



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

**INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE DNA POR COMPLEXOS DE  
Co<sup>2+</sup> COM LIGANTES TRIPODAIS N-DOADORES**

**GABRIEL LUIZ KREFT**

Florianópolis  
2014

GABRIEL LUIZ KREFT

**INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE DNA POR COMPLEXOS DE  
Co<sup>2+</sup> COM LIGANTES TRIPODAIS N-DOADORES**

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

Florianópolis  
2014

GABRIEL LUIZ KREFT

**INTERAÇÃO E CLIVAGEM DE DNA POR COMPLEXOS DE  
Co<sup>2+</sup> COM LIGANTES TRIPODAIS *N*-DOADORES**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Química, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 21 de agosto de 2014

---

Prof. Dr. Hugo Gallardo  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Hernán Terenzi  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr Alfredo Tiburcio Nunes Pires  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marciela Scarpellini  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Rosely Aparecida Peralta  
Universidade Federal de Santa Catarina

À minha família, aos meus amigos e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.





## AGRADECIMENTOS

Ao professor Hernán Terenzi pela oportunidade de estudo, confiança e por disponibilizar todos os recursos para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao professor Salah Massoud pela colaboração na realização deste trabalho. Aos professores Ademir Neves e Bernardo de Souza pela colaboração em um trabalho paralelo a esta dissertação.

Aos colegas do Centro de Biologia Molecular Estrutural: Angela, Camila, Carol, Cris, Deise, Douglas, Eduardo, Elis, Jean, Louise, Nathalia, Paulo, Priscila, Tarquin, Tiago Pacheco. Em especial ao Tiago Bortolotto pela paciência e auxílio nos experimentos. Às técnicas Elis, Martina e Vanessa.

A todos os meus amigos.

Aos meus pais, Ailton e Ursula, pelo amor, zelo, paciência e sabedoria em todos os momentos da minha vida.

À UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Química. Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudo e a CAPES, MCTI, FINEP, FAPESC e Instituto de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB).



“O que mais surpreende é o homem, pois perde a saúde para juntar dinheiro, depois perde o dinheiro para recuperar a saúde. Vive pensando ansiosamente no futuro, de tal forma que acaba por não viver nem o presente, nem o futuro. Vive como se nunca fosse morrer e morre como se nunca tivesse vivido.”

Dalai Lama



## RESUMO

Muitos estudos têm sido realizados com o ácido desoxirribonucleico interagindo com pequenas moléculas, entre estas os compostos de coordenação que podem atuar como miméticos de enzimas presentes nos organismos vivos. Com essa finalidade, foram avaliados a clivagem e a interação do DNA com uma série de cinco compostos de  $\text{Co}^{2+}$  com ligantes *N*-doadores tetradentados:  $\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ ,  $[\text{Co}(6\text{-MeTPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ ,  $[\text{Co}(6\text{-Me}_2\text{TPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ ,  $[\text{Co}(\text{BPQA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ , e  $[\text{Co}(\text{BQPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ . O DNA plasmidial pBSK II foi utilizado como modelo na técnica de eletroforese em gel de agarose. Foram realizados ensaios variando a concentração dos complexos para avaliar o efeito na atividade de clivagem, ensaios de cinética para comparar atividade com outros complexos da literatura, ensaios com inibidores de espécies reativas de oxigênio e ensaios com atmosfera de argônio com o intuito de verificar se o mecanismo de clivagem é hidrolítico ou oxidativo, ensaio com o ligante de sulco menor: distamicina e o ligante de sulco maior: verde de metila com o propósito de verificar a dependência da ligação com os sulcos e ensaios na presença de perclorato de lítio para verificar o efeito das interações eletrostáticas. Os cinco complexos são ativos frente a clivagem do DNA plasmidial, em concentrações na ordem de micromolar. Os complexos devem atuar por um mecanismo hidrolítico e são muito sensíveis ao efeito da força iônica. Nos ensaios cinéticos foram obtidos valores de  $k_{\text{cat}}$  entre  $0,98 \text{ h}^{-1}$  a  $6,02 \text{ h}^{-1}$ , para pH 7,0 e valores de  $k_{\text{cat}}$  entre  $1,99 \text{ h}^{-1}$  e  $16,8 \text{ h}^{-1}$  para pH 9,0, correspondendo a valores que aumentam a velocidade de reação na ordem de  $10^8$  a  $10^9$  comparados à hidrólise não catalisada do DNA. Também foram realizados ensaios com eletroforese com gel de poliacrilamida de alta resolução, como modelo utilizado foi uma sequência de 49 nucleotídeos. Foi verificado que os compostos  $[\text{Co}(6\text{-MeTPA})\text{Cl}]$  e  $[\text{Co}(\text{BPQA})\text{Cl}]$  clivam o DNA em todos os nucleotídeos formando produtos com terminal  $3'\text{-PO}_3^{2-}$ , sem gerar produtos típicos de mecanismos oxidativos.

**Palavras-chave:** complexos de  $\text{Co}^{2+}$ , clivagem de DNA, interação com DNA



## ABSTRACT

Many studies have been conducted with the deoxyribonucleic acid interacting with small molecules, within them coordination compounds which may act as enzyme mimics in living organisms. For this purpose cleavage and interaction with DNA were evaluated for a series of five Co(II) compounds with tetradentate N-donor ligands:  $[\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}]^+$ ,  $[\text{Co}(6\text{-MeTPA})\text{Cl}]^+$ ,  $[\text{Co}(6\text{-Me}_2\text{TPA})\text{Cl}]^+$ ,  $[\text{Co}(\text{BPQA})\text{Cl}]^+$  and  $[\text{Co}(\text{BQPA})\text{Cl}]^+$ . The plasmid DNA pBSK II was used as substrate in gel electrophoresis assays were performed varying the concentration of the complex, kinetic assays to assess DNA cleavage, trials with inhibitors of reactive oxygen species, trials with argon, assays with DNA groove binders and assays in the presence of lithium perchlorate to verify the effect of electrostatic interactions. The five complexes are active against the cleavage of plasmid DNA at concentrations on the order of micromolar. Complexes may act by a hydrolytic mechanism, are very sensitive to ionic strength effect. In kinetic experiments were obtained values of  $k_{\text{cat}}$  between  $0,98 \text{ h}^{-1}$  to  $6,02 \text{ h}^{-1}$  for pH 7.0 and values of  $k_{\text{cat}}$  between  $1,99 \text{ h}^{-1}$  to  $16,8 \text{ h}^{-1}$  for pH 9.0, corresponding to values that increase the reaction rate about  $10^8$  to  $10^9$  compared to spontaneous hydrolysis of DNA. Assays using high resolution polyacrylamide gel electrophoresis were made, the model used was a sequence of 49 nucleotides, it has been found that the compounds  $[\text{Co}(6\text{-MeTPA})\text{Cl}]$  and  $[\text{Co}(\text{BPQA})\text{Cl}]$  cleave DNA at all nucleotides forming products with  $3'\text{-PO}_3^{2-}$  termini without generating products of oxidative mechanism.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1 Representação esquemática da estrutura do DNA proposta por Watson e Crick (WATSON; CRICK, 1953).....1
- Figura 1.2 Estrutura química das bases nitrogenadas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).....2
- Figura 1.3 Estrutura química da ribose e da desoxirribose (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).....2
- Figura 1.4 Representação esquemática da estrutura química de um nucleotídeo (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).....3
- Figura 1.5 Representação esquemática da ligação fosfodiéster (em vermelho) entre os nucleotídeos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).....3
- Figura 1.6 Representação esquemática do pareamento entre as bases nitrogenadas e a formação da dupla fita (PARAGINSKI, 2007).....4
- Figura 1.7 Representação da intercalação do brometo etídio entre as bases do DNA. Ocorre um alongamento da estrutura da dupla hélice, reduzindo a densidade do DNA (CREIGHTON, T., 1999).....7
- Figura 1.8 Estruturas de alguns compostos que interagem com o DNA por intercalação (PARAGINSKI, 2007).....7
- Figura 1.9 Representação de uma fração do DNA, mostrando o sulco maior e o sulco menor. Figura extraída de <http://en.wikipedia.org/wiki/intercalation> (Adaptada, acessado em 17/09/2014).....8
- Figura 1.10 Representação da ligação de uma molécula nos sulcos do DNA. Na etapa inicial ocorre a transferência do ligante, posteriormente ocorre a liberação de contra-íons carregados que cercam o DNA, formando então interações moleculares específicas como ligações de van der Waals e de Hidrogênio. (BAILLY, CHAIRES, (1998)) adaptado (PARAGINSKI, 2007).....9

Figura 1.11 Representação da interação eletrostática entre o esqueleto do DNA carregado negativamente e o complexo com carga positiva. (QIU; GILROY; MANNERS, 2013).....9

Figura 1.12 Exemplo de Mecanismo oxidativo. Abstração de um Hidrogênio do carbono 4 da pentose por uma ERO, na presença de oxigênio e posteriores etapas do mecanismo oxidativo resultando na clivagem do DNA, gerando produtos específicos da oxidação do carbono 4 (STUBBE; et al. 1995).....11

Figura 1.13 Mecanismo de clivagem de DNA pela via hidrolítica. Etapa 1: ataque nucleofílico de uma hidroxila à ligação fosfato ligado à pentose do ácido nucléico, gerando um fosfato intermediário pentacoordenado. Etapa 2: ruptura da ligação fosfodiéster formando 5'-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> e 3'-OH terminais (MANCIN; et al, 2005).....12

Figura 1.14 Representação esquemática das formas do DNA plasmidial e de um gel de agarose mostrando a clivagem do DNA pela transformação forma superenovelada (F I), nas formas circular aberta (F II) e linear (F III). (PARAGINSKI, 2007).....14

Figura 1.15 Representação esquemática de uma sequência nucleotídica nas formas emparelhada e desemparelhada (<http://www.atdbio.com/content/7/Purification-of-oligonucleotides>) (acessado 20/06/2014) adaptado pelo autor.....15

Figura 1.16 Representação esquemática de uma sequência nucleotídica emparelhada e de um gel de poliacrilamida onde a clivagem ocorre em todas as posições (PARAGINSKI, 2007).....15

Figura 1.17 Representação esquemática de uma sequência nucleotídica emparelhada e de um gel de poliacrilamida onde a clivagem é seletiva (PARAGINSKI, 2007).....16

Figura 1.18 Eletroforese em gel de poliacrilamida, colunas 1, 2 e 3: fragmentos com terminal 3'-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>; coluna 4: fragmentos com terminal 3'-OH; coluna 5: fragmentos com terminais 3'-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, 3'-OH e 3'-fosfoglicolato; coluna 6: fragmentos com terminais 3'-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup> e 3'-OH. coluna 7: fragmentos 3'-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. (KOVACIC; et al. 2002).....17

Figura 1.19 Representação da estrutura de um ligante tri e tetradentado, livre e coordenado com o metal ( <a href="http://en.wikipedia.org/wiki/Tripodal_ligand#mediaviewer/File:TripodCoordModes.png">http://en.wikipedia.org/wiki/Tripodal_ligand#mediaviewer/File:TripodCoordModes.png</a> ) (acessado 27/06/2014).....	18
Figura 1.20 – Estrutura química dos ligantes tetradentados <i>N</i> -doadores (XU; et al., 2008).....	19
Figura 3.1 Esquema representativo do princípio do método utilizado pelo kit comercial HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN (QIAGEN, 2001).....	25
Figura 3.2 Representação da sequência 49-Mer 5'FAM designada como Oligo1.....	30
Figura 4.1 Clivagem do DNA plasmidial superenovelado pBSK II por 1 em diferentes concentrações. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [1] = 50 a 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 2 horas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=3).....	32
Figura 4.2 Clivagem do DNA plasmidial superenovelado pBSK II por 2 em diferentes concentrações. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [2] = 50 a 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 2 horas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=3).....	32
Figura 4.3 Clivagem do DNA plasmidial superenovelado pBSK II por 3 em diferentes concentrações. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [3] = 50 a 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 2 horas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=3).....	33
Figura 4.4 Clivagem do DNA plasmidial superenovelado pBSK II por 4 em diferentes concentrações. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [4] = 50 a 450 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 2 horas. Os resultados estão expressos como média $\pm$ desvio-padrão (n=3).....	33

Figura 4.5 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **5** em diferentes concentrações. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**5**] = 50 a 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 2 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).....34

Figura 4.6 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **1** em presença de sequestradores de ERO. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**1**] = 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. [DMSO] = 0,5  $\text{mol L}^{-1}$ , [KI] = 0,4  $\text{mmol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).....35

Figura 4.7 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **2** em presença de sequestradores de ERO. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**2**] = 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. [DMSO] = 0,5  $\text{mol L}^{-1}$ , [KI] = 0,4  $\text{mmol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).....35

Figura 4.8 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **3** em presença de sequestradores de ERO. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**3**] = 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. [DMSO] = 0,5  $\text{mol L}^{-1}$ , [KI] = 0,4  $\text{mmol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).....36

Figura 4.9 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **4** em presença de sequestradores de ERO. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**4**] = 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. [DMSO] = 0,5  $\text{mol L}^{-1}$ , [KI] = 0,4  $\text{mmol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).....36

Figura 4.10 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **5** em presença de sequestradores de ERO. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**5**] = 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. [DMSO] = 0,5  $\text{mol L}^{-1}$ , [KI] = 0,4  $\text{mmol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).....37

Figura 4.11 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II. **(a)** Atmosfera com oxigênio. **(b)** Atmosfera com argônio. Controle com o sistema  $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$  ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )/DTT ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Condições de reação:  $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$  de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; **[1, 2, 3, 4]** =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$  e **[5]** =  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 3 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n=3$ ).....38

Figura 4.12 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **1** em presença dos bloqueadores dos sulcos. Condições de reação:  $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$  de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; **[1]** =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos.  $[\text{Distamicina}] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Verde de Metila}] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n=3$ ).....39

Figura 4.13 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **2** em presença dos bloqueadores dos sulcos. Condições de reação:  $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$  de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; **[2]** =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos.  $[\text{Distamicina}] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Verde de Metila}] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n=3$ ).....40

Figura 4.14 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **3** em presença dos bloqueadores dos sulcos. Condições de reação:  $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$  de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; **[3]** =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos.  $[\text{Distamicina}] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Verde de Metila}] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n=3$ ).....40

Figura 4.15 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **4** em presença dos bloqueadores dos sulcos. Condições de reação:  $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$  de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; **[4]** =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos.  $[\text{Distamicina}] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ ,  $[\text{Verde de Metila}] = 50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n=3$ ).....41

Figura 4.16 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **5** em presença dos bloqueadores dos sulcos. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0; [**5**] = 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. [Distamicina] = 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , [Verde de Metila] = 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).....41

Figura 4.17 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **1** em presença de concentrações crescentes de  $\text{LiClO}_4$  (25 – 250) mmol  $\text{L}^{-1}$ . Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0; [**1**] = 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).....42

Figura 4.18 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **2** em presença de concentrações crescentes de  $\text{LiClO}_4$  (25 – 250) mmol  $\text{L}^{-1}$ . Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0; [**2**] = 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).....43

Figura 4.19 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **3** em presença de concentrações crescentes de  $\text{LiClO}_4$  (25 – 250) mmol  $\text{L}^{-1}$ . Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0; [**3**] = 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).....43

Figura 4.20 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **4** em presença de concentrações crescentes de  $\text{LiClO}_4$  (25 – 250) mmol  $\text{L}^{-1}$ . Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0; [**4**] = 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).....44

Figura 4.21 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **5** em presença de concentrações crescentes de  $\text{LiClO}_4$  (25 – 250)  $\text{mmol L}^{-1}$ . Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**5**] = 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).....44

Figura 4.22 Gráfico de  $k_{\text{obs}}$  versus concentração de **1**. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; concentrações crescentes do complexo, temperatura = 37°C. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 - 2 horas).....46

Figura 4.23 Gráfico de  $k_{\text{obs}}$  versus concentração de **2**. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; concentrações crescentes do complexo. temperatura = 37°C. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 - 2 horas).....47

Figura 4.24 Gráfico de  $k_{\text{obs}}$  versus concentração de **3**. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; concentrações crescentes do complexo. temperatura = 37°C. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 - 2 horas).....48

Figura 4.25 Gráfico de  $k_{\text{obs}}$  versus concentração de **4**. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; concentrações crescentes do complexo. temperatura = 37°C. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 - 2 horas).....49

Figura 4.26 Gráfico de  $k_{\text{obs}}$  versus concentração de **5**. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; concentrações crescentes do complexo. temperatura = 37°C. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 - 2 horas).....50

Figura 4.27 Estrutura química dos ligantes da Tabela 4.8 utilizados por MASSOUD; et al, 2013.....52

Figura 4.28 Estrutura química dos ligantes TPA e 2,2,2-tet (XU; et al, 2009).....53

Fig. 4.29 (a) Clivagem do Oligo1 (49-mer) por **2** e **4**. A coluna controle representa o oligo sem tratamento, A+G representa o marcador de Adenina + Guanina. DNA se representa o oligo tratado com a DNase. (b) Representação da sequência nucleotídica denominada Oligo1.....55

Figura 4.30 Proposta de mecanismo de clivagem hidrolítica dos compostos de estrutura  $[\text{Co}(\text{L})\text{Cl}]^+$  estudados (MASSOUD; et al.,2014).....56



## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Nome, estrutura química dos ligantes e estrutura química dos íons complexos estudados neste trabalho.....	24
Tabela 4.1. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelo complexo <b>1</b> :.....	46
Tabela 4.2. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelo complexo <b>2</b> :.....	47
Tabela 4.3. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelo complexo <b>3</b> :.....	48
Tabela 4.4. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelo complexo <b>4</b> :.....	49
Tabela 4.5. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelo complexo <b>5</b> :.....	50
Tabela 4.6 – Parâmetros da cinética de pseudo-Michaelis Menten para a clivagem hidrolítica do DNA, pelos complexos <b>1 a 5</b> em pH 7,0:.....	51
Tabela 4.7 – Parâmetros da cinética de pseudo-Michaelis Menten para a clivagem hidrolítica do DNA, pelos complexos <b>1 a 5</b> em pH 9,0:.....	51
Tabela 4.8 – Parâmetros da cinética de Pseudo Michaelis Menten para a clivagem hidrolítica de DNA por complexos da literatura.....	52



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6-MeTPA: (6-metil-2-piridil)metil)bis(2-piridilmetil)amina  
6-Me<sub>2</sub>TPA: bis(6-metil-2-piridil)metil)-(2-piridilmetil)amina  
A: adenina  
ATCG: oligonucleotídeo de 49-mer com uma região rica em ligações adenina-citosina e outra região rica em timina-guanina  
BPQA: bis(2-piridilmetil)-(2-quinolilmetil)amina  
BQPA: bis(2-quinolilmetil)-(2-piridilmetil)amina  
C: citosina  
CT-DNA: DNA de timo de bezerro (do inglês, calf thymus deoxyribonucleic acid)  
DNA: ácido desoxirribonucléico (do inglês, deoxyribonucleic acid)  
G: guanina  
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, ethylenediamine tetraacetic acid)  
ERO: espécies reativas de oxigênio  
F I: forma superenovelada do DNA plasmidial, forma I  
F II: forma circular aberta do DNA plasmidial, forma II  
F III: forma linear do DNA plasmidial, forma III  
FAM: fluoresceína  
MPA: ácido 2-mercatopropiônico  
pb: par de base do DNA  
pH: potencial hidrogeniônico  
pmap: bis(2-(2-piridil)etil)-(2-piridilmetil)amine  
T: timina  
TPA: tris[(2-piridil)metil]amina)  
Tris-HCl: hidrocloreto de tris(hidroximetil)aminometano



## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>I</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>V</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO .....	1
1.2 NUCLEASES .....	4
<b>1.2.1 Nucleases Naturais</b> .....	<b>4</b>
<b>1.2.2 Nucleases Artificiais</b> .....	<b>5</b>
1.3 INTERAÇÃO ENTRE COMPLEXOS METÁLICOS E O DNA ....	6
<b>1.3.1 Ligação com o DNA por intercalação</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3.2 Ligação com o DNA pelos sulcos</b> .....	<b>7</b>
<b>1.3.3 Interações eletrostáticas</b> .....	<b>9</b>
1.4 CLIVAGEM DE DNA POR COMPLEXOS METÁLICOS .....	10
<b>1.4.1 Clivagem Oxidativa do DNA</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4.2 Clivagem Hidrolítica do DNA</b> .....	<b>11</b>
<b>1.4.3 Estudo da clivagem do DNA</b> .....	<b>13</b>
1.5 COMPLEXOS METÁLICOS DE COBALTO COM LIGANTES TRIPODAIS TETRADENTADOS <i>N</i> -DOADORES.....	18
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>23</b>
3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES .....	23
3.2. COMPLEXOS EM ESTUDO .....	23
3.3 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL .....	24
3.4 CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL .....	25
<b>3.4.1 Efeito da concentração dos complexos</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4.2 Efeito dos inibidores de ERO</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4.3 Efeito do oxigênio</b> .....	<b>26</b>
<b>3.4.4 Efeito dos bloqueadores de sulco</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4.5 Efeito da força iônica</b> .....	<b>27</b>
<b>3.4.6 Cinética de clivagem do DNA plasmidial</b> .....	<b>28</b>
3.5 PREPARAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA .....	28
3.6 CLIVAGEM DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA .....	29
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
4.1 ESTUDOS DE INTERAÇÃO E CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL .....	31
<b>4.1.1 Efeito das concentrações dos complexos</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1.2 Efeito dos inibidores de ERO</b> .....	<b>34</b>

<b>4.1.3 Efeito do oxigênio .....</b>	<b>37</b>
<b>4.1.4 Efeito dos bloqueadores de sulco .....</b>	<b>38</b>
<b>4.1.5 Efeito da força iônica .....</b>	<b>42</b>
<b>4.1.6 Cinética de Clivagem do DNA plasmidial .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2 ESTUDOS DE CLIVAGEM DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA.....</b>	<b>54</b>
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>6. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>59</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>67</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é uma macromolécula biológica altamente estável, que armazena e transmite a informação genética nos seres vivos. Sua estrutura tridimensional foi determinada por Watson e Crick e está representada na Figura 1.1. A partir da determinação da estrutura foi possível uma melhor compreensão de como as características hereditárias são transmitidas (WATSON; CRICK, 1953).



Figura 1.1 Representação esquemática da estrutura do DNA proposta por Watson e Crick (WATSON; CRICK, 1953).

O DNA é classificado como um ácido nucléico, compostos desta categoria são biopolímeros formados por duas sequências antiparalelas, que são constituídas por monômeros chamados de nucleotídeos. Cada nucleotídeo é composto por uma base nitrogenada, uma pentose e um grupo fosfato. As bases nitrogenadas são moléculas orgânicas, que possuem um nitrogênio com um par de elétrons livres que lhe conferem características de base de Lewis. As bases nitrogenadas que constituem um nucleotídeo são derivadas de purinas: ADENINA (A) e GUANINA (G) ou derivadas de pirimidinas: CITOSINA (C), TIMINA(T) e URACILA (U) (RNA), cujas representações estruturais estão na Figura 1.2 (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

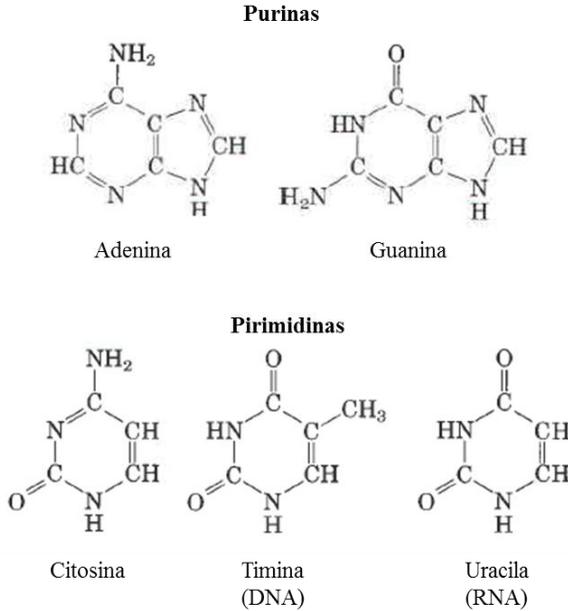


Figura 1.2 Estrutura química das bases nitrogenadas (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

A pentose que se encontra na estrutura do DNA é a desoxirribose. Já o outro ácido nucléico, o RNA, possui como pentose a ribose. As estruturas químicas dessas pentoses estão representadas na Figura 1.3 (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

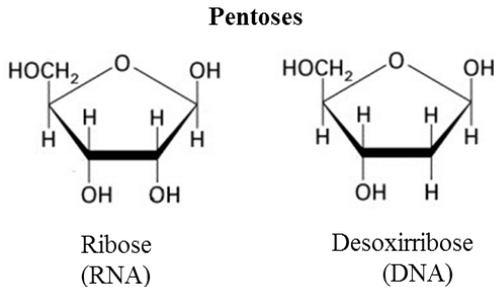


Figura 1.3 Estrutura química da ribose e da desoxirribose (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

Terminando a composição do nucleotídeo tem-se o grupo fosfato e, assim, a estrutura química de um nucleotídeo é representada na Figura 1.4 (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

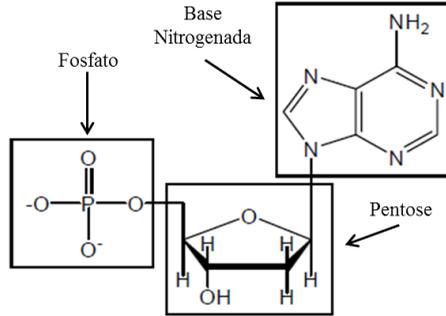


Figura 1.4 Representação esquemática da estrutura química de um nucleotídeo (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

A ligação entre os nucleotídeos nas moléculas de DNA e RNA ocorre por meio de uma ligação covalente entre o grupo 5'-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> de um nucleotídeo e o grupo 3'-OH de outro nucleotídeo formando a ligação fosfodiéster, representada na Figura 1.5 (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

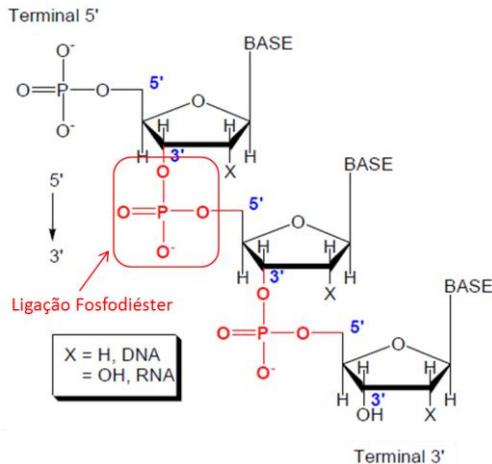


Figura 1.5 Representação esquemática da ligação fosfodiéster (em vermelho) entre os nucleotídeos (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

A união de vários nucleotídeos por meio das ligações fosfodiéster forma uma fita, que possui uma polaridade específica. Por convenção, as sequências de nucleotídeos nas moléculas de DNA e RNA são descritas no sentido da extremidade 5'-OPO<sub>3</sub><sup>2-</sup> para a extremidade 3'-OH (5'→3').

A união de duas fitas forma os ácidos nucléicos, que ocorre porque as bases nitrogenadas interagem entre si através de ligações de Hidrogênio. Na formação do DNA, a citosina (C) interage com a guanina (G) formando três ligações de Hidrogênio; enquanto a adenina (A) interage com a timina (T) formando duas ligações de Hidrogênio. Na formação do RNA, a adenina (A) interage com a uracila (U). A Figura 1.6 (STARCEVIC; et al. 2006), mostra a representação esquemática do pareamento das bases nitrogenadas.

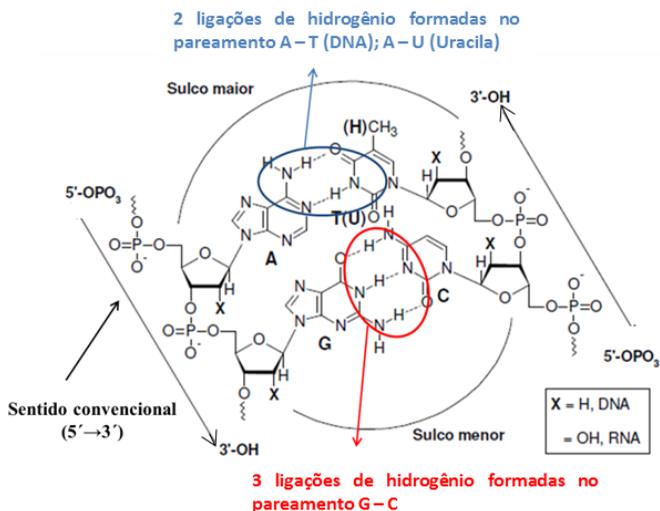


Figura 1.6 Representação esquemática do pareamento entre as bases nitrogenadas e a formação da dupla fita (PARAGINSKI, 2007).

## 1.2 NUCLEASES

### 1.2.1 Nucleases Naturais

As nucleases são enzimas que clivam as ligações entre os nucleotídeos nos ácidos nucléicos. Caso as ligações clivadas sejam as ligações fosfodiéster do DNA são chamadas de DNases. As DNases

hidrolisam as ligações fosfodiéster com constantes de velocidade na ordem de  $10^{12}$  a  $10^{16}$  maiores que a constante de hidrólise não catalisada do DNA:  $k = 3,6 \times 10^{-8} \text{ h}^{-1}$  a 37 °C a pH 7,0 (SREEDHARA; COWAN, 2001; KRAMER, 1999; SIGMAN; MAZUNDER; PERRIN, 1993). As nucleases podem ser classificadas como exonucleases, ou endonucleases. Quando são capazes de clivar os ácidos nucleicos partindo de uma das extremidades da molécula ( $5' \rightarrow 3'$ ), em uma cadeia simples, ou dupla, de nucleotídeos e quebram todas as ligações fosfodiésteres são classificadas como exonucleases. Quando a degradação ocorre em uma região interna específica dos ácidos nucleicos são chamadas de endonucleases (LEHNINGER; NELSON; COX, 2008).

A compreensão dos mecanismos de ação das DNAses naturais e artificiais tem sido foco de diversos estudos. Nestes estudos visam-se também buscar especificidade na clivagem de uma determinada ligação da fita do DNA.

Complexos de baixa massa molar que mimetizam as funções de enzimas naturais podem ser utilizados em diversas áreas, como a farmacologia, medicina e genética. (NICHOLSON, 1999; EFTHIMIADOU; et al., 2007; COLLINS; et al., 2000; OCHSNER, 1997; SUMAOKA; AZUMA; KOMIYAMA; 1998; ERKKILA; ODOM; BARTON, 1999; GUECHEVA; HENRIQUES; ERDTMANN, 2001).

### 1.2.2 Nucleases artificiais

Nucleases artificiais são compostos sintéticos que buscam mimetizar as nucleases naturais. A capacidade de clivar ácidos nucleicos com eficiência e seletividade oportuniza a essas nucleases, aplicações na área de biologia molecular, genética e medicina [SREEDHARA, COWAN; 2001].

O primeiro relato da clivagem do DNA por complexos metálicos reportado na literatura foi do sistema  $[\text{Cu}^{\text{II}}\text{-bis-(1,10-fenantrolina)}]$ , que mostrou-se capaz de clivar o DNA com mecanismo oxidativo [SIGMAN; et al., 1979]. Nos anos seguintes foram publicados vários trabalhos e revisões de complexos metálicos atuando como nucleases artificiais (LIU, et al., 2002; HORN, et al., 2005; JIANG, et al., 2007, ROSSI, et al., 2002; UMA, et al., 2004; JUN, BOCHU, LIANCAI, 2007).

O grupo de pesquisa do Prof Hernán Terenzi, em colaboração com outros grupos, também contribuiu com vários trabalhos: (OLIVEIRA, M. et al., 2005; HORN, Jr. et al., 2005; MASSOUD, et al.,

2014). Como exemplo (SCARPELLINI, M. et al., 2003), mostrou que o complexo  $[\text{Cu}(\text{HISMIMI})(\text{OH}_2)(\text{OH})]^+$ , promove a hidrólise do DNA plasmidial e do modelo bis-2,4-dinitrofenilfosfato (2,4 - BDNPP). Um outro trabalho muito interessante reportado pelo grupo, foi com o complexo  $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Cu}^{\text{II}}(\text{BPBMP})(\text{OAc})_2]^+$  (LANZNASTER, et al., 2005) que mostrou uma boa eficiência na clivagem do DNA plasmidial em condições similares às fisiológicas com baixa concentração de complexo, mostrando um bom potencial como nuclease.

Recentemente (DE SOUZA, et al., 2013), mostrou que a adição da polietilenoimina (PEI) para mimetizar a segunda esfera de coordenação de um complexo, pode aumentar a atividade do mesmo complexo na clivagem do DNA.

### 1.3 INTERAÇÃO ENTRE COMPLEXOS METÁLICOS E O DNA

Os complexos metálicos podem interagir com o DNA de várias maneiras, criando uma grande diversidade de aplicações. Essas interações ocorrem principalmente de três maneiras: ligação por intercalação, ligação pelos sulcos e interações eletrostáticas (DERVAN, 2001; ZEGLIS; PIERRE; BARTON, 2007). ). O estudo dessas interações é de fundamental importância para uma melhor compreensão do mecanismo de atuação dos complexos, podendo viabilizar seu uso como ferramentas para a medicina e para a biologia molecular (DAI, et al., 1999).

#### 1.3.1 Ligação com o DNA por intercalação

Moléculas que se intercalam com o DNA são cromóforas aromáticas planares, normalmente tri ou tetracíclicas (ANTONINI, et al., 1997). Esses compostos apresentam uma geometria adequada para deslizar entre as bases adjacentes do DNA por meio de interações de empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e ligações covalentes consequentemente ocorre um alongamento da estrutura da dupla hélice (DOUTHART, et al., 1973), como está representado na Figura 1.7.

f

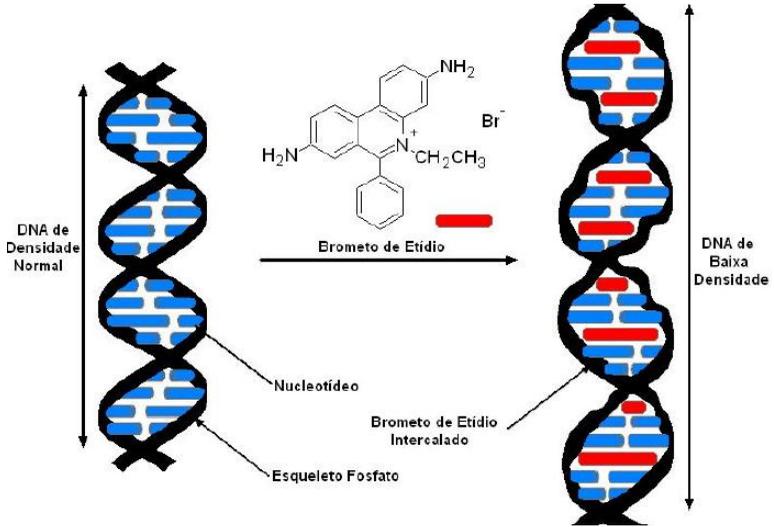


Figura 1.7 Representação da intercalação do brometo etídio entre as bases do DNA. Ocorre um alongamento da estrutura da dupla hélice, reduzindo a densidade do DNA (CREIGHTON, T., 1999).

Alguns exemplos de moléculas que se ligam ao DNA por intercalação estão representados na Figura 1.8.

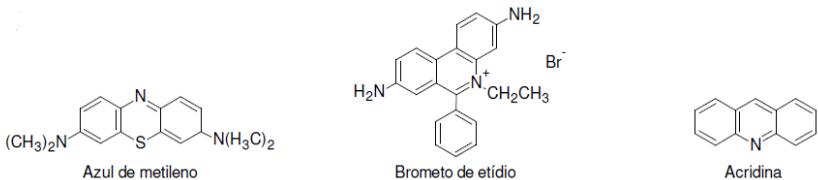


Figura 1.8 Estruturas de alguns compostos que interagem com o DNA por intercalação (PARAGINSKI, 2007).

### 1.3.2 Ligação com o DNA pelos sulcos

Várias moléculas podem se ligar aos sulcos do DNA. Os sulcos do DNA estão apresentados na Figura 1.9.

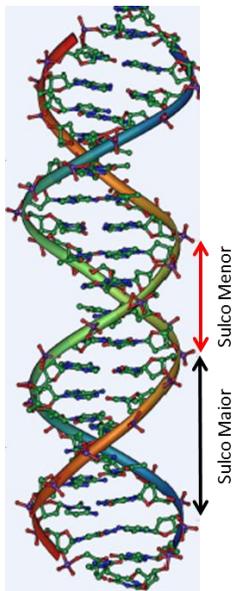


Figura 1.9 Representação de uma fração do DNA, mostrando o sulco maior e o sulco menor. Figura extraída de <http://en.wikipedia.org/wiki/intercalation> (Adaptada, acessado em 17/09/2014).

No mecanismo de intercalação, a etapa inicial é, geralmente, a transferência do ligante para o DNA (BAILLY, CHAIRES, (1998)). Caso o ligante possua carga positiva, ocorre a liberação de contra-íons carregados que cercam o DNA, como representado na Figura 1.10 (BAILLY, CHAIRES, (1998)). A partir daí podem se formar interações moleculares específicas, inclusive ligações de van der Waals e de Hidrogênio (BAILLY, CHAIRES, (1998)). A ligação no sulco maior geralmente requer um reconhecimento mais específico, enquanto que no sulco menor o mesmo não ocorra (BISCHOFF, HOFFMAN, 2002).

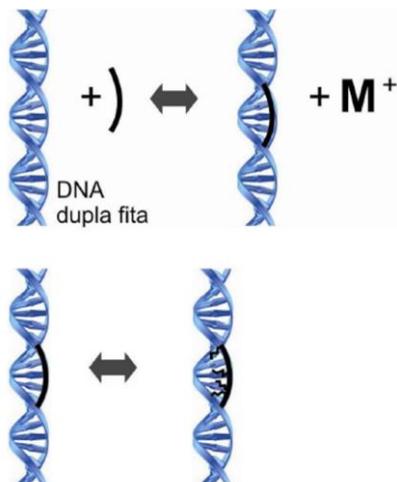


Figura 1.10 Representação da ligação de uma molécula nos sulcos do DNA. Na etapa inicial ocorre a transferência do ligante, posteriormente ocorre a liberação de contra-íons carregados que cercam o DNA, formando então interações moleculares específicas como ligações de van der Waals e de Hidrogênio. (BAILLY, CHAIRES, (1998)) adaptado (PARAGINSKI, 2007).

### 1.3.3 Interações eletrostáticas

Os complexos metálicos carregados positivamente podem interagir e neutralizar a carga negativa do esqueleto do DNA por meio da interação eletrostática quando, ocorre a aproximação do mesmo com o DNA (BLACKBURN; GAIT, 1996).

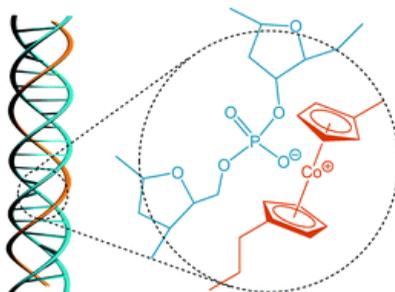


Figura 1.11 Representação da interação eletrostática entre o esqueleto do DNA carregado negativamente e o complexo com carga positiva. (QIU; GILROY; MANNERS, 2013).

## 1.4 CLIVAGEM DE DNA POR COMPLEXOS METÁLICOS

Diferentemente das nucleases naturais, que clivam o DNA unicamente pela hidrólise da ligação fosfodiéster, os compostos de coordenação podem promover a clivagem por diferentes mecanismos: por via hidrolítica (LIU; et al., 2004; 2009; SCARPELLINI et al., 2003), e por via oxidativa (JIANG; et al., 2007).

### 1.4.1 Clivagem Oxidativa do DNA

No mecanismo oxidativo de clivagem do DNA por complexos metálicos ocorre um processo de oxirredução devido à presença de oxigênio no meio reacional. Neste processo são geradas espécies reativas de oxigênio (ERO), como por exemplo: o radical ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ), oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e o radical hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ). Essas espécies podem reagir com as bases nitrogenadas, com a pentose, ou com a ligação fosfodiéster causando a quebra de suas estruturas podendo, desta forma, gerar uma grande variedade de produtos (SIGMAN; MAZUNDER; PERRIN, 1993; ARMITAGE, 1998; POGOZELSKI; TULLIUS, 1998). Um exemplo de mecanismo oxidativo está representado na Figura 1.12, que mostra o ataque das espécies reativas de oxigênio no carbono 4 da pentose do nucleotídeo. Esse ataque é conhecido da literatura por gerar os produtos: 3'-fosfoglicolato, base propenal e 5'- $PO_3^{2-}$  (STUBBE; et al. 1995).

Há situações onde a clivagem oxidativa é acionada por co-reagentes como:  $H_2O_2$ , ascorbato, ou ácido 2-mercatopropiônico (MPA) (JIMÉNEZ-GARRIDO; et al., 2005).



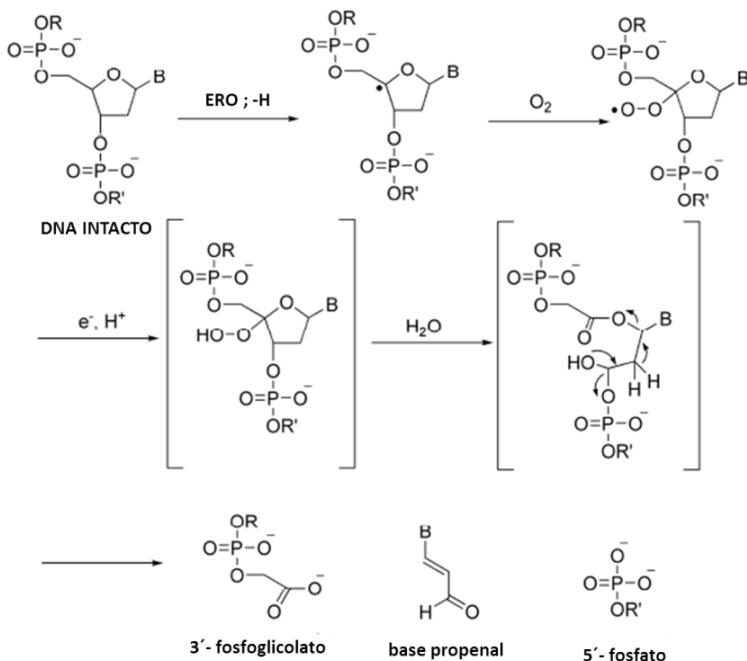


Figura 1.12 Exemplo de Mecanismo oxidativo. Abstração de um Hidrogênio do carbono 4 da pentose por uma ERO, na presença de oxigênio e posteriores etapas do mecanismo oxidativo resultando na clivagem do DNA, gerando produtos específicos da oxidação do carbono 4 (STUBBE; et al. 1995)

### 1.4.2 Clivagem Hidrolítica do DNA

No mecanismo hidrolítico de clivagem do DNA, promovida por complexos metálicos, ocorre o ataque de um nucleófilo ao fósforo da ligação fosfodiéster. Assim, um intermediário pentacoordenado é gerado. Este intermediário é estabilizado por interações de Hidrogênio. Em seguida, ocorre a quebra da ligação com a pentose podendo gerar produtos com terminais fosfatos  $3'-OPO_3^{2-}$  ou  $5'-OPO_3^{2-}$ . Na Figura 1.9 está representado um exemplo de mecanismo hidrolítico onde são formados produtos com extremidades  $5'-OPO_3^{2-}$  e  $3'-OH$  (MANCIN; et al, 2005). Em geral os complexos que possuem centro metálicos com capacidade de coordenar moléculas de água em posição *cis* entre si mostram mecanismo hidrolítico, pois essa estereoquímica facilita a interação com a ligação fosfodiéster do DNA e o ataque nucleofílico no

átomo de fósforo (OTT; KRAMER, 1999). Este comportamento pode ser observado em complexos como:  $\text{Cu}^{2+}$ -neamina derivado do antibiótico Neomicina (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000), e  $[\text{Cu}(\text{[9]aneN}_3)\text{Cl}_2]$  onde  $[\text{9]aneN}_3 = 1,4,7\text{-triazociclononano}$  (HEGG; BURSTYN, 1998).

Geralmente nos complexos onde se tem mecanismos por via hidrolítica há a presença de duas moléculas de água coordenadas em posição *cis* nos mesmos. No entanto, há relatos na literatura com complexos que contém moléculas de água em posição *trans*, e ainda assim clivam o DNA, como é o caso do complexo  $[\text{Fe}_2(\text{BPCINOL})_2(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  onde  $(\text{BPCINOL}) = [\text{N}-(2\text{-hidroxibenzil})\text{-N}(\text{piridilmetil})[(3\text{-cloro})(2\text{-hidroxi})]\text{propilamina}]$ . Este caso é raro na literatura, pois a falta de moléculas de água em posição *cis* impossibilita a hidrólise do substrato modelo BDNPP, mas não do DNA (NEVES, et al., 2001).

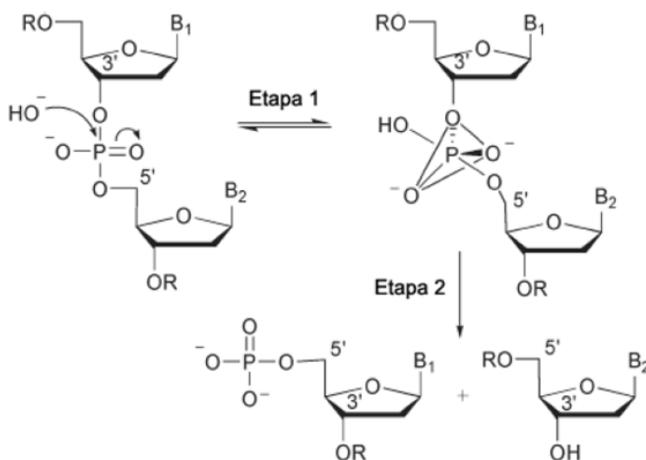


Figura 1.13 Mecanismo de clivagem de DNA pela via hidrolítica. Etapa 1: ataque nucleofílico de uma hidroxila à ligação fosfato ligado à pentose do ácido nucleico, gerando um fosfato intermediário pentacoordenado. Etapa 2: ruptura da ligação fosfodiéster formando  $5'\text{-OPO}_3^{2-}$  e  $3'\text{-OH}$  terminais (MANCIN; et al, 2005).

### 1.4.3 Estudo da clivagem do DNA

A clivagem de DNA pode ser observada por meio de várias técnicas sendo que as mais utilizadas são: a eletroforese em gel de agarose e a eletroforese em gel de poliacrilamida (PARAGINSKI, 2007).

Na eletroforese em gel de agarose é utilizado o DNA plasmidial, uma forma de DNA que assume diferentes formas na presença, ou ausência, de quebras em suas fitas. Quando intactas as fitas de DNA plasmidial estão altamente tensionadas, o que o induz a uma forma dita superenovelada (F I). Quando o plasmídeo superenovelado sofre uma, ou mais quebras, em uma das fitas há um afrouxamento em sua estrutura convertendo o plasmídeo para sua forma circular aberta, também conhecida por circular clivada (F II). No entanto, caso ocorra uma quebra dupla, ou duas quebras simples opostas entre si com uma diferença de até 16 pares de base, o plasmídeo assume uma terceira forma: a forma linear (F III) (FREIFELDER; TRUMBO, 1969). As quebras subsequentes no plasmídeo geram fragmentos menores e topologicamente indistinguíveis, que alguns autores chamam de forma fragmentada (F IV) (AKERMAN; TUIITE, 1995). Para detectar as diferentes formas no gel utiliza-se um corante fluorescente (geralmente o brometo de etídio), que se intercala no DNA. Todas essas formas (com exceção da F IV) são facilmente distinguíveis quando submetidas à eletroforese em gel de agarose (Figura 1.13), pois possuem diferentes mobilidades eletroforéticas. A quantidade das formas também pode ser distinguida pelo tamanho e intensidade luminosa da banda gerada no gel. Portanto, a capacidade de clivagem de DNA por uma substância de interesse pode ser facilmente analisada para identificação e quantificação das formas do plasmídeo.

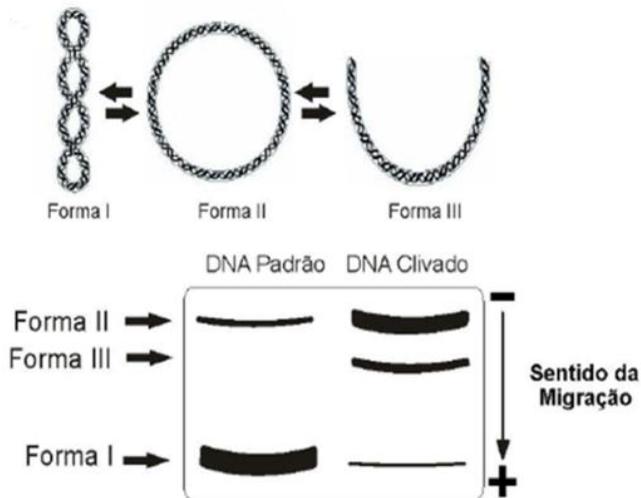


Figura 1.14 Representação esquemática das formas do DNA plasmidial e de um gel de agarose mostrando a clivagem do DNA pela transformação forma superenovelada (F I), nas formas circular aberta (F II) e linear (F III). (PARAGINSKI, 2007).

Diferentemente, na eletroforese em gel de poliacrilamida, são utilizadas sequências de nucleotídeos, chamadas também de oligonucleotídeos. A sequência pode estar emparelhada ou desemparelhada. A forma desemparelhada está organizada como uma fita linear de nucleotídeos. Quando ocorre o emparelhamento das bases é gerada uma dupla hélice que termina em um loop não-emparelhado. Esta estrutura é conhecida como "hairpin loop" (Figura 1.14). Uma das hélices possui o terminal 5' e a outra 3'. Esses terminais podem ser marcados com marcadores radioativos, fluorescentes ou quimioluminescentes (ARMITAGE, 1998).

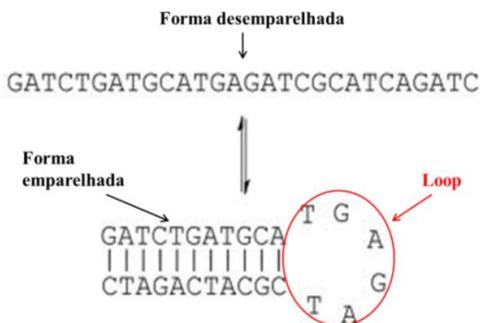


Figura 1.15 Representação esquemática de uma sequência nucleotídica nas formas emparelhada e desemparelhada (<http://www.atdbio.com/content/7/Purification-of-oligonucleotides>) (acessado 20/06/2014) adaptado pelo autor.

Ao estudar a clivagem com essa técnica é possível obter uma gama muito grande de informações verificando a seletividade para a clivagem das sequências de pares de base, pois, de acordo com o número e a intensidade das bandas, é possível distinguir as regiões de preferência de clivagem. A presença de um grande número de bandas indica pouca seletividade (Figura 1.15). Enquanto poucos fragmentos indica alta seletividade (Figura 1.16).

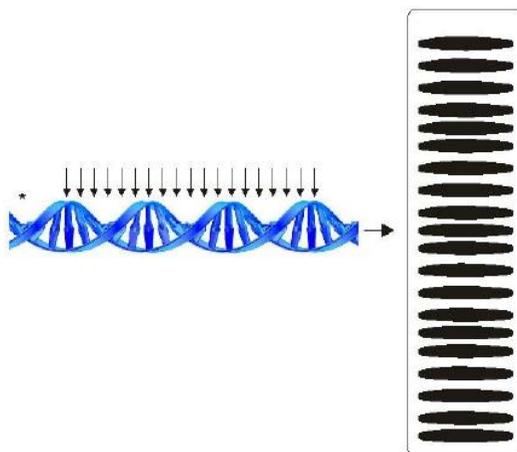


Figura 1.16 Representação esquemática de uma sequência nucleotídica emparelhada e de um gel de poliacrilamida onde a clivagem ocorre em todas as posições (PARAGINSKI, 2007).

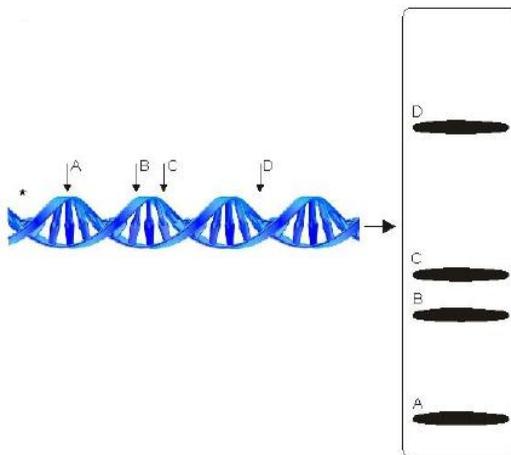


Figura 1.17 Representação esquemática de uma sequência nucleotídica emparelhada e de um gel de poliacrilamida onde a clivagem é seletiva (PARAGINSKI, 2007).

Com esta técnica, também é possível diferenciar se os produtos foram gerados por mecanismo hidrolítico, ou oxidativo, pois alguns produtos gerados de modo oxidativo apresentam diferentes padrões de migração no gel, separando-se dos demais produtos obtidos via hidrólise (POGOZELSKI; TULLIUS, 1998). Um exemplo disto, pode ser observado no relato de Kovacic e colaboradores (2002), (Figura 1.17), onde o gel de alta resolução mostra a migração de fragmentos de DNA com diferentes terminais. A primeira coluna contém marcadores com fragmentos em que a clivagem ocorre apenas na posição em que existe uma citosina e, por isso, é representado como "C". A segunda coluna possui marcadores de citosina e timina, representado por "C+T" e à terceira, mostra marcadores de guanina e adenina "G+A". As três primeiras colunas utilizam o protocolo de Maxam-Gilbert, onde são formados apenas fragmentos com terminal 3'-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup> (MAXAM; GILBERT, 1980). A quarta coluna mostra a reação com a DNase I, que forma fragmentos com terminal 3'-OH (GALAS; SCHMITZ, 1978). A quinta coluna mostra a reação com o complexo de Fe<sup>2+</sup> com o ligante Metídiopropil-EDTA [Fe(MPE)] que gera o produto de oxidação com terminal 3'-fosfoglicolato (VAN DYKE; DERVAN, 1983). A sexta coluna utiliza o íon Ce<sup>4+</sup>, conhecido da literatura por clivar o DNA de forma hidrolítica (FRANKLIN; 1994), formando tanto fragmentos com

terminal  $3'\text{-PO}_3^{2-}$  terminal como terminal  $3'\text{-OH}$  (KOVACIC; et al. 2002). A última coluna mostra o composto CeP3W, um metalopeptídeo sintetizado com a incorporação do íon  $\text{Ce}^{4+}$  com o P3W, peptídeo com 33 aminoácidos. Este sistema cliva o DNA gerando apenas fragmentos com terminal  $3'\text{-PO}_3^{2-}$  (KOVACIC; et al. 2002)

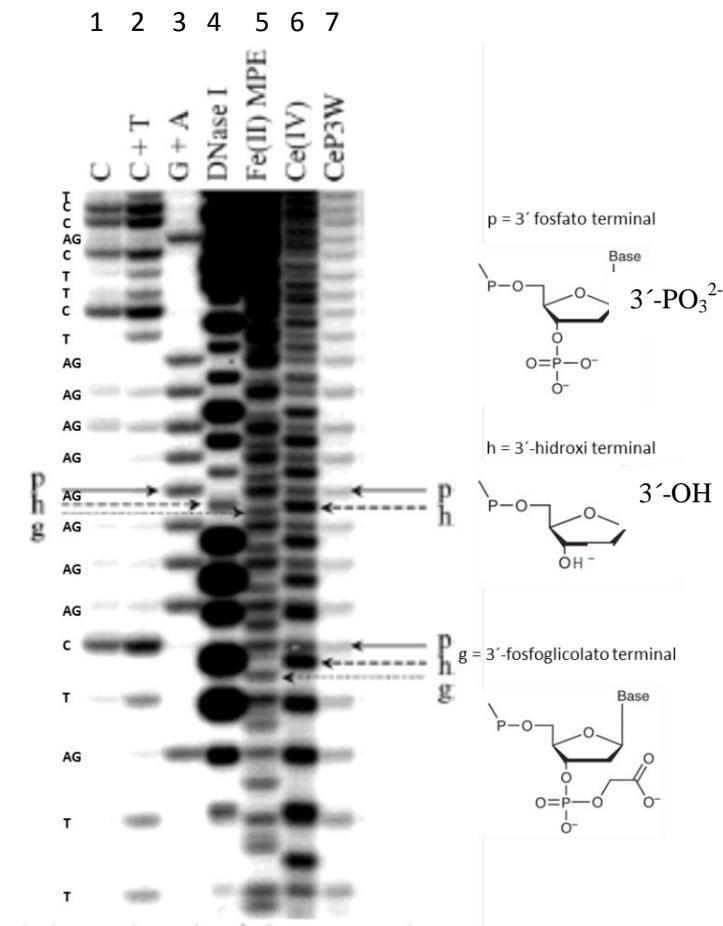


Figura 1.18 Eletroforese em gel de poliacrilamida, colunas 1, 2 e 3: fragmentos com terminal  $3'\text{-PO}_3^{2-}$ ; coluna 4: fragmentos com terminal  $3'\text{-OH}$ ; coluna 5: fragmentos com terminais  $3'\text{-PO}_3^{2-}$ ,  $3'\text{-OH}$  e  $3'\text{-fosfoglicolato}$ ; coluna 6: fragmentos com terminais  $3'\text{-PO}_3^{2-}$  e  $3'\text{-OH}$ . coluna 7: fragmentos  $3'\text{-PO}_3^{2-}$ . (KOVACIC; et al. 2002)

## 1.5 COMPLEXOS METÁLICOS DE COBALTO COM LIGANTES TRIPODAIS TETRADENTADOS *N*-DOADORES.

Ligantes tripodais são ligantes tri ou tetradentados com simetria  $C_3$  (Figura 1.18) (SHRIVER; ATKINS, 2003). Estes ligantes são empregados para obter uma coordenação não-planar em torno dos centros metálicos; uma propriedade que é importante e relevante para muitos sítio-ativos de metaloenzimas (MASSOUD, 2008).

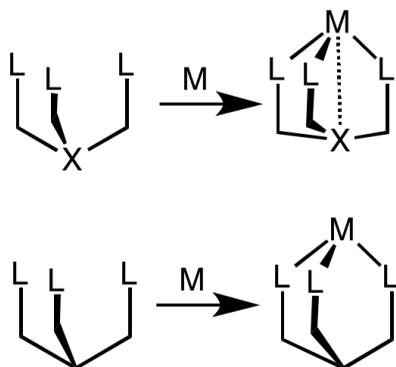


Figura 1.19 Representação da estrutura de um ligante tri e tetradentado, livre e coordenado com o metal ([http://en.wikipedia.org/wiki/Tripodal\\_ligand#mediaviewer/File:TripodCoordModes.png](http://en.wikipedia.org/wiki/Tripodal_ligand#mediaviewer/File:TripodCoordModes.png)) (acessado 27/06/2014).

Complexos de  $Co^{3+}$  com ligantes nitrogênio amínicos doadores, foram muito utilizados para promover a hidrólise de biomoléculas, como: a adenosina-trifosfato (ATP) (MASSOUD, 1994), polifosfatos estéres, diésteres de fosfato (FANSHAW; BLACKMAN; CLARK, 2003) e na clivagem do DNA (HETTICH; SCHNEIDER, 1997).

Assim, Massoud e colaboradores (2008) sintetizaram e caracterizaram uma série de complexos de  $Co^{2+}$  com ligantes tripodais tetradentados *N*-doadores (MASSOUD, 2008). Posteriormente, Xu e colaboradores realizaram um estudo de complexos com  $Co^{3+}$  como íon central, com uma série de ligantes tetraamínicos *N*-doadores, (ligantes representados na Figura 1.19). A estrutura geral dos complexos foi  $[Co(L)CO_3]ClO_4$ . Os complexos com o ligante tripodal TPA, e com o ligante 2,2,2-tet, apresentaram atividade de clivagem frente ao DNA plasmidial. O mais ativo destes complexos foi com o ligante TPA, que apresentou valores de  $k_{cat} = 1,26 h^{-1}$  e  $K_M = 1,59 \times 10^{-4} mol L^{-1}$  (XU; et al., 2009).

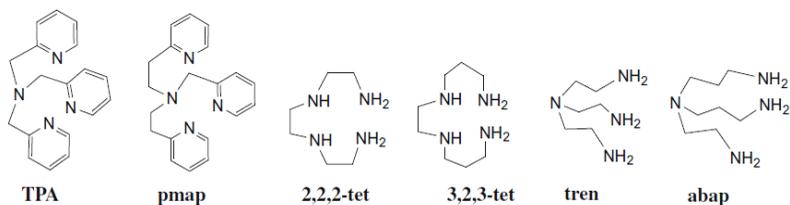


Figura 1.20 – Estrutura química dos ligantes tetradentados *N*-doadores (XU; et al., 2008)

Seguindo esta linha de pesquisa foi realizado um estudo mantendo como ligante o TPA e variando o íon metálico central ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ). A estrutura geral dos complexos foi  $[\text{M}(\text{TPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ . O complexo com o metal central  $\text{Co}^{2+}$  apresentou mecanismo hidrolítico e a melhor atividade de clivagem. O valor obtido de  $k_{\text{cat}}$  foi de  $6,59 \text{ h}^{-1}$  mostrando um aumento significativo na velocidade de reação comparado ao análogo de  $\text{Co}^{3+}$ , o  $K_M$  obtido foi de  $2,20 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . (XU; et al., 2011).

Esta diferença entre a atividade do complexo de  $\text{Co}^{2+}$  para o complexo de  $\text{Co}^{3+}$  é prevista, pois em solução aquosa há formação de equilíbrio entre as espécies: aquo =  $[\text{Co}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  e hidroxó =  $[\text{Co}(\text{L})(\text{OH})]^+$  para o complexo com  $\text{Co}^{2+}$ ; aquo =  $[\text{Co}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^{3+}$  e hidroxó =  $[\text{Co}(\text{L})(\text{OH})]^{2+}$  para o complexo com  $\text{Co}^{3+}$ . O ligante hidroxó é um nucleófilo melhor que  $\text{H}_2\text{O}$  e por consequência a espécie hidroxó é mais ativa na clivagem do DNA. O complexo com metal central  $\text{Co}^{3+}$  é mais estável (efeito termodinâmico) e mais inerte (efeito cinético), devido a ser um  $d^6$  de spin baixo, consequentemente demora mais tempo para a substituição dos ligantes e a reação de clivagem do DNA torna-se mais (SHRIVER; ATKINS, 2003).

Considerando o exposto o presente trabalho teve como objetivo o estudo de clivagem de DNA promovida por uma série de complexos de  $\text{Co}^{2+}$  com modificações na estrutura do ligante TPA (MASSOUD, 2014).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar a interação e a clivagem do DNA plasmidial e de sequências nucleotídicas utilizando uma série de cinco compostos de  $\text{Co}^{2+}$  com ligantes *N*-doadores tetradentados:  $[\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ ,  $[\text{Co}(6\text{-MeTPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ ,  $[\text{Co}(6\text{-Me}_2\text{TPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ ,  $[\text{Co}(\text{BPQA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ , e  $[\text{Co}(\text{BQPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ .

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade de clivagem do DNA plasmidial pBSKII utilizando uma série de cinco compostos de  $\text{Co}^{2+}$  com ligantes *N*-doadores tetradentados:  $[\text{Co}(\text{TPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ ,  $[\text{Co}(6\text{-MeTPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ ,  $[\text{Co}(6\text{-Me}_2\text{TPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ ,  $[\text{Co}(\text{BPQA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ , e  $[\text{Co}(\text{BQPA})\text{Cl}]\text{ClO}_4$  em diferentes concentrações dos complexos;

- Investigar indícios sobre os possíveis mecanismos de clivagem, utilizando inibidores de ERO e atmosfera com ausência de oxigênio;

- Analisar a influência da força iônica na atividade de clivagem com  $\text{LiClO}_4$ , para verificar os efeitos das interações eletrostáticas no mecanismo de clivagem do DNA.

- Analisar o modo de clivagem de DNA pelos complexos na presença de inibidores específicos do sulco menor e maior;

- Determinar os parâmetros cinéticos das reações de clivagem de DNA plasmidial pelos complexos;

- Analisar a clivagem de sequências nucleotídicas pelos complexos por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida de alta resolução.



### 3 – METODOLOGIA

#### 3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados nos ensaios com DNA foram de grau de biologia molecular e suas soluções foram preparadas em água ultrapura Milli-Q (resistividade à 25 °C de no máximo 18,2 MΩ.cm, Teor de Carbono Orgânico Total < 10 ppb) obtida pelo sistema Milli-Q Simplicity (Millipore, USA). Nos casos onde houve necessidade do uso de solventes orgânicos, como etanol e acetonitrila, os reagentes utilizados possuíam grau espectroscópico. Todas as soluções (incluindo as dos complexos) foram previamente esterilizadas, utilizando-se filtros de membrana, tipo Millex de 0,22 μm, (Millipore, USA) para evitar a contaminação bacteriana.

#### 3.2 COMPLEXOS EM ESTUDO

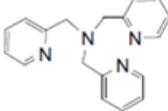
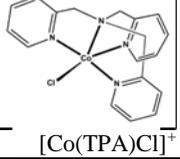
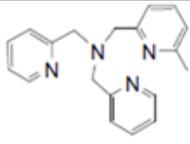
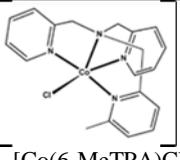
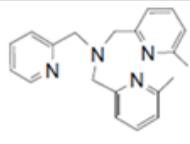
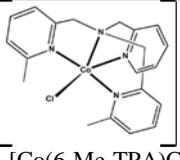
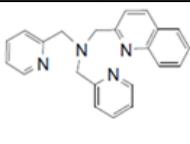
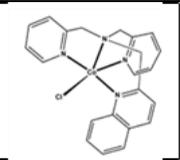
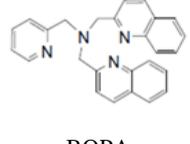
Os compostos utilizados neste trabalho: [Co(TPA)Cl]ClO<sub>4</sub>; [Co(6-MeTPA)Cl]ClO<sub>4</sub>; [Co(6-Me<sub>2</sub>TPA)Cl]ClO<sub>4</sub>; [Co(BPQA)Cl]ClO<sub>4</sub>; [Co(BQPA)Cl]ClO<sub>4</sub>, foram cedidos pelo grupo de pesquisa coordenado pelo professor Salah Massoud do Departamento de Química da Universidade de Louisiana (USA).

A caracterização dos complexos foi realizada via análise elementar, IV, UV-Visível, ESI-MS, titulação potenciométrica, titulação espectrofotométrica e difratometria de Raios X. (XU; et al., 2011; MASSOUD; et al., 2014). O nome dos ligantes, a estrutura dos ligantes e as estruturas dos íons complexos estão representadas na Tabela 3.1. Os íons complexos: [Co(TPA)Cl]<sup>+</sup>; [Co(6-MeTPA)Cl]<sup>+</sup>; [Co(6-Me<sub>2</sub>TPA)Cl]<sup>+</sup>; [Co(BPQA)Cl]<sup>+</sup>; [Co(BQPA)Cl]<sup>+</sup>, a partir daqui passarão a ser denominados de **1**, **2**, **3**, **4** e **5**, respectivamente, devido à maior facilidade de designação que seus nomes completos.

Os valores de pKa correspondentes ao equilíbrio representado a seguir, para os complexos **1**, **2**, **3**, **4** e **5** foram, respectivamente: 8,6 ± 0,1; 8,7 ± 0,1; 8,6 ± 0,1; 8,5 ± 0,1 e 8,4 ± 0,2.



Tabela 3.1 Nome, estrutura química dos ligantes e estrutura química dos íons complexos estudados neste trabalho.

	<b>Nome do ligante</b>	<b>Ligante</b>	<b>Íon complexo</b>
<b>1</b>	tris(2-piridilmetil)amina	 TPA	 [Co(TPA)Cl] <sup>+</sup>
<b>2</b>	(6-metil-2-piridil)metil)bis(2-piridilmetil) amina	 6-MeTPA	 [Co(6-MeTPA)Cl] <sup>+</sup>
<b>3</b>	bis(6-metil-2-piridil)metil)-(2-piridilmetil)amina	 6-Me <sub>2</sub> TPA	 [Co(6-Me <sub>2</sub> TPA)Cl] <sup>+</sup>
<b>4</b>	bis(2-piridilmetil)-(2-quinolilmetil)amina	 BPQA	 [Co(BPQA)Cl] <sup>+</sup>
<b>5</b>	bis(2-quinolilmetil)-(2-piridilmetil)amina	 BQPA	 [Co(BQPA)Cl] <sup>+</sup>

### 3.3 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Nos estudos de interação e clivagem do DNA pelos complexos, foi utilizado como biomolécula o plasmídeo pBSK II (Stratagene, USA) que é derivado do pUC19. Este plasmídeo possui 2961 pares de bases e contém um gene que confere resistência à ampicilina.

O plasmídeo foi extraído com o kit comercial HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN, onde foi seguido o protocolo padrão do

fabricante para extração (QIAGEN, 2001), a Figura 3.1 mostra uma representação do processo de extração do DNA plasmidial.

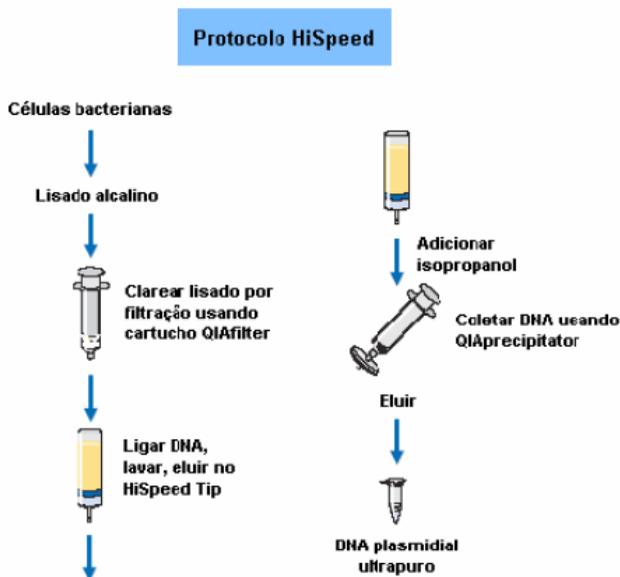


Figura 3.1 Esquema representativo do princípio do método utilizado pelo kit comercial HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN (QIAGEN, 2001).

### 3.4 CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL

Nos ensaios com o DNA plasmidial superenovelado pBSKII, foram utilizadas as seguintes condições: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [Tampão] = 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , Tris-HCl, pH 7,0 ou 9,0; temperatura de 37 °C. As reações foram interrompidas pela adição do tampão de corrida (EDTA 0,25 mol  $\text{L}^{-1}$ , glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01% - pH 8,0) e submetidas à eletroforese em gel da agarose.

Os géis de agarose foram preparados com a dissolução, sob aquecimento em forno micro-ondas, da quantidade de massa de agarose necessária para preparar um gel com concentração de 0,8 % (m/v), em tampão TBE 0,5x (Tris 44,5 mmol  $\text{L}^{-1}$ , ácido bórico 44,5 mmol  $\text{L}^{-1}$ , EDTA 1 mmol  $\text{L}^{-1}$  - pH 8,0). A solução foi despejada em uma forma para dar formato ao gel e aos poços em que serão aplicadas as amostras. Após o resfriamento, 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 da agarose (0,8%) por 120 minutos a 90 V em tampão TBE 0,5x (Tris 44,5 mmol L<sup>-1</sup>, ácido bórico 44,5 mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup> - pH 8,0).

Os géis resultantes foram corados com o agente intercalante brometo de etídio (0,3 µg mL<sup>-1</sup>), 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). Para todos os ensaios foram realizados controles, contendo as misturas reacionais sem a presença dos complexos.

### 3.4.1 Efeito da concentração dos complexos

Nos ensaios de efeito da concentração dos complexos, foram utilizadas as seguintes condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25 µmol L<sup>-1</sup> em pb); [Tampão] = 10 mmol L<sup>-1</sup>, Tris-HCl, pH 7,0; [1, 2, 3, 4 e 5] = 50 a 450 µmol L<sup>-1</sup>; temperatura = 37 °C; tempo = 2 horas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.4.2 Efeito dos inibidores de ERO

Os ensaios com inibidores de espécies reativas de oxigênio (ERO) utilizaram DMSO (0,5 mol L<sup>-1</sup>) ou KI (0,4 mmol L<sup>-1</sup>). Para todos os ensaios as condições de reação foram: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25 µmol L<sup>-1</sup> em pb); [Tampão] = 10 mmol L<sup>-1</sup>, Tris-HCl, pH 7,0; concentração dos complexos 1, 2, 3 e 4 = 450 µmol L<sup>-1</sup> e para 5 = 150 µmol L<sup>-1</sup>, pois está concentração já apresenta clivagem com a melhor eficiência para 5; temperatura = 37°C; tempo = 30 minutos. Foram realizados ensaios de controle negativo sem o inibidor e sem o complexo, e controle negativo com o inibidor e sem o complexo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.4.3 Efeito do oxigênio

Os ensaios na ausência de oxigênio foram realizados dentro de uma câmara de polietileno ou *“glove-bag”* (modelo X-27-27, I2R) que foi insuflada com argônio. Todas as soluções foram desareadas com bomba de vácuo e borbulhadas em argônio. Para todos os ensaios as

condições de reação foram: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [Tampão] = 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , Tris-HCl, pH 7,0; concentração dos complexos **1**, **2**, **3** e **4** = 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e para **5** = 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37°C; tempo = 3 horas. Para assegurar que o ambiente sem oxigênio foi mantido durante os ensaios, foi realizado um controle com o sistema  $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$  (100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ )/DTT (10  $\text{mmol L}^{-1}$ ), que cliva o DNA apenas na presença do oxigênio. Os ensaios também foram realizados em atmosfera de oxigênio. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.4.4 Efeito dos bloqueadores de sulco

Nos ensaios com os bloqueadores de sulco foram utilizadas a distamicina, ligante do sulco menor, e o verde de metila, ligante do sulco maior (VAN DYKE; HERTZBERG; DERVAN, 1983; KIM; NORDEN, 1993). O DNA plasmidial foi tratado por 30 min à temperatura ambiente com distamicina (50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) ou verde de metila (50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) em tampão 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , Tris-HCl, pH 7,0, e posteriormente incubado com os complexos para a reação. Para todos os ensaios as condições de reação foram: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [Tampão] = 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , Tris-HCl, pH 7,0; concentração dos complexos **1**, **2**, **3** e **4** = 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e para **5** = 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37°C; tempo = 30 minutos. Foram realizados ensaios de controle negativo sem o bloqueador e sem o complexo, e controle negativo com o bloqueador e sem o complexo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.4.5 Efeito da força iônica

Os ensaios de força iônica foram realizados com concentrações crescentes de  $\text{LiClO}_4$  variando de 25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 250  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Para todos os ensaios as condições de reação foram: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [Tampão] = 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , Tris-HCl, pH 7,0; concentração dos complexos **1**, **2**, **3** e **4** = 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e para **5** = 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37°C; tempo = 30 minutos. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

### 3.4.6 Cinética de clivagem do DNA plasmidial

A cinética de clivagem do DNA plasmidial pBSKII foi avaliada nos pHs 7,0 e 9,0, seguindo o método da perda da forma superenovelada (F I) ao longo do tempo de reação, seguindo cinética de pseudo-primeira ordem. Para cada concentração de complexo, as alíquotas foram interrompidas em determinados intervalos de tempo em que a taxa de consumo da Forma I permanecesse linear. As constantes observadas de clivagem de DNA ( $k_{obs}$ ) foram determinadas a partir do coeficiente angular da representação gráfica do ln da fração intacta do DNA (F I) em função do tempo reacional (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000).

Com o gráfico obtido pela curva dos valores de  $k_{obs}$  em função da concentração dos complexos foi possível obter alguns parâmetros cinéticos para a clivagem do DNA plasmidial, como: a constante catalítica ( $k_{cat}$ ); a constante de Michaelis-Menten ( $K_M$ ); a eficiência catalítica ( $k_{cat}/K_M$ ); a taxa de aceleração ( $f = k_{cat}/k_{hid}$ ), definido pela razão entre a constante catalítica e a constante de hidrólise não catalisada do DNA,  $k = 3,6 \times 10^{-8} \text{ h}^{-1}$ , pH 7,0 a 37°C; e o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) da reação catalisada pelo complexo, onde  $t_{1/2} = -\ln(0,5)/k_{cat}$  (SREEDHARA; FREED; COWAN, 2000).

### 3.5 PREPARAÇÃO DO GEL DE POLIACRILAMIDA

O gel utilizado nos seguintes ensaios e os demais procedimentos para realização de da eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante seguiu o descrito por (AUSUBEL; ALBRIGHT; JU, 2001). Sob agitação magnética, 42 g de uréia (agente desnaturante) foram dissolvidos em 10 mL de TBE (Tris 44,5 mmol L<sup>-1</sup>, ácido bórico 44,5 mmol L<sup>-1</sup>, EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup> - pH 8,0) e 40 mL de acrilamida/bis-acrilamida 29:1 (40% (m/v)) num volume total de 100 mL. Nessas condições a concentração de poliacrilamida foi de 16% que é a indicada para resolver fragmentos de DNA entre 50 e 200 pares de base. Após a homogeneização da mistura de gel, 500 µL de persulfato de amônio (APS) 10% e 50 µL tetrametiletilenodiamina (TEMED) para catalisar a polimerização do gel. Rapidamente, a mistura foi cuidadosamente pipetada para o espaço entre as placas de vidro (41 x 33 cm) seladas e espaçadas (0,4 mm). As placas contendo a mistura do gel foram deitadas e um pente de dentes retangulares foi inserido na porção superior do gel para permitir a formação dos poços. Após 2 horas, o gel

no interior das placas torna-se completamente polimerizado e o conjunto (placas/gel) é acondicionado num sistema de eletroforese vertical. Os reservatórios superior e inferior do sistema foram completados com TBE para permitir a passagem de corrente elétrica entre os pólos negativo (superior) e positivo (inferior). O conjunto foi submetido a uma pré-corrída eletroforética na ausência das amostras (50 W, 1 h), para que a temperatura do conjunto dentro do sistema atingisse os 50 °C. Este procedimento facilita a obtenção de condições altamente desnaturantes. Após a pré-corrída, todas as amostras foram aquecidas (95 °C, 5 minutos) para forçar a desnaturação das fitas do DNA, aumentando o caráter desnaturante do procedimento de eletroforese. As amostras (ainda aquecidas) foram rapidamente aplicadas aos poços do gel e submetidas à corrída eletroforética (50 W) por 150 minutos atingindo uma temperatura média de 55 °C. Com o término da corrída, o conjunto foi retirado do sistema e uma imagem do gel foi capturada usando um scanner de imagem Fujifilm-FLA-9000, com o Software Image Reader FLA-9000.

### 3.6 CLIVAGEM DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA

A sequência nucleotídica 49-Mer 5'FAM (FAM = 6-fluoresceína) que será designada como Oligo 1, (adquirida através da Integrated DNA technologies - Coralville, IA) foi utilizada como modelo de DNA na eletroforese em gel de poliacrilamida. Com o objetivo de verificar se há preferência por alguma região específica, o Oligo 1 em sua forma emparelhada *“hairpin loop”* (Figura 3.2) apresenta uma região rica em pareamento C-G e outra região rica em pareamento A-T. A 6-fluoresceína (FAM) é um marcador de fluorescência que está ancorado na extremidade 5' do oligo.

Em cada reação foi utilizado 50 pmol do Oligo 1, tratado nas seguintes condições de reação: [tampão] = 10 mmol L<sup>-1</sup>, Tris-HCl, pH 9,0; concentração do complexo **2** e **4** = 450 μmol L<sup>-1</sup>; temperatura = 50°C; tempo = 24 horas. Os demais complexos não apresentaram atividade de clivagem nessas condições e em outras condições anteriormente testadas. As reações de clivagem foram interrompidas pela adição do tampão (Formamida 80%, 1 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA, 0,05% de azul de bromofenol pH 8,0).



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTUDOS DE INTERAÇÃO E CLIVAGEM DO DNA PLASMIDIAL

#### 4.1.1 Clivagem do DNA plasmidial

A clivagem do DNA plasmidial pelos complexos **1** a **5** foi inicialmente investigada em tampão Tris-HCl - 10 mmol L<sup>-1</sup> em pH 7,0 na temperatura de 37 °C. A concentração dos complexos foi avaliada por um período de 2 horas em concentrações no intervalo de 50 a 450 μmol L<sup>-1</sup> para os complexos **1** a **4** e na concentração de 150 μmol L<sup>-1</sup> para o complexo **5**, pois, experimentos prévios mostraram que nesta concentração este complexo apresenta melhor atividade. Todos os complexos demonstraram atividade dependente da concentração na conversão da forma superenovelada do DNA plasmidial (F I) para a forma circular aberta (F II), tal como é representado nas Figuras 4.1 a 4.5, para os complexos **1** a **5** respectivamente. Nessas condições, nenhum dos complexos cliva totalmente a forma intacta do plasmídeo (F I), entretanto **2** e **4** se mostraram bastante ativos e capazes de formar o DNA linear (F III).

As concentrações de complexos afetam diretamente a atividade. Os complexos de **1** a **4** tiveram um aumento das suas atividades nas concentrações entre 50 - 450 μmol L<sup>-1</sup>, enquanto que o complexo **5** atingiu a atividade máxima na concentração de 150 μmol L<sup>-1</sup>.

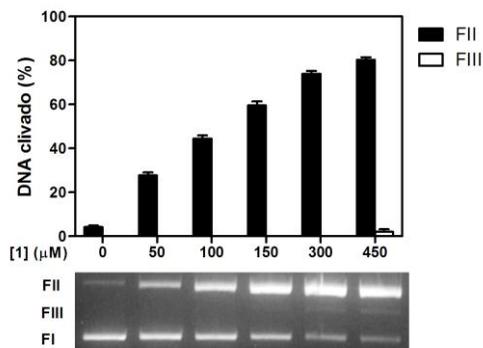


Figura 4.1 Clivagem do DNA plasmidial superenovelado pBSK II por **1** em diferentes concentrações. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0; [1] = 50 a 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 2 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

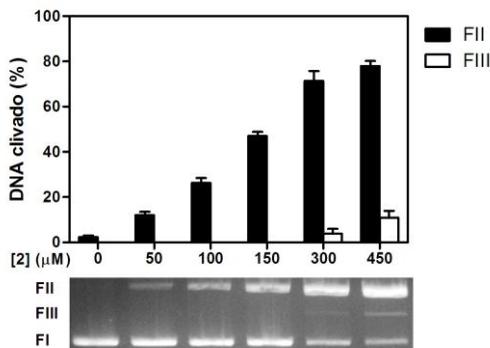


Figura 4.2 Clivagem do DNA plasmidial superenovelado pBSK II por **2** em diferentes concentrações. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0; [2] = 50 a 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 2 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

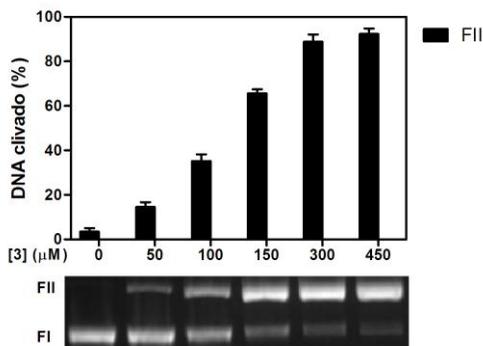


Figura 4.3 Clivagem do DNA plasmidial superrenovado pBSK II por **3** em diferentes concentrações. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**3**] = 50 a  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 2 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n=3$ ).

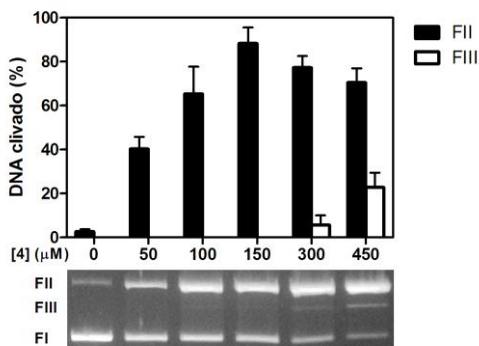


Figura 4.4 Clivagem do DNA plasmidial superrenovado pBSK II por **4** em diferentes concentrações. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**4**] = 50 a  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 2 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n=3$ ).

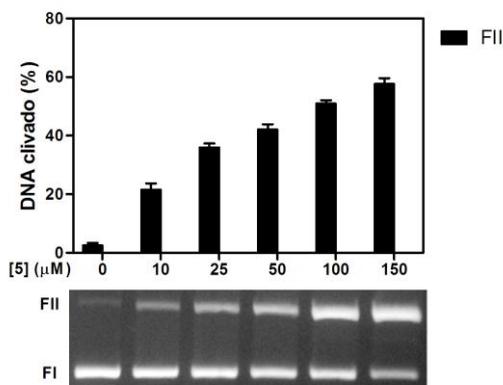


Figura 4.5 Clivagem do DNA plasmidial superenovelado pBSK II por **5** em diferentes concentrações. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [5] = 50 a  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37^\circ\text{C}$ ; tempo = 2 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n=3$ ).

#### 4.1.2 Efeito dos inibidores de ERO

Para compreender se o mecanismo utilizado pelos complexos na clivagem de DNA plasmidial foi hidrolítico ou oxidativo, uma série de sequestradores de radicais foram adicionados às misturas reacionais: 1)  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de DMSO (dimetil-sulfóxido), conhecido sequestrador do radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) (SAKURAI; TAMURA; OKATANI, 1995) e 2)  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$  de KI (iodeto de potássio), conhecido inibidor da geração de peróxidos (R-O-OH) (KELLER; POLLARD, 1977).

A adição dos inibidores não afetou significativamente a eficiência da atividade de clivagem do DNA, conforme pode ser observado nas Figuras 4.6 a 4.10, para os complexos **1** a **5** respectivamente. Este fato sugere que na clivagem do DNA pelos complexos não há a formação dos radicais hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), nem de peróxidos (R-O-OH). Este resultado vai ao encontro do que foi reportado anteriormente por Xu e colaboradores (2011) onde o complexo **1** (XU; et al. 2011) também não formou essas espécies e o que foi reportado por Xu e colaboradores (2009) para o complexo análogo com  $\text{Co}^{3+}$  (XU; et al., 2009).

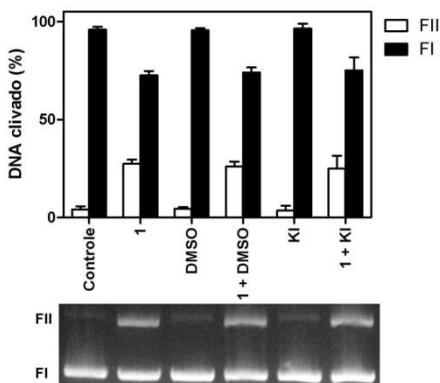


Figura 4.6 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **1** em presença de sequestradores de ERO. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**1**] =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos. [DMSO] =  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , [KI] =  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

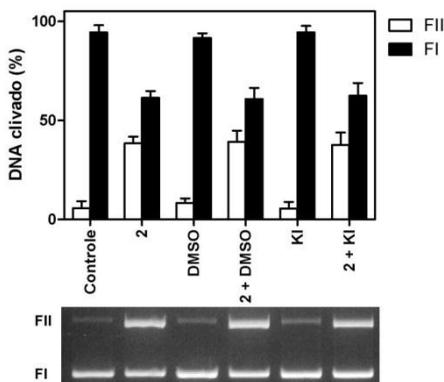


Figura 4.7 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **2** em presença de sequestradores de ERO. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**2**] =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos. [DMSO] =  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , [KI] =  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

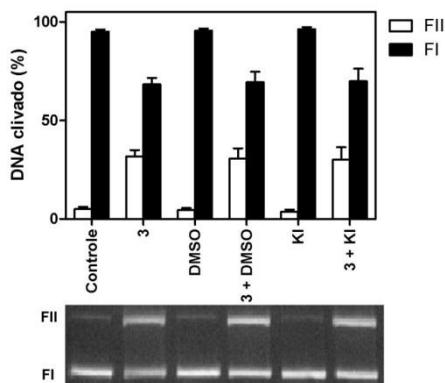


Figura 4.8 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **3** em presença de sequestradores de ERO. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**3**] =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos. [DMSO] =  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , [KI] =  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

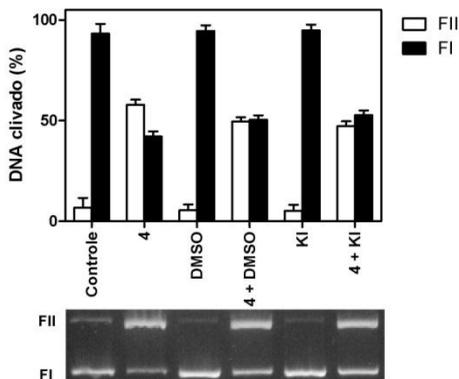


Figura 4.9 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **4** em presença de sequestradores de ERO. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**4**] =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos. [DMSO] =  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ , [KI] =  $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

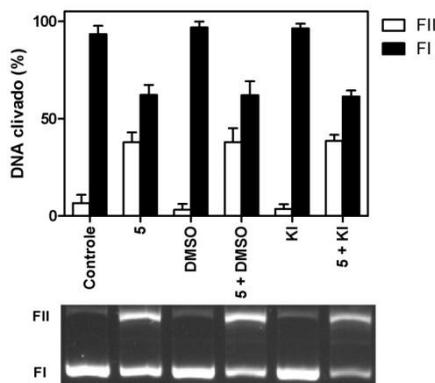
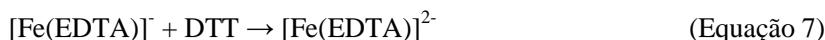
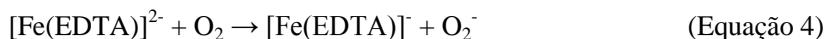


Figura 4.10 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **5** em presença de sequestradores de ERO. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**5**] = 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. [DMSO] = 0,5  $\text{mol L}^{-1}$ , [KI] = 0,4  $\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

### 4.1.3 Efeito do oxigênio

Para definir a influência do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) na clivagem de DNA plasmidial, as reações foram preparadas na presença (Figura 4.11 (a)), e na ausência de oxigênio (Figura 4.11 (b)). A possibilidade da presença de oxigênio residual sob condições anaeróbicas foi monitorada pela realização de um experimento para controle positivo, o sistema  $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}/\text{DTT}$  conhecido por gerar radicais hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), que oxidam o DNA via reação de Fenton ((POGOZELSKI; TULLIUS, 1998; NETTO; STADTMAN, 1996; SPEAR; AUST, 1998)) conforme as equações abaixo:



O controle com o sistema  $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}/\text{DTT}$  teve sua atividade muito diminuída no experimento em atmosfera de argônio, indicando baixa quantidade de oxigênio molecular durante o experimento.

Os cinco complexos da série não mostraram diferença significativa na clivagem do DNA plasmidial na ausência de oxigênio molecular, indicando que o mecanismo de clivagem é hidrolítico. Este resultado corrobora com o obtido por Xu e colaboradores (XU et al., 2009, XU et al., 2011).

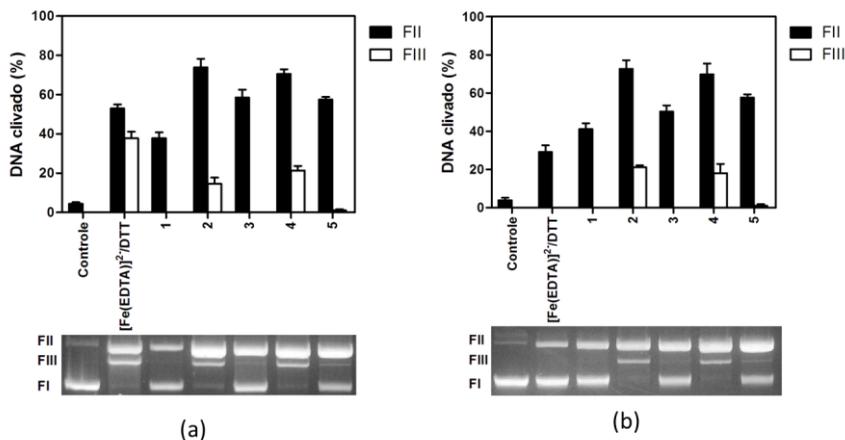


Figura 4.11 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II. **(a)** Atmosfera com oxigênio. **(b)** Atmosfera com argônio. Controle com o sistema  $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^{2-}$  ( $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ )/DTT ( $10 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Condições de reação:  $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$  de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb);  $[\text{tampão}] = \text{Tris-HCl} - 10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; **[1, 2, 3, 4]** =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$  e **[5]** =  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 3 horas. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n=3$ ).

#### 4.1.4 Efeito dos bloqueadores de sulco

A distamicina e o verde de metila são moléculas que se ligam especificamente ao sulco menor e maior do DNA (VAN DYKE; HERTZBERG; DERVAN, 1983; KIM; NORDEN, 1993), respectivamente. O estudo do efeito dos bloqueadores de sulco permite verificar se o bloqueio do sulco maior ou do sulco menor interferem na clivagem do DNA plasmidial, o que mostraria uma preferência do complexo por um deles. Os ensaios realizados pelos complexos **1 a 5** em

presença dos bloqueadores de sulco são mostrados nas Figuras 4.12 a 4.16, respectivamente.

A ocupação dos sulcos não interferiu de forma significativa no processo de clivagem catalisado pelos complexos **1** a **5**. A ocupação do sulco maior pelo verde de metila diminuiu um pouco a atividade, sugerindo uma leve dependência pelo sulco maior.

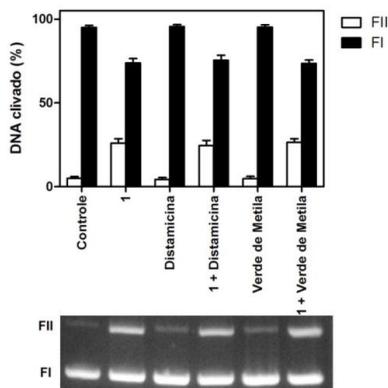


Figura 4.12 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **1** em presença dos bloqueadores dos sulcos. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**1**] =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos. [Distamicina] =  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , [Verde de Metila] =  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

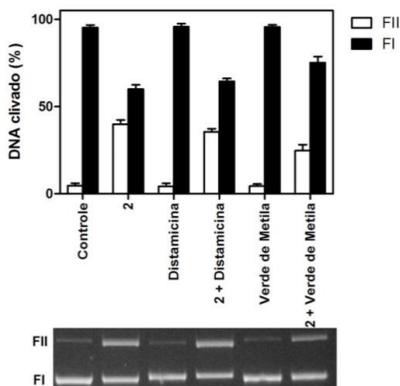


Figura 4.13 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **2** em presença dos bloqueadores dos sulcos. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**2**] =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos. [Distamicina] =  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , [Verde de Metila] =  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

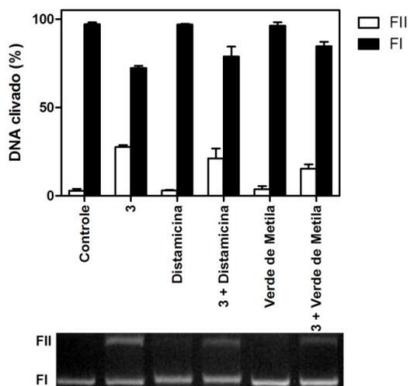


Figura 4.14 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **3** em presença dos bloqueadores dos sulcos. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**3**] =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos. [Distamicina] =  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , [Verde de Metila] =  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

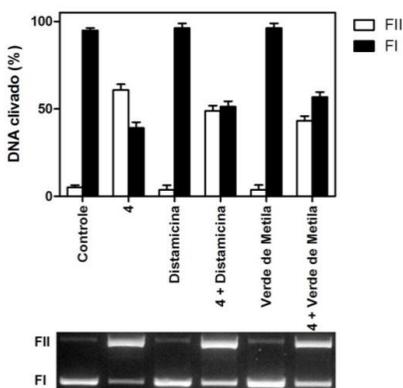


Figura 4.15 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **4** em presença dos bloqueadores dos sulcos. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**4**] =  $450 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos. [Distamicina] =  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , [Verde de Metila] =  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

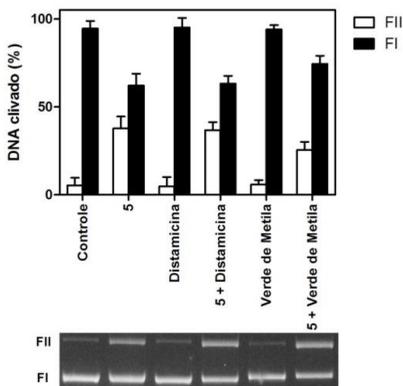


Figura 4.15 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **5** em presença dos bloqueadores dos sulcos. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**5**] =  $150 \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos. [Distamicina] =  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , [Verde de Metila] =  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

#### 4.1.5 Efeito da força iônica

Complexos metálicos carregados positivamente podem interagir e neutralizar a carga negativa do esqueleto do DNA por meio de interações eletrostáticas, devido à aproximação da molécula com o DNA (BLACKBURN; GAIT, 1996).

Para verificar se essas interações influenciam na atividade dos complexos, foram realizados ensaios de clivagem na presença de perclorato de lítio ( $\text{LiClO}_4$ ). Nesses ensaios o íon  $\text{Li}^+$  se liga no esqueleto fosfodiéster neutralizando a carga negativa do DNA, consequentemente, dificultando a interação eletrostática DNA-complexo. As Figuras 4.17 a 4.21 mostram o efeito da adição do  $\text{LiClO}_4$  para os complexos **1** a **5** respectivamente. Nestes ensaios, todos os complexos apresentaram grande redução na atividade de clivagem do DNA plasmidial, sugerindo que interações eletrostáticas são muito importantes na clivagem do DNA pelos complexos **1** a **5**.

Para verificar se essa diminuição na atividade não ocorre pela precipitação dos complexos a adição do íon comum perclorato ( $\text{ClO}_4^-$ ), foram realizados ensaios com o cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), onde foi observado o mesmo comportamento (resultado não apresentado).

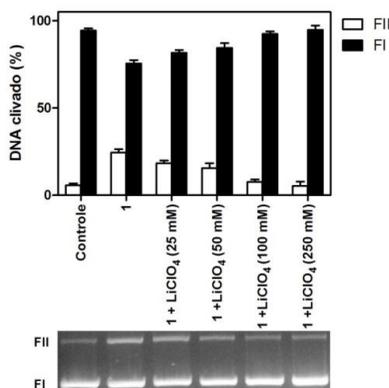


Figura 4.17 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **1** em presença de concentrações crescentes de  $\text{LiClO}_4$  (25 – 250)  $\text{mmol L}^{-1}$ . Condições de reação:  $[\text{DNA}] = 330 \text{ ng}$  de plasmídeo ( $\sim 25 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb);  $[\text{tampão}] = \text{Tris-HCl} - 10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0;  $[\text{I}] = 450 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura =  $37 \text{ } ^\circ\text{C}$ ; tempo = 30 minutos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão ( $n=3$ ).

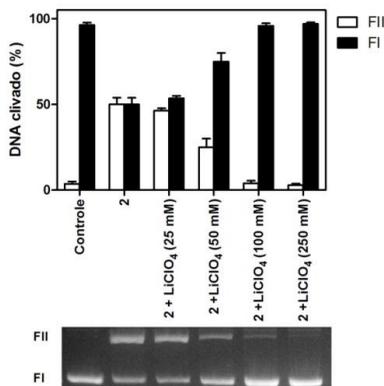


Figura 4.18 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **2** em presença de concentrações crescentes de LiClO<sub>4</sub> (25 – 250) mmol L<sup>-1</sup>. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25 μmol L<sup>-1</sup> em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; [**2**] = 450 μmol L<sup>-1</sup>; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão (n=3).

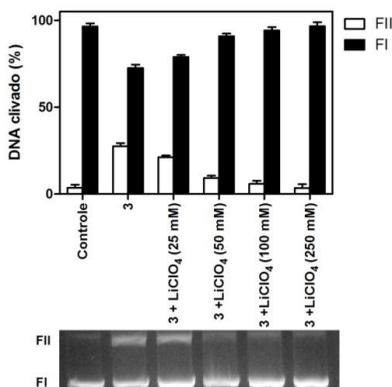


Figura 4.19 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **3** em presença de concentrações crescentes de LiClO<sub>4</sub> (25 – 250) mmol L<sup>-1</sup>. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25 μmol L<sup>-1</sup> em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 mmol L<sup>-1</sup>, pH 7,0; [**3**] = 450 μmol L<sup>-1</sup>; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. Os resultados estão expressos como média ± desvio-padrão (n=3).

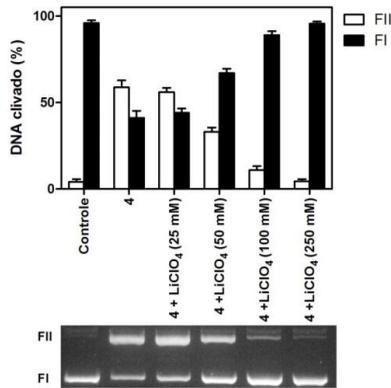


Figura 4.20 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **4** em presença de concentrações crescentes de  $\text{LiClO}_4$  (25 – 250)  $\text{mmol L}^{-1}$ . Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**4**] = 450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

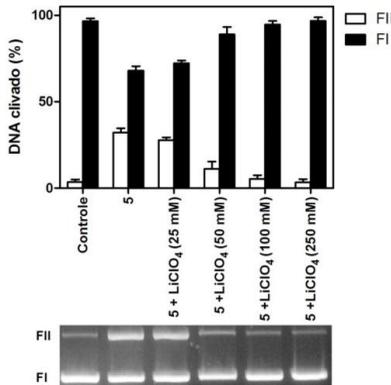


Figura 4.21 Clivagem do DNA plasmidial pBSK II por **5** em presença de concentrações crescentes de  $\text{LiClO}_4$  (25 – 250)  $\text{mmol L}^{-1}$ . Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; [**5**] = 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ; temperatura = 37 °C; tempo = 30 minutos. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio-padrão (n=3).

#### 4.1.6 Cinética de Clivagem do DNA plasmidial

O comportamento cinético da clivagem do DNA plasmidial pBSKII pelos complexos **1** a **5**, foi avaliado seguindo o decaimento exponencial da FI em função do tempo. A cinética foi tratada como de pseudo-primeira ordem na presença de concentrações crescentes do complexo. Em seguida, os dados obtidos a partir de cada concentração de complexo foram tratados como cinética de *pseudo*-Michaelis-Menten (cinética de saturação).

A concentração de DNA permaneceu constante 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb). Os perfis cinéticos para os complexos **1** a **5**, os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 4.22 a 4.26 e Tabelas 4.1 a 4.5, respectivamente.

O complexo **1** já tem dados cinéticos publicados (XU; et al., 2011) com valores de  $k_{\text{cat}} = 6,59 \text{ h}^{-1}$  e  $K_{\text{M}} = 2,20 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  utilizando o plasmídeo pUC19 na concentração de  $76,8 \mu\text{mol L}^{-1}$  de pb, em Tris-HCl -  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0 na temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . Este valor é significativamente diferente do  $k_{\text{cat}}$  obtido para este complexo no presente trabalho, que foi de  $1,11 \text{ h}^{-1}$  (Tabela 4.1) nas condições descritas na seção 3.2.6. Esta diferença já era esperada, pois o tampão Tris-HCl tem carga positiva e possivelmente interaja com o DNA, aumentando a força iônica do meio e diminuindo a atividade do complexo. Nos experimentos realizados neste trabalho utilizou-se uma concentração 10 (dez) vezes maior do tampão do que a utilizada no relato de XU e colaboradores e por isso os resultados não podem ser confrontados diretamente.

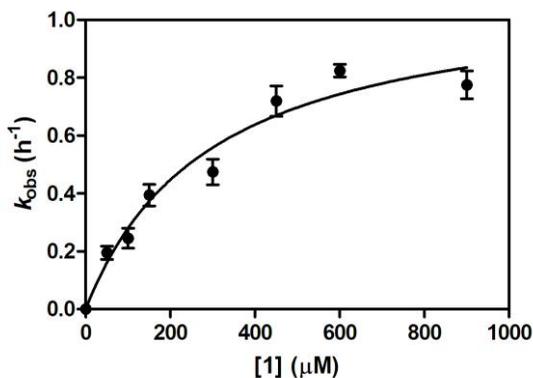


Figura 4.22 Gráfico de  $k_{obs}$  versus concentração de **1**. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; concentrações crescentes do complexo, temperatura = 37°C. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 - 2 horas).

Tabela 4.1. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelo complexo **1**:

[1] ( $\mu\text{M}$ )	$k_{obs}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
50	$1,95 (\pm 0,23) \times 10^{-1}$	1,11 ( $\pm 0,12$ )	$2,97 \times 10^{-4}$	$6,24 \times 10^{-1}$
100	$2,45 (\pm 0,35) \times 10^{-1}$			
150	$3,94 (\pm 0,37) \times 10^{-1}$			
300	$4,74 (\pm 0,44) \times 10^{-1}$			
450	$7,19 (\pm 0,53) \times 10^{-1}$			
600	$8,24 (\pm 0,22) \times 10^{-1}$			
900	$7,75 (\pm 0,48) \times 10^{-1}$			

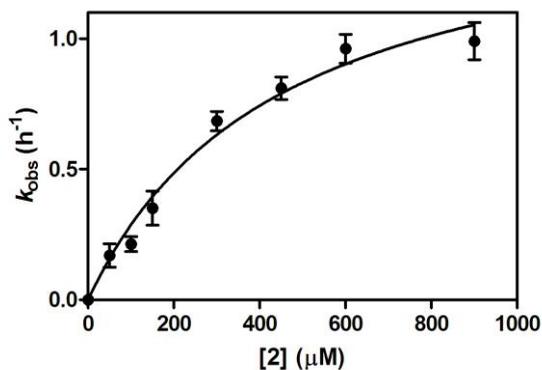


Figura 4.23 Gráfico de  $k_{\text{obs}}$  versus concentração de **2**. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl -  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; concentrações crescentes do complexo. temperatura =  $37^\circ\text{C}$ . Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 - 2 horas).

Tabela 4.2 Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelo complexo **2**:

[2] ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$K_{\text{M}}$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
50	$1,70 (\pm 0,45) \times 10^{-1}$	1,58 ( $\pm 0,15$ )	$4,49 \times 10^{-4}$	$4,39 \times 10^{-1}$
100	$2,13 (\pm 0,29) \times 10^{-1}$			
150	$3,50 (\pm 0,65) \times 10^{-1}$			
300	$6,84 (\pm 0,37) \times 10^{-1}$			
450	$8,10 (\pm 0,43) \times 10^{-1}$			
600	$9,61 (\pm 0,55) \times 10^{-1}$			
900	$9,90 (\pm 0,71) \times 10^{-1}$			

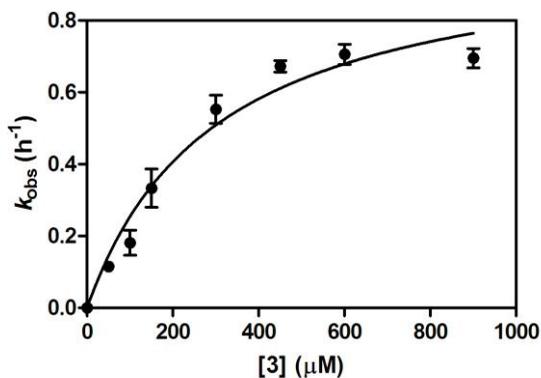


Figura 4.24 Gráfico de  $k_{\text{obs}}$  versus concentração de **3**. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo ( $\sim 25 \mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0; concentrações crescentes do complexo. temperatura = 37°C. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 - 2 horas).

Tabela 4.3. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelo complexo **3**:

[3] ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$K_{\text{M}}$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
50	$1,15 (\pm 0,14) \times 10^{-1}$	1,02 ( $\pm 0,14$ )	$3,03 \times 10^{-4}$	$6,80 \times 10^{-1}$
100	$1,81 (\pm 0,35) \times 10^{-1}$			
150	$3,33 (\pm 0,53) \times 10^{-1}$			
300	$5,53 (\pm 0,39) \times 10^{-1}$			
450	$6,72 (\pm 0,16) \times 10^{-1}$			
600	$7,06 (\pm 0,28) \times 10^{-1}$			
900	$6,95 (\pm 0,27) \times 10^{-1}$			

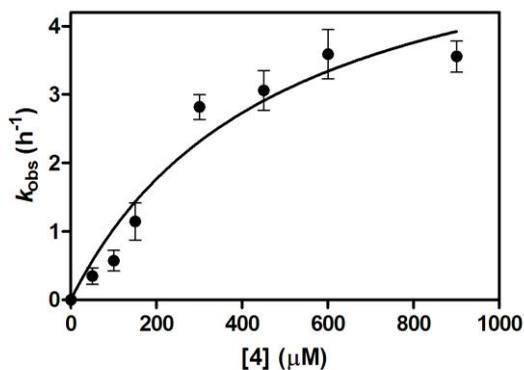


Figura 4.25 Gráfico de  $k_{obs}$  versus concentração de **4**. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; concentrações crescentes do complexo. temperatura = 37°C. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 - 2 horas).

Tabela 4.4. Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelo complexo **4**:

[4] ( $\mu\text{M}$ )	$k_{obs}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$k_{cat}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$K_M$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
50	$3,47 (\pm 0,12) \times 10^{-1}$	6,02 ( $\pm 0,08$ )	$4,81 \times 10^{-4}$	$1,15 \times 10^{-1}$
100	$5,72 (\pm 0,15) \times 10^{-1}$			
150	$1,14 (\pm 0,27)$			
300	$2,82 (\pm 0,18)$			
450	$3,06 (\pm 0,29)$			
600	$3,59 (\pm 0,36)$			
900	$3,56 (\pm 0,23)$			

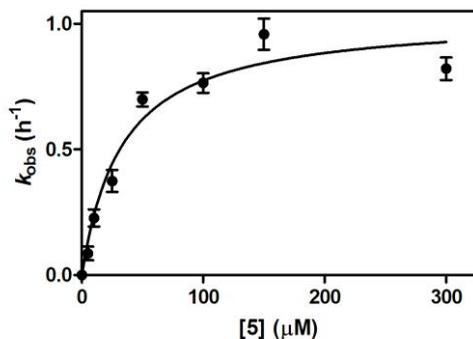


Figura 4.26 Gráfico de  $k_{\text{obs}}$  versus concentração de **5**. Condições de reação: [DNA] = 330 ng de plasmídeo (~25  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pb); [tampão] = Tris-HCl - 10  $\text{mmol L}^{-1}$ , pH 7,0; concentrações crescentes do complexo. temperatura = 37°C. Alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo (0 - 2 horas).

Tabela 4.5 Parâmetros cinéticos para as reações de clivagem catalisadas pelo complexo **5**:

[5] ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{obs}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$K_{\text{M}}$ ( $\text{mol L}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
5	$8,64 (\pm 0,27) \times 10^{-2}$	0,98 ( $\pm 0,12$ )	$3,03 \times 10^{-5}$	$7,07 \times 10^{-1}$
10	$2,27 (\pm 0,34) \times 10^{-1}$			
25	$3,74 (\pm 0,43) \times 10^{-1}$			
50	$6,98 (\pm 0,28) \times 10^{-1}$			
100	$7,64 (\pm 0,39) \times 10^{-1}$			
150	$9,58 (\pm 0,62) \times 10^{-1}$			
300	$8,21 (\pm 0,45) \times 10^{-1}$			

A Tabela 4.6 resume os resultados obtidos nas cinéticas de clivagem para os complexos de  $\text{Co}^{2+}$  em pH 7,0.

Tabela 4.6 – Parâmetros da cinética de pseudo-Michaelis-Menten para a clivagem hidrolítica do DNA, pelos complexos **1** a **5** em pH 7,0:

Complexo	$k_{cat}(h^{-1})$	$K_M(M)$	$E(h^{-1}M^{-1})$	Taxa de Aceleração
<b>1</b>	1,11 ( $\pm 0,12$ )	$2,97 \times 10^{-4}$	$3,74 \times 10^4$	$3,08 \times 10^7 (\pm 0,12)$
<b>2</b>	1,58 ( $\pm 0,15$ )	$4,49 \times 10^{-4}$	$3,52 \times 10^4$	$4,39 \times 10^7 (\pm 0,15)$
<b>3</b>	1,02 ( $\pm 0,14$ )	$3,02 \times 10^{-4}$	$3,38 \times 10^4$	$2,83 \times 10^7 (\pm 0,14)$
<b>4</b>	6,02 ( $\pm 0,08$ )	$4,81 \times 10^{-4}$	$1,25 \times 10^5$	$1,67 \times 10^8 (\pm 0,08)$
<b>5</b>	0,98 ( $\pm 0,12$ )	$3,03 \times 10^{-5}$	$3,23 \times 10^5$	$2,72 \times 10^7 (\pm 0,12)$

Hidrólise não catalisada do DNA,  $k = 3,6 \times 10^{-8} h^{-1}$  a  $37^\circ C$  e pH 7,0 (SREEDHARA; COWAN, 2001).

Pelos valores obtidos de  $k_{cat}$ , a ordem de reatividade desses complexos é: **4** > **2** > **1** > **3** > **5**. Pelos ângulos de ligações obtidos nos ensaios de difratometria de raio-X (XU, 2011; MASSOUD, 2014). Os complexos **4** e **2** apresentam uma menor aglomeração estérea próximo ao ligante  $Cl^-$ , assim, a interação com o DNA ocorre mais facilmente. Já nos complexos **3** e **5**, ocorre um aumento da aglomeração estérea em torno do  $Cl^-$  central, o que dificulta a aproximação com o DNA nessa posição e, por conseguinte, reduz as taxas de clivagem. Em solução aquosa o  $Cl^-$  é substituído por uma molécula de água ( $OH_2$ ). A taxa de aceleração mostra o aumento de clivagem comparado a constante de hidrólise da reação não catalisada  $k = 3,6 \times 10^{-8} h^{-1}$  a  $37^\circ C$  e pH 7,0 (SREEDHARA; COWAN, 2001). Os valores variaram de  $2,72 \times 10^7$  até  $1,67 \times 10^8$ .

Também foram obtidos parâmetros cinéticos em pH 9,0 para os complexos. A Tabela 4.7 resume os resultados obtidos nas cinéticas de clivagem para os complexos de em pH 9,0. Houve um grande aumento nos valores de  $k_{cat}$  que passaram a variar de  $1,99 h^{-1}$  a  $16,8 h^{-1}$ , havendo mudança na ordem de reatividade dos complexos que passou a ser **4** > **2** > **1** > **5** > **3**. Os valores de taxa de aceleração passaram a variar de  $5,53 \times 10^7$  até  $4,68 \times 10^8$ .

Tabela 4.7 – Parâmetros da cinética de Pseudo Michaelis-Menten para a clivagem hidrolítica do DNA pelos complexos **1** a **5** em pH 9,0:

Complexo	$k_{cat}(h^{-1})$	$K_M(M)$	$E(h^{-1}M^{-1})$	Taxa de Aceleração
<b>1</b>	3,02	$3,64 \times 10^{-5}$	$8,30 \times 10^5$	$8,50 \times 10^7$
<b>2</b>	10,1	$3,47 \times 10^{-4}$	$2,91 \times 10^5$	$2,81 \times 10^8$
<b>3</b>	1,99	$2,40 \times 10^{-4}$	$8,30 \times 10^4$	$5,53 \times 10^7$
<b>4</b>	16,8	$3,64 \times 10^{-4}$	$4,62 \times 10^5$	$4,68 \times 10^8$
<b>5</b>	4,92	$1,37 \times 10^{-4}$	$3,58 \times 10^5$	$1,36 \times 10^8$

Hidrólise não catalisada do DNA,  $k = 3,6 \times 10^{-8} \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ \text{ C}$  e  $\text{pH } 7,0$  (SREEDHARA; COWAN, 2001).

O aumento na atividade catalítica dos complexos em  $\text{pH } 9,0$  comparado ao  $\text{pH } 7,0$  é explicado pela desprotonação da molécula de água coordenada ao centro de  $\text{Co}^{2+}$  ( $[\text{Co}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ ) formando a espécie hidróxido ( $[\text{Co}(\text{L})\text{OH}]^+$ ) em  $\text{pH } 9,0$ . O ligante hidróxido é um nucleófilo melhor que o ligante aquo e por consequência a espécie hidróxido é mais ativa na clivagem do DNA.

Comparado a outros complexos com estruturas similares publicados na literatura, os complexos **1** a **5** mostraram-se bem ativos. Massoud e colaboradores (2013), realizaram a síntese de 4 complexos de  $\text{Cu}^{2+}$  com ligantes tetradentados *N*-doadores. Os ligantes estão representados na Figura 4.28.

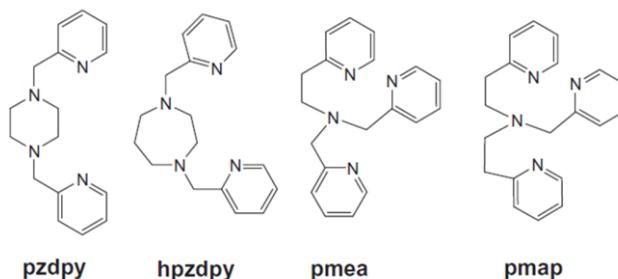


Figura 4.27 Estrutura química dos ligantes da Tabela 4.8 utilizados por MASSOUD; et al, 2013.

A Tabela 4.8 mostra os parâmetros cinéticos obtidos para estes complexos, nessa série os valores de  $k_{\text{cat}}$ , variaram de  $3,46 \times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$  a  $8,89 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$ , sendo consideravelmente menos ativos que os complexos **1** a **5**.

Tabela 4.8 – Parâmetros da cinética de Pseudo Michaelis Menten para a clivagem hidrolítica de DNA por complexos da literatura.

Complexo	$k_{\text{cat}}(\text{h}^{-1})$	$K_M (\text{M})$	Taxa de Aceleração
$[\text{Cu}(\text{pzdpy})\text{ClO}_4]^+$	$8,89 \times 10^{-1}$	$3,35 \times 10^{-4}$	$2,50 \times 10^7$
$[\text{Cu}(\text{hpzdpy})\text{ClO}_4]^+$	$9,79 \times 10^{-2}$	$1,96 \times 10^{-4}$	$2,70 \times 10^6$
$[\text{Cu}(\text{pmea})\text{Cl}]^+$	$1,47 \times 10^{-1}$	$1,93 \times 10^{-4}$	$4,10 \times 10^6$
$[\text{Cu}(\text{pmap})\text{Cl}]^+$	$3,47 \times 10^{-2}$	$3,51 \times 10^{-5}$	$1,00 \times 10^6$

Hidrólise não catalisada do DNA,  $k = 3,6 \times 10^{-8} \text{ h}^{-1}$  a  $37^\circ \text{ C}$  e  $\text{pH } 7.0$  (SREEDHARA; COWAN, 2001).

Em outro relato Xu e colaboradores (2009), sintetizaram uma série de complexos de  $\text{Co}^{3+}$  que coordenado aos ligantes tetradentados *N*-doadores TPA e 2,2,2-tet (Figura 4.29), apresentaram os valores de  $k_{\text{cat}} = 1,26 \text{ h}^{-1}$  e  $1,83 \times 10^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente, para a clivagem do DNA plasmidial (XU; et al., 2009). Sendo menos ativos que os complexos **1** a **5**.

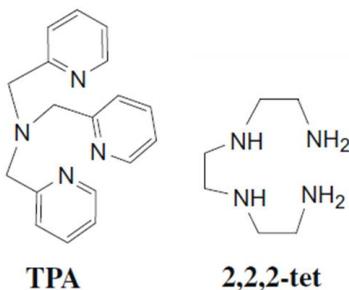


Figura 4.28 Estrutura química dos ligantes TPA e 2,2,2-tet (XU; et al, 2009).

## 4.2 ESTUDOS DE CLIVAGEM DO OLIGONUCLEOTÍDEO ATCG

Para verificar se na clivagem do DNA pelos complexos **1** a **5** ocorre preferência por alguma região específica de pares de base, foi utilizada a sequência de nucleotídeos 49-mer 5'FAM (FAM = 6-fluoresceína), designada como Oligo1, como modelo de substrato de clivagem. Este modelo possui duas regiões com sequências diferentes: uma rica em ligações A-T próxima aos terminais e outra rica em ligações G-C próxima ao "loop". Essas regiões distinguíveis podem auxiliar no reconhecimento de preferências de clivagem pelos complexos em termos de nucleotídeos. A Figura 4.31 (a) mostra a representação da estrutura do Oligo1 e a Figura 4.31 (b) mostra a foto do gel.

Nas condições de clivagem utilizadas nos experimentos de clivagem com o DNA plasmidial, nenhum dos complexos apresentou atividade frente ao Oligo 1. Quando severas condições de reação (24 horas, a 50°C) foram utilizadas, os complexos **2** e **4** apresentaram atividade de clivagem. Esses complexos induziram a fragmentação do Oligo1 em todas as ligações fosfodiésteres entre os nucleotídeos, sem preferência por nenhuma sequência específica. Os complexos clivaram o DNA gerando fragmentos que migraram do mesmo modo que o marcador A+G, o que indica que os produtos de clivagem possuem o mesmo terminal que os gerados no tratamento com piperidina (3'-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) (MAXAM; GILBERT, 1980). Esta evidência é reforçada quando a migração dos produtos de clivagem da DNase (3'-OH)(KOVACIC; et al. 2002) é comparada com a do marcador A+G. É claramente distinguível que os fragmentos com terminal 3'-OH migram mais rápido que aqueles com terminal 3'-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>.

Além disso, não há formação de fragmentos com terminal 3'-fosfoglicolato, que segundo a literatura, é gerado pela oxidação do C'4 da 2-desoxirribose (STUBBE; et al. 1995). Assim, esse experimento reforça o fato de que a clivagem do DNA ocorre por mecanismo hidrolítico.

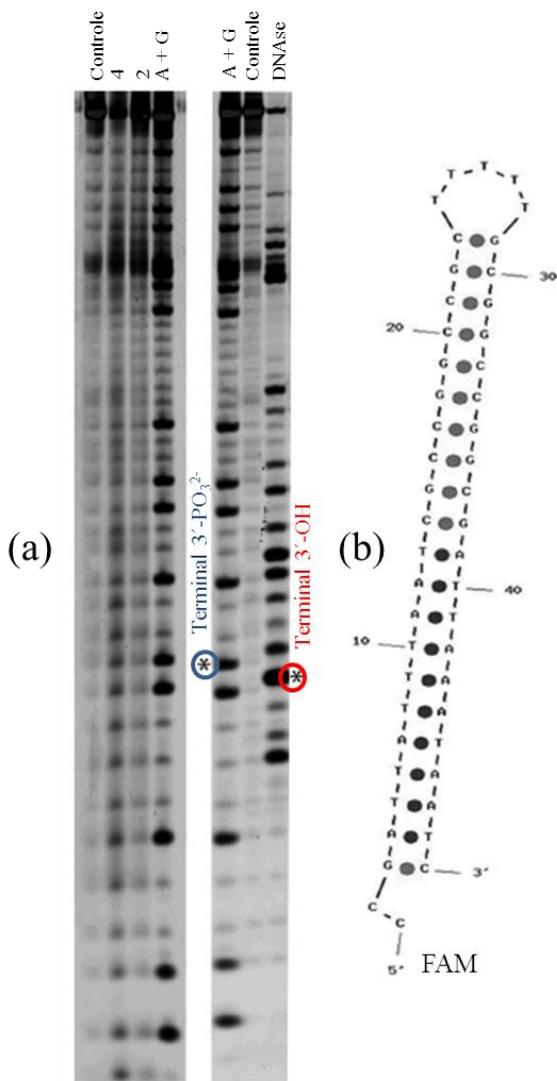


Fig. 4.29 (a) Clivagem do Oligo1 (49-mer) por 2 e 4. A coluna controle representa o oligo sem tratamento, A+G representa o marcador de Adenina + Guanina. DNA se representa o oligo tratado com a DNase. (b) Representação da sequência nucleotídica denominada Oligo1.

Foi proposto o mecanismo para a clivagem hidrolítica do DNA pelos complexos de estrutura  $[\text{Co}(\text{L})\text{Cl}]\text{ClO}_4$ . A primeira etapa envolve a formação das espécies  $[\text{Co}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  que ocorre quando os complexos de estrutura  $[\text{Co}(\text{L})\text{Cl}]^+$  são dissolvidos em solução aquosa. Forma-se então um equilíbrio ácido base entre as espécies aquo =  $[\text{Co}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  e hidróxido =  $[\text{Co}(\text{L})(\text{OH})]^+$ . Com a adição de DNA, o centro metálico de  $\text{Co}(\text{II})$  se liga a um dos átomos de oxigênio expostos na ligação fosfodiéster, assim é formado um intermediário hexacoordenado. O ligante tetradentado impõe que essa ligação ocorra com geometria cis aos grupos  $\text{H}_2\text{O}$  para a espécie aquo e  $\text{OH}^-$  para a espécie hidróxido que posteriormente atacam nucleofílicamente o átomo de fósforo levando a clivagem hidrolítica do DNA (MASSOUD; et al., 2014). O mecanismo está representado na figura 4.32.

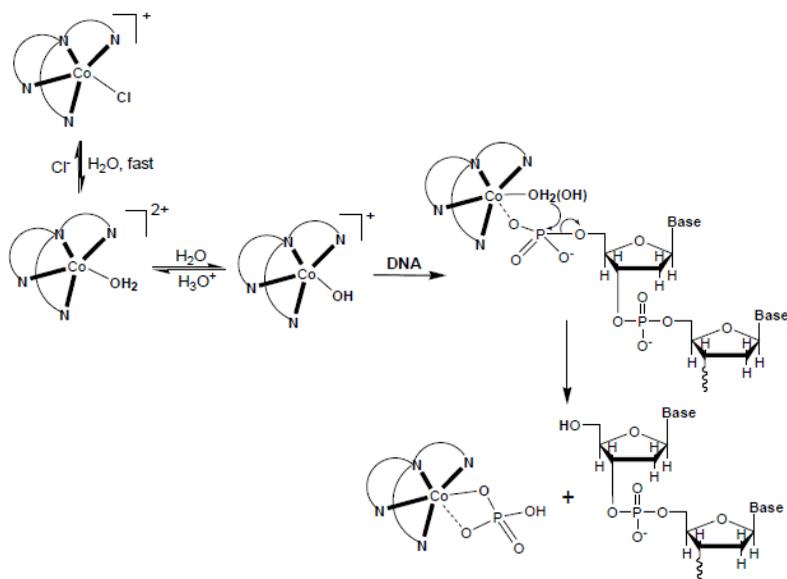


Figura 4.30 Proposta de mecanismo de clivagem hidrolítica dos compostos de estrutura  $[\text{Co}(\text{L})\text{Cl}]^+$  estudados (MASSOUD; et al., 2014).

## 5. CONCLUSÃO

Os complexos **1**, **2**, **3**, **4** e **5** em pH 7,0 a 37°C por 2 horas de reação, demonstraram atividade de clivagem do DNA plasmidial dependente da concentração. Os complexos **2** e **4** nas concentrações mais altas também induziam a formação de forma linear (F III) do substrato de DNA, que significa a promoção de quebras de cadeia dupla na estrutura do DNA. Em pH 7,0, o aumento da concentração do complexo afetou a atividade de diferentes formas. Os complexos **1**, **2**, **3** e **4** tendem a ter um aumento da sua atividade de 50-450  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , enquanto **5** entre 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 150  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Os ensaios realizados com os captore de radicais livres DMSO e KI, mostraram que nenhum deles apresentou capacidade significativa de inibir a clivagem dos complexos de  $\text{Co}^{2+}$ , indicando que não há participação do radical hidroxila ( $\text{OH}^\cdot$ ), nem geração de peróxidos (R-O-O-H) no mecanismo de clivagem. Da mesma forma o experimento com atmosfera de argônio mostrou que não houve diferenças significativas na comparação da clivagem na presença e ausência de oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), com base nesses resultados é sugerido que o mecanismo de clivagem do DNA seja hidrolítico.

Os ensaios realizados após o tratamento do DNA com os ligantes de sulco distamicina e verde de metila, sulco menor e maior respectivamente, mostraram que a ocupação dos sulcos não interferiu de forma significativa no processo de clivagem catalisado pelos complexos **1** a **5**.

Os cinco complexos apresentaram boa atividade catalítica em pH 7,0, os valores de  $k_{\text{cat}}$  variaram de 0,98  $\text{h}^{-1}$  até 6,02  $\text{h}^{-1}$ , os valores de  $K_M$  variaram de  $\sim 30 \mu\text{M}$  a  $\sim 480 \mu\text{M}$ , e houve aumento na ordem de  $10^7$  a  $10^8$ , comparado com a reação do DNA não catalisada. A ordem de atividade dos complexos foi **4** > **2** > **1** > **3** > **5**, em pH 9,0 houve aumento na atividade catalítica, os valores de  $k_{\text{cat}}$  passaram a variar de 1,99  $\text{h}^{-1}$  a 16,8  $\text{h}^{-1}$ , havendo mudança na ordem de reatividade dos complexos que passou a ser **4** > **2** > **5** > **1** > **3**. Os valores da taxa de aceleração passaram a variar de  $5,53 \times 10^7$  até  $4,68 \times 10^8$ , essa dependência do pH pode ser explicada pela desprotonação dos complexos na espécie aquo  $[\text{Co}(\text{L})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$  e aumento da espécie hidroxó  $[\text{Co}(\text{L})\text{OH}]^+$  em pH 9,0. O ligante  $\text{OH}^-$  é um nucleófilo melhor que  $\text{H}_2\text{O}$  e por consequência a espécie hidroxó é mais ativa na clivagem do DNA.

Nos ensaios com gel de alta resolução com oligonucleotídeos foi verificado que os compostos [Co(6-MeTPA)Cl] e [Co(BPQA)Cl] clivam o DNA em todos os nucleotídeos formando fragmentos com terminal 3'-PO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, também não foram encontrados produtos de provenientes de mecanismo oxidativo.

## 6 PERSPECTIVAS

- Estudar a clivagem do DNA por espectrometria de massas utilizando os cinco complexos da estrutura  $[\text{Co}(\text{L})\text{Cl}]\text{ClO}_4$  utilizados neste trabalho;
- Utilizar a técnica de dicroísmo circular para compreender melhor a interação desses complexos com o DNA;
- Determinar as constantes de associação e dissociação dos quatro complexos com o DNA por calorimetria de titulação isotérmica.
- Avaliar se os complexos são capazes de clivar proteínas.



## 7. REFERÊNCIAS

AKERMAN, B.; TUITTE, E. Single- and double-strand photocleavage of DNA by YO, YOYO and TOTO. **Nucleic Acids Research**, v.24, n.6, p.1080-1090, 1995.

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

AUSUBEL, F. M.; ALBRIGHT L. M.; JU, J. **Current protocols in molecular biology**, John Wiley & Sons, Inc., 2001.

BAILLY, C.; CHAIRES, J. B. Sequence-specific DNA minor groove binders. Design and synthesis of netropsin and distamycin analogues. **Bioconjugate Chemistry**, v. 9, p. 513-538, 1998.

BISCHOFF, G.; HOFFMANN, S. DNA-binding of drugs used in medicinal therapies. **Current Medicinal Chemistry**, v.9, p.321-348, 2002.

BLACKBURN, G. M; GAIT, M. J. **Nucleic acids in chemistry and biology**, 2<sup>a</sup> ed.: Oxford, USA, Oxford University Press, 1996.

CREIGHTON, T. E. **Encyclopedia of Molecular Biology**, New York, John Wiley & Sons, Inc., v 1-4, p. 1517, 1999.

COLLINS, M. et al. Metal complexes as anticancer agents: 2. Synthesis, spectroscopy, magnetism, electrochemistry, X-ray crystal structure and antimelanomal activity of the copper (II) complex of 5-amino-1-tolyimidazole-4-carboxylate in B16F10 mouse melanoma cells. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 3, n. 9, p. 453-457, 2000.

DAI, W. M. et al. Bifunctional 2-naphthyl propargylic sulfones high DNA intercalating and alkylating activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 9, p. 2789-2794, 1999.

DE SOUZA, B. et al. Second-Coordination-Sphere Effects Increase the Catalytic Efficiency of an Extended Model for FeIIIMII Purple Acid Phosphatases. **Inorganic Chemistry**, v. 52, n.7, p. 3594-3596, 2013.

DERVAN, P. B. Molecular recognition of DNA by small molecules. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 9, p. 2215-2235, 2001.

ERKKILA, K. E.; ODOM, D. T.; BARTON, J. K. Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA. **Chemical Reviews**, v. 99, p. 2777-279, 1999.

EFTHIMIADOU, E. K. et al. Metal complexes with the quinolone antibacterial agent N-propyl-norfloxacin: Synthesis, structure and bioactivity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 101, n. 3, p. 525-535, 2007.

FANSHAWE, R. L.; BLACKMAN, A. G.; CLARK, C. R. The hydrolysis of 4-nitrophenylphosphate promoted by [(N)4Co(OH/H)(OH/H)]<sup>+2+/3+</sup> species ((N)4 = abap, tren); use of 31P NMR to uncover mechanistic complexity. **Inorganica Chimica Acta**, v. 342, p. 114-124, 2003.

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

FENTON, H. J. H. Oxidation of tartaric acid in presence of iron. **Journal of Chemical Society – Transactions**, v.65, n.65, p.899–911, 1894.

FREIFELDER, D.; TRUMBO, B. Matching of single-strand breaks to form doublestrand breaks in DNA. **Biopolymers**, v. 7, n.5, p. 681-693, 1969.

GALAS, D.; SCHMITZ, A. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity. **Nucleic Acids Research**, v.5, n. 9, p, 3157-3170, 1978.

GUECHEVA, T; HENRIQUES, J. A. P; ERDTMANN, B. Genotoxic effects of copersulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). **Mutation Research**, v. 497: p. 19-27, 2001.

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.-J. Cobalt(III) Polyamine Complexes as Catalysts for the Hydrolysis of Phosphate Esters and of DNA. A Measurable 10 Million-Fold Rate Increase<sup>1</sup>. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, p. 5638-5647, 1997.

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

JIANG, Q. et al. Design of artificial metallonucleases with oxidative mechanism. **Coordination Chemistry Reviews**, v.251, n.15-16, p.1951-1972, 2007.

JIMÉNEZ-GARRIDO, N. et al. Antibacterial studies, DNA oxidative cleavage, and crystal structures of Cu(II) and Co(II) complexes with two quinolone family members, ciprofloxacin and enoxacin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.99, n.3, p.677-689, 2005.

JUN, T.; BOCHU, W.; LIANCAI, Z. Hydrolytic cleavage of DNA by quercetin zinc(II) complex, **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.17, n.5, p.1197-1199, 2007.

KOVACIC, R. T.; et al. Sequence-Selective DNA Cleavage by a Chimeric Metallopeptide. **Journal of American Chemical Society**. v. 125, p. 6656-6662, 2002

KELLER, K. M.; POLLARD, E. C. Action of hydrogen peroxide on degradation of DNA after irradiation in Escherichia coli. **International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics Chemistry and Medicine**, v. 5, p. 407-413, 1977.

KRAMER, 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.

LANZMASTER, M.; et al. A new heterobinuclear Fe<sup>III</sup>Cu<sup>II</sup> complex with a single terminal Fe<sup>III</sup>-O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 10, p. 319-332, 2005.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. 5<sup>a</sup> ed.: New York, W H. Freeman and Company, 2008.

LIU, C. et al. DNA hydrolytic cleavage by the diiron(III) complex Fe<sub>2</sub>(DTPB)(μ-O)(μ-Ac)Cl(BF<sub>4</sub>)<sub>2</sub>: comparison with other binuclear 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.

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

MASSOUD, S. S. Adenosine 5'-triphosphate (ATP) hydrolysis promoted by aqua-amine-cobalt(III) complexes. Patterns of reactivity, **Journal of Inorganic Biochemistry**, v.55, p. 183-191, 1994.

MASSOUD, S. S.; et al. Effect of the chelate ring size on the cleavage activity of DNA by copper(II) complexes containing pyridyl groups. **Inorganica Chimica Acta**, v. 399, p.177-184, 2013.

MASSOUD, S. S.; et al. Efficient hydrolytic cleavage of plasmid DNA by chloro-cobalt(II) complexes based on sterically hindered pyridyl tripod tetraamine ligands: synthesis, crystal structure and DNA cleavage. **Dalton Transactions**, v.43, p.10086-10103, 2014

MAXAM, A; Gilbert, W. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. **Methods Enzymology**, v. 65, p. 499–560 1980.

NETTO, L. E. S.; STADTMAN, E. R. The Iron-Catalyzed Oxidation of Dithiothreitol Is a Biphaseic Process: Hydrogen Peroxide Is Involved in the Initiation of a Free Radical Chain of Reactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 333, n. 1, p. 233-242, 1996.).

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

NICHOLSON, A. W. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 23, n. 3, p. 371-390, 1999.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 39, n. 1, p. 1-18, 1997.

OLIVEIRA, M. C. B. et al. Hydrolytic protein cleavage mediated by unusual mononuclear copper(II) complexes: X-ray structures and solution studies. **Inorganic Chemistry**, v.44, n.4, p.921-929, 2005.

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

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

PARAGINSKI, G. L. Triazenos: Clivagem do DNA, atividade antibacteriana e toxicidade frente à *Artemia Salina* Leach, Universidade Federal de Santa Maria, **Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas**, 2007.

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.

QIU, H.; GILROY, J. B.; MANNERS, I. DNA-induced chirality in water-soluble poly(cobaltoceniummethylene). **Chemical Communications**, v. 49, p. 42-44, 2013.

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.

SAKURAI, H.; TAMURA, H.; OKATANI, K. Mechanism for a new antitumor vanadium complex: hydroxyl radical-dependent DNA cleavage by 1,10 phenanthroline vanadyl complex in the presence of hydrogen peroxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 206, p. 133-137, 1995.

SCARPELLINI, M. L. et al. Phosphate Diester Hidrolisys and DNA Damage Promoted by New *cis*-Aqua/Hydroxy Copper(II) complexes Containing tridentate Imidazole-rich Ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 42, p. 8353-8365, 2003.

STARCEVIC, K. et al. Synthesis, photochemical synthesis, DNA binding and antitumor evaluation of novel cyano- and amidino-substituted derivatives of naphthofurans, naphtho-thiophenes, thieno-benzofurans, benzo-dithiophenes and their acyclic precursors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 41, p. 925-939, 2006.

SHRIVER, D. F.; ATKINS, P. W. Química Inorgânica; trad. Maria Aparecida Gomes - 3ª ed.: Porto-Alegre, Bookman, 2003.

SIGMAN, D. S. et al. Oxygen-dependent cleavage of DNA by the 1,10-Phenanthroline cuprous complex. Inhibition of Escherichia coli DNA polymerase I. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 24, p. 12269-12272, 1979.

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

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.

SREEDHARA, A.; COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 337-47, 2001.

STUBBE, J.; et al. Sequence-Specific Double-Strand Cleavage of DNA by Fe-Bleomycin. 2. Mechanism and Dynamics. **Biochemistry**, v. 34, p. 2076-2086, 1995.

SUMAOKA, J.; AZUMA, Y.; KOMIYAMA, M. Enzymatic manipulation of the fragments obtained by cerium(IV)-induced DNA scission: Characterization of hydrolytic termini. **Chemistry - A European Journal**, v. 4, n. 2, p. 205-209, 1998.

UMA, V. et al. A new dinuclear biphenylene bridged copper(II) complex: DNA cleavage under hydrolytic conditions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1760, n.5, p.814-819, 2004.

VAN DYKE, M. W.; DERVAN, P. B. Footprinting with MPE·Fe(II). Complementary-strand Analyses of Distamycin- and Actinomycin-binding Sites on Heterogeneous DNA. **Cold Spring Harbor Symposia Quantitative Biology**, v.47, p. 347-353, 1983.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.

XU, W.; et al. Hydrolytic cleavage of DNA promoted by cobalt(III)-tetraamine complexes: Synthesis and characterization of carbonatobis[2-(2-pyridylethyl)]-(2-pyridylmethyl) aminecobalt(III) perchlorate. **Polyhedron**, v. 28, p. 1221-1228, 2009.

XU, W.; et al. Effect of the central metal ion on the cleavage of DNA by [M(TPA)Cl]ClO<sub>4</sub> complexes (M = CoII, CuII and ZnII, TPA = tris(2-pyridylmethyl)amine): An efficient artificial nuclease for DNA cleavage. **Inorganica Chimica Acta**, v.373, p. 159-166, 2011.

ZEGLIS, B. M.; PIERRE, V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chemical Communications**, n. 44, p. 4565-4579, 2007.