1998), segundo as equações abaixo:



Neste experimento, os complexos apresentaram comportamentos diferentes, segundo observa-se nas Figuras 41 e 42. O complexo **1** teve

sua atividade diminuída em atmosfera de argônio em ambos os pHs testados (Figura 41). No entanto, a inibição foi substancialmente maior em pH 9,0 do que em pH 8,0, indicando que a clivagem de DNA se dá por um mecanismo oxidativo em pH 9,0 e por um mecanismo majoritariamente hidrolítico em pH 8,0.

De acordo com os estudos de titulação potenciométrica (ver seção 3.1.1.1), em pH 8,0 há uma grande porcentagem da espécie aquo-hidróxido do complexo $[(\text{OH})\text{Cu}(\text{II})(\mu\text{-alcóximo})\text{Cu}(\text{II})(\text{H}_2\text{O})]$ em solução. Logo, esta deve ser a espécie ativa na hidrólise do DNA plasmidial, já que apresenta um ligante lábil (H_2O), que permite a ligação de uma molécula de DNA a um centro metálico, e um nucleófilo (OH^-) coordenado ao outro centro metálico, disponível para o ataque intramolecular. Resultados semelhantes foram obtidos na catálise do substrato modelo 2,4-BDNPP (OSÓRIO, 2007). Conseqüentemente, em pH 9,0, a atividade hidrolítica de **1** praticamente desaparece, pois a porcentagem da espécie aquo-hidróxido diminui consideravelmente. No entanto, este é o pH ótimo, pelo fato de que a atividade oxidativa de **1** aumenta excepcionalmente. A espécie $[(\text{OH})\text{Cu}(\text{II})(\mu\text{-alcóximo})\text{Cu}(\text{II})(\text{OH})]$ passa a ser a espécie predominante em solução, devido à desprotonação da segunda molécula de água coordenada a um dos centros de cobre(II).

O mesmo foi observado para os 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 $\text{H}_2\text{Ldtb} - \{2\text{-[N,N-Bis(2-piridilmetil)aminometil]-6-[N',N'-(3,5-di-tert-butilbenzil-2-hidroxi)(2-piridilmetil)aminometil]-4-metilfenol}$), descritos por Peralta e colaboradores (2006), que apresentaram um mecanismo de clivagem de DNA dependente de oxigênio.

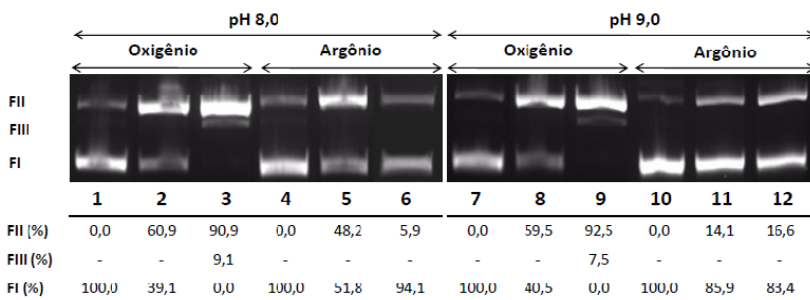


Figura 41. Clivagem de DNA plasmidial (pBSK II 30 μ M pb) pelo complexo **1** em condições aeróbicas (atmosfera de oxigênio) e anaeróbicas (atmosfera de argônio) em pH 8,0 (tampão HEPES 25 mM) e pH 9,0 (tampão CHES 25 mM). Poços 1, 4, 7 e 10: Controles (somente DNA); poços 2 e 5: reações de DNA + complexo **1** (40 μ M); poços 8 e 11: reações de DNA + complexo **1** (20 μ M); poços 3, 6, 9 e 12: reações de Fe-EDTA (100 μ M) + DTT (10 mM). Incubação: 6 horas a 37 $^{\circ}$ C.

Com relação ao complexo **2**, a clivagem de DNA também diminuiu mais em pH 9,0 do que em pH 8,0, na ausência de oxigênio, sugerindo uma atividade hidrolítica maior em pH 8,0, onde a espécie aquo-hidróxido também é a espécie ativa na catálise. No entanto, em pH 9,0, a inibição foi apenas parcial, indicando a presença de um mecanismo misto de clivagem envolvendo hidrólise e oxidação de DNA plasmidial em proporções similares (ver Figura 42).

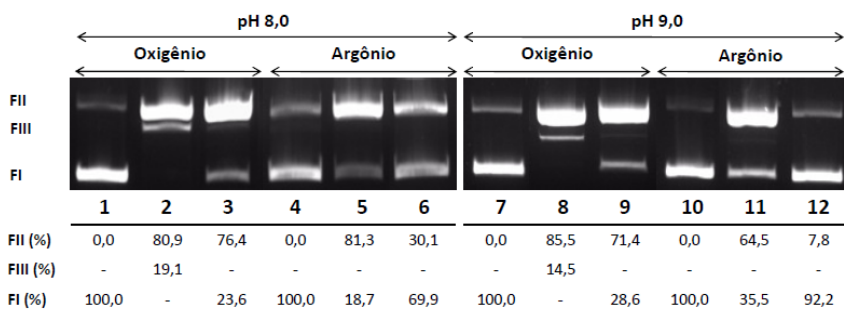


Figura 42. Clivagem de DNA plasmidial (pBSK II 30 μ M pb) pelo complexo **2** em condições aeróbicas (atmosfera de oxigênio) e anaeróbicas (atmosfera de argônio) em pH 8,0 (tampão HEPES 25 mM) e pH 9,0 (tampão CHES 25 mM). Poços 1, 4, 7 e 10: Controles (somente DNA); poços 2 e 5: reações de DNA + complexo **2** (30 μ M); poços 8 e 11: reações de DNA + complexo **2** (30 μ M); poços 3, 6, 9 e 12: reações de Fe-EDTA (100 μ M) + DTT (10 mM). Incubação: 6 horas a 37 $^{\circ}$ C.

11: reações de DNA + complexo 2 (10 μM); poços 3, 6, 9 e 12: reações de Fe-EDTA (100 μM) + DTT (10 mM). Incubação: 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Esses resultados corroboram com aqueles obtidos por Osório (2007) que demonstrou que os complexos 1 e 2 podem ser considerados promíscuos, ou seja, modelos funcionais tanto para as enzimas catecol oxidases, quanto para as hidrolases/nucleases sintéticas, já que atuam tanto na oxidação do substrato modelo 3,5-di-terc-butilcatecol (3,5-DTBC), quanto na hidrólise do diéster de fosfato 2,4-bisdinitrofenilfosfato (2,4-BDNPP).

Normalmente, complexos que possuem atividade oxidativa necessitam de agentes redutores no meio reacional (como MPA, DTT ou ascorbato), para que haja a redução do (s) centro (s) metálico (s) do complexo, que posteriormente, ao reoxidar, promove a redução do oxigênio molecular presente no meio e a formação de espécies reativas de oxigênio como radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) que oxidam o DNA (SIGMAN; MAZUMDER; PERRIN, 1993; POGOSELSKI; TULLIUS, 1998; HEGG; BURSTYN, 1998; ARMITAGE, 1998).

Assim sendo, na presença do agente quelante de cobre(I), batocuproína, os complexos 1 e 2 tiveram sua atividade completamente inibida, demonstrando que a redução dos centros de cobre(II) para cobre(I) é uma etapa importante na clivagem de DNA (Figura 43).

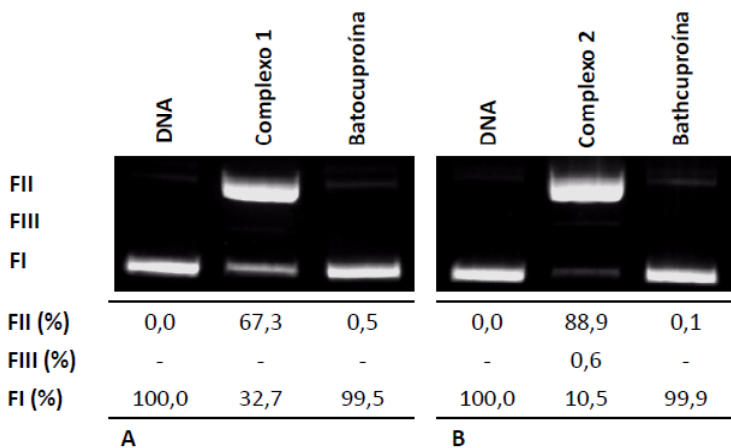


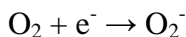
Figura 43. Efeito da batocuproína (500 μM) na clivagem de DNA pelos complexos 1 (40 μM) (A) e 2 (10 μM) (B). As reações foram realizadas em tampão CHES pH 9,0 (25 mM) e incubadas por 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Entretanto, nenhum agente redutor externo foi adicionado à mistura reacional, que em todos os testes contém basicamente DNA plasmidial, complexo **1** ou **2** e tampão CHES pH 9,0. Portanto, só poderiam estar atuando como agentes redutores o tampão CHES ou o próprio DNA plasmidial.

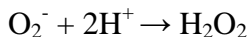
Wang e Sayre (1992) mostraram que o complexo de cobre(II) $[\text{Cu}^{2+}(\text{batho})_2]$ (onde batho=2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-disulfonato de fenantrolina) é capaz de oxidar tampões de amins terciárias, como os tampões MES, HEPES e PIPES. Nesse sentido, para verificar se o tampão CHES estaria atuando no papel de agente redutor, já que é bastante semelhante aos tampões citados, pois possui uma amina secundária em sua estrutura (Figura 37), foram realizados testes de clivagem com outros tipos de tampões (em pH 9,0) como o tampão fosfato. No entanto, não houve alterações significativas na atividade dos complexos (dados não mostrados). Portanto, sugere-se que a própria molécula de DNA estaria atuando como o agente redutor no processo cobre(II) \rightarrow cobre(I), corroborando com os resultados obtidos por Oliveira e colaboradores (2005) na análise do mecanismo de ação do complexo binuclear de cobre ($[\text{Cu}_2(\text{BMXD})]^{4+}$, onde BMXD representa o ligante poliazacina macrocíclico 3,6,9,17,20,23-hexaazatriciclo[23.3.1.1^{11,15}]-triaconta-1(29),11 (30),12,14,25,27-hexano.

Como mencionado anteriormente, a redução do oxigênio molecular pode provocar a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Esse processo ocorre da seguinte forma:

(a) A adição de um elétron a uma molécula de oxigênio no estado fundamental provoca a formação do radical superóxido (O_2^-):



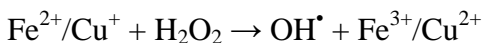
(b) O superóxido ao receber mais um elétron e dois íons hidrogênio forma peróxido de hidrogênio (H_2O_2), através de um processo chamado dismutação:



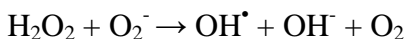
(c) Quando o H_2O_2 recebe mais um elétron e um íon hidrogênio, é formado o radical hidroxila (OH^\bullet), que é o mais reativo dos intermediários, pois pode reagir e alterar qualquer estrutura celular que esteja próxima e assim influenciar enzimas, membranas ou ácidos

nucléicos. O radical hidroxila pode ser formado principalmente de duas maneiras:

(1) Através da reação de Fenton, quando o H_2O_2 reage com íons metálicos como ferro ou cobre:



(2) Através da reação de Haber-Weiss, onde íons de metais de transição podem catalisar a reação entre H_2O_2 e superóxido, conduzindo à formação do radical hidroxila:



Outra espécie reativa de interesse é o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), que é uma forma de oxigênio spin-alterada. Cada ERO tem suas próprias características, mostrando diferentes reatividades e tempos de meia-vida.

Com o intuito de determinar quais dessas espécies estariam atuando na oxidação do DNA plasmidial, foram realizados experimentos na presença de alguns inibidores, como: DMSO, o qual atua no seqüestro de radicais hidroxila (OH^\bullet); superóxido dismutase (SOD), uma enzima que catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-) e azoteto de sódio (NaN_3), a qual atua na captura de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Os resultados obtidos estão expostos na Figura 44. A atividade do complexo **1** (Figura 44 (A)) foi parcialmente inibida na presença de DMSO, o que indica que radicais hidroxila estão envolvidos na oxidação do DNA. Por outro lado, o complexo **2** teve sua atividade inibida na presença de DMSO e SOD, sugerindo que, além dos radicais hidroxila, os radicais superóxido também atuam no processo de clivagem.

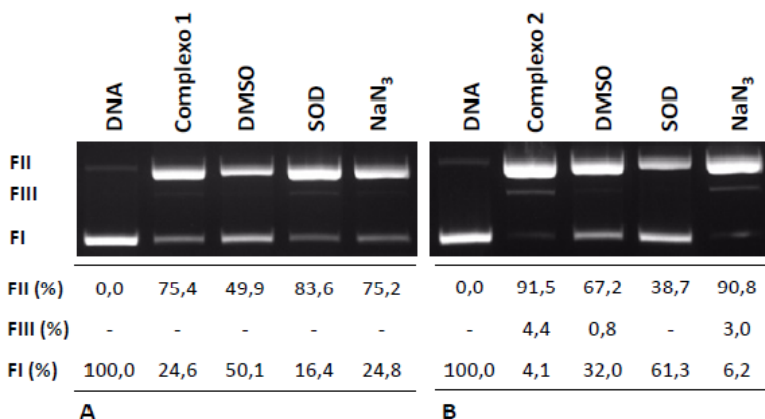


Figura 44. Clivagem de DNA pelos complexos **1** (40 μ M) (A) e **2** (10 μ M) (B) na presença de diferentes inibidores de espécies reativas de oxigênio: DMSO (10% v/v); SOD (20 unidades) e NaN₃ (500 μ M).

É importante salientar que, para que ocorra a clivagem, primeiramente deve ocorrer algum tipo de interação entre os complexos e o DNA. Normalmente, essa interação ocorre por três principais modos: intercalação, ligação nos sulcos do DNA ou interações eletrostáticas (BLACKBURN; GAIT, 1997). Deste modo, para determinar de que forma os complexos binucleares de cobre interagem com o DNA foram realizados diferentes testes, como a espectroscopia de dicroísmo circular (DC). Esta é uma técnica amplamente utilizada para diagnosticar mudanças na morfologia do DNA quando há interações com outras moléculas (GARRETT; RAGAZZON; CHAIRES, 2007). O espectro de DC do DNA livre (CT-DNA) é composto por uma banda positiva em 275 nm, devido ao empilhamento entre as bases nitrogenadas, e uma banda negativa em 245 nm, devido à helicidade direita da forma B do DNA (CHEN et al., 2008), como pode ser observado na Figura H. Assim, com a adição de concentrações crescentes dos complexos **1** (Figura 45) e **2** (Figura 46) à solução de CT-DNA, a intensidade de ambas as bandas diminuiu significativamente. O declínio da intensidade da banda negativa do DNA sugere que a interação com os complexos está provocando uma mudança de conformação de B-DNA para Z-DNA (CHEN et al., 2008). Ainda, a diminuição da intensidade da banda positiva, indica que pode estar havendo um relaxamento da dupla hélice do DNA, o que leva à perda de sua helicidade (HE et al., 2009). Este comportamento é típico de complexos ligantes dos sulcos do DNA (DHAR; NETHAJI;

CHAKRAVARTY, 2005) e pode ocorrer, também, quando há interações eletrostáticas. Ao contrário, o aumento da intensidade das bandas do DNA ocorre quando a interação se dá por meio de intercalação de estruturas planares, presentes no ligante do complexo, entre as bases nitrogenadas do DNA (CHEN et al., 2007).

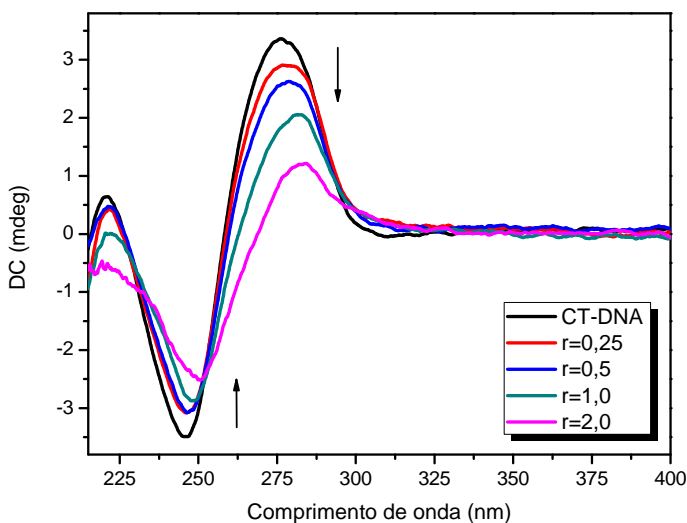


Figura 45. Espectros de dicroísmo circular de CT-DNA (200 μ M) na ausência e na presença de concentrações variadas do complexo **1** ($r=0,25$; $r=0,5$; $r=1$ e $r=2$), onde $r=[\text{complexo}]/[\text{CT-DNA}]$.

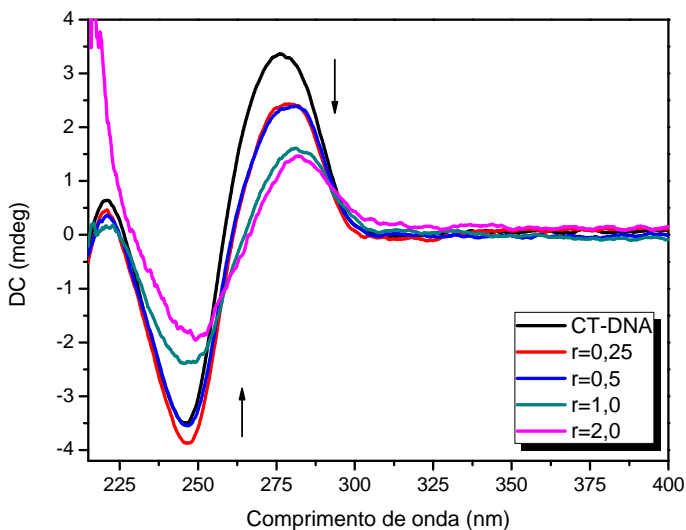


Figura 46. Espectros de dicroísmo circular de CT-DNA (200 μM) na ausência e na presença de concentrações variadas do complexo 2 ($r=0,25$; $r=0,5$; $r=1$ e $r=2$), onde $r=[\text{complexo}]/[\text{CT-DNA}]$.

Em função disso, para confirmar se os complexos atuam como ligantes dos sulcos do DNA foram feitos testes de clivagem de DNA na presença da distamicina e do verde de metila, que são ligantes específicos dos sulcos menor e maior do DNA (Figura 47), respectivamente.

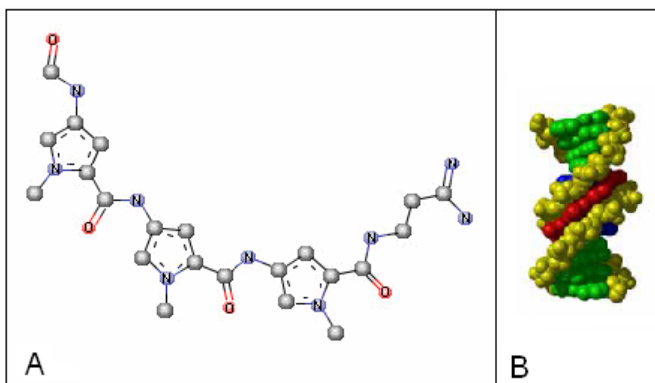


Figura 47. Estrutura química da distamicina (**A**). Ligação específica da distamicina (vermelho) ao sulco menor do DNA (**B**) (OLIVEIRA, 2006).

Na Figura 48 (A) nota-se que, com relação ao complexo **1**, tanto a presença da distamicina quanto a do verde de metila não inibiram a atividade do complexo, demonstrando que este complexo não age através dos sulcos do DNA. Por outro lado, a Figura 48 (B) mostra que a atividade do complexo **2** foi parcialmente inibida na presença da distamicina, indicando que tal complexo deve atuar através do sulco menor do DNA. Mas, como a inibição não é total, nem todos os sítios de interação entre o complexo **2** e o DNA foram bloqueados, ou seja, deve haver ainda outro tipo de interação.

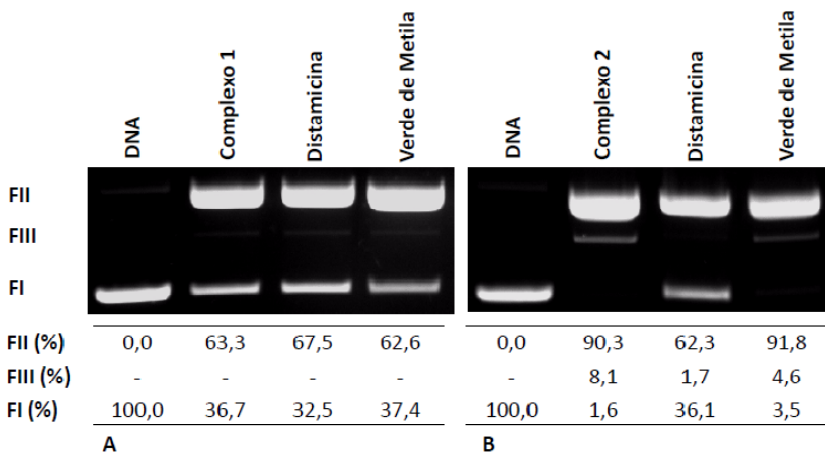


Figura 48. Influência dos ligantes específicos dos sulcos menor e maior do DNA, distamicina e verde de metila, (50 μM) na atividade de clivagem de DNA dos complexos **1** (40 μM) (**A**) e **2** (10 μM) (**B**). As reações foram realizadas em tampão CHES pH 9,0 (25 mM) e incubadas por 6 horas a 37 °C.

Segundo os espectros de DC esta seria, então, eletrostática. Esta hipótese foi ratificada através de um experimento onde se variou a força iônica das reações complexo-DNA com a adição de NaCl (0-200 mM). Assim, as Figuras 49 e 50 mostram que o aumento da força iônica levou a uma considerável inibição da clivagem de DNA, sendo que esta reduziu de mais de 90%, na ausência de NaCl, para 30% e 50% para os complexos **1** e **2**, respectivamente, na presença de 200 mM de NaCl. Esses resultados sugerem que interações eletrostáticas contribuem significativamente no processo de clivagem de DNA plasmidial por ambos os complexos, uma vez que a molécula de DNA possui carga negativa e **1** e **2** são positivamente carregados.

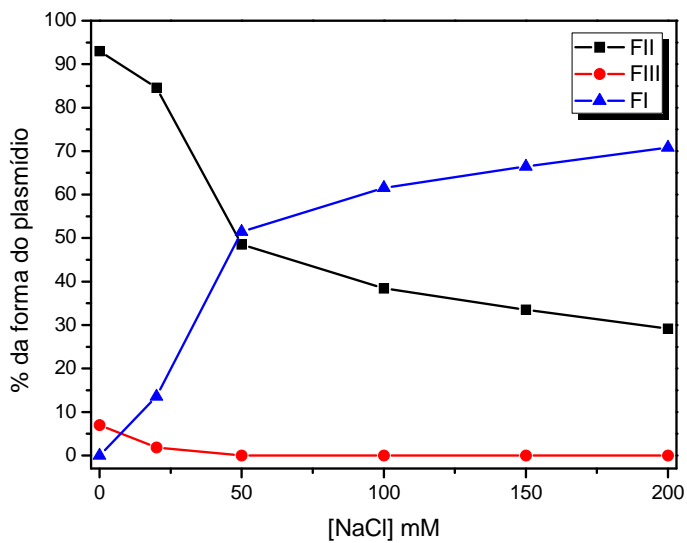


Figura 49. Efeito da força iônica na clivagem de DNA pelo complexo **1** (80 μM). Condições reacionais: Tampão CHES pH 9,0 (25 mM) e incubação de 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$.

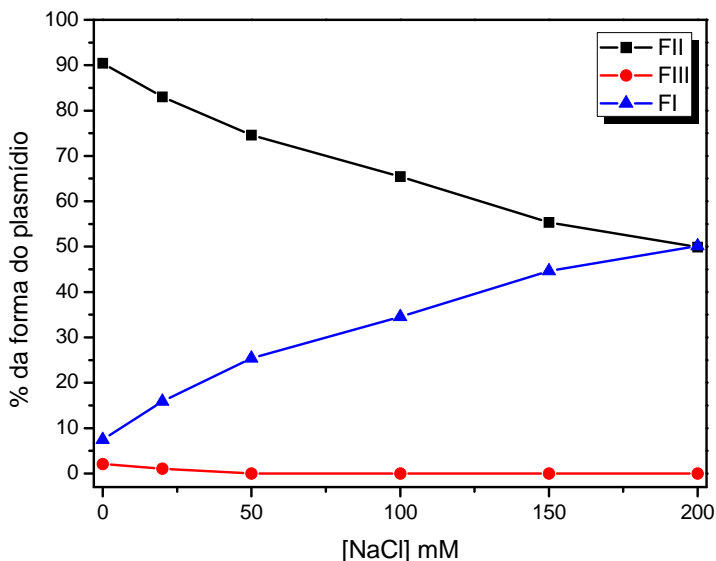


Figura 50. Efeito da força iônica na clivagem de DNA pelo complexo **2** (10 μM). Condições reacionais: Tampão CHES pH 9,0 (25 mM) e incubação de 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$.

Através desses resultados, algumas conclusões podem ser explicitadas. Como em pH 9,0 o complexo **1** possui atividade apenas oxidativa, é bastante plausível que ele interaja com o DNA apenas eletrostaticamente, já que não é necessário que o complexo se ligue efetivamente ao DNA, para que haja a formação e difusão dos radicais hidroxila e a clivagem do DNA, ou seja, apenas uma aproximação eletrostática já é suficiente para que ocorra a oxidação. O complexo **2**, por sua vez, possui um mecanismo misto de clivagem (hidrólise e oxidação) em pH 9,0. Desta forma, para que a hidrólise das ligações fosfodiéster do DNA ocorra, é necessário que haja não só interações eletrostáticas, mas também a ligação do complexo ao DNA, que, neste caso, ocorre através do sulco menor, como demonstrado. Assim, apesar de a espécie ativa na hidrólise (espécie aquo-hidroxo) estar em pequena proporção em pH 9,0 como visto, a hidrólise ocorre, pois o complexo **2** interage também através do sulco menor, o que não ocorre para o complexo **1** onde a hidrólise praticamente desaparece em pH 9,0. Com

isso, é possível deduzir, ainda, que o complexo **2** deve estar interagindo mais fortemente com o DNA do que o complexo **1**.

Para confirmar esse fato, uma titulação espectrofotométrica foi realizada com o intuito de se calcular a constante de ligação intrínscica (K_b) entre os complexos e o DNA. As Figuras 51 e 52 mostram os resultados desse experimento, onde nota-se um aumento na absorvidade molar da banda de transição d-d de ambos os complexos (hipercromismo), bem como um pequeno deslocamento da mesma para menores comprimentos de onda (hipsocrômismo), à medida que foram adicionadas quantidades crescentes de DNA plasmidial (0,5 a 1000 μM). Esse comportamento já foi observado para alguns complexos de cobre (REN et al., 2000; BALDINI et al., 2003; ZHANG et al., 2004; LIU et al., 1999; MAHADEVAN; PALANIANDAVAR, 1998), muitos dos quais interagem eletrostaticamente com o DNA.

Utilizando-se dos gráficos de $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \times [\text{DNA}]$ (inseridos nas Figuras 51 e 52), calculou-se a constante de ligação intrínscica (K_b) para os complexos **1** e **2** como sendo de $1,65 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $2,75 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente. Em outras palavras, **2** interage aproximadamente 1,6 vezes mais fortemente com o DNA do que **1**, o que corrobora com os dados anteriores. Nos espectros de DC, inclusive, as alterações provocadas nas bandas do CT-DNA também são maiores na presença do complexo **2** (Figuras 45 e 46).

Diversos complexos de cobre descritos na literatura apresentam valores de K_b semelhantes aos obtidos para **1** e **2**. Pode-se citar, por exemplo, o complexo CuMFF com uma constante de $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$. Este atua na clivagem principalmente através dos sulcos menor e maior do DNA (OLIVEIRA et al., 2009).

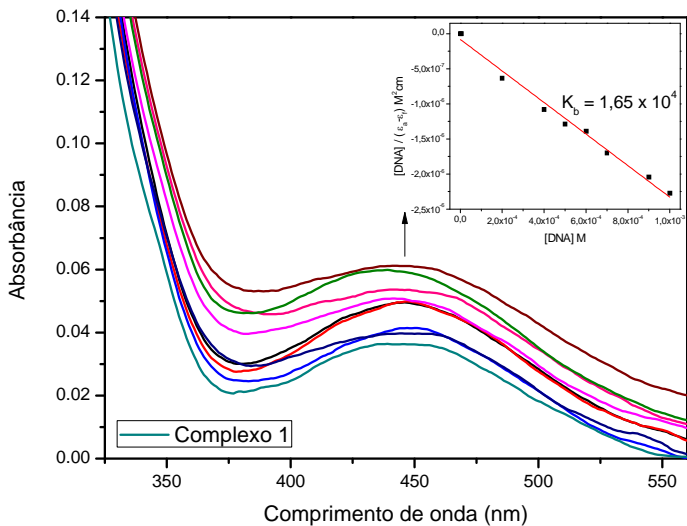


Figura 51. Titulação espectrofotométrica do complexo **1** (100 μM) na ausência e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (0,5 a 1000 μM). As reações foram realizadas em tampão CHES pH 9,0 (25 mM). Gráfico menor inserido na Figura $[DNA]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \times [DNA]$.

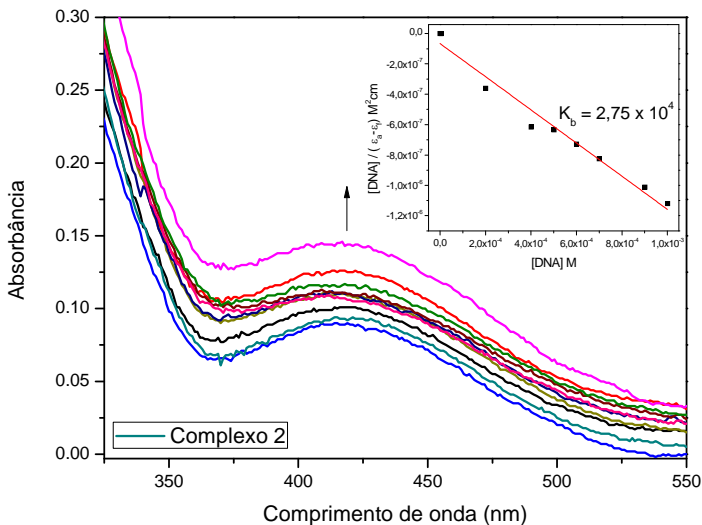


Figura 52. Titulação espectrofotométrica do complexo **2** (100 μM) na ausência e na presença de concentrações crescentes de CT-DNA (0,5 a 1000 μM). As reações foram realizadas em tampão CHES pH 9,0 (25 mM). Gráfico menor inserido na Figura $[\text{DNA}]/(\epsilon_a - \epsilon_f) \times [\text{DNA}]$.

Em resumo, esses resultados levam-nos a propor um mecanismo de ação para a clivagem de DNA plasmidial pelos complexos **1** e **2** em seu pH de maior atividade.

Primeiramente, o complexo **1** se aproxima do DNA via interações eletrostáticas com seu esqueleto de fosfatos e os centros metálicos de cobre(II) são reduzidos para cobre(I). Esta redução pode ser atribuída a uma transferência de elétrons complexo-DNA em solução (OLIVEIRA et al., 2005). Em seguida, o oxigênio (O_2) do meio reacional reage com os centros de cobre I através de um processo redox, gerando radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) que clivam o DNA oxidativamente.

O complexo **2**, por sua vez, interage com o DNA via atrações eletrostáticas e ligação no sulco menor, sendo que o mecanismo de ação é misto. A clivagem oxidativa ocorre da mesma forma descrita para o complexo **1**, havendo, no entanto, a formação de duas espécies reativas de oxigênio: os radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e os radicais superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$). Em um segundo momento, a ligação da forma aquo-hidróxido do

complexo no sulco menor do DNA promove a hidrólise de suas ligações fosfodiéster.

As cinéticas de clivagem de DNA plasmidial foram realizadas no pH de maior atividade dos complexos (tampão CHES 25 mM, pH 9,0). Assim, os dados cinéticos foram obtidos através do monitoramento da diminuição da Forma I do DNA plasmidial em diferentes concentrações dos complexos e em função do tempo de reação, utilizando-se o modelo cinético conhecido como “pseudo-Michaelis-Menten”.

Com isso, as constantes de clivagem (k_{obs}) foram calculadas em cada concentração do complexo, sendo que as Figuras 53 e 54 mostram a variação dessas constantes em função do aumento da concentração dos complexos, onde se observa um comportamento de saturação.

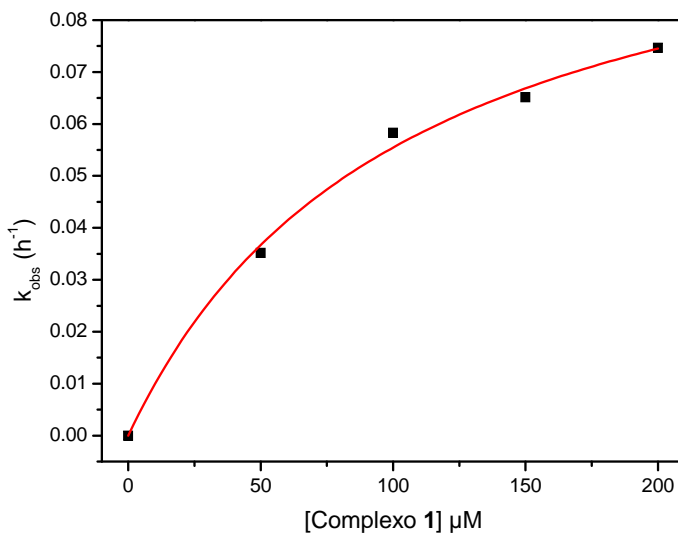


Figura 53. Gráfico de k_{obs} versus concentrações do complexo 1, mostrando um comportamento de saturação. As reações foram realizadas em pH 9,0 (tampão CHES 25 mM) com 300 ng (25 μM pb) do plasmídeo pBSK II e concentrações crescentes do complexo. A incubação foi realizada a 37 °C e alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 – 6 horas).

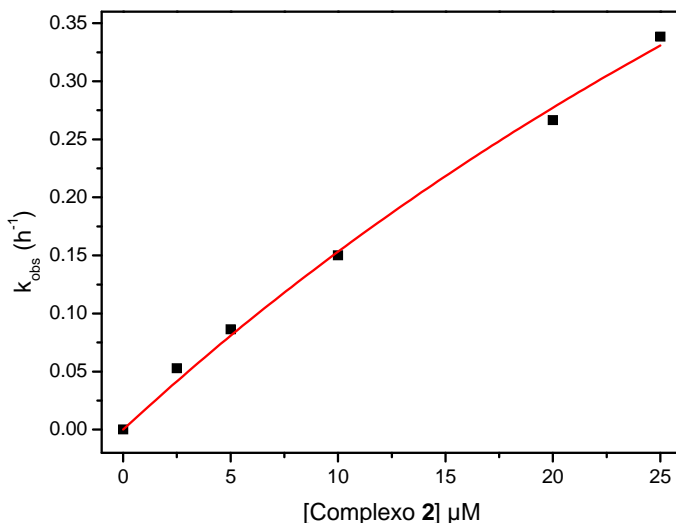


Figura 54. Gráficos de k_{obs} versus concentrações do complexo **2**, mostrando um comportamento de saturação. As reações foram realizadas em pH 9,0 (tampão CHES 25 mM) com 300 ng (25 μM pb) do plasmídeo pBSK II e concentrações crescentes do complexo. A incubação foi realizada a 37 °C e alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 – 6 horas).

Os parâmetros cinéticos calculados a partir desses dados estão dispostos na Tabela 1. Esta indica que os complexos **1** e **2** apresentam valores de k_{cat} de 0,12 e 0,55 h⁻¹, respectivamente. Assim, o valor da aceleração da degradação em relação ao DNA não catalisado ($k_{nc} = 3,6 \times 10^{-8}$ h⁻¹) foi de $3,4 \times 10^6$ vezes para **1** e $1,5 \times 10^7$ vezes para **2**, indicando que esses complexos são bastante ativos na clivagem de DNA plasmidial, já que os complexos de cobre(II) descritos na literatura apresentam uma aceleração da degradação variando entre $1,1 \times 10^6$ e $2,3 \times 10^8$ vezes em relação ao DNA não catalisado (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000; ZHANG, 2008).

Os dados de eficiência catalítica revelaram que **2** ($2,3 \times 10^4$ h⁻¹M⁻¹) é aproximadamente 23 vezes mais ativo mimetizando a função de uma nuclease química que **1** ($1,0 \times 10^3$ h⁻¹ M⁻¹), sendo que o tempo de meia-vida do DNA na presença de **1** e **2** foi de aproximadamente 5,8 e 1,3 horas, respectivamente. Assim, pode-se dizer que os parâmetros

cinéticos corroboram com os dados de interação, sendo também mais expressivos para o complexo **2**.

Em função disso, um dos fatores que deve estar contribuindo para que **2** seja o complexo mais ativo é o fato de interagir mais fortemente com o DNA, provavelmente, devido a presença de dois grupos fenóis em sua estrutura, já que estes podem aumentar significativamente o valor da constante de ligação dos complexos, como já descrito por Neves e colaboradores (2002).

Além disso, a presença dos grupos elétron-doadores, terc-butil, nos complexos **1** e **2**, provocou mudanças significativas na atividade de clivagem de DNA plasmidial, quando comparado aos complexos análogos descritos por Rossi e colaboradores (2002, 2005). O complexo $[\text{Cu}_2(\text{Hbtppnol})(\text{OAc})](\text{ClO}_4)_2$, por exemplo, o qual apresenta uma aceleração da degradação de $6,3 \times 10^5$ vezes em relação ao DNA não catalisado, é significativamente menos ativo que **1** e **2**.

Tabela 1. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelos complexos **1** e **2**.

Complexo	$k_{\text{cat}}^{\text{a}}$ (h^{-1})	K_{M} (M)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{b}}$ ($\text{h}^{-1} \text{M}^{-1}$)	$k_{\text{cat}}/k_{\text{nc}}^{\text{c}}$ catalisada	$t_{1/2}^{\text{d}}$ (h)
1	0,12	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^3$	$3,4 \times 10^6$	5,8
2	0,55	$2,4 \times 10^{-5}$	$2,3 \times 10^4$	$1,5 \times 10^7$	1,3

^aConstante de catálise. ^bEficiência catalítica. ^cAceleração da degradação em relação ao DNA não catalisado ($k_{\text{nc}}=3,6 \times 10^{-8}\text{h}^{-1}$). ^dTempo de meia vida do DNA na forma superenovelada ($t_{1/2}=-\ln(0,5)/k_{\text{cat}}$).

4.1.2 Interação e clivagem de BSA

Dada a importância de se obter pequenas moléculas capazes de atuar como proteases químicas, já que estas podem ser utilizadas em áreas de grande interesse na atualidade, como estudos de estrutura de proteínas em solução e identificação de sítios de ligação proteína-DNA (BURANAPRAPUK, 2000), os complexos binucleares de cobre(II) também foram analisados quanto à capacidade de clivar proteínas.

As Figuras 55 e 56 mostram os resultados dos testes em diferentes pHs (6,0, 7,0, 8,0 e 9,0) e concentrações dos complexos (0 - 500 μM), para **1** e **2**, respectivamente. Através destes dados é possível observar que ambos os complexos apresentam uma atividade consideravelmente baixa em pHs 6,0 e 7,0, onde há pouca degradação de BSA. Além disso, nestes pHs, observa-se, que em concentrações

acima de 200 μM , essa degradação praticamente desaparece, provavelmente, devido ao uso de altas concentrações dos complexos, as quais podem estar provocando precipitações na reação e, conseqüentemente, dificultando a clivagem. Esse fato, porém, não ocorre em pH 8,0, onde a degradação de BSA aumenta visivelmente, sendo este o pH de maior atividade dos complexos.

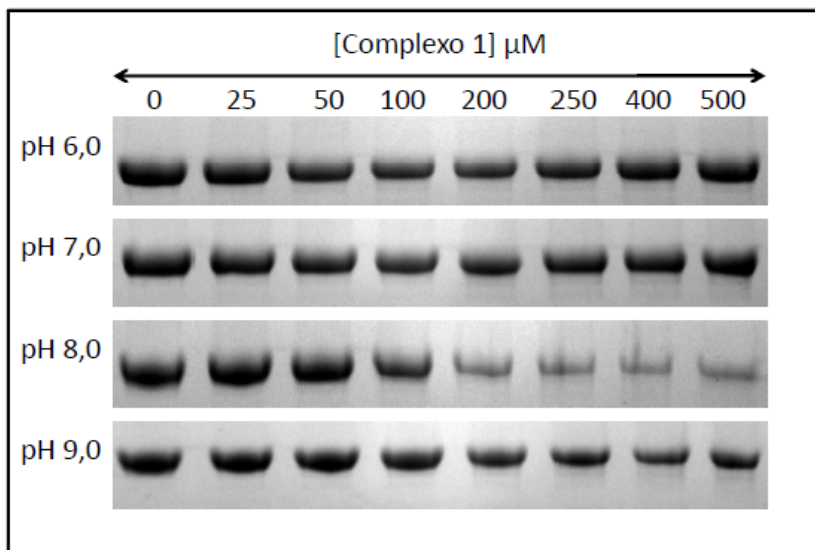


Figura 55. Clivagem de BSA (15 μM) em diferentes pHs e concentrações do complexo **1**. As reações foram incubadas durante 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Diferentes tampões (25 mM) foram utilizados de acordo com o pH: PIPES (pHs 6,0 e 7,0), HEPES (pH 8,0) e CHES (pH 9,0).

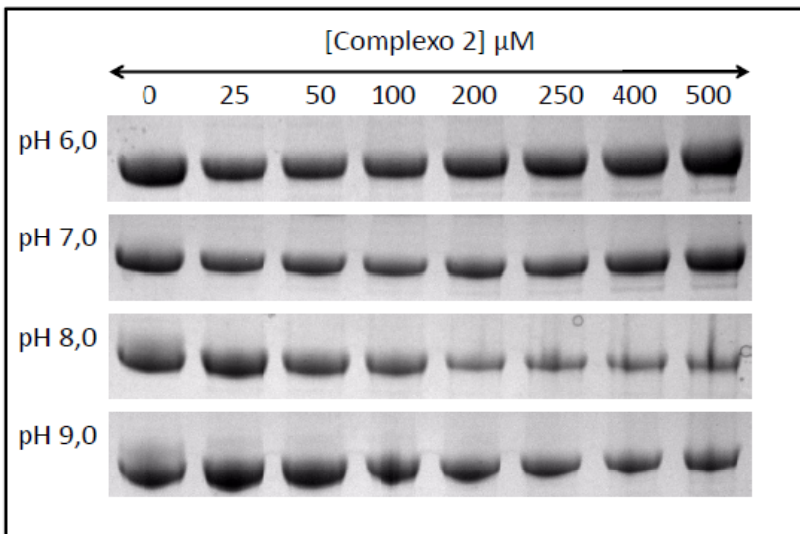


Figura 56. Clivagem de BSA (15 μM) em diferentes pHs e concentrações do complexo 2. As reações foram incubadas durante 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. Diferentes tampões (25 mM) foram utilizados de acordo com o pH: PIPES (pHs 6,0 e 7,0), HEPES (pH 8,0) e CHES (pH 9,0).

O comportamento desses complexos em pH 8,0 pode ser visto em maiores detalhes nas Figuras 57 e 58, as quais mostram as % de BSA clivada em cada concentração testada. Nessas condições, com o aumento das concentrações de **1** e **2**, a degradação de proteína aumenta rapidamente, atingindo 90% e 75%, respectivamente, em 400 μM , onde já se observam indícios de saturação da atividade.

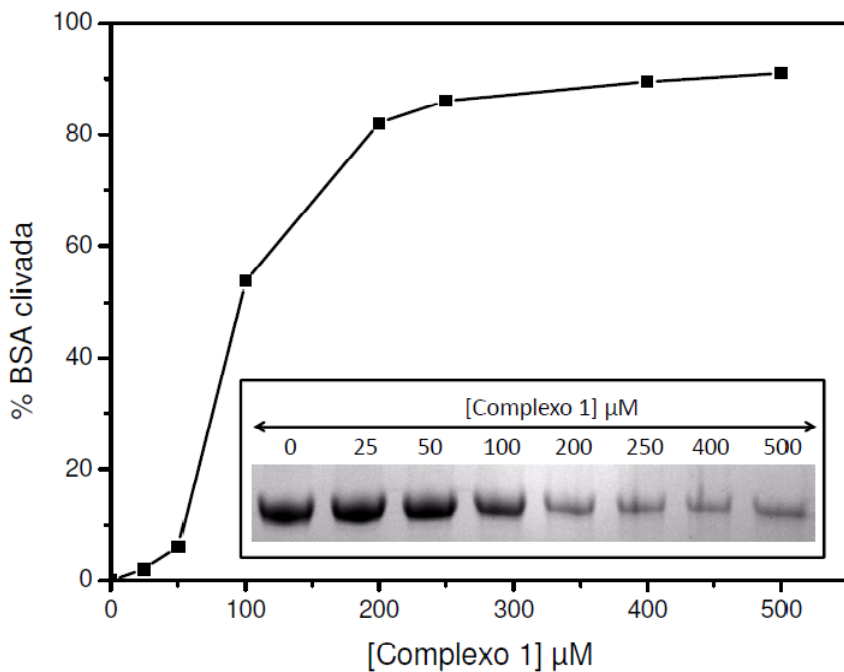


Figura 57. Gráfico das % de BSA clivada após a incubação com diferentes concentrações do complexo 1 (0 – 500 μM) em pH 8,0 (tampão HEPES 25 mM) por 6 horas a 37 $^{\circ}\text{C}$. A foto menor inserida na Figura mostra o gel de poliacrilamida obtido no teste.

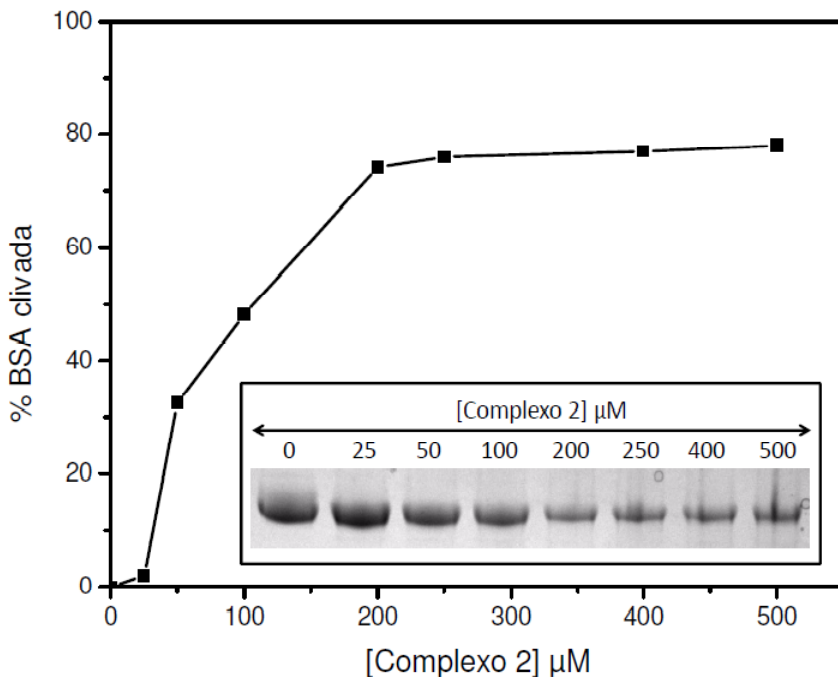


Figura 58. Gráfico das % de BSA clivada após a incubação com diferentes concentrações do complexo 2 (0 – 500 μM) em pH 8,0 (tampão HEPES 25 mM) por 6 horas a 37 °C. A foto menor inserida na Figura mostra o gel de poliacrilamida obtido no teste.

O mecanismo envolvido nas reações de clivagem de BSA pelos complexos foi determinado através de um experimento realizado em condições aeróbias (atmosfera de oxigênio) e anaeróbias (atmosfera de argônio). Para tanto, utilizou-se como controle positivo o sistema $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}/\text{DTT}$, visto que já foi demonstrado que este complexo é capaz de clivar polipeptídios através de um mecanismo oxidativo (PLATS; ERMACORA; FOX, 1993). Assim, observa-se nas Figuras 59 e 60 – poços 4, que em presença de oxigênio o complexo $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$ clivou cerca de 95% de BSA. No entanto, em atmosfera de argônio não houve degradação da mesma, o que indica que o teste foi realizado em condições anaeróbias.

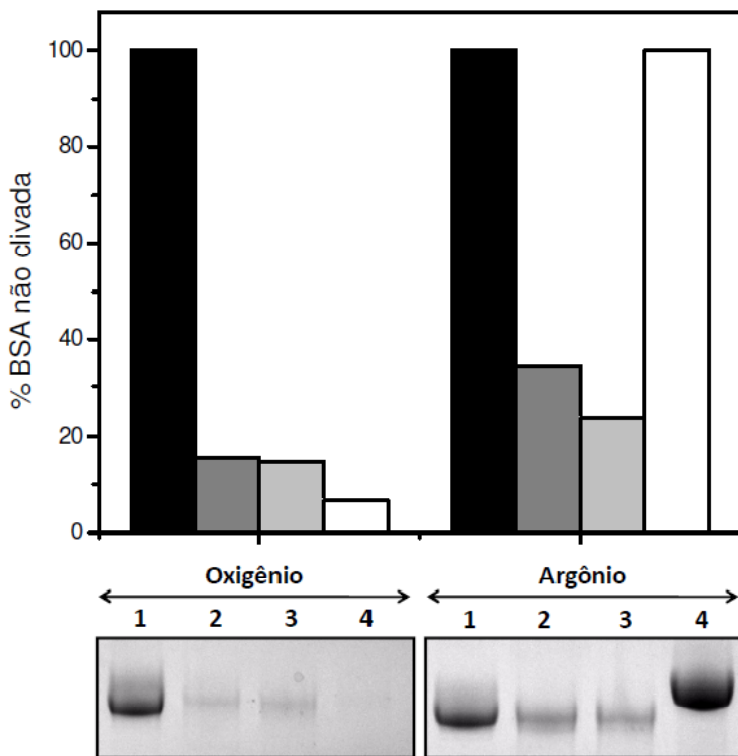


Figura 59. Gráfico das % de BSA não clivada em condições aeróbias (oxigênio) e anaeróbias (argônio) após incubação durante 6 horas a 37 °C na presença do complexo **1**. Abaixo, gel de poliacrilamida obtido no teste, onde: poços 1: somente BSA (15 μM); poços 2: BSA + complexo **1** (250 μM); poços 3: BSA + complexo **1** (500 μM) e poços 4: controle positivo $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}/\text{DTT}$.

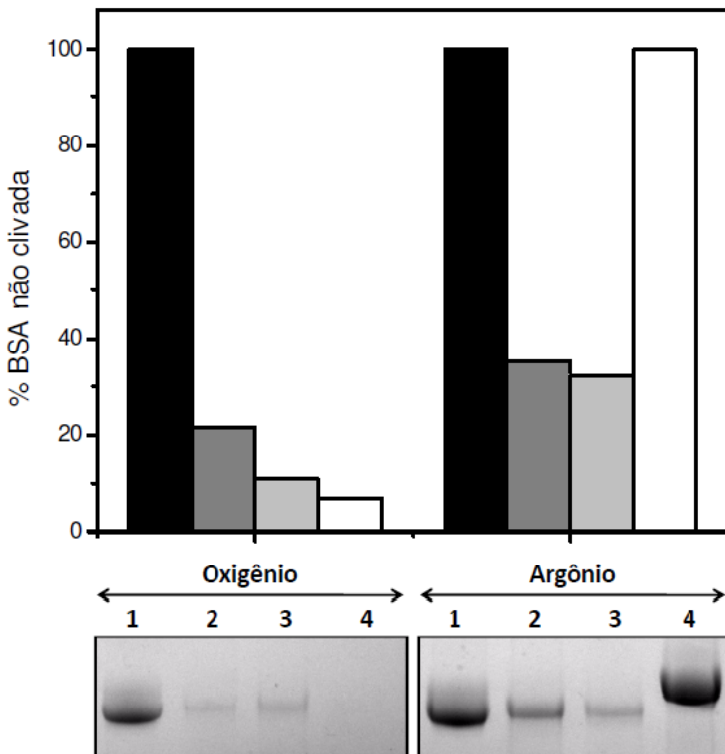


Figura 60. Gráfico das % de BSA não clivada em condições aeróbicas (oxigênio) e anaeróbicas (argônio) após incubação durante 6 horas a 37 °C na presença do complexo 2. Abaixo, gel de poliacrilamida obtido no teste, onde: poços 1: somente BSA (15 μM); poços 2: BSA + complexo 2 (250 μM); poços 3: BSA + complexo 2 (500 μM) e poços 4: controle positivo $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}/\text{DTT}$.

Os complexos binucleares de cobre, por sua vez, tiveram apenas uma pequena parcela da sua atividade inibida em atmosfera de argônio (Figura 59 e 60 – linhas 1 a 3 – para 1 e 2, respectivamente). Em outras palavras, ambos apresentam mecanismo praticamente independente de oxigênio, ou seja, majoritariamente hidrolítico.

Embora vários complexos metálicos de cobalto(III), níquel(II), cobre(II) e zinco(II) estejam sendo analisados quanto à capacidade de clivar peptídios, ainda há poucos exemplos na literatura daqueles com mecanismo hidrolítico (ZHU; KOSTIC, 2002; HEGG; BURSTYN, 1996; RAJENDIRAN et al., 2007). Ainda, alguns desses complexos são

significativamente menos ativos que **1** e **2**, que clivam BSA em concentrações a partir de 25 μM a 37 $^{\circ}\text{C}$ (Figuras 57 e 58).

De acordo com os estudos de titulação potenciométrica, a espécie ativa em pH 8,0, a qual deve estar atuando na hidrólise das ligações peptídicas, é a espécie aquo-hidróxido ($[(\text{OH})\text{Cu}(\text{II})(\mu\text{-alcóxido})\text{Cu}(\text{II})(\text{H}_2\text{O})]$). Esta espécie está de acordo com aquelas dos mecanismos de hidrólise propostos na literatura (KIMURA, 2000; MERKX; AVEERILL, 1999; TWITCHETT; SYKES, 1999), já que apresenta um ligante lábil (H_2O), o qual permite a ligação de uma molécula de substrato a um dos centros metálicos, e um nucleófilo coordenado ao outro metal, o qual está disponível para promover o ataque intramolecular.

Para avaliar as mudanças estruturais causadas na BSA com a adição dos complexos, utilizou-se a espectroscopia de dicroísmo circular. Esta técnica, além de ser útil na análise da interação entre DNA e pequenas moléculas, também tem sido amplamente utilizada no estudo da conformação de proteínas e polipeptídios em solução (GHARAGOZLOU; BOGHAEI, 2008).

Com efeito, a BSA é uma proteína apropriada para estes estudos, pois possui uma alta porcentagem de α -hélices em sua estrutura, apresentando um sinal de DC bastante característico na região do UV-distante, o qual apresenta duas bandas fortemente negativas em 209 e 220 nm (Figuras 61 e 62). A intensidade destas diz respeito à helicidade da proteína (GHARAGOZLOU; BOGHAEI, 2008).

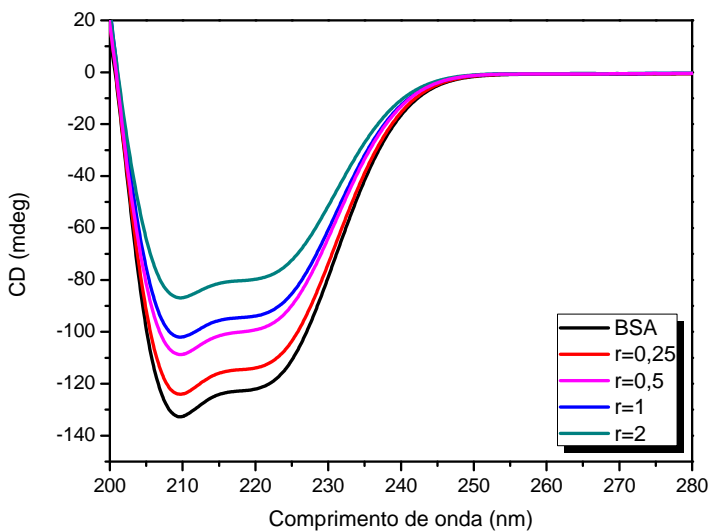


Figura 61. Espectros de dicroísmo circular de BSA (10 μM) na ausência e na presença de concentrações variadas do complexo **1** ($r=0,25$; $r=0,5$; $r=1$ e $r=2$), onde $r = [\text{complexo } 1]/[\text{BSA}]$.

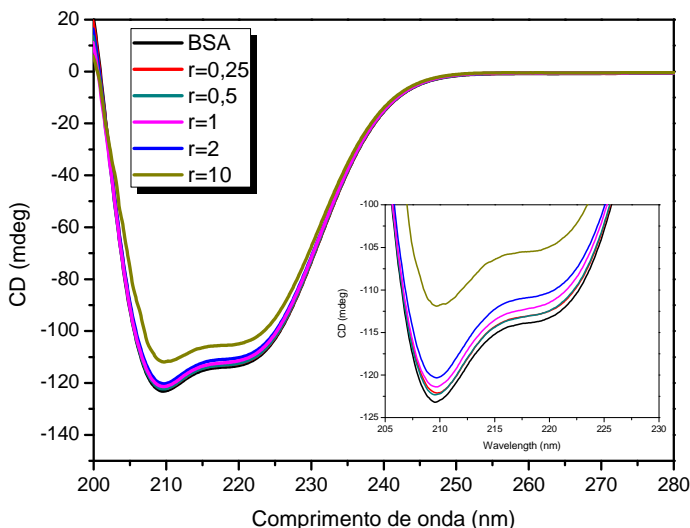


Figura 62. Espectros de dicroísmo circular de BSA (10 μM) na ausência e na presença de concentrações variadas do complexo **2** ($r=0,25$; $r=0,5$; $r=1$; $r=2$ e $r=10$), onde $r= [\text{complexo } 2]/[\text{BSA}]$.

Desta forma, os espectros de dicroísmo circular foram realizados utilizando-se uma concentração fixa de BSA (10 μM) e concentrações variadas dos complexos **1** ($r=0,25$ a $r=2$) e **2** ($r=0,25$ a $r=10$), segundo ilustram as Figuras 61 e 62, respectivamente. Destas observa-se, então, que a adição dos complexos provocou uma diminuição na intensidade das bandas de BSA. Esses resultados indicam que a interação de ambos os complexos com a proteína provoca alterações em sua estrutura secundária. Além disso, os espectros mostram que as mudanças causadas pelo complexo **1** são muito mais expressivas do que as causadas pelo complexo **2**, o que sugere que **1** esteja interagindo mais fortemente com a BSA.

Os complexos $[\text{Zn}(\text{L}_{\text{A,B}})(1,10\text{-fenantrolina})]$, onde $\text{H}_2\text{L}_{\text{A,B}}$ são ligantes baseados em bases de Schiff de aminoácidos, descritos por Gharagozlou e Boghaei (2008), apresentaram espectros semelhantes aos descritos para os complexos binucleares de cobre(II). Em seu trabalho, os autores sugeriram que estes complexos de zinco estariam interagindo com a proteína através de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas e eletrostáticas.

Desta forma, com o intuito de verificar se há interações do tipo eletrostáticas ocorrendo entre os complexos e a BSA, foi realizado um experimento onde se variou a força iônica das reações complexo-BSA com a adição de NaCl (0-200mM).

Para o complexo **1**, a Figura 63 mostra que o aumento da força iônica levou a uma considerável inibição da degradação da proteína, sendo que esta reduziu de mais de 90%, na ausência de NaCl, para 30%, na presença de 200 mM de NaCl. Esse resultado sugere que interações eletrostáticas possuem um papel fundamental no processo de clivagem de BSA pelo complexo **1**.

O complexo **2**, por sua vez, teve apenas aproximadamente 10% de sua atividade inibida com a variação da concentração de NaCl (Figura 64), indicando que apesar de haver interações eletrostáticas, estas não são determinantes na reação de clivagem de BSA por esse complexo. Sendo assim, principalmente no caso do complexo **2**, deve estar ocorrendo, ainda, um outro tipo de interação.

Há estudos que mostram que complexos metálicos com ligantes lábeis podem interagir com resíduos de alguns aminoácidos, como Cys, His, Trp, Asp e Lys, das cadeias laterais de proteínas, promovendo a hidrólise das ligações peptídicas (BURANAPRAPUK, 2000).

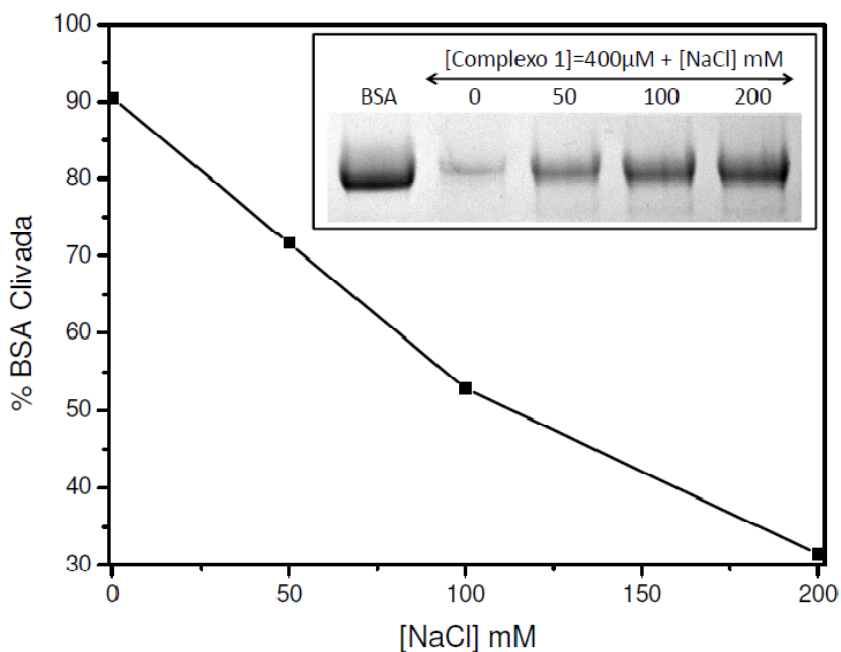


Figura 63. Efeito da força iônica na clivagem de BSA (15 μ M) pelo complexo **1** (400 μ M). Foto menor inserida na Figura: gel de poliacrilamida obtido no teste. Condições reacionais: Tampão HEPES pH 8,0 (25 mM) e incubação de 6 horas a 37 $^{\circ}$ C.

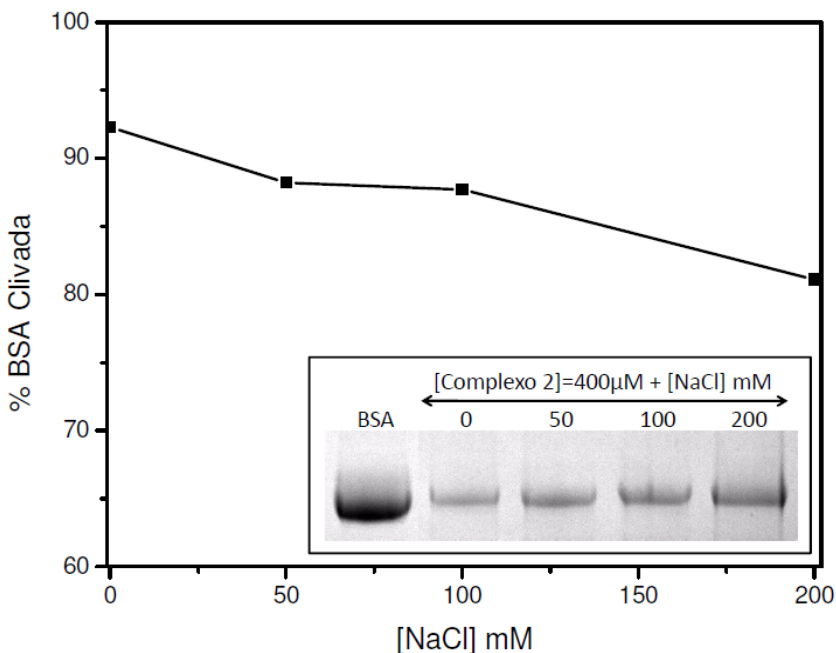


Figura 64. Efeito da força iônica na clivagem de BSA (15 μ M) pelo complexo **2** (400 μ M). Foto menor inserida na Figura: gel de poliacrilamida obtido no teste. Condições reacionais: Tampão HEPES pH 8,0 (25 mM) e incubação de 6 horas a 37 $^{\circ}$ C.

O efeito da concentração dos complexos e do tempo de incubação na velocidade de clivagem da proteína foi estudado utilizando-se uma concentração constante de BSA (15 μ M) através do modelo cinético “pseudo Michaelis-Menten”. Os géis obtidos para o complexo **1** estão representados na Figura 65.

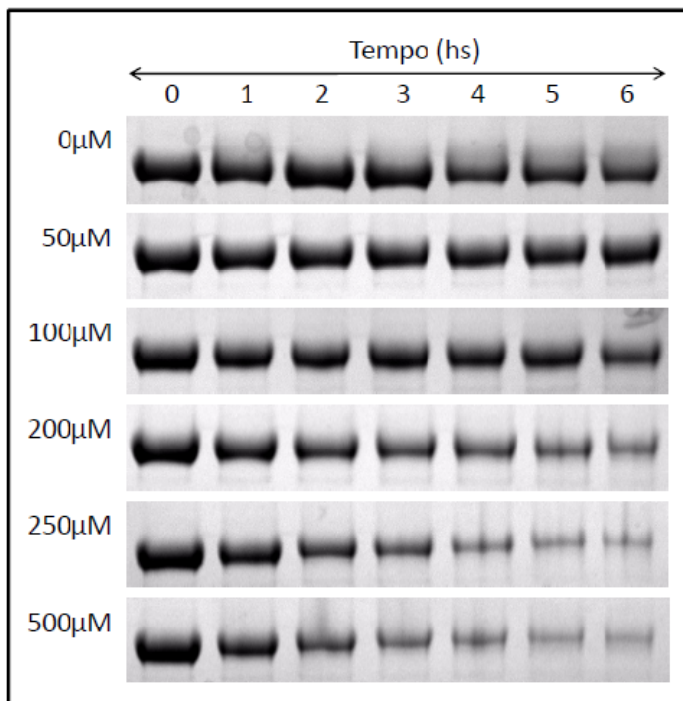


Figura 65. Clivagem de BSA em diferentes tempos de incubação (0 – 6 horas) e concentrações do complexo **1** (0 – 500 μM), onde se observa o desaparecimento da banda de BSA. As reações foram realizadas em tampão HEPES pH 8,0 (25 mM) e incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$. As alíquotas foram retiradas em intervalos de 1 hora.

Com isso, as constantes de clivagem (k_{obs}) foram calculadas, sendo que as Figuras 66 e 67 mostram a variação dessas constantes em função do aumento da concentração dos complexos, onde se observa um comportamento de saturação.

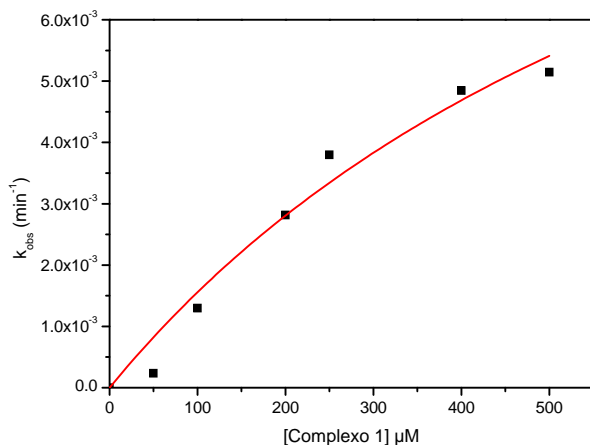


Figura 66. Variação das constantes de velocidade de clivagem (k_{obs}) em função da concentração do complexo 1, mostrando um comportamento de saturação.

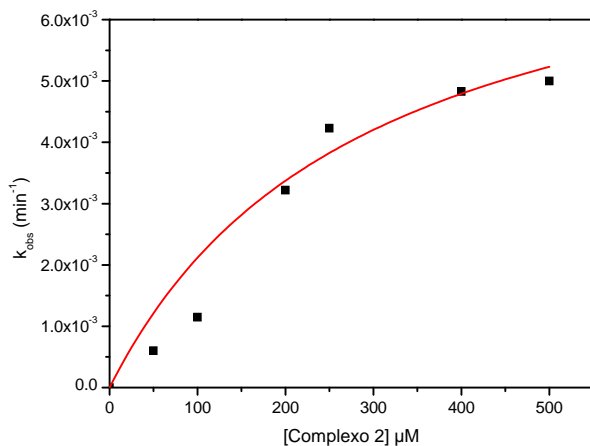


Figura 67. Variação das constantes de velocidade de clivagem (k_{obs}) em função da concentração do complexo 2, mostrando um comportamento de saturação.

A partir desses dados foram obtidos, então, os valores dos parâmetros cinéticos para as reações de clivagem, os quais estão

representados na Tabela 2. Segundo esta os complexos apresentam valores de eficiência catalítica bastante próximos, sendo de $1,1 \times 10^3 \text{ h}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para **1** e $1,0 \times 10^3 \text{ h}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para **2**, o que revela que **1** é 1,1 vezes mais ativo que **2**. Com isso, o tempo de meia vida da BSA foi menor na presença do complexo **1**, cerca de 1,3 horas, enquanto para o complexo **2** este foi de 1,4 horas.

Tabela 2. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem de BSA catalisadas pelos complexos **1** e **2**.

Complexo	$k_{\text{cat}}^{\text{a}}$ (h^{-1})	K_{M} (M)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}^{\text{b}}$ ($\text{h}^{-1} \text{ M}^{-1}$)	$t_{1/2}^{\text{d}}$ (h)
1	0,54	$5,1 \times 10^{-4}$	$1,1 \times 10^3$	1,3
2	0,50	$4,8 \times 10^{-4}$	$1,0 \times 10^3$	1,4

^aConstante de catálise. ^bEficiência catalítica. ^dTempo de meia vida da BSA ($t_{1/2} = -\ln(0,5)/k_{\text{cat}}$).

Assim, pode-se dizer que os parâmetros cinéticos corroboram com os dados de interação, sendo também maiores para o complexo **1**, o que é bastante plausível, já que uma interação mais forte com o substrato pode contribuir de forma determinante para uma maior clivagem. O mesmo foi observado para a clivagem de DNA plasmidial (ver seção 4.1.1). No entanto, neste caso, o complexo **2** é o que interage mais fortemente, sendo, por isso, mais ativo do que o complexo **1**.

Em função disso, é possível observar que a utilização de diferentes substratos (DNA ou BSA) provocou mudanças significativas na atividade e no mecanismo de clivagem dos complexos. Assim, quando o substrato é o DNA plasmidial, **1** atua através de um mecanismo oxidativo e **2** age por meio de um mecanismo misto (hidrolítico e oxidativo); nessas circunstâncias, **2** possui maior atividade e afinidade pelo DNA. Por outro lado, com a utilização da proteína como substrato, ambos os complexos procedem através de um mecanismo hidrolítico; nessas condições, **1** é o complexo mais efetivo e de maior interação com a proteína.

4.2 COMPLEXO TRINUCLEAR DE GADOLÍNIO(III)

4.2.1 Interação e clivagem de DNA plasmidial

Há quase meio século sabe-se que íons lantanídeos atuam na clivagem hidrolítica de ésteres de fosfato. No entanto, somente na última década, essa reatividade foi demonstrada na molécula de DNA. Os estudos são, em sua grande maioria, com lantanídeos complexados a poliaminocarboxilatos, bases de Schiff e grupos glicóis, sendo que esses ligantes são capazes de estabilizar os íons lantanídeos, mantendo a atividade catalítica dos mesmos (FRANKLIN, 2001).

Para determinar as condições ideais para a reação de clivagem pelo complexo trinuclear de gadolínio (**3**) em análise, foram testados diferentes pHs (6,5, 7,0, 7,5 e 8,0) e concentrações do complexo (10 – 125 μ M). Os resultados podem ser observados na Figura 68.

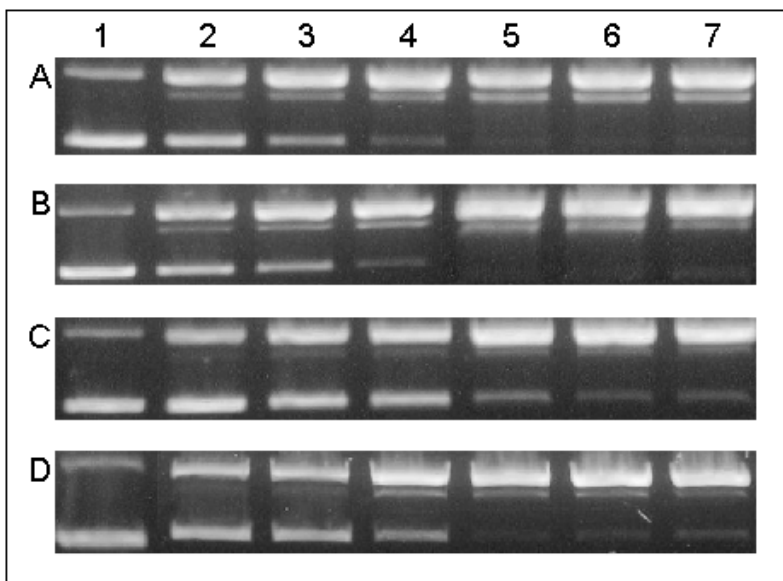


Figura 68. Clivagem de DNA plasmidial em diferentes pHs e concentrações do complexo **3**. Incubação: 7 horas a 50 °C. Poço 1: controle – somente DNA (pBSK-II 40 μ M pb); poços 2 – 7: DNA + complexo 10, 20, 30, 60, 90 e 125 μ M, respectivamente. Onde: A, B, C e D representam as reações realizadas em 25 mM de PIPES (pHs 6,5; 7,0 e 7,5) e HEPES (pH 8,0), respectivamente.

O complexo apresentou uma grande atividade de clivagem em todos os pHs testados. Assim, observa-se não só o aparecimento da Forma II (circular) do plasmídio, mas também da Forma III (linear). Esta aparece, inclusive, nas reações onde se utilizou a menor concentração do complexo (10 μ M).

Nesse contexto, Zhu e colaboradores (1998) reportaram complexos binucleares com os lantanídeos Érbio (Er) e Hólmio (Ho) 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 μ M.

É importante salientar que o aparecimento da Forma III do plasmídio ocorre provavelmente devido a eventos de cortes independentes, em fitas opostas na molécula de DNA, onde o segundo corte deve estar ocorrendo bastante próximo ao primeiro. Isto porque para que ocorra a passagem da Forma circular para a Forma linear, é necessário que haja uma distância de no máximo 12 pares de base entre os cortes na fita de DNA (NEVES et al., 2001).

Com relação ao pH, 6,5 e 7,0 são aqueles onde há maior clivagem, segundo observa-se na Figura 68. Deste modo, para trabalhar o mais próximo possível das condições fisiológicas, os demais testes foram realizados em pH 7,0 (tampão PIPES 25 mM).

Para verificar o tipo de mecanismo (hidrolítico ou oxidativo) envolvido no processo de clivagem de DNA pelo complexo **3**, foram realizados experimentos na presença de DMSO, o qual, como mencionado anteriormente, é um captador de radicais OH \cdot .

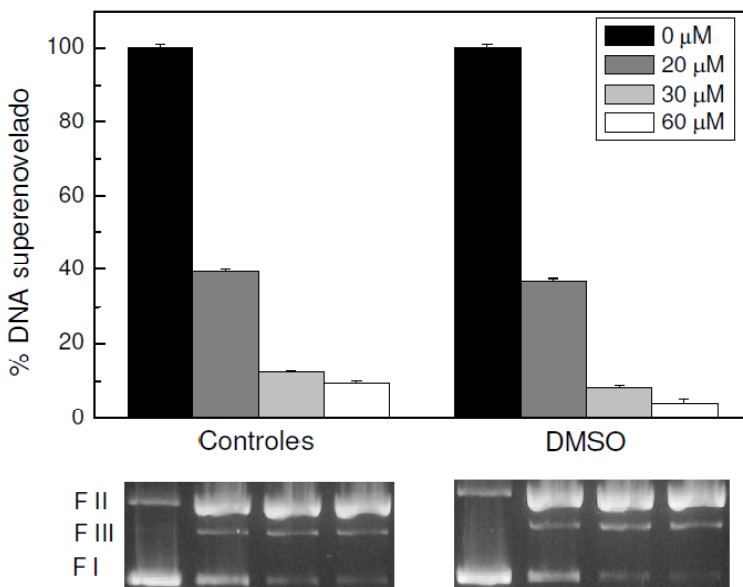


Figura 69. Experimento utilizando DMSO como captador de radicais livres nas reações do complexo **3**. As reações foram incubadas a 50 °C por 7 horas em pH 7,0. Abaixo, gel de agarose 0,8 % do teste.

Os resultados ilustrados na Figura 69 mostram que o complexo manteve as porcentagens de clivagem de DNA superrevelado na presença de DMSO, indicando que radicais hidroxila difusos não estão envolvidos na clivagem do DNA plasmidial. Isto sugere que o mecanismo de ação desse complexo seja hidrolítico. Este resultado é bastante plausível, pois até mesmo íons lantanídeos com atividade redox, como o íon Ce^{IV} , agem como catalisadores hidrolíticos (SHIGEKAWA; ISHIDA; MIYAKE, 1999). Além disso, grande parte dos complexos de lantanídeos descritos na literatura atua hidroliticamente na clivagem de ésteres de fosfato (FRANKLIN, 2001; ZHU et al, 1999; BERG; SIMEONOV; JANDA, 1999; HASHIMOTO; NAKAMURA, 1996).

De maneira geral, o mecanismo hidrolítico é preferível ao oxidativo, uma vez que a clivagem oxidativa do DNA produz radicais livres (fitas do DNA com terminais incapazes de serem religados enzimaticamente), além de promover danos periféricos consideráveis às células. Além disso, a difusão dos radicais pode dificultar a especificidade na clivagem de interesse (CHEN et al., 2008).

Através de experimentos de equilíbrio potenciométrico, realizados por Camargo (2008), obteve-se a curva de distribuição das espécies em função do pH e, conseqüentemente, as espécies envolvidas na catálise (ver seção 3.1.2). Assim, nos pHs 6,5 e 7,0, onde há maior atividade do complexo, há a desprotonação de uma molécula de água coordenada a um dos centros metálicos na espécie $[\text{Gd}_3\text{L}_2]^{3+}$ e a formação da espécie $[\text{Gd}_3(\text{OH})\text{L}_2]^{2+}$, que deve ser a espécie ativa na hidrólise do DNA, pois possui um grupo hidróxido capaz de promover o ataque nucleofílico na reação de clivagem.

O decréscimo da atividade do complexo em pHs maiores que 7,0 (Figura 68) se deve provavelmente à presença das espécies $[\text{Gd}_3(\text{OH})_2\text{L}_2]^{1+}$, $[\text{Gd}_3(\text{OH})_3\text{L}_2]$ e $[\text{Gd}_3(\text{OH})_4\text{L}_2]^{1-}$, as quais têm sua carga negativa aumentada, causando uma repulsão maior ao substrato, o que desfavorece a hidrólise do DNA. Comportamento semelhante foi observado na catálise do substrato ativado BDNPP (CAMARGO et al., 2008).

Com o intuito de analisar o modo de interação do complexo com o DNA, foi realizado um experimento na presença da distamicina e do verde de metila, que são ligantes específicos dos sulcos menor e maior do DNA, respectivamente.

A Figura 70 mostra os géis e a quantificação das bandas da Forma I do plasmídeo, para o referido experimento. Assim, observa-se que o complexo **3** teve sua atividade inibida apenas na presença da distamicina. Inibição esta bastante expressiva, o que indica que **3** interage preferencialmente com o sulco menor do DNA. Outros estudos de interação DNA/complexo mostram resultados semelhantes (OLIVEIRA, 2006; SEVERINO, 2007; OTERO et al., 2006).

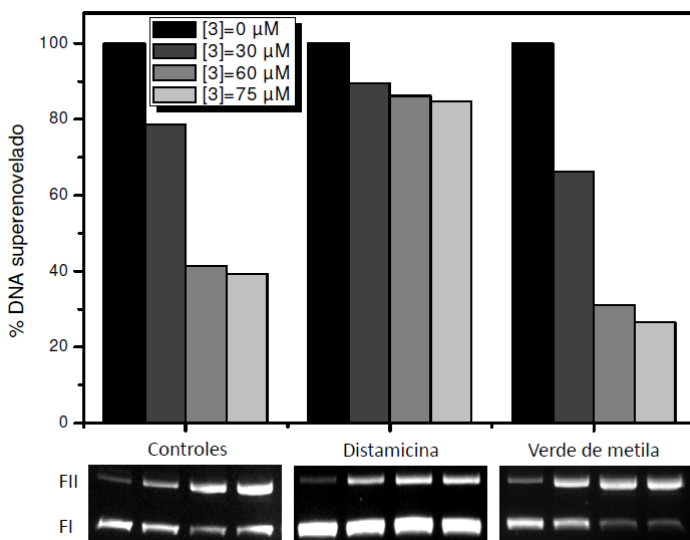


Figura 70. Análise de clivagem de DNA plasmidial pelo complexo **3** na ausência (controles) e na presença da distamicina (40 μM) e do verde de metila (40 μM). Todas as reações foram incubadas por 7 horas a 50 °C em 25 mM de tampão PIPES pH 7,0.

Novamente, os parâmetros cinéticos foram calculados através do modelo cinético “pseudo Michaelis-Menten”. A Figura 71 mostra o gráfico das constantes de catálise (k_{cat}) em diferentes concentrações do complexo **3**, onde se observa um comportamento tendente à saturação.

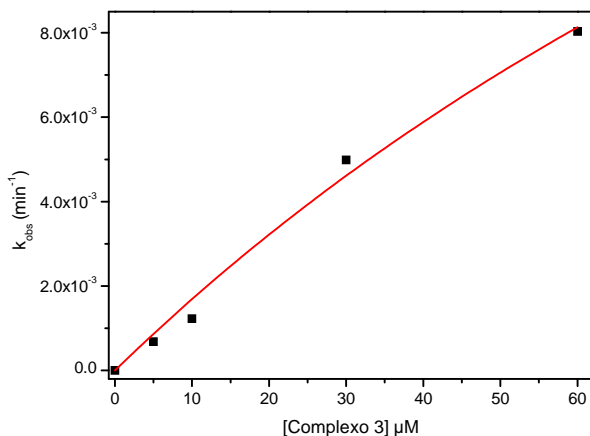


Figura 71. Variação das constantes de velocidade de clivagem (k_{obs}) em função da concentração do complexo **3**, mostrando um comportamento de saturação.

Assim, o complexo **3** apresenta um valor de k_{cat} bastante expressivo ($3,42 \text{ h}^{-1}$), sendo que o valor da aceleração da degradação em relação ao DNA não catalisado ($k_{nc} = 3,6 \times 10^{-8} \text{ h}^{-1}$) foi de $9,5 \times 10^7$ vezes.

Em comparação ao complexo mononuclear de gadolínio, previamente publicado por Camargo e colaboradores (2008), que possui k_{cat} de $0,47 \text{ h}^{-1}$ e um aumento em relação à degradação natural do DNA de $1,2 \times 10^7$ vezes, o complexo trinuclear é aproximadamente 8 vezes mais ativo. No entanto, como possui um K_M muito elevado ($4,6 \times 10^{-4} \text{ M}$), sua eficiência catalítica ($7,5 \times 10^3 \text{ h}^{-1}\text{M}^{-1}$), razão entre k_{cat} e K_M , é menor que a do complexo mononuclear ($1,8 \times 10^4 \text{ h}^{-1}\text{M}^{-1}$), já que este possui um valor de K_M consideravelmente menor ($2,5 \times 10^{-5} \text{ M}$). Por isso, apesar de possuir um k_{cat} maior, o complexo trinuclear de gadolínio deve interagir mais fracamente com o DNA, justificando sua menor eficiência catalítica em relação ao complexo mononuclear.

Normalmente, o que se observa na literatura é que complexos com maior número de centros metálicos são mais ativos devido a um efeito cooperativo que os torna mais reativos que sistemas mononucleares. Com efeito, este comportamento pôde ser observado no estudo de complexos macrocíclicos de lantanídeos (JUREK; MARTELL, 2000), onde os complexos mononucleares apresentam

constantes de velocidade menores, frente à hidrólise do substrato BNPP, do que os complexos binucleares. Acredita-se que isso ocorra, pois os complexos binucleares apresentam dois íons lantanídeos atuando como ácidos de Lewis em detrimento dos mononucleares que apresentam apenas um. O mesmo efeito pode ser observado na natureza, onde muitas enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato são ativadas por dois ou mais íons metálicos.

5 CONCLUSÕES

Complexos binucleares de cobre(II):

Ambos os complexos foram capazes de clivar DNA plasmidial em baixas concentrações (μM) em uma ampla faixa de pHs (6,0 a 9,0) a 37°C , sendo 9,0 o pH de maior atividade.

Com relação aos mecanismos de ação e interação com DNA, os complexos apresentaram comportamentos diferentes.

O complexo **1** atua através de um mecanismo oxidativo, envolvendo a formação de cobre I e do radical $\text{OH}\cdot$. A formação dessas espécies é resultado de um ciclo catalítico onde o centro metálico do complexo (um ou dois sítios de cobre(II)) é reduzido pelo próprio DNA, sendo posteriormente reoxidado pelo O_2 . Ainda, a interação se dá exclusivamente por atrações eletrostáticas.

O complexo **2**, por sua vez, interage com o DNA via atrações eletrostáticas e ligação no sulco menor, sendo que o mecanismo de ação é misto. A clivagem oxidativa ocorre da mesma forma descrita para o complexo **1**, havendo, no entanto, a formação de duas espécies reativas de oxigênio: os radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e os radicais superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$). Em um segundo momento, a ligação da forma aquo-hidróxido do complexo no sulco menor do DNA promove a hidrólise de suas ligações fosfodiéster.

Os dados de eficiência catalítica revelaram que **2** ($2,3 \times 10^4 \text{ h}^{-1}\text{M}^{-1}$) é aproximadamente 23 vezes mais ativo na função de uma nuclease química que **1** ($1,0 \times 10^3 \text{ h}^{-1} \text{M}^{-1}$). A diferença de atividade entre os complexos parece estar relacionada com a força de ligação à molécula de DNA, já que **2** também apresenta maior valor de K_b do que **1**. Esse fato se justifica pela presença de dois grupos fenóis na estrutura do complexo **2**, já que estes podem aumentar significativamente o valor da constante de ligação do complexo.

Além disso, a presença dos grupos elétron-doadores, *terc*-butil, nos complexos **1** e **2**, provocou mudanças significativas na atividade de clivagem de DNA plasmidial.

Os complexos dinucleares também apresentaram bons resultados na degradação de BSA. A maior atividade foi observada em pH 8,0, no qual o mecanismo de ação de ambos é hidrolítico e a espécie ativa na catálise é a aquo-hidróxido ($[(\text{OH})\text{Cu}(\text{II})(\mu\text{-alcóximo})\text{Cu}(\text{II})(\text{H}_2\text{O})]$).

É importante salientar o fato de esses complexos binucleares atuarem tanto na clivagem de moléculas de DNA quanto na de proteínas, o que caracteriza sua “promiscuidade catalítica”, um fenômeno bastante observado em enzimas, mas pouco descrito em sistemas modelo sintéticos.

Complexo trinuclear de gadolínio(III):

Este complexo mostrou-se bastante ativo na clivagem de DNA plasmidial em baixas concentrações (μM) e pH 7,0. Testes na presença de inibidores indicaram a ocorrência de um mecanismo hidrolítico de clivagem via sulco menor do DNA, sendo $[\text{Gd}_3(\text{OH})\text{L}_2]^{2+}$ a espécie ativa na catálise.

6 PERSPECTIVAS

Avaliar o mecanismo de ação do complexo **3** na clivagem de moléculas de DNA mais detalhadamente através de testes na presença de outros tipos de inibidores (SOD, NaN_3 , batocuproína, verde de metila), bem como experimentos em condições anaeróbias (atmosfera de argônio).

Determinar os tipos de interações DNA-complexo **3** via titulações espectrofotométricas, desnaturação térmica, espectroscopia de dicroísmo circular, etc.

Avaliar a capacidade do complexo **3** na clivagem de proteínas, como a BSA.

Realizar estudos com outros tipos de DNA (linear simples fita, polinucleotídeos) para verificar se os complexos possuem especificidade por algum desses substratos.

Ainda, a obtenção de cristais dos complexos ligados a pequenos nucleotídeos também é um dado importante que poderá elucidar precisamente como essas moléculas interagem com o DNA e determinar o possível sítio de ligação.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BALDINI, M. et al. Cu(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: the case of 5-formyluracil. Synthesis, characterization, X-ray structures, DNA interaction studies, and biological activity. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 6, p. 2049-2055, 2003.

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

BASU, H.; et al. Recognition of Z-RNA and Z-DNA determinants by polyamines in solution: experimental and theoretical studies. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 6, n. 2, p. 299-309, 1988.

BATISTA, S. C., et al. Highly efficient phosphate diester hydrolysis and DNA interaction by a new unsymmetrical Fe^{III}Ni^{II} model complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 6, p. 1161-1165, 2003.

BAYKAL, U.; AKKAYA, E. U. Synthesis and phosphodiester transesterification activity of the La³⁺ - complex of a novel functionalized octadentate ligand. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 32, p. 5861-5864, 1998.

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

BLACKBURN, G. M.; GAIT, M. J. **Nucleic Acids in Chemistry and Biology**. segunda ed. New York: Oxford University Press, 1997. 528 p.

BORDIGNON LUIZ, M.T.; SZPOGANICS, B.; et al. Molecular Recognition of dipeptides. Catalysis of deuteration and hydrolysis of glycylglycine by dinuclear OBISDIEN Zn(II) complexes. **Inorganica Chimica Acta**, v.287, v.2, p.134-141, 1999.

BRANUM, M. E., et al. Double-strand hydrolysis of plasmid DNA by dicerium complexes at 37°C. **Journal of American Chemical Society**, v. 123, n. 9, p. 1898-1904, 2001.

BRYANT, R.A.R.; HANSEN, D.E. Direct measurement of the uncatalyzed rate of hydrolysis of a peptide bond. **Journal of American Chemical Society**, v.121, n.23, p. 5498-5499, 1996.

BURANAPRAPUK, A. Artificial metallopeptidases: regioselective cleavage of lysozyme. **Chemical Communications**, p. 597–598, 2000.

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.

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, 2008.

CAMARGO, M.A. Desenvolvimento de novos modelos funcionais para hidrolases-nucleases baseados em complexos com íons lantanídeos. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, **Tese de doutorado em Química**, 2008.

CHAO, H., et al. DNA binding studies of ruthenium(II) complexes containing asymmetric tridentate ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 92, p. 165-170, 2002.

CHEI, W. S; SUH, J. Peptide- or Protein-Cleaving Agents Based on Metal Complexes. In: KARLIN, K. D. **Progress in Inorganic Chemistry**, v.55, ed. John Wiley & Sons, Inc, 2007.

CHEN, L.; 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, p. 156-166, 2007.

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

CHRISTIANSON, D.W.; LIPSCOMB, W.N. Carboxipeptidase A. **Accounts of Chemical Research**, v.22, n.2, p. 62-69, 1989.

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, p. 805–812, 2005.

- FARAH, S. B. **DNA Segredos e Mistérios**. São Paulo: Sarvier, 1997.
- FRANKLIN, S. J. Lanthanide-mediated DNA hydrolysis. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 2, p. 201-208, 2001.
- GARBETT, N.C.; RAGAZZON, P.A.; CHAIRES, J.B. Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions. **Nature Protocols**, v. 2, n.12, p. 3166-3172, 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**, v. 71, p.1617-1622, 2008.
- GOMEZ-TAGLE, P., YATSIMIRSKY, A.K. Phosphodiester Hydrolysis by Lanthanide Complexes of Bis-Tris Propane. **Inorganic Chemistry**, v. 40, p. 3786-3796, 2001.
- 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.
- HASHIMOTO, S.; NAKAMURA, Y. Characterization of lanthanide-mediated DNA cleavage by intercalator-linked hydroxamic acids: comparison with transition systems. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 21, p. 2623-2628, 1996.
- HE, J.; et al. Phosphodiester hydrolysis and specific DNA binding and cleavage promoted by guanidinium-functionalized zinc complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 103, p. 851-858, 2009.
- HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Copper(II) macrocycles cleave single-stranded and double stranded DNA under both aerobic and anaerobic conditions. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 26, p. 7474-7481, 1996.
- HEGG, E. L.; BURSTYN, J. N. Hydrolysis of Unactivated Peptide Bonds by a Macrocyclic Copper(II) Complex: $\text{Cu}([9]\text{aneN}_3)\text{Cl}_2$ Hydrolyzes Both Dipeptides and Proteins. **Journal of 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.

HETTICH, R.; SCHNEIDER, H. Supramolecular Chemistry. Part 71. Evidence for Hydrolytic DNA Cleavage by Lanthanide(III) and Cobalt(III) Derivatives. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions.**, v.2, p. 2069-2072, 1997.

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.

HORN, J. A. et al. Synthesis, crystal structure and properties of dinuclear iron(III) complexes containing terminally coordinated phenolate/H₂O/OH- groups as models for purple acid phosphatases: efficient hydrolytic DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, n. 2, p. 339-351, 2005.

HÖRNER, R. Estudo de compostos capazes de clivar o DNA. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, **Tese de doutorado em Química**, 238 p., 2003.

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.

JEUNG, C.-S., et al. Hydrolysis of plasmid DNA catalyzed by Co(III) complex of cyclen attached to polystyrene. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, p. 2401-2404, 2001.

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

KAHNE, D.; STILL, W.C. Hydrolysis of a peptide bond in neutral water. **Journal of American Chemical Society**, v. 110, n. 22, p. 7529-7534, 1988.

KAMINSKAIA, N. V.; KOSTIC, N. M. New selectivity in peptide hydrolysis by metal complexes. Platinum(II) complexes promote cleavage of peptides next to the tryptophan residue. **Inorganic Chemistry**, v. 40, n. 10, p. 2368-2377, 2001.

KIMURA, E., Dimetallic hydrolases and their models, **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 4, p. 207-213, 2000.

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. 259, p. 680-685, 1970.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2ª ed.: São Paulo, Sarvier Editora de Livros Médicos, 1995.

LESLIE, A.G.; et al. Polymorphism of DNA double helices. **Journal of Molecular Biology**, v. 143, n. 1, p. 49-72, 1980.

LIU, C. et al. DNA damage by copper(II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 75, p. 233-240, 1999.

LIU, C., et al. DNA hydrolytic cleavage by the diiron(III) complex $\text{Fe}_2(\text{DTPB})(\mu\text{-O})(\mu\text{-Ac})\text{Cl}(\text{BF}_4)_2$: Comparison with other transition metal complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 913-922, 2002.

LIU, C.; et al. DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. **Coordination Chemistry Reviews**, v.248, n.1-2, p.147-168, 2004.

LIU, C.; WANG, L. DNA hydrolytic cleavage catalyzed by synthetic multinuclear metallonucleases. **Dalton Transactions**, v.14, n.2, p.227-239, 2009.

MACÍAS, B.; et al. Structural characterization and nuclease activity of mixed copper(II) complexes with sulfonamides and bipyridil. **Inorganica Chimica Acta**, v. 353, p. 139-144, 2003.

MAHADEVAN, S.; PALANIANDAVAR, M. Spectroscopic and voltammetric studies on copper complexes of 2,9-dimethyl-1,10-phenanthrolines bound to calf thymus DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 37, n. 4, p. 693-700, 1998.

MANCIN, F. et al. Artificial Metallonucleases. **Chemical Communications**, v.28, 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, 2003.

MERKX, M. and AVERILL, B. A. Probing the role of the trivalent metal in phosphate ester hydrolysis: preparation and characterization of Purple Acid Phosphatases containing $\text{Al}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ and $\text{In}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}$ active sites, including the first example of an active aluminum enzyme. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 6683-6689, 1999.

MILOVIC, N. M.; KOSTIC, N. M. Palladium(II) complexes, as synthetic peptidases, regioselectively cleave the second peptide bond upstream from methionine and histidine side chains. **Journal of American Chemical Society**, v. 124, n. 17, p. 4759-4769, 2002.

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

MORRISSEY, J.H. Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. **Analytical Biochemistry**, v. 117, p. 307-310, 1981.

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

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

NAVARRO, M., et al. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of $[\text{Cu}(\text{dppz})_2]\text{BF}_4$. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, p. 364-369, 2003.

NETTO, L. E. S.; STADTMAN, E. R. The iron-catalyzed oxidation of dithiothreitol is a biphasic process: hydrogen peroxide is involved in the initiation of a free radical 116 chain of reactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, n. 1, p. 233-242, 1996.

NEVES, A., et al. Catecholase Activity of a Series of Dicopper(II) Complexes with Variable $\text{Cu-OH}(\text{phenol})$ Moieties, **Inorganic Chemistry**, v. 41, p. 1788-1794, 2002.

NEVES, A., et al. Hydrolytic DNA cleavage promoted by a dinuclear iron(III) complex. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 4, n. 8, p. 388-391, 2001.

- NOVAKOVA, O., et al. DNA interactions of monofunctional organometallic ruthenium(II) antitumor complexes in cell-free media. **Biochemistry**, v. 42, n. 39, p. 11544-11554, 2003.
- OLIVEIRA, M. C. B. Nucleases Sintéticas: Caracterização bioquímica e mecanismo de ação sobre DNA. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, **Tese de doutorado em Química**, 119 p., 2006.
- OLIVEIRA, M. C. B., et al. Hydrolytic Protein Cleavage by Unusual Mononuclear Copper(II) Complexes: X-ray Structures and Solution Studies. **Inorganic Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 921-929, 2005.
- OLIVEIRA, M. C. B., et al. Mononuclear Cu^{II}-Phenolate Bioinspired Complex is Catalytically. **Inorganic Chemistry**, v.48, n.7, p.2711-2713, 2009.
- OLIVEIRA, M. C. B., et al. Nucleic acid cleavage by a Cu(II) polyaza macrocyclic complex. **Polyhedron**, v.24, n.4, p.495-499, 2005.
- OSÓRIO, R.E.M.B. Novos ligantes e complexos binucleares de cobre(II) promíscuos: modelos miméticos para as enzimas catecol oxidase e hidrolases/nucleases sintéticas. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, **Dissertação de Mestrado em Química**, 2007.
- OTERO, L., et al. DNA conformational changes and cleavage by ruthenium(II) nitrofurylsemicarbazone complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2006.
- OTT, R.; KRÄMER, R. DNA hydrolysis by inorganic catalysts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 52, p. 761-767, 1999.
- PELCZAR, M. J. Jr.; et al. **Microbiologia – Conceitos e aplicações**, v.1, p. 76-78, 1997.
- PERALTA, R. A., et al. New unsymmetric dinuclear Cu^{II}Cu^{II} complexes and their relevance to copper(II) containing metalloenzymes and DNA cleavage. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 100, p. 992-1004, 2006.
- PLATIS, I.; ERMACORA, M.; FOX, R.O. Oxidative polypeptide cleavage mediated by EDTA-iron covalently linked to cysteine residues. **Biochemistry**, v. 32, n. 47, p. 12761-12767, 1993.

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.

QIAGEN. HiSpeed™ Plasmid Purification Handbook. 2001. 46 p.

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.

RANA, T. M.; MEARES, C. F. Transfer of Oxygen from an Artificial Protease to Peptide Carbon During Proteolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences - USA**, v. 88, n. 23, p. 10578-10582, 1991.

RANGARAJAN, E. S.; SHANKAR, V. Sugar non-specific endonucleases. **FEMS Microbiology Reviews**, v.25, n.5, p.583-613, 2001.

REN, R. et al. A simple copper(II)-L-histidine system for efficient hydrolytic cleavage of DNA. **Inorganic Chemistry**, v. 39, n. 24, p. 5454-63, 2000.

ROSSI, L. M., et al. Hydrolytic activity of a dinuclear copper(II,II) complex in phosphate diester and DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v. 337, p. 366-370, 2002.

ROSSI, L. M., et al. Synthesis, structure and properties of unsymmetrical l-alkoxo-dicopper(II) complexes: biological relevance to phosphodiester and DNA cleavage and cytotoxic activity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 358, p. 1807-1822, 2005.

ROY, M. et al. Photo-induced double-strand DNA and site-specific protein cleavage activity of L-histidine (1-oxo)diiron(III) complexes of heterocyclic bases. **Dalton Transactions**, v.28, n.24, p.4671-4682, 2009.

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.

SEVERINO, P.C. Atividade de modelos biomiméticos de fosfatases ácidas púrpuras sobre ácidos nucléicos. Florianópolis, Universidade

Federal de Santa Catarina, **Tese de doutorado em Química**, 104 p., 2007.

SHIGEKAWA, H., ISHIDA, M., MIYAKE, K. Extended X-Ray Absorption Fine Structure Study on the Cerium (IV)-Induced DNA Hydrolysis: Implication to the Roles of 4 f Orbitals en the Catalysis. **Applied Physics Letters**, v. 74, p. 460-463, 1999.

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

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

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 American Chemical Society**, v. 122, n. 37, p. 8814-8824, 2000.

TWITCHETT, M. B., SYKES, A. G. Structure, Properties and Reacitty of the $\text{Fe}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ and $\text{Zn}^{\text{II}}\text{Fe}^{\text{III}}$ Purple Acis Phosphatases. **European Journal of Inorganic Chemistry**, p. 2105-2115, 1999.

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

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, p. 193-201, 1998.

WANG, F.; SAYRE, L. M. Kinetics and mechanism of aliphatic amine oxidation by aqueous $(\text{batho})_2\text{Cu}(\text{II})$. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 1, p. 248-255, 1992.

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

WESTERMEIER, R. Electrophoresis in Practice: A Guide to Theory and Practice. New York: **VCH Publishers, Inc.**, 1993. 277 p.

WHITTAKER, J., et al. The interaction of DNA-targeted platinum phenanthridinium complexes with DNA in human cells. **Anti-Cancer Drug Design**, v. 16, n. 16, p. 81-89, 2001.

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.

YOO, S. H. et al. Artificial Metalloprotease with Active Site Comprising Aldehyde Group and Cu(II)Cyclen Complex. **Journal of 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.

ZHANG, H., et al. Synthesis, crystal structure, cytotoxic activity and DNA-binding properties of the copper(II) and zinc(II) complexes with 1-[3-(2-pyridyl)pyrazol-1-ylmethyl]naphthalene. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 99, p. 1119-1125, 2005.

ZHANG, L. et al. Regioselective Cleavage of Myoglobin with Copper(II) Compounds at Neutral pH. **Inorganic Chemistry**, v.42, n.2, p.492-498, 2003.

ZHANG, S. et al. A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1,10-phenanthroline and l-threonine with DNA nuclease activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 98, n. 12, p. 2099-2106, 2004.

ZHANG, Z. N. Synthesis, structure and nuclease activity of copper complexes of disubstituted 2,20-bipyridine ligands bearing ammonium groups. **Polyhedron**, v. 27, p.1898-1904, 2008.

ZHU, D., et al. Lanthanide Binuclear Macrocyclic Complexes as Synthetic Enzymes for the Cleavage of DNA. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 135, p.107-110, 1998.

ZHU, D.; et al. Binuclear Lanthanide Complexes as Catalysts for the Hydrolysis of Double-Stranded DNA. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 2, p. 351-353, 1999.

ZHU, L., et al. Geometry-dependent phosphodiester hydrolysis catalyzed by binuclear copper complexes. **Inorganic Chemistry**, v. 42, n. 24, p. 7912-7920, 2003.

ZHU, L.; KOSTIC, 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, p. 104-110, 2002.