



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA – UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – CCB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA - MIP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CLAUS TRÖGER PICH

**NUCLEASES SINTÉTICAS: ANÁLISE DA ATIVIDADE DE CLIVAGEM
DE DNA, DE CLIVAGEM DE PROTEÍNA E GENOTÓXICA DE
COMPOSTOS METÁLICOS**

FLORIANÓPOLIS, SC, BRASIL
MARÇO, 2010

CLAUS TRÖGER PICH

**NUCLEASES SINTÉTICAS: ANÁLISE DA ATIVIDADE DE CLIVAGEM
DE DNA, DE CLIVAGEM DE PROTEÍNA E GENOTÓXICA DE
COMPOSTOS METÁLICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal da Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Hernán terenzi

FLORIANÓPOLIS, SC, BRASIL

MARÇO, 2010

CLAUS TRÖGER PICH

**NUCLEASES SINTÉTICAS: ANÁLISE DA ATIVIDADE DE CLIVAGEM
DE DNA, DE CLIVAGEM DE PROTEÍNA E GENOTÓXICA DE
COMPOSTOS METÁLICOS**

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

Aprovado pela Banca Examinadora em março de 2010.

Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard – Coordenador do Programa

Prof. Dr. Hernán Terenzi – Orientador – UFSC

Prof. Dr. Ademir Neves – UFSC

Prof^a. Dra. Marciela Scarpellini – UFRJ

Prof. Dr. Rogério Correa – UNISUL

Prof^a. Dra. Maria Risoleta Freire Marques – UFSC

Prof. Dr. Adailton Bortoluzzi – UFSC

FLORIANÓPOLIS, SC, BRASIL

MARÇO, 2010

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Anne Lore Martha Tröger e Helmuth Carlos Pich (in memoriam), por todo apoio que sempre me proporcionaram para estudar e prosseguir no desenvolvimento de meus conhecimentos. Por não terem desistido mesmo que eventualmente pudesse parecer que eu não tinha jeito e por me fazerem saber que eu sempre poderia contar com eles.

A minha companheira, Luciane Dal Pont, a quem eu conheci no começo desta caminhada, e me aceitou em sua vida mesmo que eu não tivesse disponível todo o tempo que gostaria para dedicar a ela nestes quatro anos de noites e dias de viagens entre Florianópolis e Criciúma.

Ao meu orientador, Professor Doutor Hernán Terenzi, que me aceitou em seu laboratório mesmo que eu não pudesse dedicar-me exclusivamente aos trabalhos necessários para a confecção desta tese. Sua confiança e o respeito pela sua pessoa foram um dos principais fatores que me levaram ao término desta jornada.

Aos professores e estudantes de química que tão prontamente forneceram os compostos utilizados na realização desta tese bem como pelas suas sugestões e troca de idéias na interpretação dos resultados.

Aos colegas de laboratório, Patrícia, Franciele, Gustavo Claudio, Gisele, Jean, Tiago que sempre se mostraram prestativos e auxiliaram quando possível muitas vezes compensando a minha pouca disponibilidade de tempo.

Aos estagiários e bolsistas dos laboratórios da UNESC participantes do Grupo de Pesquisa em Genética e Toxicologia, Fernanda, Tamiris, Luceli, Tiago, Jean, Wiliam, Geovana que participaram das análises de genotoxicidade e inibição de crescimento bacteriano além de proporcionar suporte para que eu pudesse me dedicar a esta tese.

Aos meus amigos de Criciúma e Florianópolis que compartilharam carros e moradias e desta maneira tornaram possível, mesmo que entrando em suas vidas, eu pudesse manter a freqüência de experimentos nos laboratórios.

A todos que de alguma maneira participaram de modo positivo na minha vida nestes quatro anos, pois estes momentos de amizade e companheirismo são essenciais para que tudo o esforço valha a pena.

RESUMO

Quatro séries de compostos metálicos foram analisadas com o objetivo de avaliar sua atividade de clivagem de DNA, de clivagem de proteína e biológica. Foram determinadas suas concentrações efetivas, pHs ótimos, formas de atuação, cinética de reação, especificidade de sítio de ação, capacidade de interação por estudos espectrofotométricos e atividade tóxica e genotóxica em modelos diversos. Os compostos binucleares de cobre [Cu₂(μ-OH)L₂], miméticos de catecol-oxidases, demonstraram atividades de clivagem de DNA e de clivagem de proteína variadas dependentes da estrutura de seus ligantes. Estudos espectrofotométricos revelaram sua interação com DNA e proteína BSA além de citotoxicidade e genotoxicidade em todos os sistemas testados. Os compostos mono e binucleares de Ferro - Fe(HPCINOL) apresentaram atividade de clivagem de DNA e de clivagem de proteína bastante intensa estando entre os mais ativos compostos já descritos. Estudos espectrofotométricos revelaram sua interação com DNA e proteína BSA, mas também sua instabilidade em solução. Estudos de genotoxicidade e toxicidade demonstraram ambas as atividades para estes compostos. Os compostos binucleares de FeZnR (7, 8, 9 e 10) tiveram seus prováveis modos de ação e cinética de reação determinados bem como suas atividades sobre células bacterianas podendo em termos de eficiência serem classificados na seguinte ordem: 10 > 9 > 8 > 7. O composto 11, o qual não foi testado em presença de luz, demonstrou atividade de clivagem de DNA de grande eficiência de forma hidrolítica, mas ausência de atividade de clivagem de proteína e atividade antibacteriana não significativa. Os compostos 12, 13 e 14, tiveram sua atividade testada em presença e ausência de luz e diferenças significativas foram encontradas. A presença de luz levou a uma maior atividade de clivagem de DNA e ao desenvolvimento de atividade de clivagem de proteína de todos os compostos. Estes, por não sofrerem inibição de atividade por DMSO, agem provavelmente de maneira oxidativa livre da formação de radicais OH[•].

Palavras-chave: Compostos Metálicos, Clivagem de DNA, Clivagem de Proteína, Enzimas Sintéticas

ABSTRACT

Four series of metallic complexes were analysed with the purpose of evaluating their DNA cleavage, protease cleavage and biological activity. It was determined their effective concentrations, optimal pHs, mode of acting, kinetic reactions, specificity of interaction sites, spectrophotometric studies of interaction capacity, toxic and genotoxic studies in several models. The copper binuclear complexes $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})\text{L}_2]$ that are mimetic of catechol-oxidases, show DNA cleavage activity depending on the structure of their ligands. Spectrophotometric studies revealed their interaction with DNA and BSA protein besides having cytotoxic and genotoxic activities in all models tested. The mono and binuclear complexes show strong DNA cleavage activities being among the most active complexes already described. Spectrophotometric studies revealed their interaction with DNA and BSA protein but also their instability in solution. Toxicity and genotoxicity studies show both activities for these complexes. The binuclear heterovalent complexes Fe(III)Zn(II)R (FeZnMe , FeZnH , FeZnBr and FeZnNO_2) had their probable mode of action and reaction kinetic values determined. In addition their antimicrobial activities are described and its possible describe their efficiency in the following order $\text{FeZnNO}_2 > \text{FeZnBr} > \text{FeZnNH} > \text{FeZnMe}$. The $[\text{Fe}(\text{dpq-dTzol})_2](\text{OH}_2)_2^{+2}$ complex which was not tested in the presence of light, show great efficiency of nuclease activity. The $[\text{Fe}(\text{dpq})_3]^{+2}$, $[\text{Fe}(\text{dppz})_3]^{+2}$ e $[\text{Fe}(\text{dpqQX})_3]^{+2}$ complexes in the presence and lack of visible light and significant differences were found. The presence of light led to a higher DNA cleavage activity and the development of protein cleavage activity of all complexes. These ones, that had not their activity inhibited by DMSO, act probably in an oxidative mode free of OH^\cdot radical formation.

Keywords: Metallic Compounds, DNA Cleavage, Protein Cleavage, Synthetic Enzymes

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** A: Estrutura geral dos desoxiribonucleotídeos e B: Bases nitrogenadas que compõem os nucleotídeos tanto no DNA como no RNA.....22
- FIGURA 2:** Estrutura do esqueleto covalente dos ácidos nucleicos é constituído por grupos fosfato e anéis de ribose de forma alternada23
- FIGURA 3:** Estrutura esquemática da dupla hélice do DNA na forma B. Estão demonstrados os pares de bases constituintes e o número de ligações de hidrogênio. Também estão indicadas as cavidades maior e menor da estrutura.....25
- FIGURA 4:** Os grupos funcionais sobre as bases são mostradas nas cavidades maior e menor do DNA. Os grupos assinalados em vermelho são aqueles que podem ser usados para o reconhecimento pelas proteínas na cavidade maior, de um modo base-específico25
- FIGURA 5:** Representações das estruturas tridimensionais das enzimas: exonuclease 1 (A) e endonuclease EcoRI (B) de *Escherichia coli* associadas a dupla fita de DNA.....27
- FIGURA 6:** Mecanismo hidrolítico de endonucleases.....28
- FIGURA 7:** A. Geometria de compostos caracterizados como ligantes de cavidade (Groove Binder), metalintercaladores (metallointercalator) e metalinserssores (metalloinsertor) respectivamente. B. Três formas de ligação de compostos com DNA: ligação na cavidade, intercalação e inserção respectivamente31
- FIGURA 8:** Prodigiosina e seus derivados que quando complexados ao Cu(II) formam compostos com atividade de clivagem de DNA e também compostos inativos. Alterações na estrutura do ligante perturbam o ambiente do centro metálico.....34
- FIGURA 9:** Estrutura dos compostos Cu(dppt)Cl₂ e Cu(pta)Cl₂ que apresentam atividades de ligação e quebra de DNA distintas, sendo o segundo o mais ativo devido a planaridade de sua estrutura35
- FIGURA 10:** Atividade de clivagem de DNA das formas cis e trans de compostos de Ni demonstrando a influência da configuração geométrica na habilidade dos mesmos em cortar o DNA.....36

- FIGURA 11:** Estrutura básica dos aminoácidos apresentando seus dois isômeros D) que são imagens especulares. R indica a cadeia lateral.....
- FIGURA 12:** Formação de uma ligação peptídica.....
- FIGURA 13:** Representação das estruturas de alfa-hélice (A) e folha-beta (B) nas formas de fita e bolas e hastes respectivamente. As pontes de hidrogênio estão representadas por linhas pontilhadas azuis entre os grupamentos CO e NH. Nas folhas-beta estão representadas fitas paralelas e antiparalelas.....39
- FIGURA 14:** Estrutura terciária da proteína mioglobina caracterizada por uma série de alfa-hélices e voltas, grupo Heme e átomo de ferro. O modelo de bolas e hastes é demonstrada na figura 14 A e o modelo de fitas e linhas na figura B40
- FIGURA 15:** Estrutura da molécula de hemoglobina representando o quarto nível estrutural das proteínas através da presença de duas subunidades alfa (vermelho) e duas subunidades beta (amarelo). Os grupamentos heme estão demonstrados em preto com os átomos de ferro em violeta41
- FIGURA 16:** ORTEP do composto binucleares de $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})\text{L}_2]$ 1 (A) 2 (B) e 3 (C).....48
- FIGURA 17:** ORTEP dos compostos $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})(\text{SO}_4)]_2\text{-}\mu\text{-oxo.6H}_2\text{O}$ ou composto 4 (A), $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})\text{Cl}_2]\cdot\text{NO}_3$ ou composto 5 (B) e $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})(\text{Cl})]_2\text{-}\mu\text{-oxo.6H}_2\text{O}$ ou composto 6 (c).....49
- FIGURA 18:** Ortep do composto FeZnH (A) e representação esquemática dos compostos binucleares de Ferro(III) e Zinco(II) biomiméticos de fosfatases ácidas púrpuras (B) onde R é OH, CH₃, BR ou NO₂.....50
- FIGURA 19:** Representação esquemática do composto 11 ($[\text{Fe}(\text{dpq-dtZol})_2(\text{OH}_2)_2]^{+2}$) nas formas CIC e trans respectivamente. Fonte: Miranda (2008).....51
- FIGURA 20:** Representação esquemática dos compostos 12 ($[\text{Fe}(\text{dpq})_3]^{+2}$ - A), 13 ($[\text{Fe}(\text{dpqQX})_3]^{+2}$ - B) e 14 ($[\text{Fe}(\text{dppz})_3]^{+2}$ - C).....51
- FIGURA 21:** Esquema de Corte da Molécula de DNA Plasmidial.....52
- FIGURA 22:** Fotografia de um gel de agarose demonstrando a separação das formas do DNA plasmidial.....52
- FIGURA 23:** Aparência típica de um gel obtido a partir de análise de concentrações variadas de compostos e conseqüente corte de DNA plasmidial.....53
- FIGURA 24:** Esquema representativo do método da extração do DNA.....55

- FIGURA 25:** Estrutura Química da distamicina (A). B: Ligação específica da distamicina (vermelho) ao sulco menor do DNA
- FIGURA 26:** Descrição simplificada do teste cometa: 1 – Preparação das amostras de controle positivo, controle negativo, e amostras teste. 2 – As amostras são inseridas em gel de agarose. 3 – As células são lisadas numa solução com altas concentrações de sais e detergente. 4 – As lâminas são submetidas a eletroforese. 5 – As células são coloridas com substâncias redutoras (nitrito de prata) 6 – Leitura analisando o tamanho e intensidade da cauda do cometa64
- FIGURA 27:** Classificação dos danos no DNA. (onde a classe de dano índice 0 (zero) não apresenta fragmentação do DNA, e nas classes subsequentes aparecem quantidades crescente de fragmentos, aumentando juntamente com sua classificação até dano índice 4)66
- FIGURA 28:** Análise de atividade de clivagem de DNA observada pela proporção de DNA plasmidial quebrado pelos compostos 1, 2 e 3 em diferentes pHs. A concentração utilizada para confecção desta figura foi de 5 μ M. Também pode ser observada a maior atividade do composto 2 quando comparado aos outros70
- FIGURA 29:** Análise de atividade de clivagem de DNA observada pela proporção de DNA plasmidial quebrado pelos compostos 1 (A), 2(B) e 3 (C) em diferentes concentrações (0 a 40 μ M)70
- FIGURA 30:** Incubação dos compostos 1 (A), 2 (B) e 3 (C) em presença e ausência de distamicina71
- FIGURA 31:** Análise da atividade de clivagem de DNA dos compostos 1 e 2 incubados na presença de DMSO que atua como sequestrador de radicais hidroxila. Ambos compostos não demonstraram redução significativa de atividade indicando provável atividade hidrolítica ou oxidativa livre de radicais hidroxila72
- FIGURA 32:** Incubação dos compostos em presença e ausência de oxigênio atmosférico caracterizando a atividade hidrolítica do composto 1 (A) e a atividade mista do composto 2(B) sobre a molécula de DNA.....73
- FIGURA 33:** Análise da cinética pseudo-michaeliana dos compostos 1 (A) 2(B) e 3 (C).....73
- FIGURA 34:** Interação do DNA de timo de vitelo com os compostos 1 (A) 2(B) e 3 (C) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível.....75
- FIGURA 35:** Análise da atividade de clivagem de proteína dos compostos 1 (A), 2(B) e 3 (C) incubados 6 horas a 50 °C com proteína BSA em concentrações crescentes.

As setas indicam bandas provenientes da fragmentação gerada pela atividade compostos

- FIGURA 36:** Interação dos compostos 1 (A) 2(B) 3 (C) com proteína albumina de soro bovino observada por espectrofotometria sem período de incubação77
- FIGURA 37:** Interação dos compostos 1 (A) 2(B) 3 (C) com proteína albumina de soro bovino observada por espectrofotometria com período de incubação78
- FIGURA 38:** Interação dos compostos 1 (A) 2(B) 3 (C) com proteína albumina de soro bovino observada por dicroísmo circular. As reações foram realizadas com concentração de 10 μ M de BSA e 0 a 80 μ M dos compostos.....78
- FIGURA 39:** Atividade genotóxica observada como índice de dano e freqüência de dano ao DNA do composto $Cu_2(\mu-OH)_1$ em sangue humano total (A e B) e leucócitos isolados (C e D).....80
- FIGURA 40:** Atividade genotóxica observada como índice de dano e freqüência de dano ao DNA do composto $Cu_2(\mu-OH)_2$ em sangue humano total (A e B) e leucócitos isolados (C e D).....81
- FIGURA 41:** Cinética de dano e reparação de DNA causados pelos compostos 1 e 2 em células de sangue periférico de camundongos analisada através do índice e freqüência de dano ao DNA82
- FIGURA 42:** Atividade antibacteriana dos compostos 1, 2 e 3 (A, B e C) frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphilococcus aureus* em meio líquido. A inibição do crescimento é expressa como inibição porcentual de densidade óptica (OD_{600})83
- FIGURA 43:** Análise de atividade de clivagem de DNA observada pela proporção de DNA plasmidial clivado pelos compostos $Fe(HPCINOL)_1$, $Fe(HPCINOL)_2$ e $Fe(HPCINOL)_3$ em diferentes pHs. A concentração utilizada foi de 10 μ M.....84
- FIGURA 44:** Análise de atividade de clivagem de DNA observada pela proporção de DNA plasmidial clivado pelos compostos $Fe(HPCINOL)_1$ (A), $Fe(HPCINOL)_2$ (B) e $Fe(HPCINOL)_3$ (C) em diferentes concentrações (0 a 100 μ M para $Fe(HPCINOL)_1$ e 0 a 80 μ M para $Fe(HPCINOL)_2$ e 3)84
- FIGURA 45:** Incubação dos compostos $Fe(HPCINOL)_1$ (A), $Fe(HPCINOL)_2$ (B) e $Fe(HPCINOL)_3$ (C) em presença e ausência de distamicina indicando a preferência dos complexos pela interação com a molécula de DNA através da cavidade menor desta.....85
- FIGURA 46:** Análise da atividade de clivagem de DNA dos compostos $Fe(HPCINOL)_1$ (A), 2 (B) e 3 (C) incubados na presença de DMSO . Os compostos

não demonstraram redução significativa de atividade indicando provável atividade hidrolítica ou oxidativa livre de radicais hidroxila.....

FIGURA 47: Incubação dos compostos em presença e ausência de oxigênio atmosférico caracterizando a atividade hidrolítica do composto Fe(HPCINOL)1 (A) e a atividade mista dos compostos Fe(HPCINOL)2 (B) e 3 (C) sobre a molécula de DNA.....86

FIGURA 48: Análise da cinética pseudo-michaeliana dos compostos Fe(HPCINOL)1 (A) Fe(HPCINOL)2 (B) e Fe(HPCINOL)3 (C)87

FIGURA 49: Interação do DNA de timo de vitelo com os compostos Fe(HPCINOL)1 (A) Fe(HPCINOL)2 (B) e Fe(HPCINOL)3 (C) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível após incubação de 12 horas a 50°C89

FIGURA 50: Análise da atividade de clivagem de proteína dos compostos Fe(HPCINOL)1 (A), Fe(HPCINOL)2 (B) e Fe(HPCINOL)3 (C) incubados em concentrações de 0,25 , 50 e 100µM por 6 horas a 50°C com proteína BSA na concentração de 10µM. As setas indicam bandas provenientes da fragmentação gerada pela atividade dos compostos89

FIGURA 51: Interação dos compostos Fe(HPCINOL)1 (A) Fe(HPCINOL)2 (B) Fe(HPCINOL)3 (C) com proteína albumina de soro bovino observada por espectrofotometria sem período de incubação.....90

FIGURA 52: Interação dos compostos Fe(HPCINOL)1 (A) Fe(HPCINOL)2 (B) Fe(HPCINOL)3 (C) com proteína albumina de soro bovino em concentrações variadas observada por espectrofotometria após com período de incubação de 6 horas a 50°C91

FIGURA 53: Estabilidade dos compostos Fe(HPCINOL)1 (A) Fe(HPCINOL)2 (B) Fe(HPCINOL)3 (C) incubados em tampão HEPES pH 8,0 a 50°C durante 0, 6 e 12 horas....91

FIGURA 54: Interação dos compostos Fe(HPCINOL)1 (A) Fe(HPCINOL)2 (B) e Fe(HPCINOL)3 (C) com proteína albumina de soro bovino observada por dicroísmo circular. As incubações foram realizadas com concentração de 10 µM de BSA e 0 a 80µM dos compostos92

FIGURA 55: Atividade genotóxica do composto Fe(HPCINOL)1 em sangue humano total e leucócitos isolados.....93

FIGURA 56: Atividade genotóxica do composto Fe(HPCINOL)2 em sangue humano total e leucócitos isolados.....94

- FIGURA 57:** Atividade genotóxica do composto Fe(HPCINOL)₃ em sangue hurr total e leucócitos isolados.....
- FIGURA 58:** Atividade antibacteriana dos compostos 1, 2 e 3 (A, B e C) frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphilococcus aureus* em meio líquido. A inibição do crescimento é expressa como inibição porcentual de densidade óptica (OD₆₀₀)96
- FIGURA 59:** Incubação dos compostos FeZnMe (A), FeZnH (B), FeZnBr (C) e FeZnNO₂ (D) em presença e ausência de distamicina. Foi observada inibição nos compostos FeZnMe e FeZnNO₂.....97
- FIGURA 60:** Análise da atividade de clivagem de DNA dos compostos FeZnMe, H, Br e NO₂ (A, B, C e D) incubados na presença de DMSO que atua como seqüestrador de radicais hidroxila. Somente o composto FeZnBr demonstrou redução perceptível de atividade indicando possível atividade oxidativa vinculada a radicais hidroxila.....98
- FIGURA 61:** Análise da atividade de clivagem de DNA dos compostos FeZnMe, H, Br e NO₂ (A, B, C e D) incubados na presença e ausência de oxigênio. Nenhuma conclusão objetiva foi obtida devido à impossibilidade de serem obtidas condições ótimas de incubação99
- FIGURA 62: Análise da cinética pseudo-michaeliana dos compostos FeZnH-CH₃, OH, Br e NO₂ (A, B, C e D) nas concentrações indicadas 100
- FIGURA 63:** Atividade antibacteriana dos compostos FeZnMe, H, Br e NO₂ (A, B, C e D) frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphilococcus aureus* em meio líquido. A inibição do crescimento é expressa como inibição porcentual de densidade óptica (OD₆₀₀). 101
- FIGURA 64:** Análise de atividade de clivagem de DNA observada pela proporção de DNA plasmidial quebrado pelo composto 11 em diferentes pHs. A concentração utilizada para confecção desta figura foi de 10⁻⁶M. Também pode ser observada a maior atividade do composto em tampão HEPES e em pHs mais ácidos 102
- FIGURA 65:** Análise de atividade de clivagem de DNA observada pela proporção de DNA plasmidial cortado pelo composto 11 em diferentes concentrações (0 a 80⁻⁶M). O composto apresenta atividade dependente de concentração e de pH sendo esta maior em maiores concentrações e pHs mais ácidos 105
- FIGURA 66:** Atividade de clivagem de DNA do ligante dpq-dTzol sobre DNA plasmidial. Os resultados indicam ausência de atividade e uma provável interação da substância com a dupla fita em concentrações crescentes do ligante 104

- FIGURA 67:** Incubação dos compostos 11 em presença e ausência de distamicina.....
- FIGURA 68:** Incubação dos compostos em presença e ausência de oxigênio atmosférico caracterizando a atividade hidrolítica do composto 11 sobre a molécula de DNA..... 106
- FIGURA 69:** Análise da cinética pseudo-michaeliana do composto 11 107
- FIGURA 70:** Análise da atividade de clivagem de proteína do composto 11 incubados 6 horas a 50°C com proteína BSA em concentrações crescentes. Não foi encontrada nas concentrações testadas atividade de clivagem de proteína detectável..... 108
- FIGURA 71:** Atividade antibacteriana do composto 11 frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphilococcus aureus* em meio líquido. A inibição do crescimento é expressa como inibição porcentual de densidade óptica (OD₆₀₀) 109
- FIGURA 72:** Análise de atividade de clivagem de DNA observada pelo aumento de DNA plasmidial quebrado pelos compostos 12, 13 e 14 em diferentes concentrações em presença e ausência de luz visível. Pode ser observada a maior atividade em presença de luz visível e dos compostos 13 e 14 em relação ao composto 12 110
- FIGURA 73:** Resultados da incubação dos compostos 12, 13 e 14 em presença de DMSO e distamicina. Pode ser observada a ausência de qualquer efeito inibitório na atividade de clivagem de DNA pelo DMSO para todos os compostos e inibição por distamicina somente para o composto 12 111
- FIGURA 74:** Análise da atividade de clivagem de proteína dos compostos 12 (A), 13 (B) e 14 (C) incubados 2 horas a 37°C com proteína BSA em concentrações crescentes. Somente foi encontrada atividade nas incubações realizadas na presença de luz 112
- FIGURA 75:** Atividade antibacteriana dos compostos [Fe(dpq)₃]⁺² (A), [Fe(dppz)₃]⁺² (B) e [Fe(dpqQX)₃]⁺² (C) frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphilococcus aureus* em meio líquido. A inibição do crescimento é expressa como inibição porcentual de densidade óptica (OD₆₀₀) demonstrando que os compostos tem maior atividade frente a bactéria *S. aureus* quando comparada com *E. coli*. 113

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Análise da cinética de reação de corte da DNA plasmidial pelos compostos $\text{Cu}_2(\square\text{-OH})$	74
TABELA 2: Razão entre cortes simples e duplos e razões de número de cortes por mol calculadas para os três compostos $\text{Cu}_2(\square\text{-OH})$	74
TABELA 3: Análise da cinética de reação de corte da DNA plasmidial pelos compostos $\text{Fe}(\text{HPCINOL})$	87
TABELA 4: Razão entre cortes simples e duplos razões de número de cortes por mol calculadas para os três compostos $\text{Fe}(\text{HPCINOL})$	88
TABELA 5: Análise da cinética de reação de corte da DNA plasmidial pelos compostos FeZnMe , H, Br e NO_2	100
TABELA 6: Análise da cinética de reação de corte da DNA plasmidial pelo composto 11.....	107
TABELA 7: Razão entre cortes simples e duplos razões de número de cortes por μmol calculadas para os três compostos 12, 13 e 14.....	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-BDNPP	bis(2,4-dinitrofenil)fosfato
CH₃CN	Acetonitrila
CT-DNA	DNA de timo de Vitelo (bezerro) " <i>Calf Thymus DNA</i> "
DMSO	dimetil sulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
F I	forma superenovelada do plasmídeo
F II	forma circular aberta do plasmídeo
F III	forma linear do plasmídeo
HEPES	N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-ácido etanosulfônico
kDa	Quilo Daltons
kpb	Quilobase – 1 Kpd corresponde a 1000 pares de base
M²⁺	Metal divalente
M³⁺	Metal trivalente
mM	Milimolar
ml	mililitro
μl	microlitro
μM	micromolar
μg	micrograma
ng	nanograma
pBSK II	Plasmídeo Bluescript SK II
PAP	Fosfatase Ácida Púrpura
pb	pares de bases de DNA
PIPES	Piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etano sulfônico)
RNA	ácido ribonucléico
TBE	tampão Tris/borato/EDTA
TRIS	tris(hidroximetil) aminometano
UV-Vis	ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	24
1.1 ESTRUTURA DO DNA.....	25
1.1.1 Plasmídeos.....	30
1.2 NUCLEASES.....	30
1.2.1 Nucleases de Origem Biológica.....	31
1.2.2 Nucleases Sintéticas ou Compostos Metálicos com Atividade de Clivagem de DNA.....	33
1.2.3 Fatores que Afetam a Atividade de Clivagem de DNA dos Compostos Metálicos.....	36
1.2.3.1 Natureza dos Íons Metálicos.....	37
1.2.3.1.1 Centros Metálicos.....	37
1.2.3.1.2 Potencial Redox dos Íons Metálicos.....	37
1.2.3.2 Ligantes.....	37
1.2.3.2.1 Necessidades Estruturais.....	37
1.2.3.2.2 Cargas dos Ligantes.....	38
1.2.3.2.3 Estrutura Planar.....	38
1.2.3.2.4 Configuração Geométrica.....	39
1.2.3.2.5 Fatores Estéreos.....	40
1.2.3.3 Co-fatores e Condições de Reação.....	40
1.2.3.3.1 Co-fatores.....	40
1.2.3.3.2 Valores de pH e Força Iônica.....	41
1.3 PROTEÍNAS.....	41
1.4 PROTEASES.....	45
1.4.1 Compostos Metálicos com Atividades de Clivagem de Proteínas.....	47
1.4.1.1 Compostos Metálicos que Necessitam de Co-fatores Oxiredutores Para Clivagem de Peptídeos.....	47
1.4.1.2 Compostos Metálicos que Não Necessitam de Co-fatores Oxiredutores Para Clivagem de Peptídeos.....	48
1.5 ATIVIDADE DE COMPOSTOS METÁLICOS SOBRE SISTEMAS VIVOS: GENOTOXICIDADE.....	48

1.5.1 Agentes Genotóxicos.....	
1.5.2 Dano Genético e Mutação.....	49
1.5.3 Testes Genotoxicológicos e Mutagênicos	50
2 OBJETIVOS.....	51
2.1 OBJETIVO GERAL.....	51
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
3.1 COMPOSTOS.....	52
3.1.1 Compostos Binucleares de Cobre [CU ₂ (μ-OH)L ₂].....	52
3.1.2 Compostos Mono e Binucleares de Ferro.....	52
3.1.3 COMPOSTOS BINUCLEARES DE FERRO(III)ZINCO(II)	53
3.1.4 Compostos Mononucleares de FE(II) Derivados de Fenantrolina.....	54
3.2 INTERAÇÃO COM DNA “ <i>IN VITRO</i> ”: ATIVIDADE DE CLIVAGEM DE DNA. .55	
3.2.1 DNA Plasmidial.....	57
3.2.1.1 Preparação de Células Competentes.	57
3.2.1.2 Transformação de Células Bacterianas Competentes.....	58
3.2.1.3 Extração de DNA Plasmidial a Partir de Células Competentes.....	58
3.2.1.4 Análise de Pureza, Grau de Degradação e Quantificação do DNA Plasmidial.....	59
3.2.2 Verificação da Atividade de Clivagem de DNA Dependente de Ph e Concentração	59
3.2.3 Interação do Composto com Moléculas de DNA na Presença de Distamicina	60
3.2.4 Interação dos Compostos com Moléculas de DNA na Presença de DMSO	61
3.2.5 Interação do Composto com Moléculas de DNA na Ausência de Oxigênio	61
3.2.6 Cinética de Interação dos Compostos com DNA com Saturação de Agente Catalítico (Cinética Pseudo-Michaeliana).....	62
3.2.7 Cálculo da Especificidade de Sítio de Corte de DNA.....	63
3.3 ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS COM PROTEÍNAS	64
3.3.1 Teste de Clivagem de Proteína Albumina de Soro Bovino (BSA).....	64

3.3.2 Titulação Espectrofotométrica da Interação Composto/DNA de T Vitelo (CT-DNA) e Composto/Proteína (BSA).....	
3.3.2.1 Titulação Espectrofotométrica da Interação Composto/DNA de T Vitelo.....	64
3.3.2.2 Titulação Espectrofotométrica da Interação Composto – Proteína (BSA)	65
3.4 ANÁLISE DA INTERAÇÃO COMPOSTO/PROTEÍNA (BSA) POR DICROÍSMO CIRCULAR.....	65
3.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	66
3.6 TESTES DE INTERAÇÃO COM DNA <i>IN VIVO</i>: GENOTOXICIDADE	66
3.6.1 Testes de Genotoxicidade e Cinética de Interação em Camundongos: Teste Cometa.....	66
3.6.1.1 Formação dos Grupos Amostrais e Tratamentos	67
3.6.1.2 Realização do Teste Cometa	68
3.6.2 Testes de Genotoxicidade em Sangue Periférico Total e Linfócitos Humanos: Teste Cometa	70
3.6.2.1 Obtenção das Amostras	70
3.6.2.2 Obtenção dos Leucócitos Totais	71
3.6.2.2.1 Teste Cometa com Sangue Total	71
3.6.2.2.2 Teste Cometa com Leucócitos Totais	72
4 RESULTADOS.....	73
4.1 COMPOSTOS BINUCLEARES DE COBRE 1, 2 E 3.	73
4.1.1 Atividade de Clivagem de DNA dos Compostos 1, 2 e 3 Dependente de Ph e Concentração.	73
4.1.2 Atividade de Clivagem de DNA dos Compostos 1, 2 e 3 em Presença de Distamicina	75
4.1.3 Atividade dos Compostos 1 e 2 em Presença de DMSO	75
4.1.4 Atividade dos Compostos 1 e 2 em Presença e Ausência de Oxigênio Atmosférico	76
4.1.5 Análise da Cinética da Reação de Corte da Molécula de DNA pelos Compostos 1, 2 e 3.....	77
4.1.6 Cálculo da Especificidade de Sítio de Corte de DNA dos Compostos 1, 2 e 3.	78

4.1.7 Interação dos Compostos 1, 2 e 3 com DNA de Timo de Vitelo Observada por Espectrofotometria.....	78
4.1.8 Atividade de Clivagem de Proteína dos Compostos 1, 2 e 3.....	
4.1.9 Interação dos Compostos 1, 2 e 3 com Proteína BSA Observada Espectrofotometria	
4.1.10 Interação Dos Compostos $CU_2(\mu-OH)$ com Proteína Albumina de Soro Bovino Observada por Dicroísmo Circular.....	82
4.1.1.11 Atividade Genotóxica dos Compostos 1, 2 e 3.....	83
4.1.1.12 Atividade Antibacteriana dos Compostos 1, 2 e 3 em Meio Líquido. ..	84
4.1.1.13 Cinética e reparação de dano ao DNA causado pelos compostos 1 em sangue periférico de camundongos.....	85
4.1.12 Atividade antibacteriana dos compostos 1, 2 e 3 em meio líquido.....	86
4.2 Compostos Mono e Binucleares de Ferro - Fe(HPCLNOL).....	87
4.2.1 Atividade de Clivagem de DNA dos Compostos 3, 4 e 5 Dependente de Ph e Concentração	87
4.2.2 Atividade de Clivagem de DNA dos Compostos 4, 5 e 6 em Presença e Distamicina.	89
4.2.3 Atividade dos Compostos 4, 5 e 6 em Presença de DMSO	89
4.2.4 Atividade dos Compostos 4, 5 E 6 em Presença e Ausência de Oxigênio Atmosférico	90
4.2.5 Análise da Cinética da Reação de Corte da Molécula de DNA pelos Compostos 4, 5 e 6.....	91
4.2.6 CÁLCULO DA ESPECIFICIDADE DE SÍTIO DE CORTE DE DNA DOS COMPOSTOS 4, 5 E 6.....	92
4.2.7 Interação dos Compostos Fe(HPCLNOL) com DNA de Timo de Vitelo Observada por Espectrofotometria	92
4.2.8 Atividade de Clivagem de Proteína dos Compostos 4, 5 e 6.....	93
4.2.9 Interação dos Compostos 4, 5 e 6 com Proteína BSA Observada por Espectrofotometria	94
4.2.9.1 Interação dos compostos 4, 5 e 6 com proteína BSA observada por espectrofotometria sem período de incubação.....	94
4.2.9.2 Interação dos compostos 4, 5 e 6 com proteína BSA observada por espectrofotometria após período de incubação.....	95

4.2.1.0 Interação dos Compostos 4, 5 e 6 com Proteína Albumina de Soro Bovino Observada por Dicroísmo Circular.....	
4.2.1.1 Atividade Genotóxica dos Compostos 4, 5 e 6.....	
4.2.1.2 Atividade Antibacteriana dos Compostos 4, 5 e 6 em Meio Líquido	
4.3 COMPOSTOS BINUCLEARES DE FE(II) 7, 8, 9 E 10.....	100
4.3.1 Atividade de Clivagem de DNA dos Compostos 7, 8, 9 e 10 em Presença de Distamicina.....	100
4.3.2 Atividade dos Compostos 7, 8, 9 e 10 em Presença de DMSO.....	101
4.3.3 Atividade dos Compostos 7, 8, 9 e 10 em Presença e Ausência de Oxigênio Atmosférico.....	102
4.3.4 Análise da Cinética da Reação de Corte da Molécula de DNA pelos Compostos 7, 8, 9 e 10.....	103
4.3.5 Atividade Antibacteriana dos Compostos 7, 8, 9 e 10 em Meio Líquido	104
4.4 COMPOSTOS MONONUCLEARES DE FERRO (II).....	105
4.4.1 Atividade de Clivagem de DNA do Composto 11 Dependente de Ph e Concentração.....	106
4.4.2 Atividade de Clivagem de DNA do Ligante DPQ-DTZOL não Complexado.....	107
4.4.3 Atividade de Clivagem de DNA do Composto 11 em Presença de Distamicina.....	108
4.4.4 Atividade do Composto 11 em Presença e Ausência de Oxigênio Atmosférico.....	109
4.4.5 Análise da Cinética da Reação de Corte da Molécula de DNA pelo Composto 11.....	110
4.4.6 Cálculo da Especificidade de Sítio de Corte de DNA do Composto 11..	111
4.4.7 Atividade de Clivagem de Proteína do Composto 11.....	112
4.4.8 Atividade Antibacteriana do Composto 11 em Meio Líquido.....	113
4.4.9 Atividade de Clivagem de DNA dos Compostos 12, 13 e 14 Dependente da Presença ou Ausência de Luz Visível e de Concentração.....	113
4.4.10 Atividade de clivagem de DNA dos compostos 12, 13 e 14 em presença de DMSO e distamicina.....	114
4.4.11 Atividade de clivagem de proteína dos compostos 12, 13 e 14.....	115
4.1.12 Atividade antibacteriana dos compostos 1, 2 e 3 em meio líquido.....	116
5 DISCUSSÃO.....	118

5.1 COMPOSTOS BINUCLEARES DE COBRE [CU₂(□-OH)L₂].	118
5.2 COMPOSTOS DE FE(II) 4, 5 E 6	
5.3 COMPOSTOS BINUCLEARES DE FE(II)ZN(III)R 7, 8, 9 E 10	
5.4 COMPOSTOS MONONUCLEARES DE FE(II)	
6 CONCLUSÕES	129
BIBLIOGRAFIA	131
ANEXOS	139

1 INTRODUÇÃO

O Brasil, como país emergente, e com influência crescente na economia mundial tem a necessidade e vêm realizando investimentos em áreas de inovação tecnológica. Uma das prioridades estabelecidas é a nanotecnologia, na qual o governo espera que o país conquiste 1% do mercado mundial de produtos gerados em alguns anos (Os dados estão no estudo “Nanotecnologia”, coordenado pelo Núcleo de Assuntos Estratégicos (NAE) da Presidência da República), e uma prova disso está no histórico de editais lançados destinados a esta área de interesse pelo governo federal nos últimos anos.

O estudo de compostos metálicos como modelos ou miméticos de enzimas, que não chegam a ser um tamanho expressivo numa escala nanométrica quando comparado a nanotubos de carbonos, fulerenos, nanopartículas de diferentes materiais, mas que são capazes de interagir e modificar grandes sistemas químicos tem se revelado de grande interesse. São protótipos para aplicações distintas entre si, tais como, interação com sítios específicos de biomoléculas, entre elas ácidos nucleicos e proteínas, resultando em reações de quebra de ligações químicas (seletivas ou não), ou simplesmente reconhecimento e sinalização de pontos específicos dessas moléculas. Essas características podem ser empregadas no tratamento de patologias geradas por microorganismos, doenças que envolvam mutação genética, como no caso do câncer ou mesmo para produção de drogas farmacologicamente ativas para as mais variadas necessidades. O reconhecimento molecular e a sinalização são ferramentas para a realização de diagnósticos médicos, ou na área da biotecnologia, onde cada vez mais a variedade de ferramentas moleculares se faz necessária.

Como exemplos de compostos que interagem com moléculas biológicas podemos citar compostos de cisplatina, que é um fármaco que revolucionou o tratamento de várias formas de câncer (REEDJIK, 2003), radionuclídeos que podem ser utilizados como marcadores para análises, compostos radioterapêuticos

emissores de radiação beta, compostos envolvendo vanádio como miméticos de insulina e compostos de cromo que atuam como intermediários na ativação de receptores de insulina (CLARKE, 2003).

Compostos com atividade de clivagem de DNA hidrolítica podem ser utilizados como enzimas de restrição artificiais. Estas moléculas podem apresentar uma série de vantagens sobre as enzimas de restrição através da capacidade de clivar o DNA em sítios de restrição não reconhecidos pelas enzimas utilizadas (HEGG, 1998) e também por serem menores em tamanho podendo alcançar regiões estereoquimicamente impedidas de uma macromolécula (GONZALEZ-ALVAREZ, 2003).

Outras alternativas são moléculas sintéticas que clivam o DNA oxidativamente que têm se destacado como agentes na técnica de “DNA footprinting” (TERENZI et al, 1998) e mais recentemente, como ferramenta para fragmentação e marcação fluorescente de ácidos nucléicos para hibridização através da tecnologia do microchip de DNA (Kelly et al, 2002).

Desta maneira, segundo Cowan (2001), “a habilidade em clivar ácidos nucléicos, em um modo não degradativo, e com altos níveis de seletividade por sítios ou estruturas, oferecerá muitas aplicações para a manipulação de genes (biologia molecular), para o desenho de sondas estruturais e o desenvolvimento de novas terapêuticas”.

A habilidade de interagir e quebrar proteínas de maneira específica ou não, possibilita o desenvolvimento de novas terapias anticâncer como por exemplo através da inibição de proteína-quinases que são expressas de maneira exacerbada em células cancerosas levando à formação de tumores malignos (MAITY et al, 2009 apud GOKCUMEN et al, 2006).

Tais habilidades destes compostos deram origem aos conceitos de nucleases e proteases sintéticas. Sendo as nucleases definidas como “compostos capazes de clivar ácidos nucléicos em condições próximas às fisiológicas, de maneira hidrolítica ou oxidativa” (OLIVEIRA, 2006) e conseqüentemente as proteases podem ser descritas como “compostos capazes de clivar proteínas ou peptídeos em condições próximas às fisiológicas, de maneira hidrolítica ou oxidativa”.

1.1 Estrutura do DNA

Os ácidos nucléicos são polímeros lineares muito longos constituídos de monômeros chamados nucleotídeos. Diferentes ácidos nucléicos podem ter desde cerca de 80 nucleotídeos, como em tRNA, até mais de 10^8 pares de nucleotídeos em um único cromossomo eucariótico. A unidade de tamanho de um ácido nucléico é o par de bases (para espécies com fita dupla), geralmente abreviado como pb, ou base (para espécies com fita simples). O cromossomo na *Escherichia coli* (*E. coli*) tem 4×10^6 pb o que significa uma massa molar de 3×10^9 Da e um comprimento de 1,5 mm. Já o DNA genômico de uma única célula humana tem $3,9 \times 10^9$ pb e 990 mm de comprimento (ZAHA et al,2003).

Os nucleotídeos são constituídos por uma base nitrogenada heterocíclica, uma pentose e um grupo fosfato (Figura 1A). No DNA, as seqüências de bases contêm a informação genética, enquanto que o açúcar e o fosfato têm um papel estrutural. As bases nitrogenadas são derivadas de anéis de purina e pirimidinas (Figura 1B). As principais purinas são adenina (**A**) e guanina (**G**), que são encontradas tanto em DNA como em RNA. As principais pirimidinas são citosina (**C**), timina (**T**) no DNA e uracila (**U**), substituindo a timina em RNA (ZAHA et al,2003).

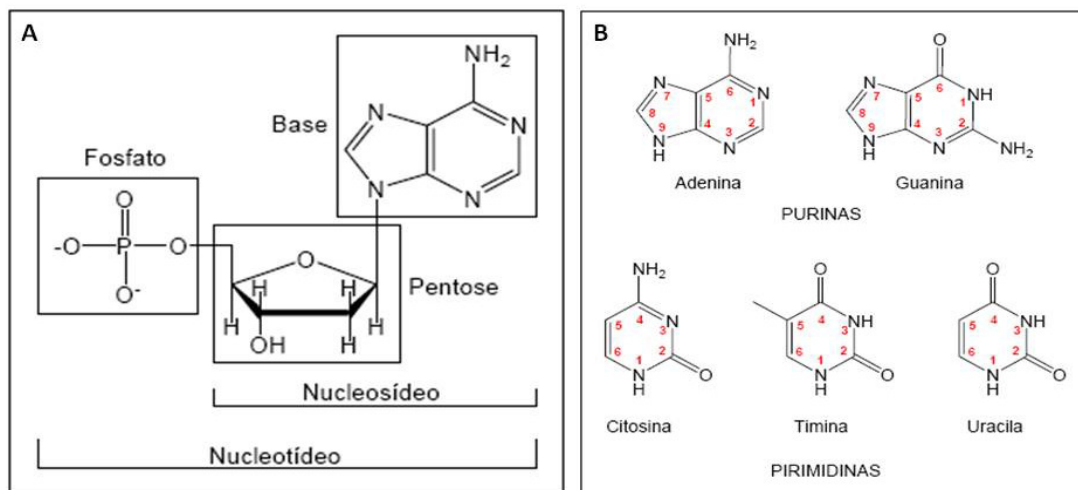


Figura 1: A: Estrutura geral dos desoxiribonucleotídeos e B: Bases nitrogenadas que compõem os nucleotídeos tanto no DNA como no RNA

Fonte: BERG; TYMOCZKO e STRYER, 2008

Os nucleotídeos que constituem as moléculas de DNA e RNA estão ligados covalentemente uns aos outros através dos grupos fosfato. Esta ligação é formada pela ligação do grupo 5'-fosfato de um nucleotídeo com o grupo 3'-OH de outro nucleotídeo, criando uma ligação fosfodiéster. Desta forma, o esqueleto covalente dos ácidos nucléicos é constituído por grupos fosfato e anéis de ribose de forma alternada. Todas as ligações fosfodiéster possuem a mesma orientação ao longo da cadeia, dando a cada fita do ácido nucléico linear uma polaridade específica e diferentes terminais 3' e 5' (3'-OH e 5'-OPO). Convencionalmente, as seqüências de nucleotídeos nas moléculas de DNA e RNA são descritas no sentido da extremidade 5'-OPO- para a extremidade 3'-OH (5'→3'), e correspondem à estrutura primária desses ácidos nucléicos (Figura 2) (ZAHA et al,2003).

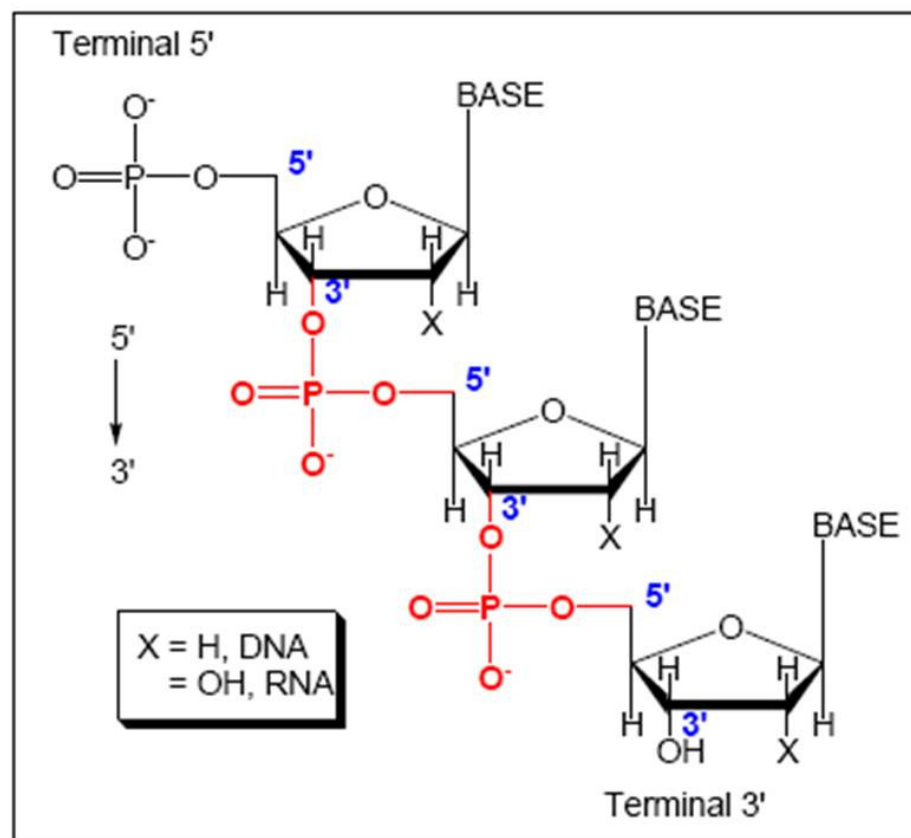


Figura 2: Estrutura do esqueleto covalente dos ácidos nucléicos é constituído por grupos fosfato e anéis de ribose de forma alternada

Fonte: BERG; TYMOCZKO e STRYER, 2008

As ligações fosfodiéster que formam o esqueleto covalente do DNA são extremamente estáveis em relação à hidrólise não enzimática. Esta grande estabilidade, inclusive, torna difícil a determinação do seu tempo de meia vida ($t_{1/2}$),

sendo necessária utilização de altas temperaturas, para posterior extrapolação para 25 °C. Na literatura podem ser encontrados valores distintos para o $t_{1/2}$ do RNA e do DNA. Para o RNA em água a 25 °C e pH = 7, os valores variam de 110 a 800 anos, enquanto que para o DNA os valores de $t_{1/2}$, em água a 25 °C e pH = 7, variam de 130 mil a dezenas ou centenas de bilhões de anos (Cowan, 2001).

Além disso, em pH fisiológico as moléculas de DNA estão negativamente carregadas, o que inibe a hidrólise das ligações fosfodiéster pelo ataque de nucleófilos que estão em sua maioria carregados positivamente devido a presença de íons com esta característica (Cowan, 2001). Este comportamento revela o porquê da escolha, pela natureza, do DNA como forma de armazenamento do material genético.

Finalmente, o DNA é composto por duas cadeias polinucleotídicas, de sentidos opostos, enroladas em torno de um eixo, formando uma dupla hélice com uma cavidade maior e uma menor que delimitam o acesso a sítios de reconhecimento da molécula por parte de proteínas e outras substâncias (Figura 3). Esta estrutura é mantida através de ligações de hidrogênio entre as bases de cada fita sempre pareando uma adenina com uma timina e uma citosina com uma guanina (Figura 3) (BERG; TYMOCZKO e STRYER, 2008).

As interações com proteínas ou outras substâncias se dão normalmente através de seqüências específicas de pares de bases reconhecidos na forma B do DNA, pelas posições de doadores ou receptores de hidrogênio ou grupos metila presentes nas cavidades maior e menor conforme demonstrado na Figura 4 (Nelson, D. e Cox, M., M., 2000). Uma quantidade limitada de pares de bases é tudo que é necessário para a obtenção de um sítio único e discriminatório principalmente na cavidade maior do DNA. Estes sítios são bastante utilizados por proteínas reguladoras e enzimas de restrição entre outras.

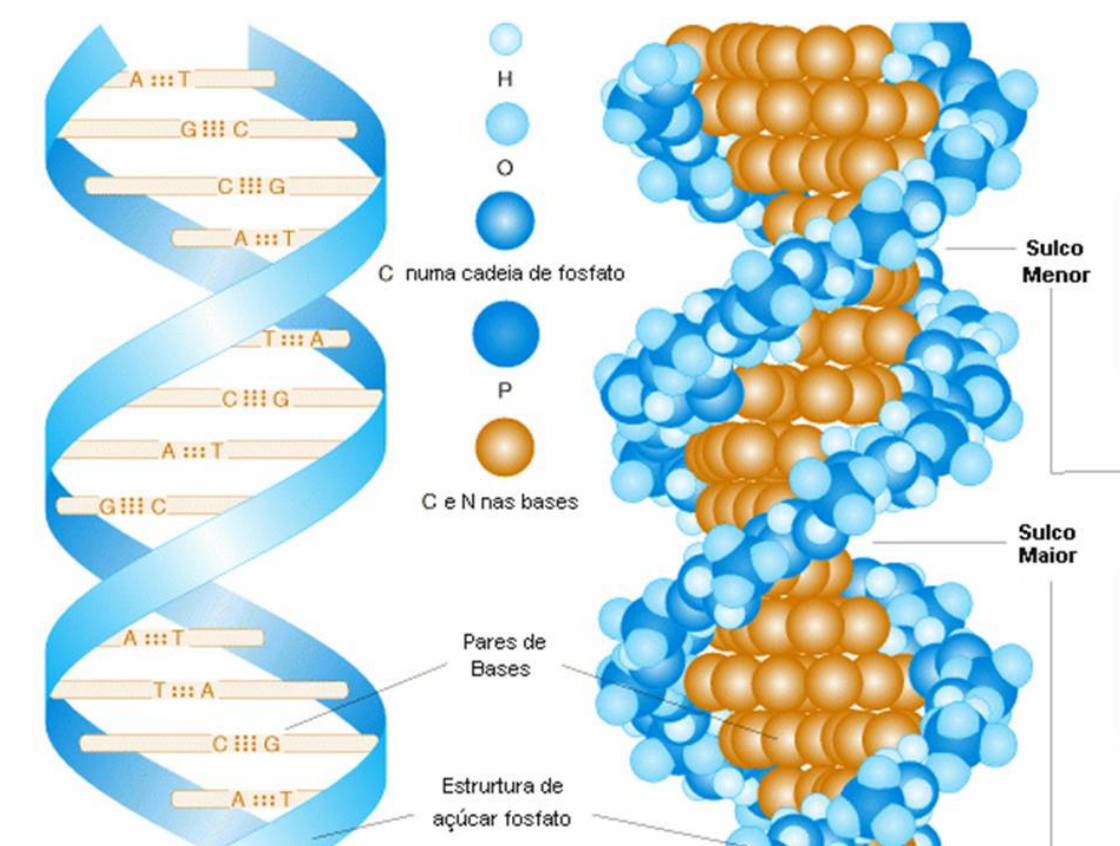


Figura 3: Estrutura esquemática da dupla hélice do DNA na forma B. Estão demonstrados os pares de bases constituintes e o número de ligações de hidrogênio. Também estão indicadas as cavidades maior e menor da estrutura
Fonte: DUCLOS (2004)

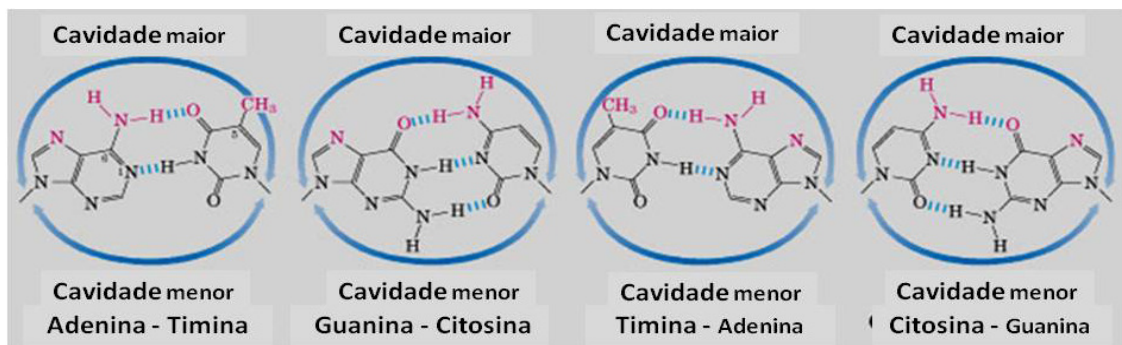


Figura 4: Os grupos funcionais sobre as bases são mostrados nas cavidades maior e menor do DNA. Os grupos assinalados em vermelho são aqueles que podem ser usados para o reconhecimento pelas proteínas na cavidade maior, de um modo base-específico
Fonte: Nelson, D. and Cox, M., M., 2000

1.1.1 Plasmídeos

Plasmídeos são elementos genéticos extracromossômicos com capacidade de replicação autônoma independente do cromossomo bacteriano sendo considerados replicons (unidades genéticas de replicação autônoma). Utilizam uma origem de replicação semelhante a região ori-C que regula o número de cópias do plasmídeo nas células e seus grupos de compatibilidade. A grande maioria dos plasmídeos é formada por moléculas de DNA dupla fita circulares, mas existem também plasmídeos lineares e plasmídeos integrativos que se posicionam no cromossomo das células. O tamanho destes elementos pode variar de 1 a 1000 Kilobases (Kb) e normalmente não possuem homologia com o cromossomo da célula hospedeira em sua seqüência nucleotídica.

Os plasmídios podem ser classificados de acordo com a quantidade e as espécies bacterianas que habitam ou de acordo com seus grupos de incompatibilidade. Estes baseiam-se no fato de que plasmídios diferentes podem estar presentes em uma mesma célula desde que sejam compatíveis. Também podem ser classificados como naturais, que são normalmente encontrados nas bactérias em seu estado selvagem e artificiais que via de regra foram produzidos por engenharia genética e possuem características distintas e bem definidas, como é o caso do plasmídeo pBSK-II (ZAHA, 2003).

1.2 NUCLEASES

Como resultado de sua notável estabilidade a natureza escolheu os ésteres de fosfato para unir as unidades básicas do material genético, os nucleotídeos (WILCOX, 1996; COWAN, 2001). A hidrólise dos fosfodiésteres é normalmente inibida pelas grandes cargas negativas que impedem a aproximação dos nucleófilos ao esqueleto do DNA. No entanto, a hidrólise destas ligações é essencial em muitos momentos do ciclo celular, como, por exemplo, a já citada reparação do DNA, além dos sinais de transdução e integração de elementos genéticos (SREEDHARA and COWAN, 2001).

As enzimas que tem como atividade a degradação de ácidos nucléicos são conhecidas como nucleases e a hidrólise dos ésteres de fosfato mediada por metais

é uma rota catalítica comum na bioquímica de ácidos nucléicos (COWAN, 1998). Entretanto, atualmente enzimas oxidativas que também têm a capacidade de produzir quebras simples e duplas na estrutura dos ácidos nucléicos também são consideradas (JIANG, 2007). Enzimas com estas características são comuns e essenciais para os organismos vivos.

1.2.1 Nucleases de Origem Biológica

As nucleases de origem biológica são normalmente classificadas como exonucleases ou endonucleases (Figura 5 A e B). As exonucleases degradam o ácido nucléico na direção 5' → 3' ou na direção 3' → 5', removendo apenas nucleotídeos das extremidades 5' ou 3', de uma fita de ácido nucléico de dupla hélice, respectivamente. As endonucleases, podem degradar os ácidos nucléicos em qualquer lugar da fita, tando de forma hidrolítica como oxidativa, reduzindo-a a fragmentos cada vez menores. Existem algumas classes importantes que clivam apenas seqüências específicas de nucleotídeos, essas enzimas são muito aplicadas em biotecnologia e são conhecidas como endonucleases de restrição. (NELSON E COX, 2002).

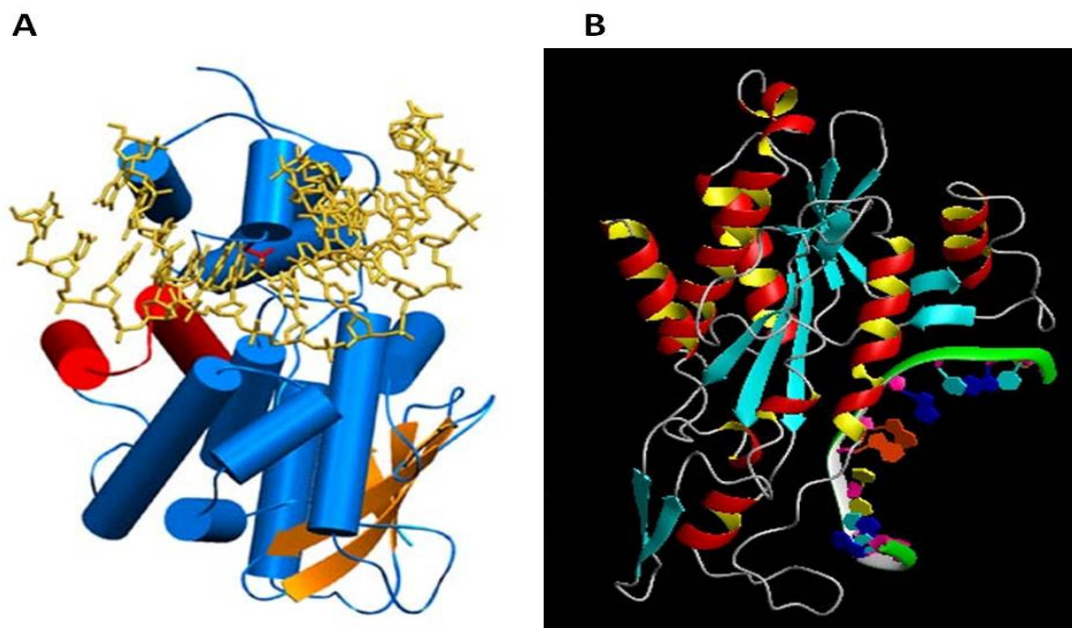


Figura 5: Representações das estruturas trimensionais das enzimas: exonuclease 1 (A) e endonuclease EcoRI (B) de *Escherichia coli* associadas à dupla fita de DNA

Fonte: <http://gibk26.bse.kyutech.ac.jp/> acessado em 28/08/2009

A principal reação catalisada pelas endonucleases de restrição é a hidrólise do arcabouço de fosfodiéster do DNA. Especificamente, é rompida a ligação entre o átomo de oxigênio 3' e o fósforo, os produtos desta reação são terminações de DNA com uma hidroxila 3' livre e uma fosforila em 5', que podem ser religadas com ajuda de outros tipos de enzimas chamadas de ligases, que não é o enfoque desse trabalho. Esta reação de hidrólise acontece por um ataque nucleofílico ao átomo de fósforo. As endonucleases podem clivar o DNA como representado na figura 13. Neste mecanismo o nucleófilo ataca o átomo de fósforo, e se forma um estado de transição pentacoordenados. Esta forma tem uma geometria de bi pirâmide trigonal, centralizada no átomo de fósforo, com nucleofílico que chega em um dos vértices e um grupamento é deslocado. (BERG; TYMOCZKO e STRYER, 2008).

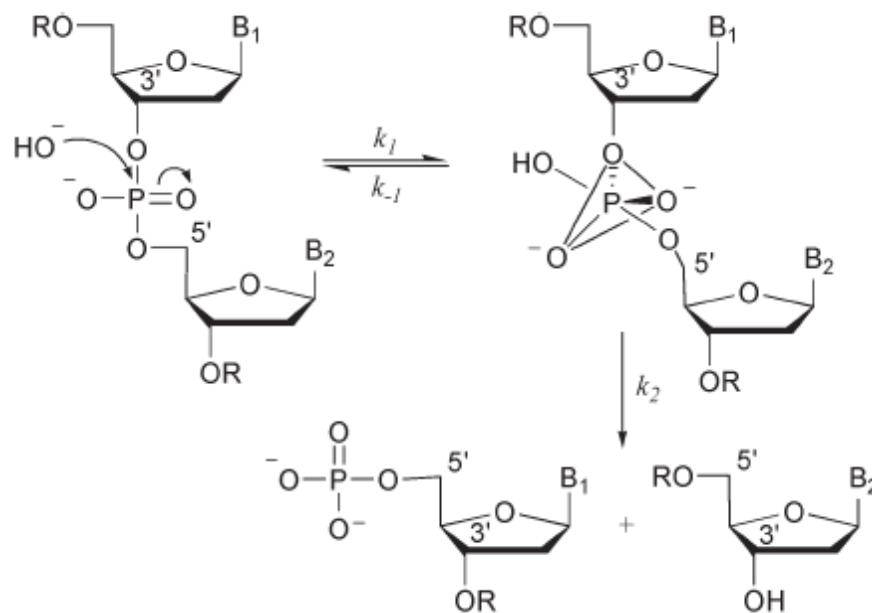


Figura 6: Mecanismo hidrolítico de endonucleases
Fonte: Mancin, Tecilla, Tonelatto (2005)

O átomo de magnésio (Mg) é o mais comumente utilizado para atividade da endonuclease, provavelmente por sua grande disponibilidade na natureza, possibilidade de ser encontrado em estados de hidratação adequados, capacidade de troca de ligantes, capacidade de resistir a reações redox e densidade de carga (WILCOX, 1996). Em endonucleases o magnésio é encontrado coordenado

a seis ligantes, dos quais três são moléculas de água, dois são carboxilatos de aspartatos da enzima, e um é um átomo de oxigênio da fosforila no local da clivagem. O átomo de magnésio mantém uma molécula de água em uma posição a partir da qual ela pode atacar a fosforila e, junto com os aspartatos, ajuda a polarizar a molécula de água para a desprotonação. (BERG; TYMOCZKO e STRYER, 2008). Centros enzimáticos multinucleares constituídos de metais de transição também podem ser encontrados nesta classe de enzimas entre os quais os elementos zinco, manganês e ferro são os exemplos mais freqüentes.

As metalohidrolases binucleares são exemplos desta classe de enzimas e entre estas estão as fosfatases ácidas púrpuras (PAPs do inglês “purple acid phosphatase”) que são enzimas nas quais a necessidade de um centro heterovalente já foi estabelecida. Este centro composto de Fe (III) M (II) onde M = Fe , ZN ou Mn pertence a uma família de enzimas que catalisa a hidrólise de uma grande variedade de substratos fosfatados em pHs que vão do ácido ao neutro. Estas enzimas são normalmente altamente conservadas e as fosfatases de animais compartilham no mínimo 85% de identidade entre si (MITIC et al, 2006).

Exonucleases também são um exemplo de enzimas que podem ter um centro catalítico contendo dois íons metálicos. Geralmente estas enzimas fazem parte da DNA polimerase, que é um composto multifuncional que também possui a atividade exode clivagem de DNA 5´3´. Outros tipos destas exonucleases seriam as exonucleases de reparação TREX1 componentes da p53 humana, de ratos e camundongos, a atividade exonucleasica do supressor de metástase NM23-H1 entre outros. Estas enzimas requisitam íons divalentes, em particular Mg(II), Mn(II) e Zn(II) (MITIC et al, 2006).

1.2.2 Nucleases Sintéticas ou Compostos Metálicos com Atividade de Clivagem de DNA

A capacidade de mimetizar a atividade de determinadas proteínas hidrolizando DNA ou RNA de maneira reversível e com seletividade de seqüência ou estrutura tem se tornado cada vez mais importante para a biotecnologia, biologia estrutural e indústria farmacêutica. Uma vez que a hidrólise de ácidos nucléicos é inibida por grande carga negativa do esqueleto polianiónico dos ácidos nucléicos, a

utilização de metais carregados positivamente como co-fatores é uma das estratégias que podem ser utilizadas para efetuar estas reações (COWAN, 2001).

A interação, de maneira não covalente, dos complexos com moléculas de DNA normalmente se dá de três maneiras diferentes (ZELIGS et al, 2007). Por interação eletrostática nas cavidades da dupla hélice de DNA, por intercalação entre as bases nitrogenadas e por inserção, ligando-se ou substituindo estas bases com partes de seus grupos ligantes, dando origem a três classes de complexos os ligantes de cavidade (Groove Binder), os intercaladores (metallointercalator) e os insersores (metalloinsertor) (Figura 7). Estes complexos, com poucas exceções, compartilham características importantes. Quase todos são cineticamente inertes, com estruturas octaédricas ou quadráticas-planas, características estas que lhes conferem estabilidade. São normalmente rígidos, pois flutuação de formas estruturais implicaria em perda de especificidade e capacidade de reconhecimento dos alvos e, finalmente, muitos são passíveis de foto ou quimioindução, fatores que influenciam sua utilização como sondas ou catalisadores sitio específicos.

Centros metálicos multinucleares baseados em metais de transição como Zn(II), Fe(II) e Mn(II) entre outros também já foram caracterizados como hidrolases e vários compostos já foram descritos na literatura (COWAN, 2001). Aparentemente, centros metálicos binucleares tem maior atividade sobre as moléculas de ácidos nucléicos que seus análogos mononucleares. Uma considerável cooperatividade parece existir entre os dois íons metálicos na dupla ativação de ácidos de Lewis e na clivagem das ligações fosfodiester.

A utilização de metais de transição para síntese de compostos metálicos com atividade de nuclease, tanto oxidativa como hidrolítica, tem obtido um grande sucesso, mas ainda existe muito a ser estudado para o melhoramento de suas atividades quando estas são comparadas com às reações mediadas por enzimas. Compostos de cromo são descritos por interagirem com DNA de maneira não intercalativa ou através da cavidade maior do DNA e promoverem o corte de DNA plasmidial quando o catalisador está em grande quantidade (COWAN, 2001).

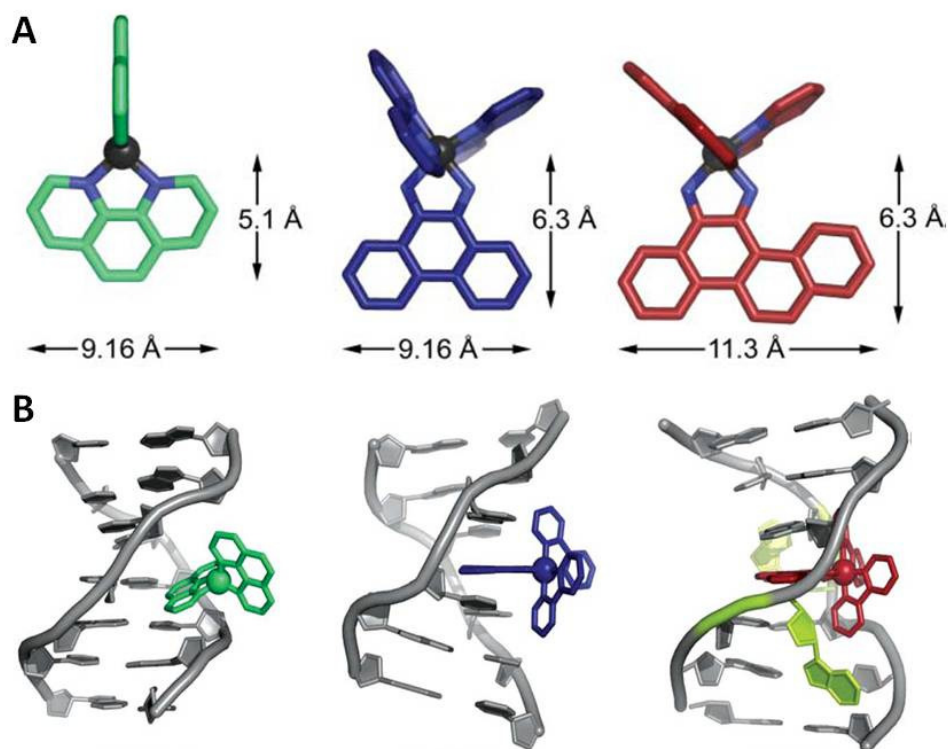


Figura 7: A. Geometria de compostos caracterizados como ligantes de cavidade (Groove Binder), metalintercaladores (metallointercalator) e metalinsensores (metalloinsertor) respectivamente. B. Três formas de ligação de compostos com DNA: ligação na cavidade, intercalação e inserção respectivamente

Fonte: Zeligs et al (2007)

A clivagem de DNA também foi obtida com compostos binucleares de cobre e a sua atividade foi bastante superior a de seus análogos monucleares reforçando a teoria da cooperatividade entre os centros metálicos. Compostos de cobre-histidina demonstraram ter atividade hidrolítica com uma seletividade por seqüências GTCG e GTG (CHAND et al, 2000). Um composto de ferro ligado à bleomicina demonstrou atividade oxidativa através da formação de hidroxiperóxido que representaria a forma ativada da bleomicina. Este composto apresenta boa atividade de clivagem de DNA, mas para que possa ser reciclado e catalizar múltiplas reações é necessária a adição de agentes redutores (ROELFES et al, 2000).

Um composto binuclear de ferro(III) e zinco(II) ($\text{Fe(III)}\mu\text{-OHZn(II)OH}$) e seus derivados que mimetizam fosfatases ácidas púrpuras foram recentemente descritos (NEVES et al, 2007; SEVERINO, 2008) e suas atividades sobre 2,6-bi(dinitrofenolfosfato) e DNA plasmidial foram descritas.

O desenvolvimento de compostos de lantanídeos como agentes de clivagem de ácidos nucleicos está baseado nas características citadas anteriormente e vários compostos foram descritos. Entre eles compostos binucleares de cério (BRANUN et al, 2001) que promovem uma quebra dupla de cadeia para cada dez quebras simples, o que significa que o segundo corte na dupla fita não pode ser atribuído a outra quebra aleatória de DNA, demonstrando seletividade na sua atividade. Esta seletividade pode estar relacionada a sensibilidade dos íons metálicos ao ambiente e é suportada por três situações: 1) interdependência do reconhecimento do substrato e ligação dos dois íons metálicos, 2) utilização de íons com níveis rigorosos de requerimentos de coordenação para desestabilizar a ligação enzima-substrato e liberar o produto e 3) dependência do ambiente eletrostático pelos resíduos catalíticos e dos ácidos nucleicos para formação do nucleófilo e para movimentação do íons metálico durante a reação de transferência do grupo fosforil (YANG et al, 2006).

Compostos ternários de cobre(II) complexados à metil-L-cisteína [Cu(SMe-L-cys)(B)(H₂O)](X) (1-4), onde B é 2,2'-bipiridina, 1,10-fenantrolina, dipiridoquinoxalina and dipiridofenazina, demonstraram atividade de clivagem de DNA oxidativa e capacidade de realizar múltiplas reações após sofrer processo de redução fotoinduzida por luz visível (PATRA, Nethaji e Chakravarty, 2007). Mono e bi adutos de compostos de Fe(III) com ligante dppz ([Fe(dppz)]Cl₃ e [Fe(dppz)₂]Cl₃) também foram sintetizados e sua interação com DNA de timo de vitelo foi estudada por espectrofotometria e dicroísmo circular. Estes se mostraram excelentes intercalantes promovendo aglutinação de DNA e elevação de sua temperatura de desnaturação (TERENZI et al, 2009).

1.2.3 Fatores que Afetam a Atividade de Clivagem de DNA dos Compostos Metálicos

Existem vários fatores que podem influenciar a habilidade dos compostos metálicos de cortar DNA. Dentre estes podemos salientar os centros metálicos, os ligantes e co-fatores tais como: pH, força iônica do meio, temperatura e tempo de reação (JIANG et al, 2007). Alguns destes serão tratados a seguir.

1.2.3.1 Natureza dos íons metálicos

1.2.3.1.1 Centros Metálicos

Propriedades intrínsecas dos centros metálicos são determinantes na habilidade de clivar o DNA por compostos metálicos. Metais de transição envolvidos em oxidação de nucleotídeos, mais especificamente de suas bases, determinam se o mecanismo será transferência de elétrons, formação de EROs ou ERMOs. Podem definir também pela fotoclivagem de DNA ou como é o caso do zinco, podem promover preferencialmente a hidrólise da ligação fosfato (MANCIN et al,2005).

1.2.3.1.2 Potencial Redox dos Íons Metálicos

A clivagem oxidativa induzida por compostos metálicos acontece freqüentemente através de ciclos redox entre diferentes estados de oxidação dos íons metálicos. Desta maneira, o potencial redox destes íons é um índice bastante útil para a avaliação da habilidade de clivagem de DNA por parte destes íons, sendo normalmente mais efetivos os compostos com o maior potencial redox (Jiang, 2007).

1.2.3.2 Ligantes

1.2.3.2.1 Necessidades Estruturais

Muitos são os exemplos de necessidades estruturais que podem exemplificar as diferentes necessidades de estruturas capazes de posicionar corretamente os íons metálicos junto à estrutura do DNA. O complexo Cu-prodigiosina corta DNA por oxidação (Figura 8), atividade esta que se origina da complexação do Cu(II) por uma estrutura tripirrólica rica em elétrons (PARK et al. 2003). Qualquer modificação ou substituição dos anéis pirrólicos (Figura 8) diminui ou até mesmo torna o composto inativo (JIANG et al, 2007).

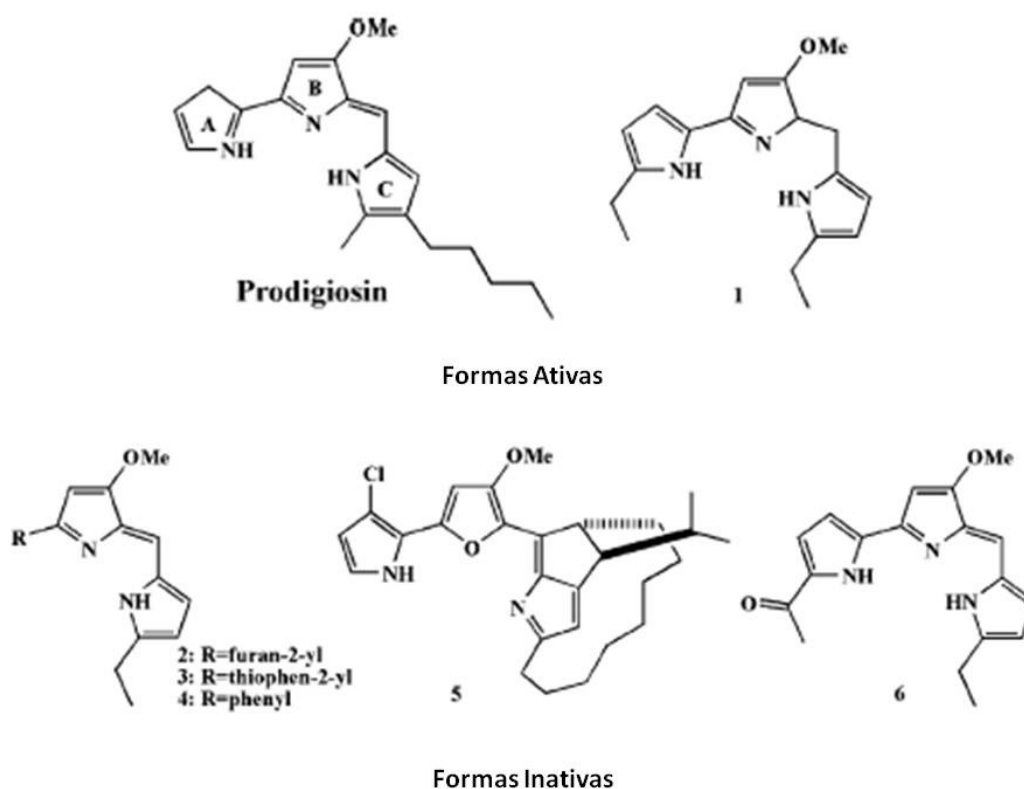


Figura 8: Prodigiosina e seus derivados que quando complexados ao Cu(II) formam compostos com atividade de clivagem de DNA e também compostos inativos. Alterações na estrutura do ligante perturbam o ambiente do centro metálico

Fonte: JIANG et al (2007)

1.2.3.2.2 Carga dos ligantes

Uma vez que o DNA é carregado negativamente, as altas cargas positivas de muitos dos compostos metálicos tende a conferir a estes uma maior afinidade pelos ácidos nucléicos e desta maneira aumentar a atividade destes compostos (JIANG et al, 2007).

1.2.3.2.3 Estrutura Planar

A estrutura planar dos ligantes é mais um fator que influencia a atividade de clivagem de DNA dos compostos, pois esta planaridade, como por exemplo um grupo fenila pode aumentar o potencial de ligação das metalonucleases por intercalação. Um exemplo desta característica pode ser dado pelos compostos

[Cu(dppt)Cl₂] e [Cu(pta)Cl₂] (Figura 9) que possuem duas formas, uma não planar e outra planar. O segundo complexo possui maior capacidade de ligação e atividade de clivagem de DNA (WANG et al, 2004). Também pode-se afirmar que compostos com uma maior estrutura planar podem mais facilmente ser ativados ou por foto indução ou por co-fatores.

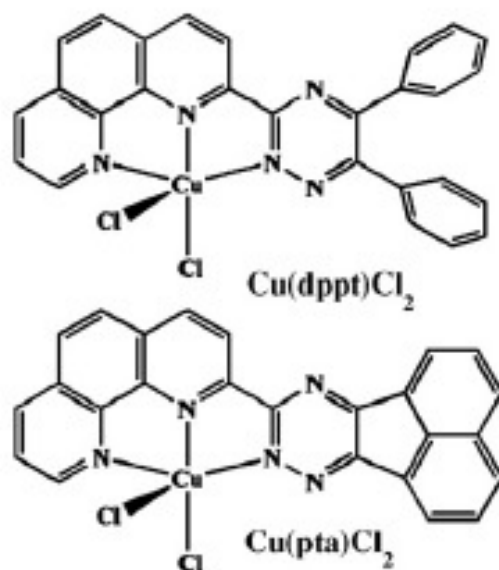


Figura 9: Estrutura dos compostos [Cu(dppt)Cl₂] e [Cu(pta)Cl₂] que apresentam atividades de ligação e quebra de DNA distintas, sendo o segundo o mais ativo devido à planaridade de sua estrutura
Fonte: JANG et al, 2007

1.2.3.2.4 Configuração Geométrica

A configuração geométrica de ligantes, incluindo as formas *cis* e *trans* e dextrógira (D) de levógira (L), podem influenciar a eficiência e a seletividade dos compostos. Braços laterais de compostos de dioxociclanos contendo metades de quinoxalina tem sua atividade controlada pelas formas *cis* e *trans* (HEGEDUS et al, 2003). A forma *cis*-quinoxalina tem uma atividade muito maior que a forma *trans*-quinoxalina (figura 10).

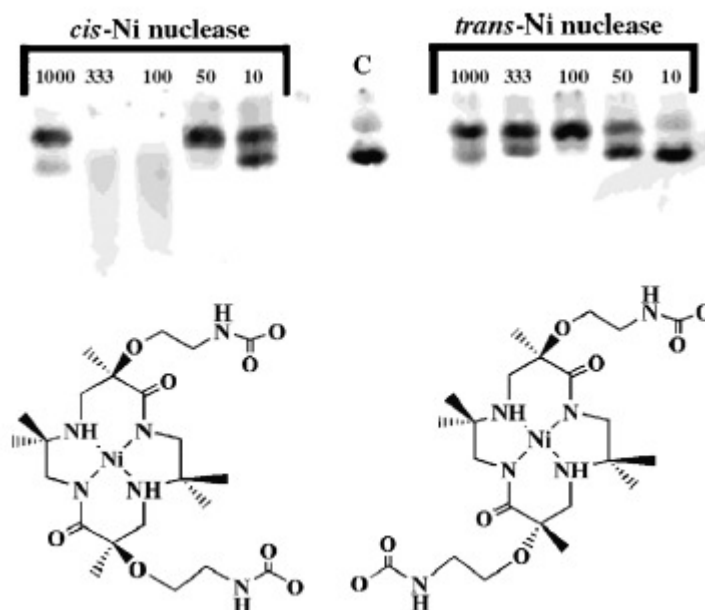


Figura 10: Atividade de clivagem de DNA das formas *cis* e *trans* de compostos de Ni demonstrando a influencia da configuração geométrica na habilidade dos mesmos em cortar o DNA
Fonte: HEGEDUS et al (2003)

1.2.3.2.5 Fatores Estéreos

O efeito estéreo de compostos metálicos pode influenciar a sua ligação ao DNA e, desta maneira, proporcionar diferentes atividades de clivagem desta molécula. Este efeito de impedimento pela forma da molécula pode ser demonstrado através dos compostos $[\text{Cu}(\text{dppt})\text{Cl}_2]$ e $[\text{Cu}(\text{pta})\text{Cl}_2]$ já citados e representados na figura 9. Outras situações poderiam ser exemplificadas pela maior atividade do composto $[\text{Cu}(\text{phen})]^{2+}$ sobre seu análogo constituído por duas fenila $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$. Curiosamente em outras situações compostos binucleares tem mais atividade que seus análogos com um só ligante (JIANG et al, 2007).

1.2.3.3 Co-fatores e Condições de Reação

1.2.3.3.1 Co-fatores

A atividade e/ou especificidade de muitas metalonucleases, principalmente para compostos de atividade oxidativa, podem ser afetadas fortemente pela natureza e concentrações de oxidantes como KHSO_4 ou H_2O_2 e redutores como ácido ascórbico, ácido mercaptopropionico, glutatona, ditioneitol, entre outros. Em compostos de cobre-fenantrolina, a atividade é sempre uma ordem de magnitude maior em presença de ácido ascórbico do que em presença de ácido mercaptopropiônico. Esta diferença pode ser explicada, ou pela formação de um intermediário inativo para o DNA por parte do ácido mecaptopropiônico ou pela formação de H_2O_2 pela oxidação do ácido ascórbico (BALES et al, 2005).

A influência da concentração do co-fator também é complicada, pois pode produzir espécies reativas de oxigênio e também estar envolvido em ciclos redox dos compostos. O aumento da concentração normalmente aumenta a atividade do composto, mas seu excesso pode reduzir espécies reativas de oxigênio formadas (JIANG et al, 2007).

1.2.3.3.2 Valores de pH e força iônica

Para muitas metalonucleases, o pH pode ter um efeito primário em sua atividade, similar ao efeito ácido/base das enzimas naturais. A seleção de um pH ótimo para o composto é crucial para a eficiência da atividade de clivagem de DNA, que pode variar de acordo com a natureza dos íons metálicos, estados de protonação, co-fatores e concentração dos substratos.

O aumento da força iônica pode alterar a capacidade dos compostos de se aproximar do DNA resultando na redução da atividade de clivagem. Então, condições iônicas ideais são essenciais para o corte eficiente da molécula (JIANG et al, 2007).

1.3 PROTEÍNAS

As proteínas são moléculas de estrutura complexa e massa molar elevada (de 5.000 a 1.000.000 ou mais unidades de massa atômica), sintetizadas pelos

organismos vivos através da condensação de um grande número de moléculas de alfa-aminoácidos, através de ligações denominadas ligações peptídicas.

Os aminoácidos, unidades estruturais básicas das proteínas, são constituídos por um grupamento amina, uma carboxila, um átomo de hidrogênio e um radical (R) todos ligados a um carbono alfa. As cadeias laterais podem ser alifáticas ou aromáticas, conter átomos de enxofre, possuírem características ácidas ou básicas e/ou possuírem carga. Nas proteínas somente são utilizadas as formas L dos aminoácidos (Figura 11).

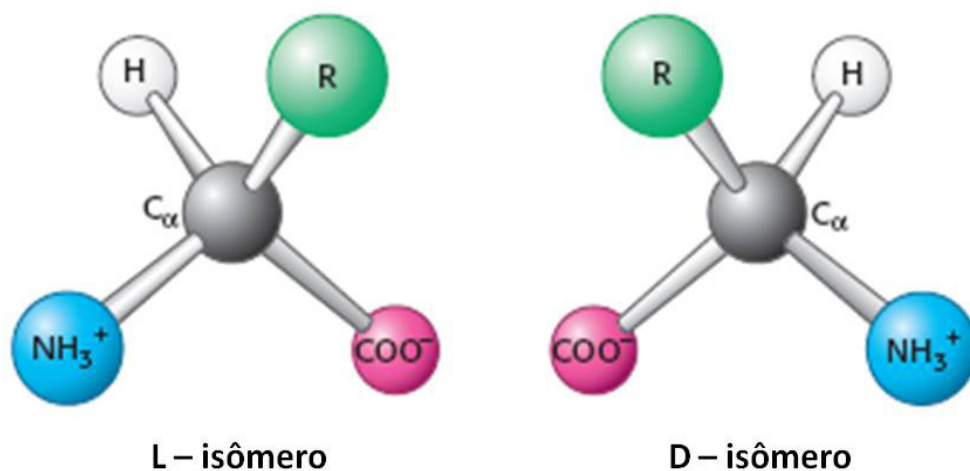


Figura 11: Estrutura básica dos aminoácidos apresentando seus dois isômeros (L e D) que são imagens especulares. R indica a cadeia lateral

Fonte: BERG; TYMOCZKO e STRYER (2008)

As ligações peptídicas que normalmente unem estes aminoácidos constituem da reação entre uma carboxila com um grupamento amina com a liberação de uma molécula de água. (Figura 12). Energeticamente a reação tende à hidrólise, sendo então necessária energia para o seu estabelecimento (BERG; TYMOCZKO e STRYER, 2008).

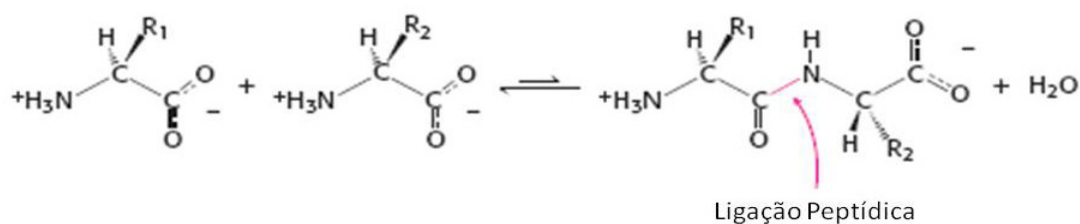


Figura 12: Formação de uma ligação peptídica

Fonte: BERG; TYMOCZKO e STRYER, (2008)

As proteínas são normalmente organizadas em três ou quatro níveis estruturais que são definidos por ganho de complexidade na arquitetura das moléculas.

O primeiro nível estrutural é dado pela seqüência de aminoácidos ao longo da cadeia polipeptídica. É o nível estrutural mais simples e mais importante, pois dele deriva todo o arranjo espacial da molécula. São específicos para cada proteína, sendo geralmente determinados geneticamente. Sua estrutura primária é somente a seqüência dos aminoácidos, sem se preocupar com a orientação espacial da molécula. Suas ligações são ligações peptídicas.

O segundo nível estrutural é determinado pelo arranjo espacial de aminoácidos próximos entre si na seqüência primária da proteína. Seus principais arranjos são a alfa-hélice e a folha-beta, possuindo também as voltas que são regiões localizadas entre as anteriormente citadas. As alfa-hélices são estruturas em espiral formadas por ligações de hidrogênio entre o primeiro e o quarto aminoácido, o segundo e o quinto e assim por diante (Figura 13 A). Cada aminoácido relaciona-se com o seguinte por uma distância de 1,5 Å e uma rotação de 100° perfazendo 3,6 radicais de aminoácidos por volta de hélice. As folhas-beta são constituídas por fitas pregueadas nas quais os aminoácidos estão distantes 3,5 Å entre si e estas fitas são estabilizadas por ligações de hidrogênio entre grupamentos NH e CO de fitas adjacentes e não do mesmo filamento como nas alfa-hélices (Figura 13 B).

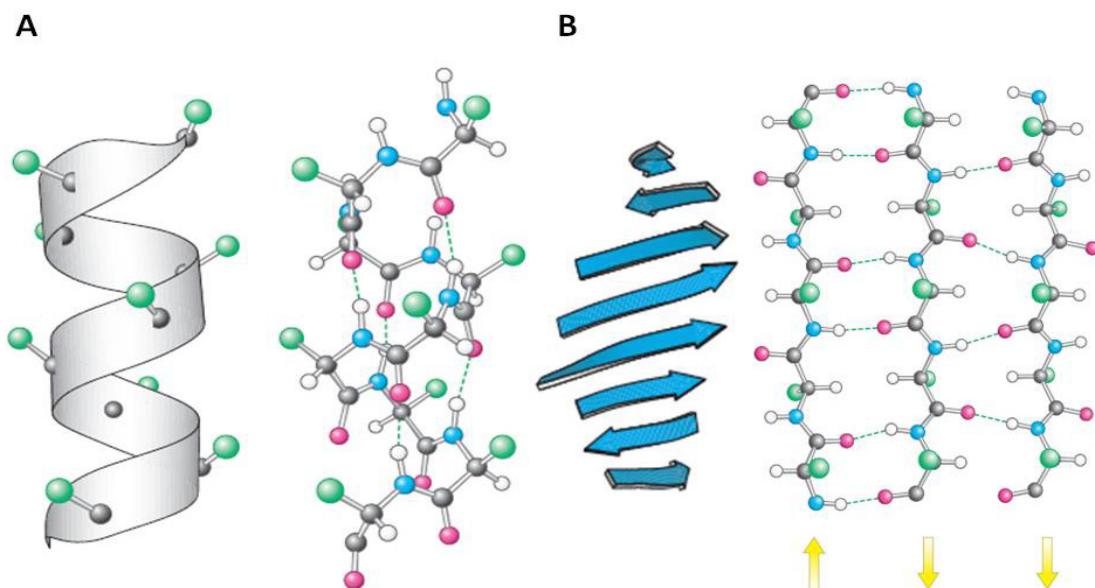


Figura 13: Representação das estruturas de alfa-hélice (A) e folha-beta (B) nas formas de fita e bolas e hastes respectivamente. As pontes de hidrogênio estão representadas por linhas pontilhadas azuis entre os grupamentos CO e NH. Nas folhas-beta estão representadas fitas paralelas e antiparalelas
Fonte: BERG; TYMOCZKO e STRYER (2008)

O terceiro nível estrutural resulta do enrolamento da α -hélice ou da folha pregueada, sendo estabilizado por ligações de hidrogênio e ligações dissulfeto. Esta estrutura confere a actividade biológica às proteínas. Este descreve o dobramento final de uma cadeia, por interações de regiões com estrutura regular, ou de regiões sem estrutura definida, podendo haver interações de segmentos distantes de estrutura primária, por ligações não covalentes (Figura 14 A e B). A estrutura terciária é caracterizada pelas interações de longa distância entre aminoácidos, denominadas interações hidrofóbicas, e pelas interações eletrostáticas (BERG; TYMOCZKO e STRYER, 2008).

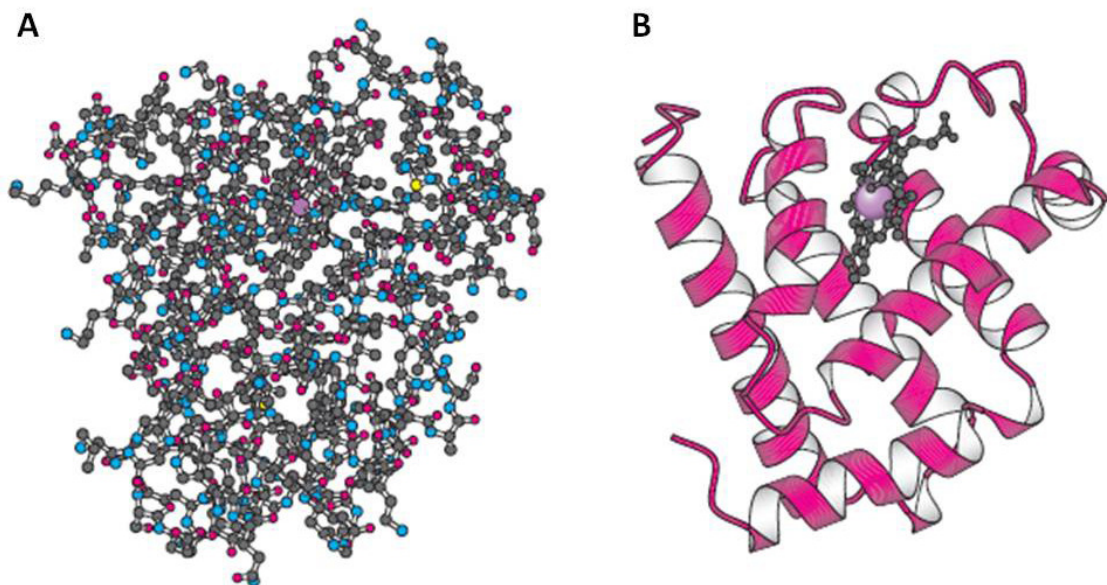


Figura 14: Estrutura terciária da proteína mioglobina caracterizada por uma série de alfa-hélices e voltas, grupo Heme e átomo de ferro. O modelo de bolas e hastes é demonstrada na figura 14 A e o modelo de fitas e linhas na figura B.

Fonte: BERG; TYMOCZKO e STRYER (2008)

O quarto nível estrutural ocorre quando as proteínas são compostas de mais de uma cadeia polipeptídica produzida através de interações entre cadeias idênticas entre si provenientes do mesmo gene ou diferentes provenientes de genes diferentes. Estas interações são guiadas e estabilizadas pelas mesmas interações da terciária. A junção de cadeias polipeptídicas pode produzir diferentes funções para as proteínas Um dos principais exemplos de estrutura quaternária é a hemoglobina (Figura 15) cuja estrutura é formada por quatro cadeias polipeptídicas sendo duas alfa e duas beta (BERG; TYMOCZKO e STRYER, 2008).

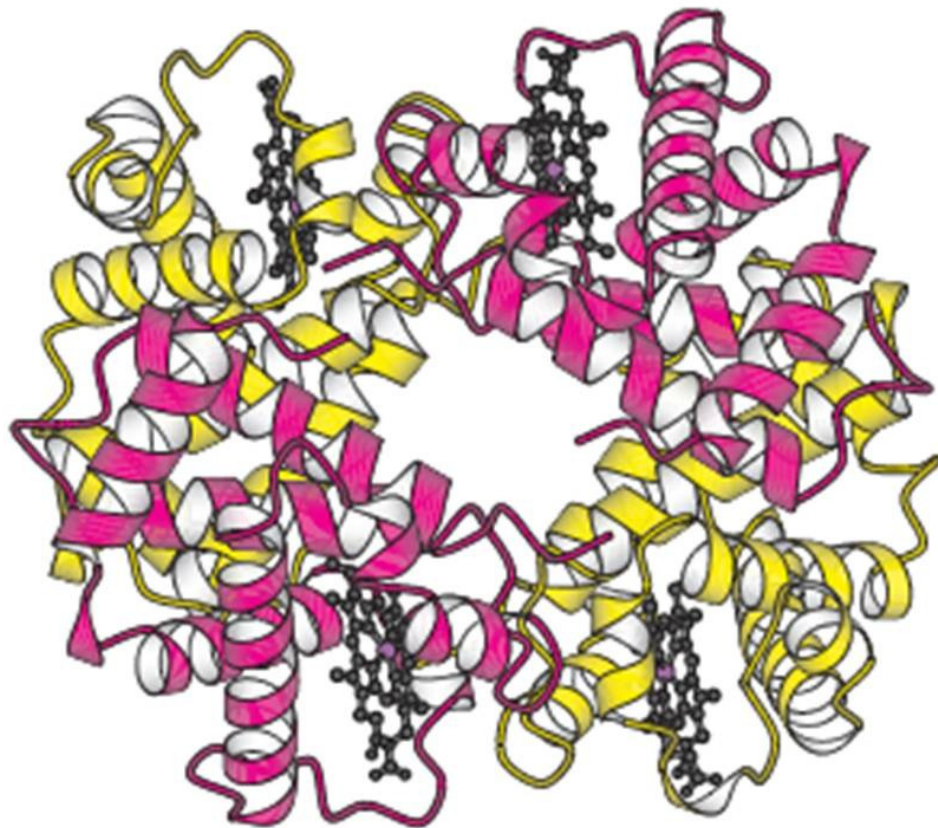


Figura 15: Estrutura da molécula de hemoglobina representando o quarto nível estrutural das proteínas através da presença de duas subunidades alfa (vermelho) e duas subunidades beta (amarelo). Os grupamentos heme estão demonstrados em preto com os átomos de ferro em violeta. **Fonte:** BERG; TYMOCZKO e STRYER (2008)

1.4 PROTEASES

Ligações peptídicas são bastante estáveis em condições naturais, característica esta que se reflete na sua meia vida para hidrólise espontânea, que é de aproximadamente 500 anos na temperatura ambiente e pH 7 (OLIVEIRA et al, 2005). Quando a quebra de peptídeos se faz necessária em sistemas biológicos enzimas que aceleram estas reações se fazem necessárias.

Proteases (proteínases, peptidases ou enzimas proteolíticas) são enzimas que quebram ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas. Proteases realizam funções essenciais em todos os organismos vivos. Elas foram inicialmente reconhecidas como enzimas de ação proteolítica do suco gástrico que estariam envolvidas na degradação das proteínas da dieta alimentar. No entanto, os avanços da biologia molecular e bioquímica trouxeram uma nova visão na qual proteases, além de suas funções não específicas, possuem outras altamente seletivas,

limitadas e eficientes no metabolismo celular pós traducional. Processos proteolíticos influenciam na ovulação, fertilização, desenvolvimento embrionário, formação de ossos, controle do remodelamento de tecidos, crescimento neuronal, apresentação de antígenos, regulação do ciclo celular, regulação dos processos imunológicos, ativação celular, cura de ferimentos, angiogênese e apoptose. Alterações na estrutura e nos padrões de expressão de protease estão envolvidas em processos patológicos tais como câncer, artrite, osteoporose, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. Esta grande variedade de funções deriva da evolução a partir de enzimas simples cuja função era de meras unidades catalíticas inespecíficas, através de proteínas gigantes, tais como a tripeptidil peptidase II, até máquinas precisas de degradação de proteínas como o complexo proteossomo. Em termos de especificidade algumas proteases mostram atividades bastante restritas a um pequeno grupo de proteínas ou até mesmo a somente uma proteína, enquanto outras são claramente promíscuas. Proteases também utilizam distintas estratégias para definir suas atividades intra e extracelulares, e na maior parte das vezes atuam em integração de diferentes substratos, proteases, inibidores, receptores e proteínas de ligação (PUENTE et al, 2003).

O degradoma, que é o conjunto de proteases de um organismo expresso em seus diferentes momentos fisiológicos em diferentes tecidos, já conta nos seres humanos com mais de 553 enzimas diferentes definidas como endopeptidases, quando quebram ligações peptídicas dentro da cadeia de aminoácios, ou exopeptidases, quando atuam nas regiões N ou C terminais destas (PUENTE et al, 2003). Estas enzimas também podem ser classificadas como proteases de serina, proteases de treonina, proteases de cisteína, proteases de ácido aspártico, metaloproteases e proteases de ácido glutâmico. As primeiras três, na quebra da ligação peptídica, utilizam um mecanismo que envolve a formação de um resíduo de aminoácido, serina, treonina ou cisteína, respectivamente. No caso das três seguintes, o processo envolve a formação de uma molécula de água nucleófila que ataca o grupamento carbonila da ligação peptídica (PUENTE e LOPEZ-OTIN, 2004).

1.4.1 Compostos Metálicos com Atividades de Clivagem de Proteínas

Compostos metálicos que clivam peptídeos estão entre as substâncias que mimetizam enzimas que demonstram possibilidade de uso em uma grande variedade de situações, tais como seqüenciamento de proteínas e proteômica. Quando a clivagem de proteínas assistida por metais é realizada em condições não desnaturantes de temperatura e pH, o seu uso pode ser estendido para o estudo das funções protéicas e análise de estruturas, análise do dobramento de estruturas, mapeamento de sítios ativos, sítios de ligação de metais e ligantes, mudanças conformacionais na estrutura das proteínas induzidas por ligantes, geração de proteínas semi sintéticas e terapêutica (LEE e SUH, 2009).

Muitas drogas que atuam sobre doenças relacionadas a proteínas tais como receptores, funcionam através da sua ligação com as proteínas-alvos inativando-as através de sua permanência no sítio de ligação. Drogas baseadas em substâncias capazes de clivar peptídeos, preferencialmente de maneira seletiva, apresentariam muitas vantagens, pois as quantidades necessárias seriam bastante reduzidas uma vez que ao fim da reação a droga catalítica estaria livre para reagir novamente com outra molécula-alvo.

As moléculas que clivam peptídeos podem ser divididas em grupos referentes à sua forma de agir, estrutura e necessidade, ou não, de cofatores para realizar as reações (LEE e SUH, 2009).

1.4.1.1 Compostos Metálicos Que Necessitam de Co-fatores Oxiredutores Para Clivagem de Peptídeos

Estudos foram realizados com compostos metálicos em combinação com aditivos oxiredutores para obter tanto atividade oxidativa quanto hidrolítica. Vários íons metálicos foram utilizados, tais como Cu(I)/Cu(II), Fe(II)/ Fe(III), Cr(III), Ce(V) e Ni(II) (LEE e SUH, 2009). A seletividade destes complexos foi obtida ligando-se os mesmos a moléculas orgânicas que reconheciam proteínas. Como exemplo, para obter um ataque seletivo à calmodulina um composto de EDTA foi ligado ao agonista desta substância, a trifluoroperazina. Este composto promovia o corte seletivo do

composto em presença de Fe(II), O₂ e ditioneitol (LEE e SUH, 2009 apud SHEPARTZ e CUENOUD, 1990) .

1.4.1.2 Compostos Metálicos Que Não Necessitam de Co-fatores Oxiredutores Para Clivar Peptídeos

Vários compostos de cobalto(III) já foram testados quanto à sua capacidade de hidrolizar peptídeos. Esta capacidade é dependente de um aumento da reatividade do centro metálico, ou da concentração efetiva deste metal sobre a ligação peptídica a ser atingida. A reatividade pode então ser modulada por alterações do microambiente por indução de colaboração com grupos catalíticos adicionais, ou pela modificação da estrutura do ligante do centro metálico.

Já foi observado que a atividade proteolítica de um complexo de Cu(II) e ciclono é aumentada quando este é ligado a derivados de poliestirenos. Este aumento de atividade pode ser atribuído ao micro-ambiente hidrofóbico criado (LEE e SUH, 2009).

OLIVEIRA et al (2005) descrevem dois complexos de Cu(II), [Cu(HL1)Cl₂] e [Cu(L1)Cl], com atividade de clivagem de proteína sobre BSA e Taq DNA polimerase. Estes complexos sintetizados a partir de uma reação de cloreto de cobre(II) e o ligante 2-[(bis(piridilmetil)amino)metil]-4-metil-6-formilfenol (HL1) em condições distintas apresentam atividade proteolítica aparentemente específica, pois formam fragmentos específicos após as reações de proteólise que provavelmente é hidrolítica.

1.5 ATIVIDADE DE COMPOSTOS METÁLICOS SOBRE SISTEMAS VIVOS: GENOTOXICIDADE

A interação direta ou indireta com o DNA de células vivas, tanto de organismos unicelulares como pluricelulares pode, na maioria dos casos, originar alterações no código genético destas células. Alterações estas que podem ser transitórias, possíveis de serem reparadas pelos sistemas de reparação de DNA, quanto permanentes, que podem afetar células somáticas ou até mesmo

germinativas e, desta maneira, ganham capacidade de se perpetuar através de gerações.

A genotoxicidade estuda sob os aspectos genéticos, o que perturba a vida ou induz à morte, tanto a nível celular como de organismo. A genotoxicidade é uma especialidade relativamente recente e se situa na interface entre toxicologia e genética, por isto, denominada freqüentemente de genética toxicológica. (ERDTMANN, 2003).

1.5.1 Agentes Genotóxicos

Constantemente, humanos são expostos a vários tipos de agentes genotóxicos, seja pela ingestão de alimentos e bebidas, pela inalação de fumaça e irradiações diversas do meio ambiente, contaminantes atmosféricos impregnados no solo, na água e no ar. (ERDTMANN, 2003).

Esta exposição pode causar diversos efeitos sobre nossa saúde, alguns destes são expressos imediatamente, enquanto outros levam anos ou décadas para se manifestarem. Os principais efeitos são o câncer e doenças genéticas nas gerações seguintes. Continuadamente, pesquisas estão sendo feitas para identificar os agentes genotóxicos, com o objetivo de reconhecer condições da exposição danosa e monitorar populações que podem estar sofrendo exposição excessiva, com o objetivo de prevenir conseqüências adversas sobre a população (ERDTMANN, 2003).

1.5.2 Dano Genético e Mutação

A mutação é definida como sendo qualquer alteração permanente no DNA que não pode ser explicada pela recombinação. Esta mutação normalmente provém de danos causados à molécula de DNA que não puderam ser corretamente reparados pelos sistemas de reparação de DNA normalmente presentes na célula. Mas quando analisa-se todo o processo de alteração do DNA, vamos notar que alguns são chamados de normais, pois são previstos e regulados geneticamente. (NELSON E COX, 2002).

De acordo com a etiologia, as mutações e/ou os danos genéticos são classificados em espontâneos, quando ocorrem sem que haja a interferência de qualquer agente capaz de provocá-los, e induzidos, quando ocorrem com frequência aumentada pela ação de agentes físicos e/ou químicos conhecidos, denominados de agentes mutagênicos. A maioria destes agentes atua diretamente sobre o DNA, seja promovendo a alteração da estrutura, troca, retirada ou adição de pares de bases (nucleotídeos). Outras vezes podem intercalar-se ou incorporar-se ao próprio DNA, com efeitos como quebras simples e duplas nos cromossomos, que podem dar origem a aberrações cromossômicas como inversões, translocações, adições e deleções entre outras (ZAHA, 2003).

Uma série de problemas podem decorrer das mutações. Na grande maioria das vezes, os resultados das mutações são maléficos, incluindo má-formação, câncer, envelhecimento e morte (ERDTMANN, 2003).

1.5.3 Testes Genotóxicológicos e Mutagênicos

Vários testes genotóxicológicos já foram propostos e, em sua maioria, visam avaliar danos fixados, ou seja, mutações pontuais ou alterações cromossômicas, tais como testes de Ames e micronúcleos. Outros avaliam os danos produzidos ao DNA que em um ambiente intracelular ainda podem ser passíveis de reparação, fiel ou não, como por exemplo, o teste cometa (Single cell gel electrophoresis) utilizado neste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a interação de compostos metálicos com DNA e com proteínas, através da atividade de clivagem de DNA, genotoxicidade, atividade proteolítica, espectrofotometria e atividade antibacteriana.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Análise da atividade de clivagem de DNA pelos compostos através de sua reação com DNA plasmidial e emprego de técnicas de eletroforese para verificação de concentração e pH ótimos, forma de atuação e parâmetros cinéticos.
- Verificação de atividade dos compostos sobre DNA através de testes de genotoxicidade (teste cometa) em sangue periférico de camundongos e leucócitos humanos totais.
- Análise da atividade de clivagem de proteína pelos compostos através de sua reação com a proteína BSA e emprego de técnicas de eletroforese.
- Análise da interação dos compostos com a proteína BSA e DNA de timo de vitelo por espectrofotometria de varredura e dicroísmo circular.
- Verificação da atividade antibacteriana frente a bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (gram+ e gram-) para verificação de concentração inibitória mínima e concentração letal de 50% (CL₅₀).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 COMPOSTOS

3.1.1 Compostos binucleares de Cobre $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})\text{L}_2]$

Os compostos desta família, $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{C}_{21}\text{H}_{33}\text{ON}_6)]^{2+}$ (composto 1) $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{C}_{27}\text{H}_{33}\text{ON}_6)(\text{ClO}_4)]^+$ (composto 2) e $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})(\text{C}_{27}\text{H}_{24}\text{O}_2\text{N}_4)]^+$ (composto 3) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Nicolas A. Rey, do Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC), do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, sob a orientação do Prof. Dr. Ademir Neves. Estes três compostos diferem entre si pela estrutura e combinação de seus ligantes. São modelos miméticos de catecol oxidases, que pertencem à classe das oxiredutases e são encontradas em vegetais. Estas catalisam a reação de oxidação de catecóis as suas correspondentes quinonas envolvendo dois elétrons associados com a redução de oxigênio molecular para água. Os modelos utilizados neste trabalho contêm um centro dinuclear de Cu(II) em seu sítio ativo e suas estruturas estão descritas na figura 16.

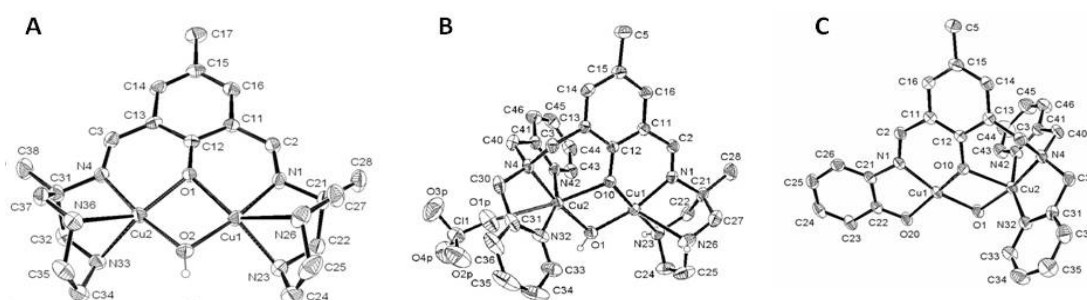


Figura 16: ORTEP do composto binucleares de $[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})\text{L}_2]$ 1 (A) 2 (B) e 3 (C)

3.1.2 Compostos Mono e Binucleares de Ferro

Os compostos mono e binucleares de Fe(II), sintetizados por Parrilha (2008) foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Adolfo Horn da Universidade Federal

Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, em um trabalho de cooperação com este laboratório.

No composto $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})(\text{SO}_4)]_2\text{-}\mu\text{-oxo}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (composto 4) os dois átomos de ferro estão coordenados por duas piridinas, uma amina e um álcool do ligante HPCINOL, uma ponte oxo e um íon sulfato monodentado. A estrutura é um dímero unido pela ponte oxo (Figura 17 A). Este composto é bastante solúvel em água e apresenta 4 pontos de protonação/desprotonação com valores pKa de 2.77(3), 4.34(6), 8.07(4) e 8.58(8) (PARRILHA et al, 2008).

No composto $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})\text{Cl}_2]\cdot\text{NO}_3$ (composto 5) um átomo de Fe(II) está coordenado por duas piridinas, uma amina e um álcool do ligante HPCINOL, mais uma oxidrila e dois íons cloro monodentados (Figura 17 B).

Bastante semelhante ao composto anterior, no composto $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})(\text{Cl})]_2\text{-}\mu\text{-oxo}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (composto 6) os dois átomos de ferro estão coordenados por duas piridinas, uma amina e um álcool do ligante HPCINOL, mais uma ponte oxo e um íon cloro monodentado. A estrutura é um dímero unido pela ponte oxo (Figura 17 C). Este composto é possui alta solubilidade em água.

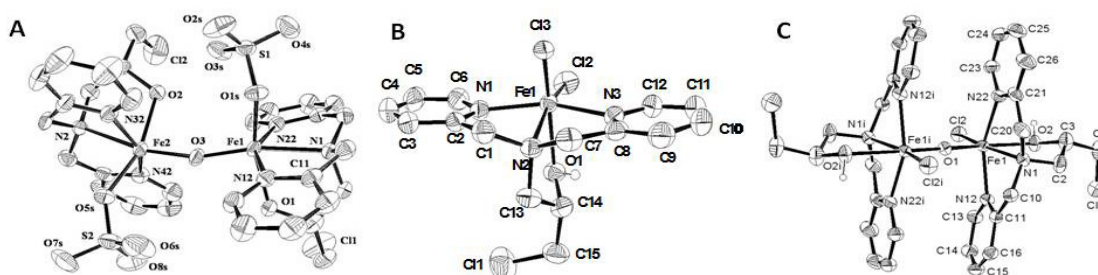


Figura 17: ORTEP dos compostos $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})(\text{SO}_4)]_2\text{-}\mu\text{-oxo}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou composto 4 (A), $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})\text{Cl}_2]\cdot\text{NO}_3$ ou composto 5 (B) e $[\text{Fe}(\text{HPCINOL})(\text{Cl})]_2\text{-}\mu\text{-oxo}\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ou composto 6 (C)

3.1.3 Compostos Binucleares de Ferro(III)Zinco(II)

Foram sintetizados (PERALTA, 2005) quatro novos complexos heterobinucleares de Fe(III)Zn(II) biomiméticos da enzima fosfatase ácida púrpura. Estas enzimas são responsáveis pela imobilização de ésteres orgânicos de fosfato em plantas; pelo transporte de ferro durante a gestação, em mamíferos e pela geração de espécies ativas de oxigênio macrófagos específicas.

Os compostos modelos diferem entre si pela adição de substituintes (doadores ou receptores de elétrons) ao ligante polidentado principal. São então nomeados: FeZnCH₃, FeZnH, FeZnBr e FeZnNO₂ (compostos 7,8,9 e 10 respectivamente). Estes complexos foram descritos primeiramente por Neves et al. (2007) e sua estrutura geral está demonstrada na figura 18 A e B.

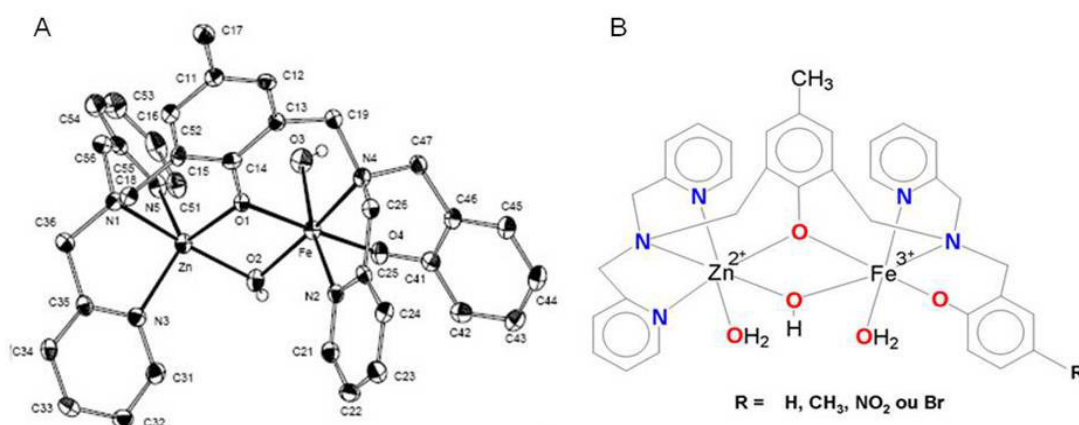


Figura 18: Ortep do composto FeZnH (A) e representação esquemática dos compostos binucleares de Ferro(III) e Zinco(II) biomiméticos de fosfatases ácidas púrpuras (B) onde R é OH, CH₃, BR ou NO₂.
Fonte: Neves et al, (2007)

3.1.4 Compostos Mononucleares de Fe(II) Derivados de Fenantrolina

Estes compostos, derivados de fenantrolina que combinada a metais apresenta normalmente a capacidade de intercalar nos sulcos maior e menor do DNA (GHARAGOZLOU, 2008, apud SIGMANN et al, 1979) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Fábio da Silva Miranda, quando aluno do Programa de Pós-Graduação em Química sob a orientação do Prof. Dr. Ademir Neves e estão divididos em dois grupos. O composto do primeiro grupo, nomeado $[\text{Fe}(\text{dpq-dtZol})_2(\text{OH}_2)_2]^{+2}$ (composto 11), está estruturado em um núcleo de Fe(II) que coordena duas unidades do ligante dpq-dTzoll e duas moléculas de água. O ligante é constituído de uma molécula derivada de fenantrolina, a dipirido[3,2-f:2',3'-h]quinoxalinas (dpq) e duas unidades de tetrazol associadas, que lhe conferem melhor solubilidade em água e grande quantidade de átomos de nitrogênio para estabelecimento de ligações de hidrogênio. As possíveis formas do composto (*cis* e *trans*) estão demonstradas na figura 19.

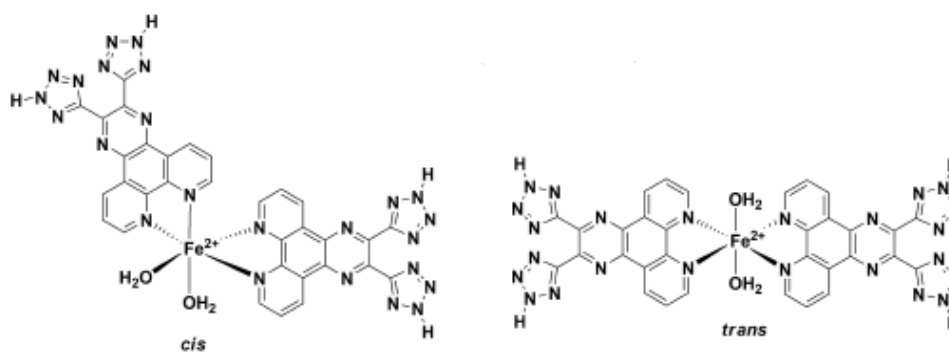


Figura 19: Representação esquemática do composto 11 ($[\text{Fe}(\text{dpq-dtZol})_2(\text{OH}_2)_2]^{+2}$) nas formas *cis* e *trans* respectivamente.

Fonte: Miranda (2008)

O segundo grupo é constituído por compostos mononucleares de Fe(II) complexados a três unidades de ligantes que ocupam todos os centros de coordenação do metal. Estes compostos foram nomeados $[\text{Fe}(\text{dpq})_3]^{+2}$ (composto 12), $[\text{Fe}(\text{dpqQX})_3]^{+2}$ (composto 13) e $[\text{Fe}(\text{dppz})_3]^{+2}$ (composto 14) onde dpq é dipirido[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxalina, dpqQX é dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]quinoxalina[2,3-*b*]quinoxalina monohidratada e dppz é dipirido[3,2-*a*:2',3'-*c*]fenazina. As prováveis estruturas destes complexos estão descritas na figura 20A, B e C respectivamente.

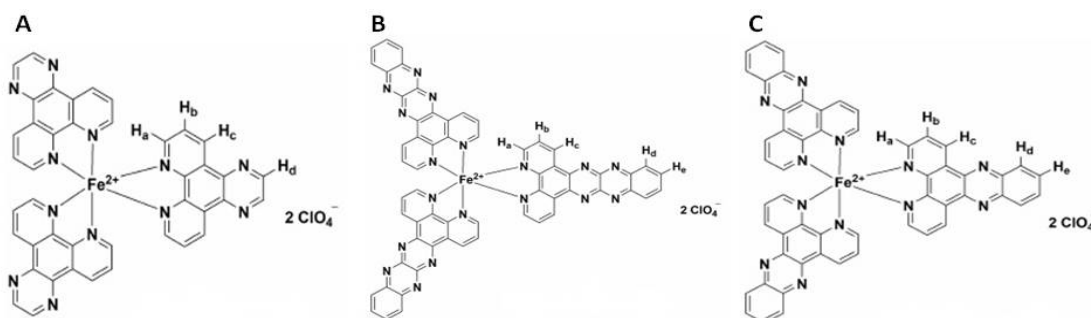


Figura 20: Representação esquemática dos compostos 12 ($[\text{Fe}(\text{dpq})_3]^{+2}$ - A), 13 ($[\text{Fe}(\text{dpqQX})_3]^{+2}$ - B) e 14 ($[\text{Fe}(\text{dppz})_3]^{+2}$ - C)

Fonte: Miranda (2008)

3.2 INTERAÇÃO COM DNA “*IN VITRO*”: ATIVIDADE DE CLIVAGEM DE DNA

Além de sua forma normal superenovelada (F I) o DNA plasmidial pode possuir a forma circular aberta (F II) e a forma linear (F III). Quebras na dupla hélice fazem com que a forma superenovelada transforme-se em forma circular aberta

através de quebras simples e forma linear através de quebra dupla de cadeia (Figura 21). Todas as três possuem velocidades de migração eletroforética diferenciadas, apresentando-se como bandas distintas em géis de eletroforese, como demonstrado nas figuras 22 e 23 (Sreddhara and Cowan, 2001).

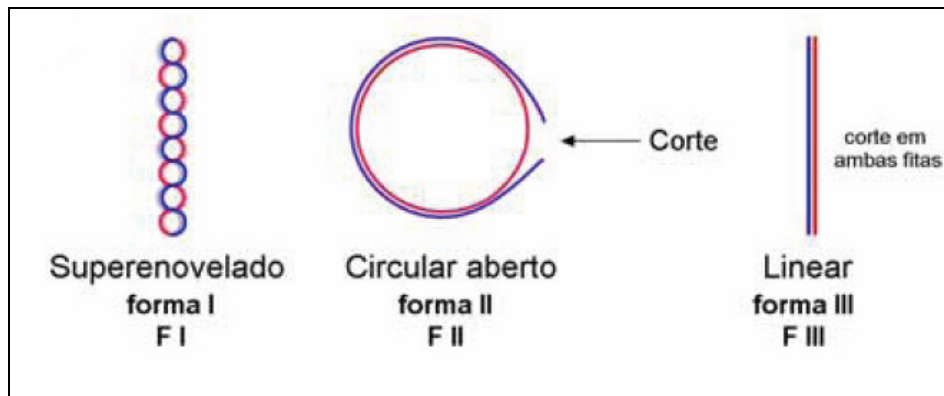


Figura 21: Esquema de Corte da Molécula de DNA Plasmidial
Fonte: modificado de Berg; Tymoczko e Stryer, (2004)

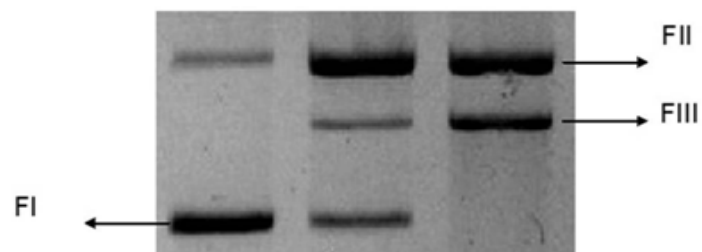


Figura 22: Fotografia de um gel de agarose demonstrando a separação das formas do DNA plasmidial
Fonte: autor

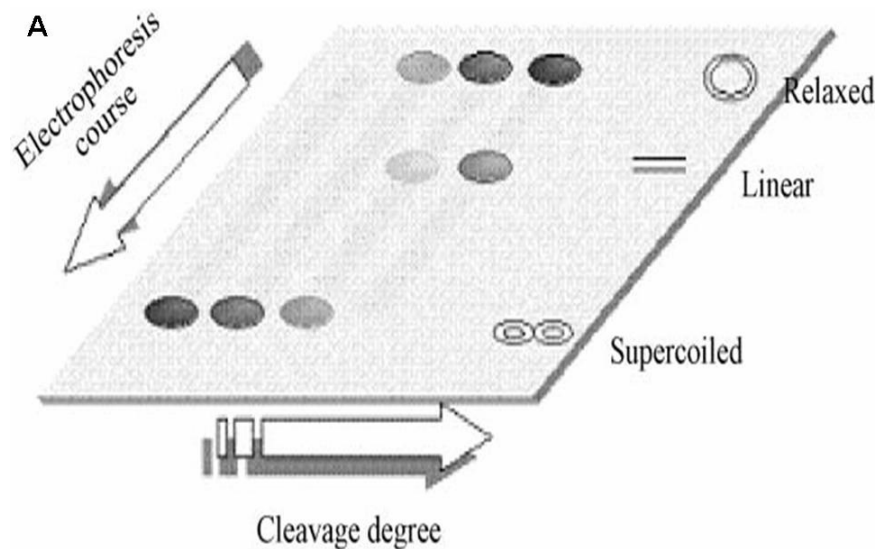


Figura 23: Aparência típica de um gel obtido a partir de análise de concentrações variadas de compostos e conseqüente corte de DNA plasmidial
Fonte: Mancin et al, 2005

3.2.1 DNA Plasmidial

3.2.1.1 Preparação de Células Competentes

Essa metodologia foi empregada com a finalidade de tornar cepas bacterianas capazes de incorporar facilmente fragmentos de DNA, através de tratamento químico, conforme procedimento descrito por AUSUBEL et al. (2002).

A partir de uma pré-cultura de bactéria *E.coli* DH5alfa 4 mL de células bacterianas foram inoculados em 300 ml de meio LB líquido (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1% em pH 7,5). Esta cultura foi incubada a 37°C, sob agitação (140 rpm), até atingir DO A₅₉₀ = 0,4 (aproximadamente 18 horas). Após esta etapa a cultura bacteriana foi dividida em alíquotas em tubos de centrifuga e mantida em banho de gelo por 10 minutos. As alíquotas foram centrifugadas por 7 minutos a 1600 x g a 4 °C, o sobrenadante foi desprezado, foiram acrescentados 10 mL de solução de CaCl₂ gelada(CaCl₂ 60 mM, glicerol 15%, tampão PIPES 10 mM pH 7,0) seguido de nova centrifugação por 5 minutos,1600 x g à 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado restante foi suspenso em 10 ml de solução de CaCl₂, e mantido em banho que gelo por 30 minutos. Este material foi centrifugado mais uma

vez por 5 minutos em $1600 \times g$ a 4°C , o sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspense em 1,5 ml de solução de CaCl_2 , e então dividido em alíquotas de 50 μl e armazenadas em freezer (-80°C), para posterior utilização experimental.

3.2.1.2 Transformação das Células Bacterianas Competentes

A transformação bacteriana tem por objetivo introduzir o plasmídeo desejado nas bactérias competentes, através do choque térmico. Com esse método obtém-se em placas de petri com meio sólido, colônias de bactérias transformadas com o plasmídeo desejado. (AUSUBEL, 2002).

Soluções contendo as bactérias competentes e o plasmídeo desejado foram retiradas do freezer -80°C e descongeladas em banho de gelo. Foram transferidas 10 μL de solução de plasmídeo para um tubo de ensaio com 50 μl de suspensão de bactérias, onde foram mantidos em repouso por 15 minutos em banho de gelo. Um choque térmico em banho Maria a 42°C por 1 minuto foi aplicado seguido da adição ao tubo de 1,0 mL de meio LB líquido. Este foi levado para uma estufa 37°C por 60 minutos. Após este período o tubo foi centrifugado por 2 minutos a $5000 \times g$, e foram retirados 750 μL do sobrenadante, ressuspensando as células bacterianas nos 250 μl restantes. Esta suspensão de bactérias foi plaqueada com ajuda de uma alça de vidro, em uma placa de petri contendo o meio LB sólido (peptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, agar 1,5% em $\text{pH} = 7,5$) e ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de meio LB – antibiótico utilizado para a seleção das bactérias portadoras do plasmídeo). Esta placa foi levada para estufa a 37°C e incubada por 24 horas para o crescimento bacteriano podendo ser armazenada em geladeira por no máximo 10 dias.

3.2.1.3 Extração de DNA Plasmidial a Partir de Células Bacterianas

A extração foi realizada utilizando-se o HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit, QIAGEN, onde se seguiu o protocolo padrão do fabricante, como mostrado na figura 24, que representa esquematicamente o processo de extração do DNA plasmidial. A

partir deste procedimento obtém-se normalmente quantidades superiores a 90% de DNA plasmidial intacto, que se mantém em sua forma superenovelada.

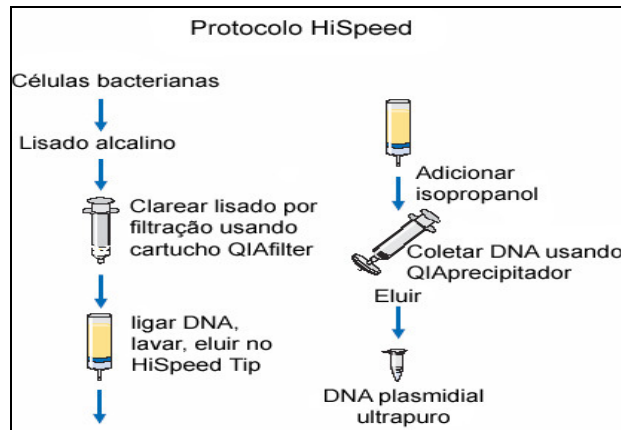


Figura 24: Esquema representativo do método da extração do DNA
Fonte: QIAGEN, HiSpeed™ Plasmid Maxi Kit

3.2.1.4 Análise de Pureza, Grau de Degradação e Quantificação do DNA Plasmidial

A quantificação e pureza do DNA plasmidial, foi realizada em um espectrofotômetro Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences. Para quantificação utiliza-se o programa interno do aparelho que expressa o resultado em ng/μL. Para a análise de pureza verifica-se a razão entre a absorbância de ácidos nucleicos (260 nm) sobre a absorbância de proteínas (280 nm) onde valores entre 1,8 e 1,9 indicam uma solução de DNA com alta pureza. (OLIVEIRA, 2006). Para análise do grau de degradação do DNA realiza-se uma observação visual em gel de eletroforese.

3.2.2 Verificação da Atividade de Clivagem de DNA Dependente de pH e concentração

Incubações contendo 600 ng de DNA plasmidial em diferentes pHs a 50°C com concentrações variadas dos compostos ou ligantes e sem a presença dos mesmos (controles negativos), foram preparadas e tratadas conforme descrito por SCARPELLINI *et al* (2003). Após um período de incubação de 16 horas foram realizadas corridas eletroforéticas em gel de agarose com brometo de etídeo

(AUSUBEL *et al*, 2002), a partir das quais as imagens foram adquiridas. Procedeu-se a avaliação das quantidades proporcionais das três formas de plasmídios comparando as diferentes concentrações entre si e com os controles utilizando o programa Labworks Software v 4.0 (UPV inc.). A intensidade de plasmídio superenovelado foi corrigida por um fator de 1,47 como um resultado da sua menor capacidade de corar com brometo de etídeo (SREEDHARA, FREED e COWAN, 2000).

Quando o ligante isolado (não complexado) era fornecido pelo grupo encarregado da síntese do composto, o mesmo procedimento era executado para análise das propriedades deste.

3.2.3 Interação do composto com moléculas de DNA na presença de distamicina

Para avaliar se os compostos atuam através do sulco maior ou do sulco menor do DNA, foram realizados experimentos em presença e ausência de distamicina (Figura 25) (LANZMASTER *et al*, 2005), que promove inibição competitiva pela ligação na cavidade menor do DNA (HIRAKU, OIKAWA, KAWANISHI, 2002). O DNA plasmidial foi pré-incubado em presença e ausência de distamicina, na concentração de 30 μM e utilizado em incubações contendo 600 ng. Estas incubações foram realizadas com concentrações variadas de composto e controles negativos. As reações foram mantidas a 50°C pelo período de 2 a 4 horas. Amostras foram submetidas a eletroforese, fotografadas e analisadas como descrito anteriormente.

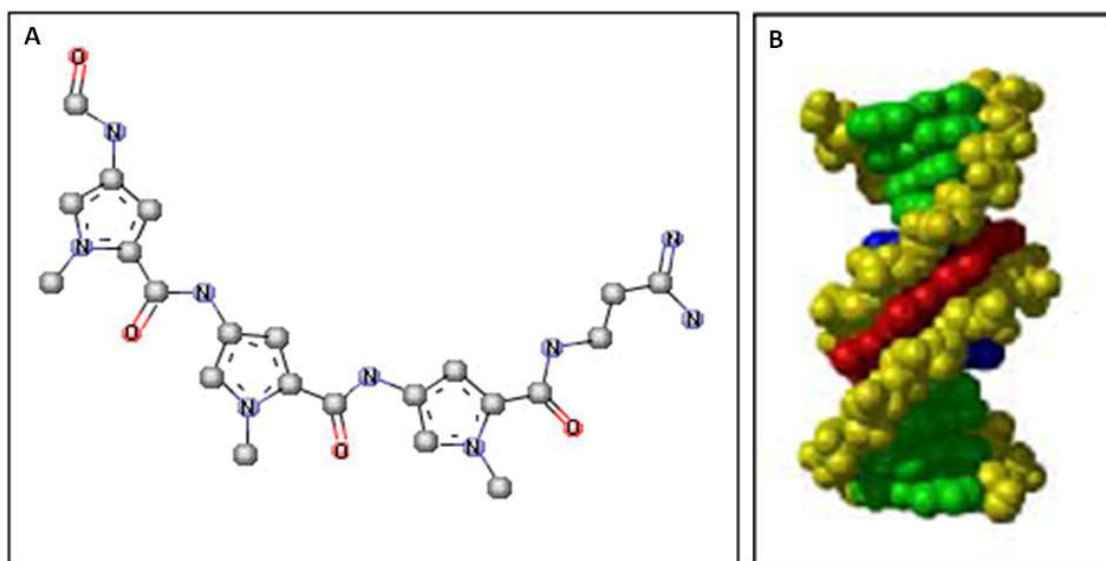


Figura 25: Estrutura molecular da distamicina (A). B: Ligação específica da distamicina (vermelho) ao sulco menor do DNA

Fonte: Severino, 2008; apud sítio:

http://www.pharmacy.umaryland.edu/courses/PHAR531/lectures_old/fig/dna_fig8a.gif - acessada em 25/04/2006

3.2.4 Interação dos compostos com moléculas de DNA na presença de DMSO

Para avaliar se os compostos atuam de maneira hidrolítica ou oxidativa sobre o DNA, foram realizados experimentos em presença e ausência de DMSO, que captura espécies reativas de oxigênio (SCARPELLINI et al, 2003). O DNA plasmidial foi incubado em presença e ausência de DMSO na concentração de 10% com concentrações variadas de composto controles negativos. Estas foram mantidas a 50° C pelo período de 2 a 4 horas. Amostras foram submetidas a eletroforese, fotografadas e analisadas como descrito anteriormente.

3.2.5 Interação do composto com moléculas de DNA na ausência de oxigênio

Quando os testes de atividade em presença de ou ausência de DMSO produziram resultados inconclusivos ou que necessitassem de confirmação, experimentos em atmosfera de argônio foram realizados (LANZMASTER *et al*, 2005). Estes experimentos tiveram como objetivo classificar como hidrolítica ou oxidativa o tipo de reação ocorrida no corte das moléculas de DNA plasmidial. Para este

experimento a água e os tampões foram deaerados em um dessecador com atmosfera de pressão negativa e agitação e posteriormente equilibrados em atmosfera de argônio. Todas as soluções foram preparadas em atmosfera de argônio gerada em um “saco de manipulação” vedado. As incubações foram realizadas em pH ótimo para cada composto, na temperatura de 50°C por 2 a 4 horas em um dessecador preenchido com argônio em pressão negativa. [Fe(EDTA)] foi utilizado como controle para a presença de oxigênio, uma vez que o mesmo somente promove cortes no DNA de maneira oxidativa, necessitando de oxigênio livre para gerar espécies reativas de oxigênio (EROS). As mesmas soluções foram imediatamente utilizadas para experimentos em atmosfera rica em oxigênio (ambiente). Após a incubação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose, fotografadas e analisadas como descrito anteriormente.

3.2.6 Cinética de interação dos compostos com DNA com saturação de agente catalítico (cinética pseudo-michaeliana)

A razão de corte da molécula de DNA em várias concentrações dos compostos foi estabelecida. Reações em pHs específicos contendo DNA plasmidial e concentrações variadas dos compostos estabelecidas de acordo com os experimentos de atividade dependente de pH e concentração (item 3.6.1), foram incubadas a 50°C e alíquotas foram coletadas em intervalos de tempo determinados pela atividade anteriormente demonstrada. Cada série de amostras de uma concentração foi analisada em gel de agarose como descrito anteriormente e o valor de sua constante catalítica (K_{obs}) foi determinado como função logarítmica neperiana (\ln) de S/S_0 onde S é a concentração da FI do plasmídeo na amostra e S_0 é a concentração da mesma forma no momento do início da reação. Estes dados são então graficados versus a concentração do composto e analisados como uma reação cinética de primeira ordem (Michaelis - Menten) a partir da qual são obtidos os valores de K_{cat} e K_m . A partir destes resultados podem ser calculados os valores de eficiência catalítica e aumento da velocidade de degradação da molécula de DNA comparada com a velocidade de reação da clivagem do substrato não catalisada (SREEDHARA, FREED and COWAN, 2000).

Esta reação é chamada de “pseudo Michaelis – Menten”, pois ao contrário da reação original, onde se mantém constante a concentração do catalisador variando a concentração do substrato, procede-se de maneira inversa, mantendo constante a concentração do substrato. Neste caso é observada uma situação onde uma única reação ocorre por molécula de catalisador diferentemente da situação clássica onde várias reações são realizadas por molécula de catalisador (SREDHARA e COWAN, 2001).

3.2.7 Cálculo da Especificidade de Sítio de Corte de DNA

O cálculo se baseia na equação de Cowan, Collis e Grigg (1987), a partir da equação de Freifelder e Trumbo (1969), que utilizam proporções das formas FI, FII e FIII para calcular a razão de cortes simples (FII) e cortes duplos (FIII) através das fórmulas $n_1 = -\ln(f_I(1+n_2))$ e $n_2 = f_{III}/(1 - f_{III})$, onde n_1 é o número de cortes simples, n_2 o número de cortes duplos, f_I a fração da forma superenovelada e f_{III} a fração da forma linear. As proporções das formas de DNA plasmidial normalmente expressas como números percentuais devem ser expressas sob a forma de frações e os resultados de n_1 e n_2 são médias de cálculos realizados a partir de experimentos em várias concentrações. Posteriormente calcula-se a razão entre n_1 e n_2 . Foi postulado que um valor de $n_1/n_2 = 120$, caracteriza o corte duplo como puramente randômico, portanto, valores baixos de n_1/n_2 caracterizam os cortes duplos como específicos. Deve-se levar em consideração o fato de que somente é possível a determinação de n_1 , n_2 e n_1/n_2 quando, na mesma reação, o DNA assumir no mínimo 0,01% de cada uma das formas (I, II e III). São obtidos ainda resultados do número de cortes simples por mol (μmol no caso) de composto através da divisão de n_1 pela concentração de composto utilizado no experimento. O resultado é expresso como uma média calculada a partir de vários experimentos.

3.3 ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS COMPOSTOS COM PROTEÍNAS

Estas análises visam identificar entre os compostos com atividade sobre o DNA plasmidial, aqueles com capacidade de atuar como proteolíticos. As técnicas de estudo são descritas a seguir.

3.3.1 Teste de Clivagem de Proteína Albumina de Soro Bovino (BSA)

Neste teste, diferentes condições foram utilizadas para cada composto, alterando as concentrações do mesmo e a temperatura de incubação, de acordo com os resultados previamente obtidos. A proteína BSA, na concentração de 10 μ M, foi incubada em 50 mM de tampão HEPES pH 7,5. No final do período de incubação foi adicionada uma alíquota de tampão para corrida eletroforética 2X (100mM Tris-HCL pH 6,8; 7% SDS; 20% glicerol; 2% betamercaptoetanol e 0,01% azul de bromofenol). Estas amostras de proteína foram submetidas a um gel SDS-PAGE descontínuo (4% e 10% de acrilamida) em cuba de eletroforese vertical (Ausubel et al, 2002). Os géis foram corados com coomasie blue ou nitrato de prata. As imagens computadorizadas dos géis foram produzidas para eventual análise e quantificação de proteína utilizando-se o programa Labworks Software v 4.0 (UPV inc.).

3.3.2 Titulação Espectrofotométrica da Interação Composto/DNA de Timo de Vitelo (CT-DNA) e Composto/proteína (BSA)

Estes testes são realizados com o objetivo de verificar alterações na estrutura dos compostos decorrentes da interação com seus substratos.

3.3.2.1 Titulação Espectrofotométrica da Interação Composto/DNA de Timo de Vitelo

Foi utilizada a titulação espectrofotométrica dos compostos metálicos em estudo com CT-DNA para se caracterizar a ligação destes compostos com moléculas

de DNA (NAVARRO et al., 2003; BALDINI et al, 2003; ZANG et al, 2004). Para tanto, foram registrados espectros eletrônicos de varredura UV-Vis de soluções com valores crescentes de [CT-DNA]/[composto], para cada composto. A concentração de cada complexo foi previamente determinada por varredura UV-Vis. Foi utilizada para os experimentos a concentração que proporcionou um sinal de boa qualidade com pico de absorção bem definido. Estas soluções foram analisadas imediatamente após seu preparo, ou após um período de incubação que permitisse uma maior interação do composto com o substrato. Com esses espectros, foram avaliadas mudanças na absorção dos compostos, bem como deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima.

3.3.2.2 Titulação Espectrofotométrica da Interação Composto – Proteína (BSA)

Para estes experimentos foi utilizada a mesma metodologia descrita no item anterior somente substituindo o DNA de timo de vitelo por proteína BSA em concentrações valores crescentes de [CT-DNA]/[composto]. Novamente, com esses espectros, foram avaliadas mudanças na absorção dos complexos, bem como deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima.

3.4 ANÁLISE DA INTERAÇÃO COMPOSTO/PROTEÍNA (BSA) POR DICROÍSMO CIRCULAR

Os testes de interação composto/DNA de timo de vitelo através de dicroísmo circular foram executados conforme procedimentos descritos por Gharagozlou (2008), Chandrayan et al (2008) e Fu et al (2008) com adaptações. Reações contendo proteína BSA na concentração de 10 μ M em tampão HEPES pH7,5 na concentração de 10 mM foram estabelecidas com concentrações crescentes de composto (0, 10, 20 40, 60 e 80 μ M) e analisadas em um espectropolarímetro Jasco J-810 utilizando uma cubeta de 120 μ L em temperatura de 25°C. As leituras foram realizadas de 190 a 350 nm na velocidade de 200 nm/min.

3.5 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Várias substâncias com atuação sobre DNA plasmidial podem ser utilizadas como substâncias bactericidas ou bacteriostáticas. Testes de inibição de crescimento podem ser utilizados para verificação da eficiência destes compostos frente a várias cepas bacterianas.

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram determinados pelo método de diluição em microcultura (INOUE et al, 2006). Os compostos eram dissolvidos e adicionados nas concentrações especificadas em nutriente BHI. De uma suspensão de células (10^7 UFC) 10 μ l foram adicionados a 90 μ l de meio contendo composto e estes foram incubados a 37°C por 24 horas sem agitação. As amostras foram diluídas em 1,9 mL de solução de NaCl e observadas por espectrofotometria (OD_{600}) e comparadas ao meio diluído e isento de células como controle. A CIM foi determinada como a menor concentração na qual não houve alteração no meio quando comparado ao controle.

3.6 Testes de Interação com DNA *in vivo*: Genotoxicidade

3.6.1 Testes de Genotoxicidade e Cinética de Interação em Camundongos: Teste Cometa

Este teste, também chamado de Single Cell Gel Electrophoresis Assay (SCGE), é capaz de detectar danos ao DNA induzido por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. (VILELA, 2003).

São disponíveis dois protocolos para realização do teste que estão relacionados com o pH utilizado e, conseqüentemente, com a sua abrangência: a) versão neutra, detecta quebras duplas nas moléculas de DNA e *crosslink*, e b) versão alcalina, que detecta quebras de fita única e dupla, sítios álcalilábeis (sensíveis a pH alcalino) e eventos de ligação entre cadeias (*Crosslinks*). (VILLELA, 2003).

Nota-se que este teste tem seu procedimento bastante rápido e, além disso, possui uma sensibilidade bastante grande, tendo um indicativo bem apurado de dano ao DNA (GUECHEVA, 2003).

O início do teste se dá com células embebidas em agarose, onde suas membranas são rompidas por detergentes e suas proteínas nucleares (inclusive as histonas) extraídas com altas concentrações de sais. Por definição, o resultado deste processo será um nucleóide, ou seja, uma série de alças superenoveladas de DNA desprovidas de histona. (RIBEIRO, 2003).

Como estes nucleóides serão submetidos à corrente elétrica, caso exista quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofrerá mudanças, visto que as alças de DNA se desenovelam formando um halo, permitindo uma migração dos fragmentos e caracterizando uma cauda que deu origem ao nome do teste (RIBEIRO, 2003). A temperatura do experimento e o tempo de duração da eletroforese devem ser padronizados, pois estas variáveis podem influenciar negativamente nos resultados obtidos com o teste. (SPEIT *et al*, 1999).

Muitas vantagens são percebidas no ensaio cometa e, quando este é comparado a outros testes para detecção de substâncias que promovem dano ao DNA, este tem se mostrado bastante sensível. Porém, não é utilizado para detectar mutação, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem vir a ser restauradas, ou resultar em danos permanentes (RIBEIRO, 2003).

3.6.1.1 Formação dos Grupos Amostrais e Tratamento

Após aprovação pelo comitê de ética, para os testes de genotoxicidade foram utilizados camundongos CF1 machos, com idade entre 6 e 12 semanas, fornecidos pelo biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais utilizados nos testes foram selecionados aleatoriamente. Foi realizada uma distribuição aleatória de indivíduos em caixas contendo seis indivíduos cada para cada grupo teste e para os controles positivos e negativos. Após a formação dos grupos, os animais foram pesados, não devendo esta exceder 20% para mais ou menos o peso médio dos indivíduos. Os animais tiveram suas caudas marcadas com listras de um a seis com caneta marcadora.

Os animais foram tratados com os compostos via intraperitoneal, em doses estabelecidas conforme os resultados dos experimentos de interação com DNA plasmidial, utilizando-se doses que tenham apresentado capacidade de quebrar DNA. Somente foram testados compostos que tenham apresentado resultados positivos nestes testes. Os veículos para os compostos são aqueles recomendados pelos pesquisadores responsáveis pela síntese, buscando-se sempre os mais inócuos o possível, visando não interferir com os resultados bem como diminuir ao máximo o desconforto do animal. Os tratamentos são seguidos de retiradas de sangue de cauda para realização de teste cometa, nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos. Para obtenção de material para teste de micronúcleos os animais foram sacrificados 24 horas após o tratamento.

3.6.1.2 Realização do Teste Cometa

A preparação e a análise do ensaio cometa foi realizada como descrito por Silva et al (2000) com algumas adaptações e está explicitada de forma esquemática na figura 26.

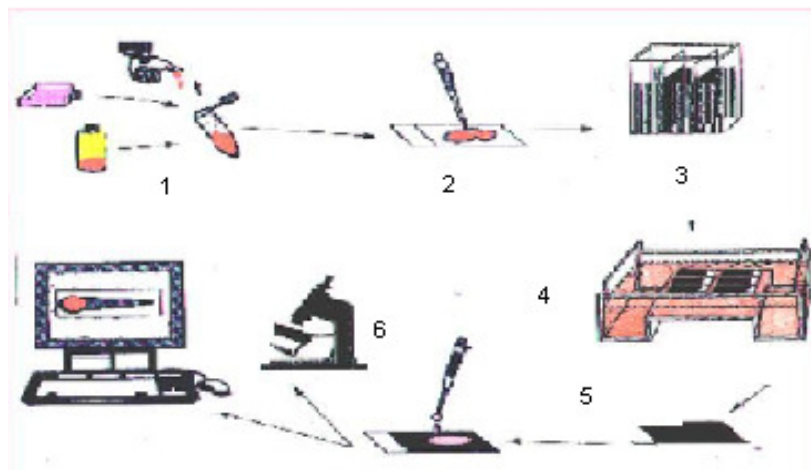


Figura 26: Descrição simplificada do teste cometa: 1 – Preparação das amostras, controle positivo, controle negativo, e amostras teste. 2 – As amostras são imersas em gel de agarose. 3 – As células são lisadas numa solução com altas concentrações de sais e detergente. 4 – As lâminas são submetidas a eletroforese. 5 – As células são coloridas com substancias redutoras (nitrato de prata) 6 – Leitura analisando o tamanho e intensidade da cauda do cometa

Fonte: adaptado de Silva, Erdtmann, Henriques (2003)

As amostras foram preparadas com 5 µl de sangue periférico provenientes dos camundongos dos grupos teste e controle, com 90 µl de agarose de baixa fusão (0,75%) sob uma lâmina pré-coberta com agarose (1,5%), onde foi adicionada uma lamínula para moldar o gel. Em seguida as lâminas foram levadas a um refrigerador a 8°C durante 5 minutos (até que a camada de agarose solidificasse). A lamínula foi removida cuidadosamente e as lâminas posicionadas em uma cubeta contendo solução de para rompimento de membranas (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 10 mM Tris; 1% Triton X-100 e 10% DMSO). Após 2 horas as lâminas foram retiradas da solução e acondicionadas com a parte horizontal do gel em uma cuba de eletroforese contendo solução tampão de eletroforese (300 mM NaOH; 1 mM EDTA; pH 13,00–13,50) suficiente para cobrir todas as lâminas por 20 minutos. A corrida eletroforética foi realizada por um período de 15 minutos nas condições de 25 Volts, 300 miliamperes e temperatura de 8° C. Todas as etapas descritas foram realizadas sob luz amarela para evitar a indução de danos ao DNA. Após a eletroforese as lâminas foram retiradas cuidadosamente da cuba e o tampão neutralizado utilizando solução de 0,4 M Tris HCL; pH 7,5. Este processo foi repetido três vezes em intervalos de 5 minutos, seguindo-se enxague com água destilada e desidratação das lâminas em uma estufa a 37° C. Posteriormente as lâminas foram hidratadas com água destilada e fixadas com solução de 15 g de ácido Tricloracético; 5 g sulfato de zinco (7 H₂O); 5 mL glicerol; para 100 mL água destilada por 10 minutos. As lâminas, lavadas três vezes com água destilada, foram levadas a estufa 37° C por 1 hora e 30 minutos para secagem. Após re-hidratação com água destilada as lâminas foram acondicionadas em uma cubeta protegida da luz, contendo 66 mL de solução de 10 g de carbonato de sódio em 200 mL de água destilada e 34 mL de solução de 0,1 g de Nitrato de amônio; 0,1g de Nitrato de prata; 0,25g de ácido tungstosílico; 0,15 mL de formaldeído; em 100 mL de água destilada por 15 minutos em banho Maria a 37°C para coloração. As lâminas foram retiradas da cubeta contendo solução de coloração e levadas para uma cubeta contendo solução de 1mL ácido acético em 100 mL de água destilada por 5 minutos para término do processo e de onde foram lavadas em levadas para a secagem em estufa a 37°C.

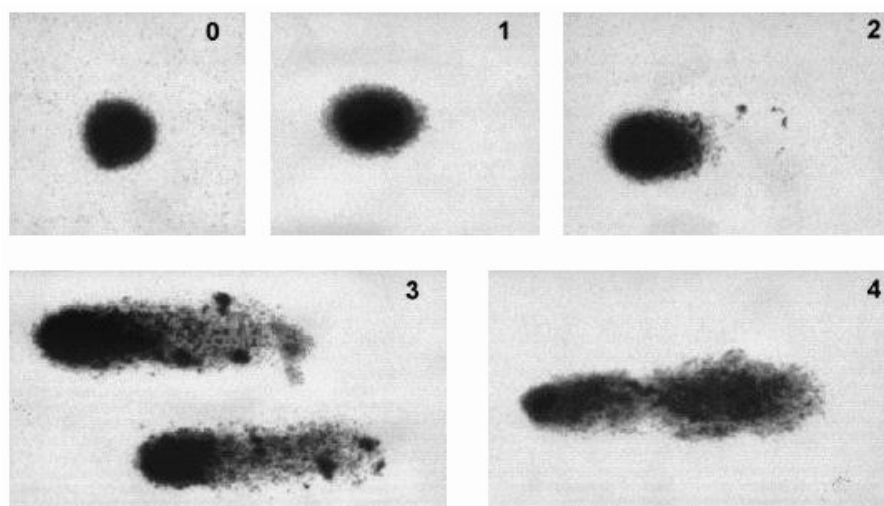


Figura 27: Classificação dos danos no DNA. (onde a classe de dano índice 0 (zero) não apresenta fragmentação do DNA, e nas classes subseqüentes aparecem quantidades crescente de fragmentos, aumentando juntamente com sua classificação até dano índice 4)

Fonte: adaptado de Silva, Erdtmann, Henriques (2003)

A análise consistiu em contar aleatoriamente 100 células de cada amostra (indivíduo) em microscópio óptico (Nikon Elipse E 200), com ampliação de 400 vezes para avaliação dos danos ao DNA. As células foram avaliadas visualmente e receberam uma classificação que varia de 0 (não danificada) a 4 (dano máximo) (Figura 27) de acordo com a intensidade e tamanho da cauda (VILLELA, 2003). Esta classificação foi multiplicada pelo número de células que a atingiram, ficando estabelecido um índice que pode variar de 0 (ausência completa de dano) até 400 (quantidade máxima de dano). Também foi avaliada a freqüência de dano que demonstra o número de células danificadas entre as 100 células visualizadas podendo-se, na comparação dos dados, avaliar a intensidade com que determinada substância atinge o DNA (Bortolotto et al, 2009).

3.6.2 Testes de Genotoxicidade em Sangue Periférico Total e Linfócitos Humanos: Teste Cometa

3.6.2.1 Obtenção das Amostras

A metodologia utilizada foi a descrita por Paula et al, (2005) com modificações. Para a coleta de sangue, um total de 8 voluntários foi selecionado,

sendo 4 do sexo feminino, 4 do sexo masculino, com idades entre 19 e 30 anos, não fumantes, hígidos, com hábitos de vida semelhantes mediante a coleta prévia de consentimento livre e informado.

Foram coletados 5 mL de sangue com seringa e agulha descartáveis, em veia periférica, após prévia assepsia com álcool 70% do local de coleta. Este sangue foi colocado em tubos de ensaio, previamente identificados como indivíduos A, B, C, D, E, F, G, H, heparinizados com 200 μ L, e encapados com papel laminado para evitar dano ao DNA causado pela iluminação. Deste sangue total, 2,5 mL foram redistribuídos para outros microtubos de ensaio (eppendorf) para obtenção dos leucócitos totais.

3.6.2.2 Obtenção dos Leucócitos Totais

Os tubos de ensaio separados para obtenção de leucócitos totais foram colocados em uma centrífuga Fanem, onde foram submetidos a 2500 rpm por 10 minutos. Deste procedimento obtiveram-se três fases, plasma superficial, nuvem de leucócitos e precipitado. A nuvem de leucócitos totais foi coletada com auxílio de uma pipeta de pasteur e ressuspensa em um tubo de ensaio pequeno (eppendorf) com PBS (PBS 10 X – 80 g NaCl; 2 g KCl; 2 g $\text{KH}_2(\text{PO}_4)$; 21,7 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ ou (28,12 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$) e novamente centrifugado, agora em centrífuga eppendorf, disponível também no laboratório de Bioquímica, nos mesmos parâmetros da centrifugação anterior. O sobrenadante resultante foi descartado e as células foram novamente ressuspensas em PBS. Após esta etapa procedeu-se com o teste de genotoxicidade (cometa) propriamente dito.

3.6.2.2.1 Teste Cometa com Sangue Total

Para realização do teste cometa com sangue total, alíquotas de 90 μ L do sangue coletado foram transferidas para microtubos de ensaio, ao qual foram adicionados 10 μ L de solução de composto em diversas concentrações definidas com base nos experimentos de interação com DNA. Estas suspensões foram então

incubadas por duas horas a 37° C em estufa e posteriormente o teste foi realizado como descrito no item 3.6.1.2.

3.6.2.2.2 Teste Cometa com Leucócitos Totais

Pra realização do teste cometa com leucócitos totais alíquotas de 90 µL das células isoladas foram transferidas para microtubos de ensaio ao qual foram adicionados 10 µL de solução de composto em diversas concentrações definidas com base nos experimentos de interação com DNA. Estas suspensões foram então incubadas por duas horas a 37° C em estufa e posteriormente o teste foi realizado como descrito no item 3.6.1.2.

4 RESULTADOS

Foram observados para vários compostos os parâmetros de interação e corte das moléculas de DNA plasmidial em termos de análise de pH ótimo, atividade dependente da concentração, forma de interação e rompimento da cadeia, local de interação com a molécula, cinética de reação, análise espectrofotométrica de interação, interação com proteína através de quebra de cadeia de aminoácidos, análise espectrofotométrica e dicroísmo circular. Também foram realizados testes de genotoxicidade com alguns dos compostos para verificação de sua capacidade de interagir com a molécula de DNA “*in vivo*” e sua atividade antibacteriana.

A seguir serão apresentados os resultados agrupados pelas famílias de compostos analisados.

4.1 COMPOSTOS BINUCLEARES DE COBRE 1, 2 E 3

Estes compostos foram descritos no item 3.1.1. Os compostos 1 e 2 foram analisados com mais detalhes devido a sua significativa atividade. O composto 3 por possuir baixa atividade não teve prosseguimento em seus estudos.

4.1.1 Atividade de clivagem de DNA dos compostos 1, 2 e 3 dependente de pH e concentração

A atividade dos compostos foi testada em pHs variando de seis a oito e os resultados são apresentados na figura 28. Foi utilizado o tampão PIPES para os pHs 6,0 a 7,5 e HEPES para o pH 8,0 em incubações de 16 horas a 50° C. Pode-se observar que a maior atividade dos compostos 1 e 2 está próxima ao pH 7,5 e do composto 3 próxima ao pH 7 caracterizadas pela maior atividade de redução proporcional da forma superenovelada do DNA. A atividade dos compostos também pode ser observada em todos os pHs testados sendo o composto 2 notadamente o mais ativo em quase todos os pHs.

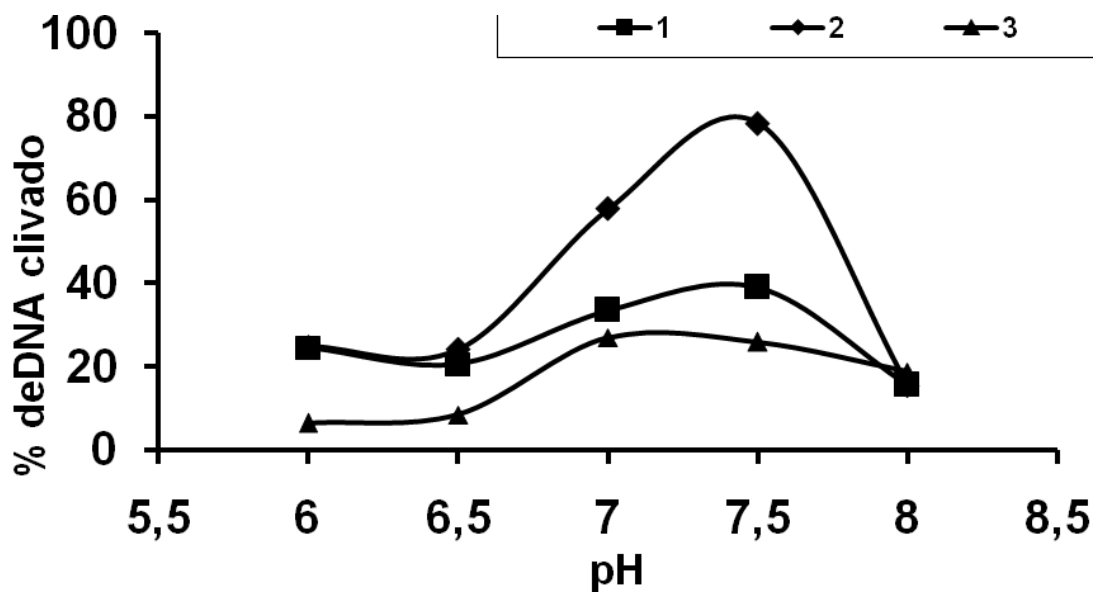


Figura 28: Análise de atividade de clivagem de DNA observada pela proporção de DNA plasmidial quebrado pelos compostos 1, 2 e 3 em diferentes pHs. A concentração utilizada para confecção desta figura foi de 5 μ M. Também pode ser observada a maior atividade do composto 2 quando comparado aos outros

O aumento da concentração dos compostos no intervalo utilizado (0 a 40 μ M) em incubações de 16 horas a 50° C também se reflete em um aumento da atividade de clivagem de DNA dos três compostos (Figura 29). Novamente, pode ser observada a maior atividade do composto 2 evidenciada pela total ausência da forma super-enovelada já na concentração de 10 μ M.

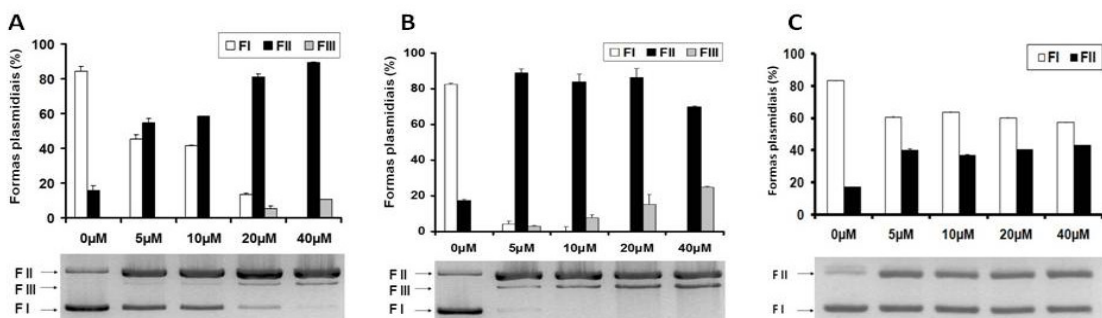


Figura 29: Análise de atividade de clivagem de DNA observada pela proporção de DNA plasmidial quebrado pelos compostos 1 (A), 2(B) e 3 (C) em diferentes concentrações (0 a 40 μ M)

4.1.2 Atividade de Clivagem de DNA dos Compostos 1, 2 e 3 em Presença de Distamicina

Os compostos foram incubados na presença de distamicina, que é um competidor pela cavidade menor do DNA, durante 2 horas a 50°C. O efeito da competição pela cavidade menor pode ser observado na figura 30, que mostra uma redução de 50% na atividade de clivagem de DNA do composto 1 (A) e de 40% no composto 2 (B). Nenhuma inibição significativa foi encontrada nas incubações com o composto 3 (C). Este resultado indica que os compostos 1 e 2 tem sua atividade baseada na interação com o DNA através da cavidade menor da molécula. A baixa atividade do composto 3 não permite conclusões a este respeito.

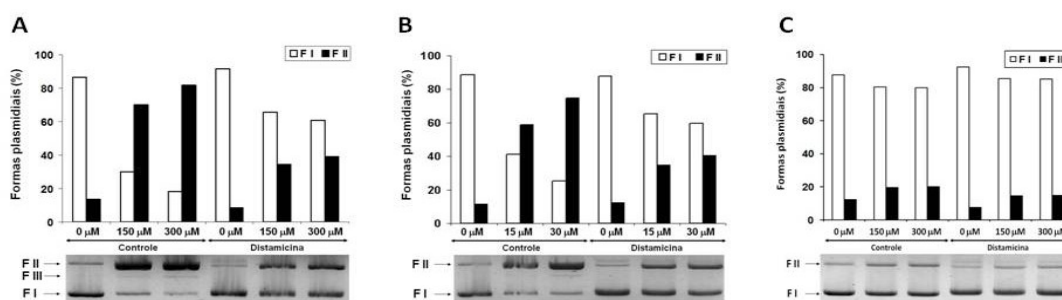


Figura 30: Incubação dos compostos 1 (A), 2 (B) e 3 (C) em presença e ausência de distamicina

4.1.3 Atividade dos Compostos 1 e 2 em Presença de DMSO

Os compostos 1 e 2 foram incubados na presença de DMSO que atua como seqüestrador de radicais hidroxila que são responsáveis pela atividade oxidativa de muitas nucleases. As incubações foram realizadas a 50°C pelo período de 2 horas. O composto 3 não foi testado pois sua baixa atividade não permite incubações em tempo e concentrações restritas. Nos compostos testados não foi observada nenhuma redução de atividade, sugerindo que esta seja ou hidrolítica, ou de uma via oxidativa independente da formação de radicais hidroxila (Figura 31).

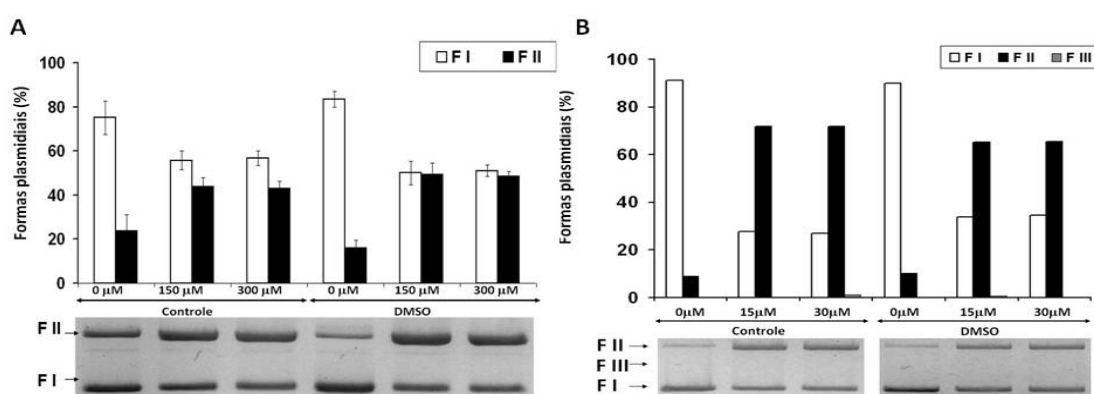


Figura 31: Análise da atividade de clivagem de DNA dos compostos 1 e 2 incubados na presença de DMSO que atua como seqüestrador de radicais hidroxila. Ambos compostos não demonstraram redução significativa de atividade indicando provável atividade hidrolítica ou oxidativa livre de radicais hidroxila

4.1.4 Atividade dos compostos 1 e 2 em presença e ausência de oxigênio atmosférico

Os compostos foram incubados em presença ou ausência de oxigênio atmosférico com o objetivo de verificar a forma pela qual o composto executa o corte da molécula de DNA. A atmosfera livre de oxigênio é obtida por refluxo de argônio e caracterizada pela ausência de atividade catalítica da substância [Fe(EDTA)] que necessita de oxigênio livre para gerar EAS. O composto 3 não foi testado pois sua baixa atividade não permite incubações em tempo e concentrações restritas. As incubações foram realizadas a 50°C pelo período de 2 horas. Os resultados demonstram que o composto 1 deve ter atividade hidrolítica, pois nenhuma redução significativa foi observada em atmosfera de argônio (Figura 32 A). O composto 2 demonstrou uma sensível redução em sua atividade na ausência de oxigênio, mas esta não foi totalmente inibida indicando que este composto possui a habilidade de atuar tanto hidroliticamente quanto oxidativamente (Figura 32 B).

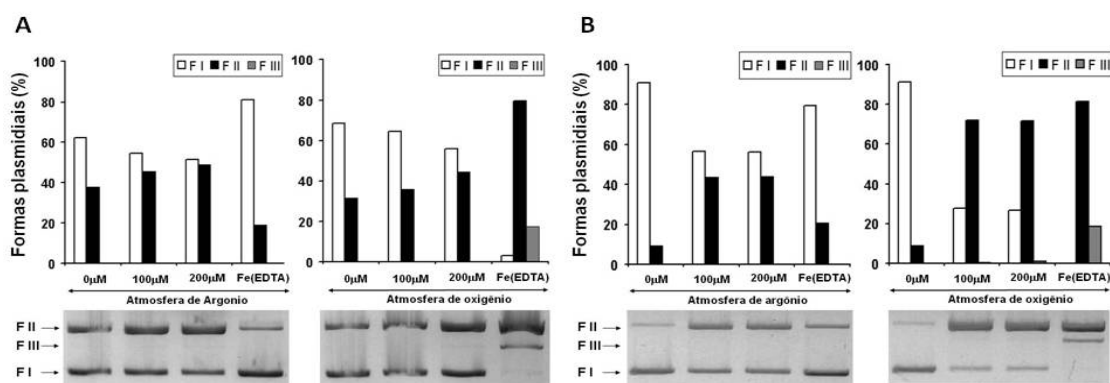


Figura 32: Incubação dos compostos em presença e ausência de oxigênio atmosférico caracterizando a atividade hidrolítica do composto 1 (A) e a atividade mista do composto 2(B) sobre a molécula de DNA

4.1.5 Análise da cinética da reação de corte da molécula de DNA pelos compostos 1, 2 e 3

Os compostos foram incubados com DNA em concentrações que variavam de 0 a 500 μM , a 50°C, e alíquotas foram retiradas a cada 15 minutos até que se completassem 90 minutos. As amostras foram tratadas como descrito no item 3.2.6. Os resultados gráficos obtidos estão demonstrados na figura 33 e os valores de K_m , K_{cat} , eficiência catalítica e incremento da degradação da molécula de DNA constam na tabela 1.

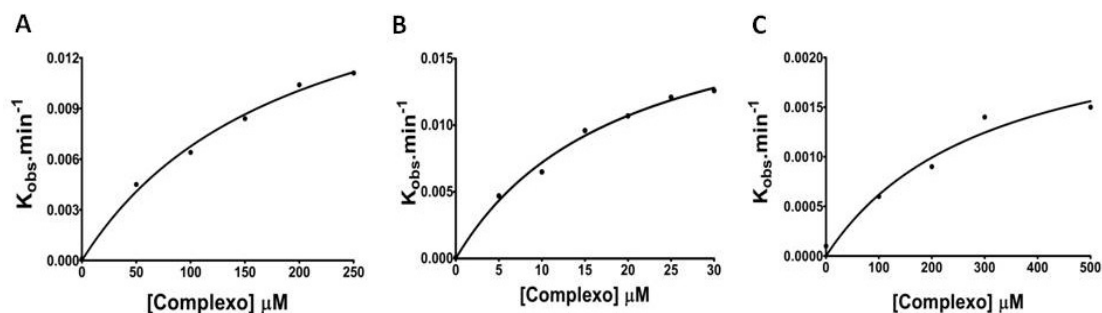


Figura 33: Análise da cinética pseudo-michaeliana dos compostos 1 (A) 2(B) e 3 (C)

Tabela 1: Análise da cinética de reação de corte da DNA plasmidial pelos compostos 1, 2 e 3

Composto	K_m ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	K_{cat} (h^{-1})	eficiência catalítica ($\text{mol}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Incremento de degradação
1	191,7	1,182	6165,88	$3,28.10^7$
2	19,1	1,254	6541,47	$3,48.10^7$
3	759,0	0,204	266,64	$5,62.10^6$

4.1.6 Cálculo da especificidade de sítio de corte de DNA dos compostos 1, 2 e 3

A razão entre cortes simples e duplos foi calculada conforme Cowan, Collis e Grigg (1987). Não foi possível obter estes resultados para o composto 3 pois este não gera cortes duplos nas concentrações testadas. As razões de número de cortes por mol foram calculadas para os três compostos. Os resultados estão expressos na tabela 4 como média acompanhada de desvio padrão.

Os resultados obtidos demonstram um padrão aleatório de cortes de DNA revelando que os compostos 1 e 2 produzem quebras de modo inespecífico. As razões de cortes por concentração de composto reforçam os resultados anteriores, pois apresentam o composto 2 como o mais ativo dos três estudados.

Tabela 2: Razão entre cortes simples e duplos e razões de número de cortes por mol calculadas para os compostos 1, 2 e 3

	n1	n2	n1/n2	n1/[comp]
1	$5,52 \pm 4,13$	$0,09 \pm 0,04$	$55,60 \pm 24,73$	$0,12 \pm 0,04$
2	$1,42 \pm 0,50$	$0,03 \pm 0,02$	$60,39 \pm 17,97$	$0,15 \pm 0,06$
3	$0,56 \pm 0,11$	Nc	Nc	$0,05 \pm 0,03$

4.1.7 Interação dos compostos 1, 2 e 3 com DNA de timo de vitelo observada por espectrofotometria

Os compostos em concentração de 50 μM incubados por 12 horas com concentrações crescentes de DNA de timo de vitelo (0 a 200 μM) em proporções

respectivas (DNA:composto) de 0:1, 0,5:1, 1:1, 2:1 e 4:1 foram analisados em estudos de espectrofotometria (Figura 34). Pode ser observada uma redução de intensidade da absorbância dos três compostos após a incubação com DNA. A redução mais expressiva pode ser observada para o composto 3 na maior concentração de DNA, mas em contrapartida resultados significativos podem ser observados para o composto 2 na presença de 100 μM de DNA. O composto 1 foi dentre os três o que apresentou menor atividade.

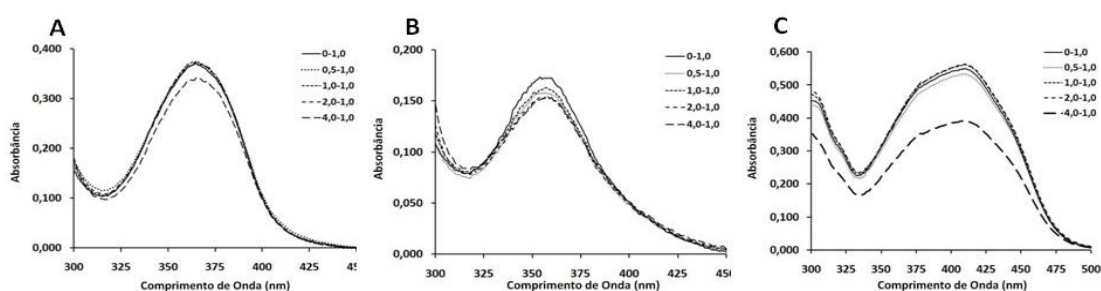


Figura 34: Interação do DNA de timo de vitelo com os compostos 1 (A) 2(B) e 3 (C) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível

4.1.8 Atividade de clivagem de proteína dos compostos 1, 2 e 3

Os compostos $\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})$ nas concentrações de 0, 125, 250 e 500 μM foram testados com a proteína albumina de soro bovino (BSA) com o objetivo de determinar a presença de atividade de clivagem de proteína e interação composto proteína. Os compostos 1 e 2 apresentaram padrões semelhantes de atividade clivando a proteína e gerando bandas de tamanhos e intensidades semelhantes. O composto 3 aparentemente não apresentou atividade de clivagem de proteína provavelmente levando a precipitação da proteína como pode ser observado no gel de eletroforese através de acúmulo de material com peso maior que 66KD (Figura 35).

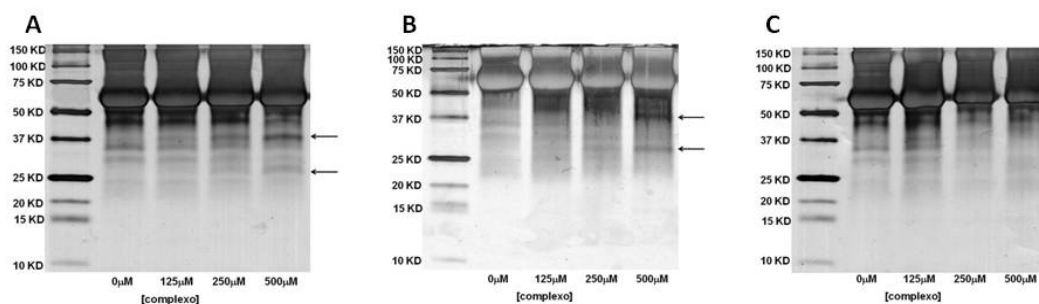


Figura 35: Análise da atividade de clivagem de proteína dos compostos 1 (A), 2(B) e 3 (C) incubados 6 horas a 50°C com proteína BSA em concentrações crescentes. As setas indicam bandas provenientes da fragmentação gerada pela atividade dos compostos

4.1.9 Interação dos Compostos 1, 2 e 3 com Proteína BSA Observada por Espectrofotometria

Os compostos 1, 2 e 3 na concentração de 50 μM tiveram sua interação com proteína BSA observada por espectrofotometria antes e depois de um período de incubação de 6 horas a 50°C. Os compostos foram incubados com concentrações crescentes de proteína (0 a 200 μM) em concentração constante de 50 μM nas proporções de 0:1, 0,5:1, 1:1, 2:1 e 4:1.

4.1.9.1 Interação dos compostos 1, 2 e 3 com proteína BSA observada por espectrofotometria sem período de Incubação

Os resultados das análises da interação dos compostos 1, 2 e 3 com proteína BSA sem período de incubação estão demonstrados na figura 36 A, B e C respectivamente. Os compostos 1 e 2 apresentaram um aumento em suas absorvidades (hipercromismo) nas concentrações de 0 a 100 μM de proteína BSA, mas na concentração de 200 μM ambos apresentaram redução em de suas absorvidades (hipocromismo) contrariando a tendência anteriormente apresentada. Os compostos 2e 3 apresentaram um deslocamento batocrômico (para valores maiores de comprimento de onda - λ). Este deslocamento no composto 3 demonstrou ser muito mais intenso e presente na mesma intensidade em todas as concentrações de proteína BSA testadas. Neste composto, também pode ser

observada uma redução de sua absorvidade (hipocromismo) que com o aumento das concentrações de proteína BSA tendeu a ser revertida (hipercromismo).

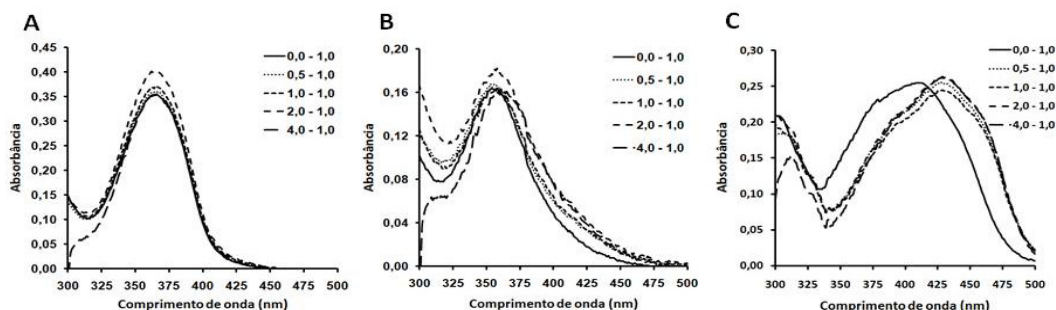


Figura 36: Interação dos compostos 1 (A) 2(B) 3 (C) com proteína albumina de soro bovino observada por espectrofotometria sem período de incubação

4.1.9.2 Interação dos Compostos 1, 2 e 3 com proteína BSA Observada por Espectrofotometria após período de Incubação

Os resultados das análises da interação dos compostos $\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})$ com proteína BSA após o período de incubação de 6 horas estão demonstrados na figura 37 A, B e C. Os compostos 1 e 2 apresentaram uma diminuição em suas absorvidades (hipocromismo) nos picos característicos de absorção de 360nm e 350nm respectivamente e o surgimento gradual de um novo pico localizado em 437nm e 410nm respectivamente. O hipocromismo dos picos característicos e o hipercromismo dos picos de absorção surgidos foram diretamente proporcionais ao aumento da concentração da proteína BSA nas incubações, sugerindo interações proteína/composto que afetaram severamente a estrutura dos últimos. O composto 3 apresentou por sua vez um hipocromismo de sua banda característica de absorção localizada em 410nm e um batocromismo da mesma para um novo pico de absorção localizado em 425nm.

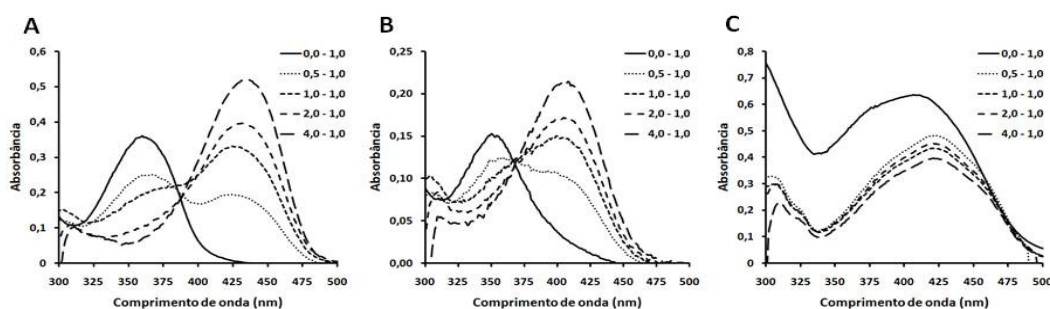


Figura 37: Interação dos compostos 1 (A) 2(B) 3 (C) com proteína albumina de soro bovino observada por espectrofotometria com período de incubação

4.1.10 Interação dos compostos $\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})$ com proteína albumina de soro bovino observada por dicroísmo circular

Os resultados da análise da interação dos compostos $\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})$ com proteína albumina de soro bovino observada por dicroísmo circular estão expressos na figura 38. O composto 1 apresenta boa capacidade de interação com a proteína BSA, como pode ser observado pela diminuição do sinal característico de α -hélices presente no pico de 220nm (GARRAGOZLOU, BOGHAEI, 2008). O composto 2 diferentemente dos outros resultado apresentou uma atividade de interação menor que o composto anterior neste teste mas também reduziu a quantidade de α -hélices detectadas. Já o composto 3 que, como demonstrado anteriormente não quebra a proteína BSA mas provavelmente através de sua interação com a mesma, promove sua precipitação. Estes resultados são corroborados pela redução do sinal em 220nm e, na maior concentração, uma distorção da curva característica de precipitação (aglutinação) da proteína.

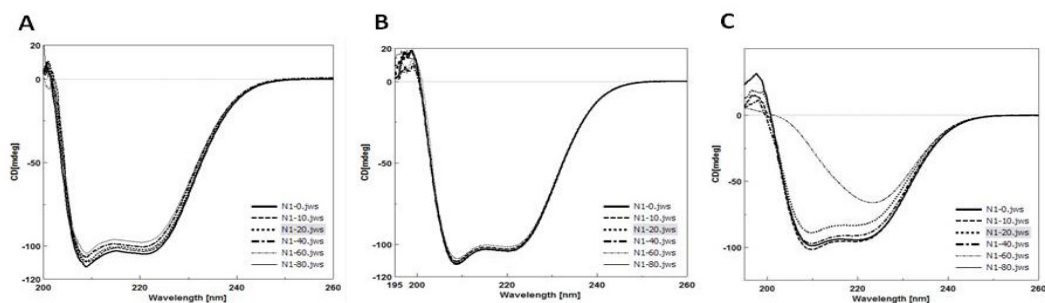


Figura 38: Interação dos compostos 1 (A) 2(B) e 3 (C) com proteína albumina de soro bovino observada por dicroísmo circular. As reações foram realizadas com concentração de 10 μM de BSA e 0 a 80 μM dos compostos

4.1.11 Atividade Genotóxica dos Compostos 1, 2 e 3

O compostos 1 e 2 foram testados quanto às suas atividades genotóxicas, através de teste cometa em modelos de linfócitos humanos, em presença e ausência de nutrientes também foram testados em camundongos nos quais é possível a observação da cinética de dano e reparação de DNA. O composto 3 não foi testado devido à baixa atividade observada nos testes anteriores.

4.1.11.1 Atividade genotóxica do composto 1 em sangue humano total e leucócitos isolados

Sangue humano total e leucócitos isolados obtidos conforme descrito nos itens 3.10.2.1 e 3.10.2.2 foram incubados com o composto nas concentrações de 0, 25, 50, 100 e 200 μM a 37°C por 1,5 hora. Água destilada, tampão PIPES foram utilizados como controles negativos e peróxido de hidrogênio como positivo.

Em incubações com sangue total humano os resultados de índice de dano (Figura 39 A) e frequência de dano (Figura 39 B) demonstram que o composto 1 apresenta atividade genotóxica nas concentrações de 100 e 200 μM . Em incubações com Leucócitos isolados o mesmo composto apresentou diferenças significativas de índice de dano (Figura 39 C) quando comparado com o controle negativo somente na concentração de 200 μM , mas as diferenças foram significativas na frequência de dano (Figura 39 D) nas concentrações de 50, 100 e 200 μM .

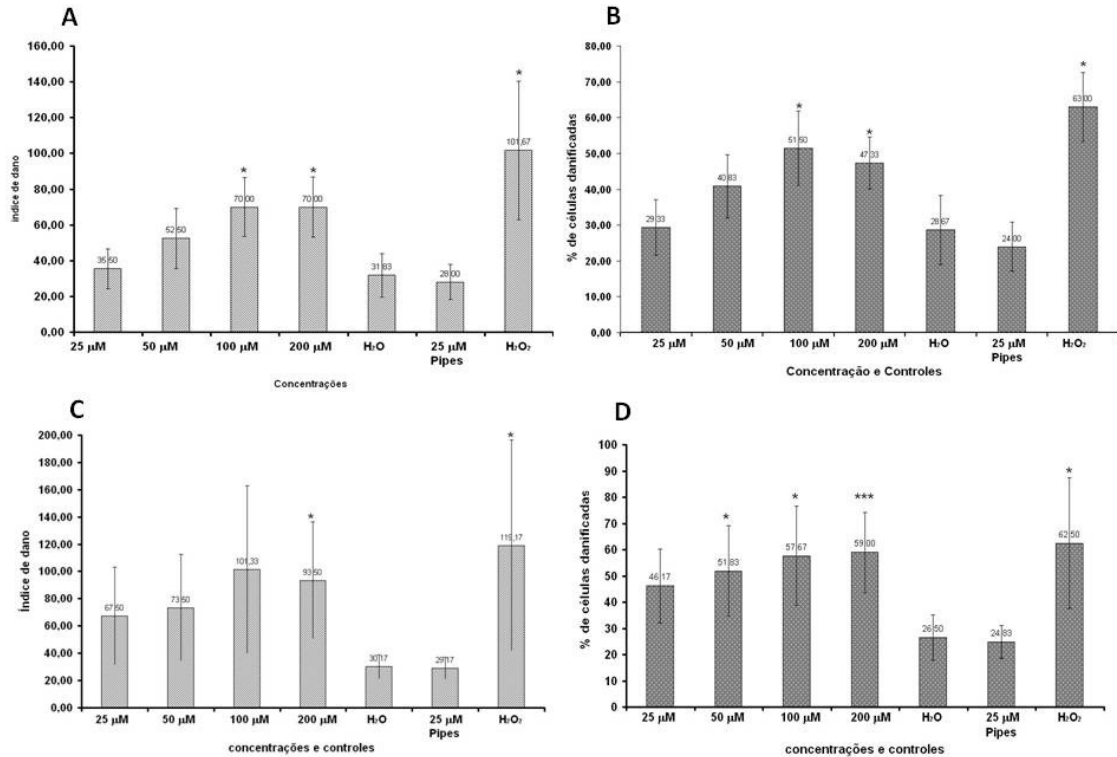


Figura 39: Atividade genotóxica observada como índice de dano e freqüência de dano ao DNA do composto 1 em sangue humano total (A e B) e leucócitos isolados (C e D)

4.1.11.2 Atividade genotóxica do composto 2 em sangue humano total e leucócitos isolados

Sangue humano total e Leucócitos isolados obtidos conforme descrito nos itens 3.10.2.1 e 3.10.2.2 foram incubados com o composto nas concentrações de 0, 25, 50, 100 e 200 μ M a 37° C por 1,5 hora. Água destilada, tampão PIPES foram utilizados como controles negativos e peróxido de hidrogênio como positivo.

Em incubações com sangue total humano os resultados de índice de dano (Figura 40 A) e freqüência de dano (Figura 40 B) demonstram que o composto 2 apresenta atividade genotóxica na concentração de 100 μ M. Em incubações com Leucócitos isolados, o mesmo composto apresentou diferenças significativas de índice de dano (Figura 40 C) e freqüência de dano (Figura 40 D) quando comparado com o controle negativo somente na concentração de 200 μ M.

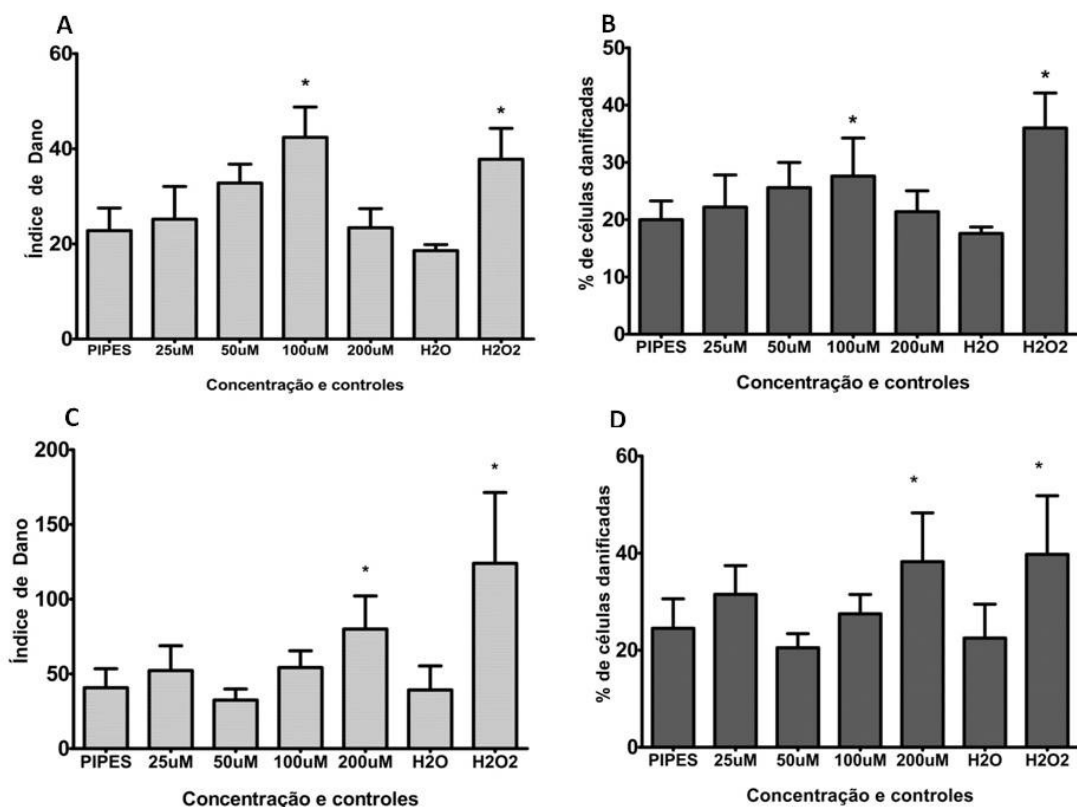


Figura 40: Atividade genotóxica observada como índice de dano e freqüência de dano ao DNA do composto 2 em sangue humano total (A e B) e leucócitos isolados (C e D)

4.1.11.3 Cinética e reparação de dano ao DNA causado pelos compostos 1 em sangue periférico de camundongos

Camundongos foram inoculados com os compostos 1 e 2 nas concentrações de 0, 25, 50 e 100 µM. Amostras de sangue foram retiradas aos 0, 30, 60, 120 e 240 minutos e analisadas conforme descrito anteriormente. Os resultados demonstram que ambos os compostos diferem nas suas atividades tanto atividade genotóxica quanto para a cinética de dano e reparação. Resultados significativos para índice (103,67) e freqüência (62,3) de dano ao DNA, foram obtidos com o composto 1 em 30 minutos na concentração de 100 µM sendo este dano prontamente reparado já aos 60 minutos (Figura 41 A). Na concentração de 50 µM estes foram obtidos aos 60 minutos tanto para índice de dano (53,33) quanto para freqüência de dano ao DNA (39,17), sendo este dano reparado aos 120 minutos após a inoculação (Figura 41 B). Quando camundongos foram inoculados com composto 2 índices e freqüências de dano ao DNA somente apresentaram valores

significativamente aumentados nas concentrações de 100 (232,67 e 78,67) e 50 μM (231,67 e 67,7) nos tempos de 120 e 240 minutos, respectivamente (Figura 41 C e D).

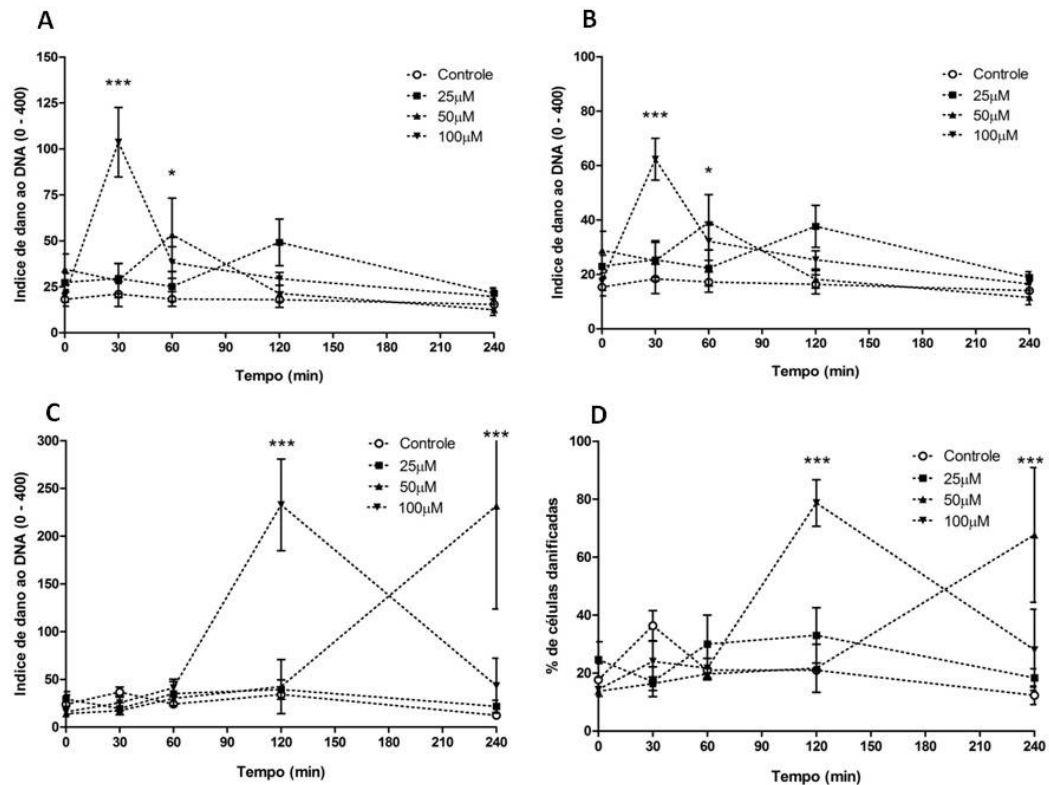


Figura 41: Cinética de dano e reparação de DNA causados pelos compostos 1 (A e B) e 2 (C e D) em células de sangue periférico de camundongos analisada através do índice e frequência de dano ao DNA

4.1.12 Atividade antibacteriana dos compostos 1, 2 e 3 em meio líquido

Inóculos bacterianos das espécies *Escherichia coli* (gram -) e *Saphilococcus aureus* (gram +) foram incubados em meio líquido em presença de diferentes concentrações dos compostos 1, 2 e 3. A inibição de crescimento bacteriano destas bactérias está expressa na figura 42 A, B e C. Pode-se observar que os três compostos têm maior atividade frente à bactéria *S. aureus* quando comparada com *E. coli*. Em nenhum dos casos foi possível observar uma inibição total de crescimento bacteriano de *E. coli*, mas uma concentração inibitória mínima pode ser observada a partir de 400 μM para os três compostos frente à bactéria *S. aureus*.

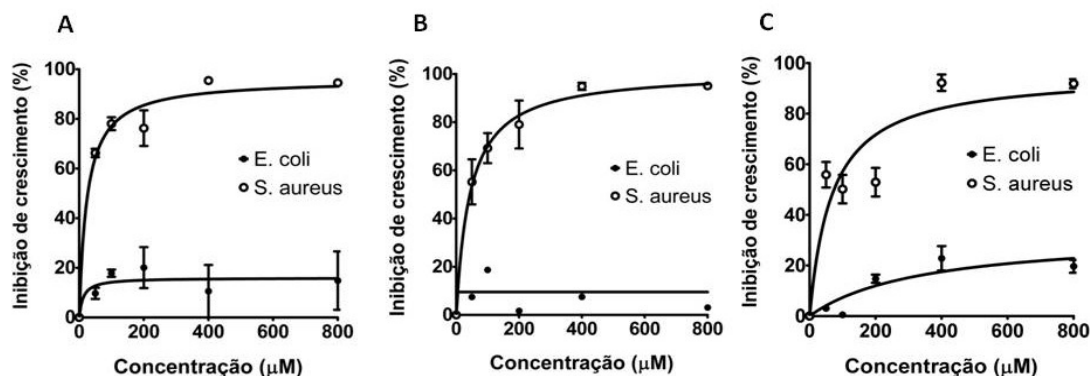


Figura 42: Atividade antibacteriana dos compostos 1, 2 e 3 (A, B e C) frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphilococcus aureus* em meio líquido. A inibição do crescimento é expressa como inibição porcentual de densidade óptica (OD_{600})

4.2 COMPOSTOS MONO E BINUCLEARES DE FERRO - FE(HPCINOL)

Estes compostos foram descritos no item 3.1.2. Os resultados das análises dos compostos $[Fe(HPCINOL)(SO_4)]_2 \cdot \mu\text{-O} \cdot 6H_2O$, $[Fe(HPCINOL)Cl_2] \cdot NO_3$ e $[Fe(HPCINOL)Cl]_2 \cdot \mu\text{-O} \cdot Cl_2 \cdot 2H_2O$ (1, 2 e 3 respectivamente) estão apresentados por análise permitindo uma comparação direta dos resultados obtidos entre si.

4.2.1 Atividade de clivagem de DNA dos compostos 3, 4 e 5 dependente de pH e concentração

A atividade dos compostos foi testada em diferentes pHs e os resultados são apresentados na figura 43. Foi utilizado o tampão HEPES para os três pHs testados em incubações de 16 horas a 50°C. Pode-se observar individualmente a maior atividade dos compostos 3, 4 e 5 em pH 7,0 sendo a mesma mais pronunciada para o composto 4 já descrita por Parrilha et al (2008). Já o composto 6 em pH 8,0 possui maior atividade, caracterizada pela maior quantidade de DNA nas formas circular e linear (quebra simples e dupla respectivamente). Deve-se salientar que as diferenças observadas entre os compostos deste grupo foram pouco significativas, caracterizando os três compostos como de grande atividade.

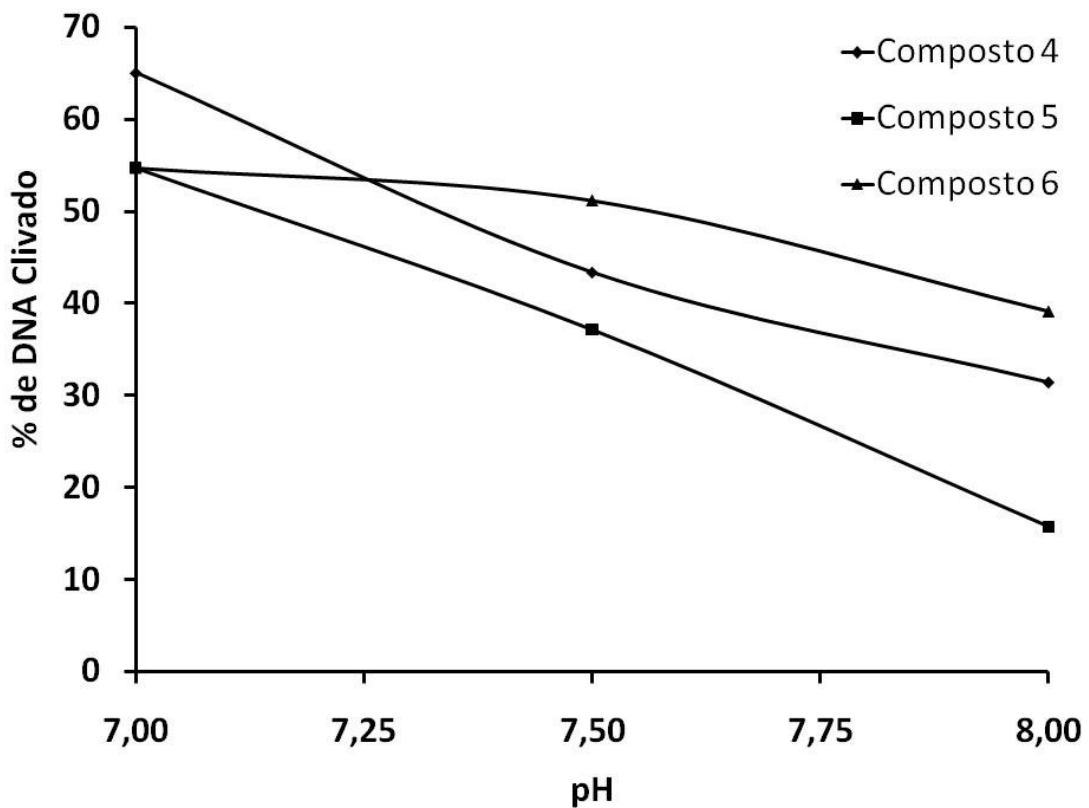


Figura 43: Análise de atividade de clivagem de DNA observada pela proporção de DNA plasmidial clivado pelos compostos 4, 5 e 6 em diferentes pHs. A concentração utilizada foi de 10 μM

O aumento da concentração do composto 4 no intervalo de 0 a 100 μM e de 0 a 80 μM para os composto 5 e 6 em incubações de 16 horas a 50 $^{\circ}\text{C}$ reflete em um aumento da atividade de clivagem de DNA dos três compostos dependente de concentração (Figura 44). Pode ser observada a maior atividade do composto 4 evidenciada pela total ausência da forma super-torcida já na concentração de 50 μM .

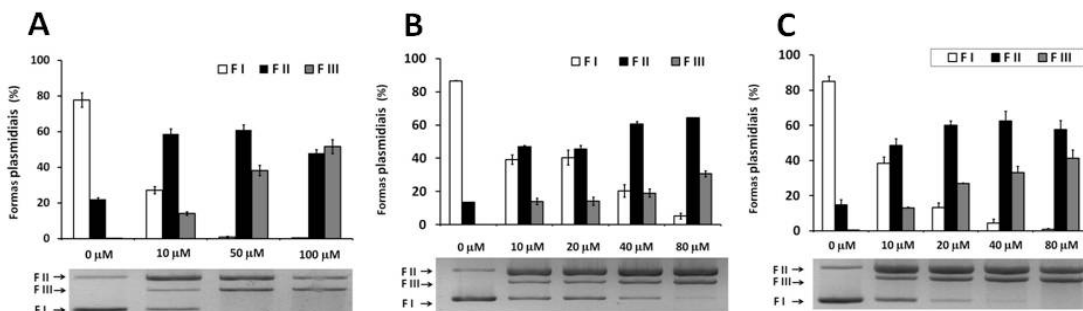


Figura 44: Análise de atividade de clivagem de DNA observada pela proporção de DNA plasmidial clivado pelos compostos 4 (A), 5 (B) e 6 (C) em diferentes concentrações (0 a 100 μM para 4 e 0 a 80 μM para 5 e 6)

4.2.2 Atividade de clivagem de DNA dos compostos 4, 5 e 6 em presença de distamicina

Os compostos foram incubados na presença de distamicina, que é um competidor pela cavidade menor do DNA, durante 2 horas a 50°C. O efeito da competição pela cavidade menor pode ser observado na figura 45, que mostra uma redução de atividade de clivagem de DNA nos 3 compostos sendo esta mais elevada para o composto 4. Este resultado demonstra que os compostos tem atividade preferencialmente baseada em interação com o DNA através da cavidade menor da molécula.

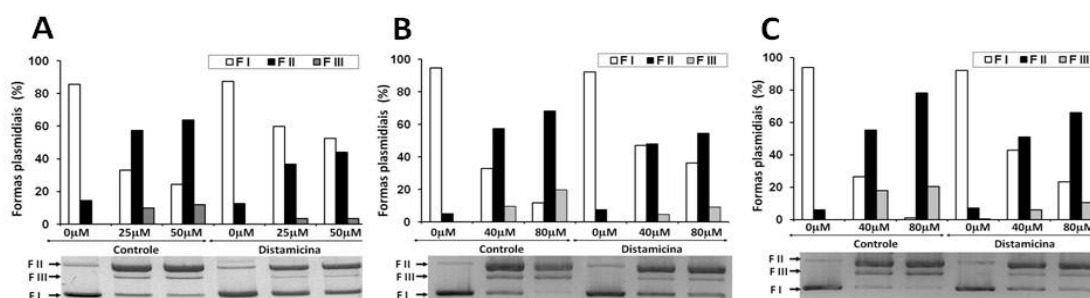


Figura 45: Incubação dos compostos 4 (A), 5 (B) e 6 (C) em presença e ausência de distamicina indicando a preferência dos compostos pela interação com a molécula de DNA através da cavidade menor desta

4.2.3 Atividade dos compostos 4, 5 e 6 em presença de DMSO

Os compostos 4, 5 e 6 foram incubados na presença de DMSO que atua como seqüestrador de radicais hidroxila necessário a atividade oxidativa de muitas nucleases. As incubações foram realizadas a 50°C pelo período de 2 horas. Nas incubações com o composto 4 não foi observada nenhuma redução significativa de atividade sugerindo que esta seja hidrolítica ou de uma via oxidativa independente da formação de radicais hidroxila. Já nas incubações com os compostos 5 e 6 um efeito significativo da presença de DMSO pode ser observado sugerindo atividade oxidativa dependente de radicais hidroxila (Figura 46).

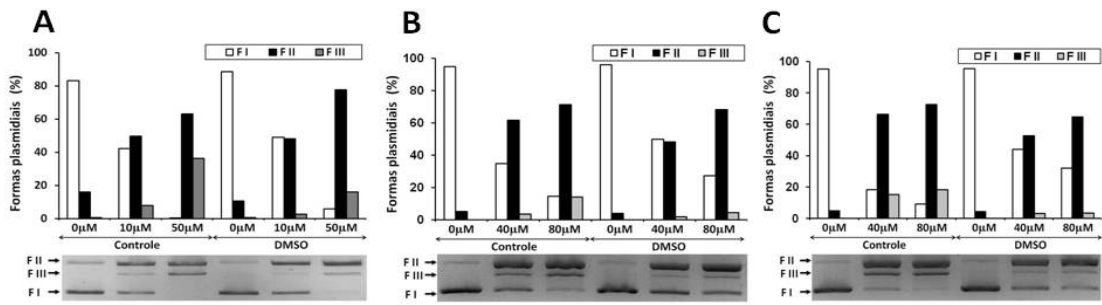


Figura 46: Análise da atividade de clivagem de DNA dos compostos 4 (A), 2 (B) e 3 (C) incubados na presença de DMSO. O composto 4 não demonstrou redução significativa de atividade indicando provável atividade hidrolítica ou oxidativa livre de radicais hidroxila. Os compostos 5 e 6 apresentaram redução de atividade indicando oxidação dependente de radicais hidroxila.

4.2.4 Atividade dos compostos 4, 5 e 6 em presença e ausência de oxigênio atmosférico

Os compostos foram incubados em presença e ausência de oxigênio atmosférico com o objetivo de verificar a forma pela qual o composto executa o corte da molécula de DNA (Item 3.2.5). A atmosfera livre de oxigênio é obtida pelo refluxo de argônio e caracterizada pela ausência de atividade catalítica do sistema [Fe(EDTA)] que necessita de oxigênio livre para gerar EROS. As incubações foram realizadas a 50°C pelo período de 2 horas. Os resultados demonstram que o composto 4 tem atividade hidrolítica, pois nenhuma redução significativa na mesma foi observada em ausência de oxigênio (Figura 47 A). Os compostos 5 e 6 demonstraram uma sensível redução em sua atividade na ausência de oxigênio, mas esta não foi totalmente inibida indicando que estes compostos possuem a habilidade de atuar tanto hidroliticamente como oxidativamente (Figura 47 B e C).

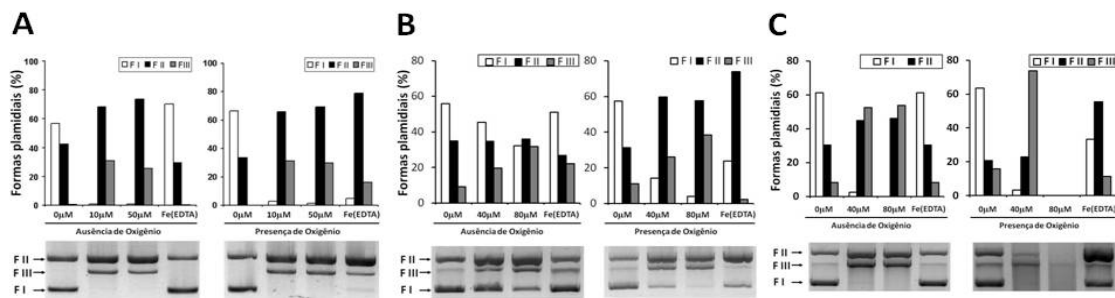


Figura 47: Incubação dos compostos em presença e ausência de oxigênio atmosférico caracterizando a atividade hidrolítica do composto 4 (A) e a atividade mista dos compostos 5 (B) e 6 (C) sobre a molécula de DNA.

4.2.5 Análise da cinética da reação de corte da molécula de DNA pelos compostos 4, 5 e 6

Os compostos 4 e 5 foram incubados com DNA em concentrações que variavam de 0 a 80 μM e o composto 6 de 0 a 20 μM a 50°C em pH 7. Alíquotas foram retiradas a cada 15 minutos a partir do momento de início da reação até que se completassem 90 minutos. As amostras foram tratadas como descrito no item 3.2.6. Os resultados gráficos obtidos estão demonstrados na figura 48 e os valores de K_m , K_{cat} , eficiência catalítica e incremento da degradação da molécula de DNA constam da tabela 3. As razões de cortes por concentração de composto reforçam os resultados anteriores, pois apresentam o composto 6 como o mais ativo dos três estudados.

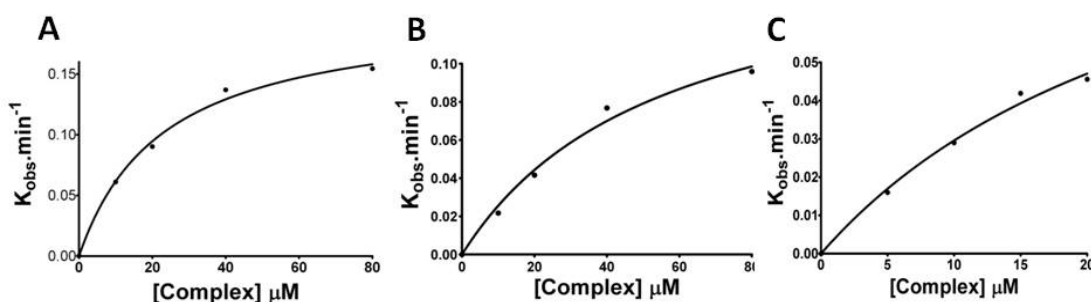


Figura 48: Análise da cinética pseudo-michaeliana dos compostos 4 (A) 5 (B) e 6 (C)

Tabela 3: Análise da cinética de reação de corte da DNA plasmidial pelos compostos 4, 5 e 6

	K_m $\mu\text{mol.L}^{-1}$	K_{cat} (h^{-1})	eficiência catalítica $(\text{mol}^{-1}.\text{h}^{-1})$	Incremento de degradação
4	23,03	12,216	530438,6	$3,39.10^8$
5	55,18	9,99	181043,9	$2,78.10^8$
6	28,93	6,906	238714,1	$1,92.10^8$

4.2.6 Cálculo da especificidade de sítio de corte de DNA dos compostos 4, 5 e 6

A razão entre cortes simples e duplos foi calculada conforme Cowan, Collis e Grigg (1987). As razões de número de cortes por mol também foram calculadas para os três compostos. Os resultados estão expressos na tabela 4 como média acompanhada de desvio padrão. Os resultados obtidos demonstram um padrão não aleatório de cortes de DNA revelando que os compostos 4, 5 e 6 provavelmente produzem quebras de modo específico.

Tabela 4: Razão entre cortes simples e duplos razões de número de cortes por mol calculadas para os compostos 4, 5 e 6

	n1	n2	n1/n2	n1/[comp]
4	2,19±1,65	0,75±0,80	5,35±4,09	0,05±0,01
5	1,08±0,91	0,18±0,14	5,98±0,73	0,04±0,01
6	2,18±1,61	0,47±0,37	4,86±0,61	0,07±0,01

4.2.7 Interação dos compostos 4, 5 e 6 com DNA de timo de vitelo observada por espectrofotometria

Os compostos em concentração de 50 µM incubados por 12 horas a 50° C com concentrações crescentes de DNA de timo de vitelo (0 a 200 µM) em proporções respectivas de DNA/composto de 0:1, 0,5:1, 1:1, 2:1 e 4:1 foram analisados em estudos de espectrofotometria. A capacidade de absorvância do composto 4 difere significativamente dos outros dois compostos quando analisados isoladamente. O primeiro apresenta um pico bastante evidente em 409nm e os restantes um joelho em 365nm. Os resultados obtidos com o primeiro composto indicam uma redução na absorvância nas três menores concentrações testadas que se inverteu na concentração mais alta. Nos resultados obtidos com os outros dois compostos, todas as concentrações apresentaram resultados semelhantes, com exceção da incubação controle ausente de DNA que apresentou resultados reduzidos (Figura 49).

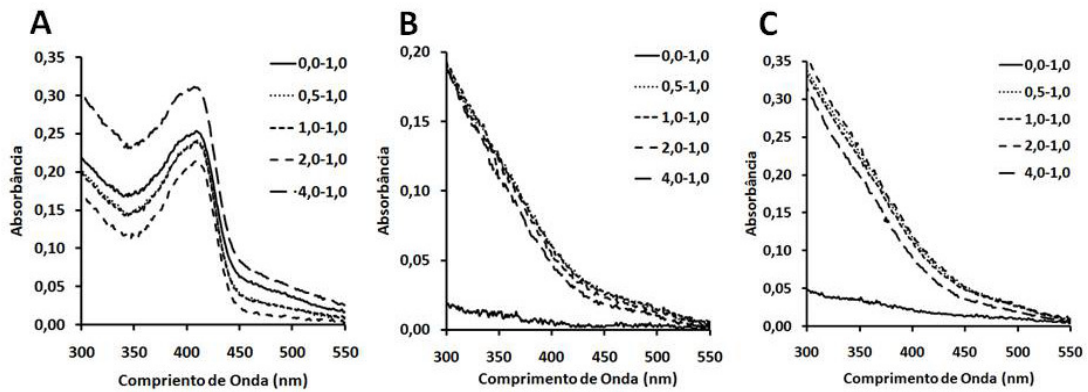


Figura 49: Interação do DNA de timo de vitelo com os compostos 4 (A) 5 (B) e 6 (C) observado por espectrofotometria de UV próximo e luz visível após incubação de 12 horas a 50°C em pH 7,0

4.2.8 Atividade de clivagem de proteína dos compostos 4, 5 e 6

Os compostos 4, 5 e 6, nas concentrações de 0, 25, 50 e 100 μM , foram testados frente a proteína albumina de soro bovino (BSA) com o objetivo de determinar a presença de atividade de clivagem de proteína e interação composto/proteína. Os compostos 4, 2 e 3 apresentaram padrões semelhantes de atividade clivando a proteína e gerando bandas de tamanhos e intensidades semelhantes, sendo a maior atividade detectada para o composto 5 que demonstrou intensa degradação da proteína já na concentração de 25 μM (Figura 50).

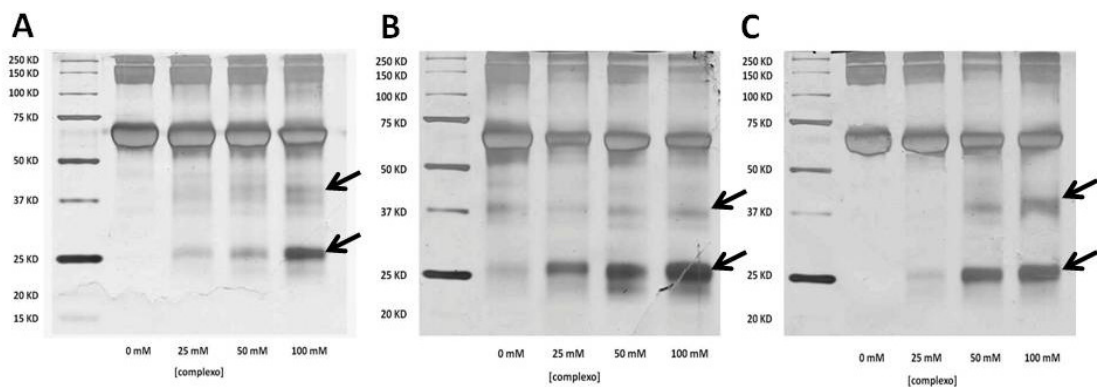


Figura 50: Análise da atividade de clivagem de proteína dos compostos 4 (A), 5 (B) e 6 (C) incubados em concentrações de 0,25, 50 e 100 μM por 6 horas a 50°C em pH 7,0 com proteína BSA na concentração de 10 μM . As setas indicam bandas provenientes da fragmentação gerada pela atividade dos compostos

4.2.9 Interação dos compostos 4, 5 e 6 com proteína BSA observada por espectrofotometria

Os compostos 4, 5 e 6 na concentração de 50 μM tiveram sua interação com proteína BSA observada por espectrofotometria antes e depois de um período de incubação de 6 horas a 50°C . Os compostos foram incubados com concentrações crescentes de proteína (0 a 200 μM) em concentração constante de 50 μM nas proporções de 0:1, 0,5:1, 1:1, 2:1 e 4:1.

4.2.9.1 Interação dos compostos 4, 5 e 6 com proteína BSA observada por espectrofotometria sem período de incubação

Os resultados das análises da interação dos compostos 4, 5 e 6 com proteína BSA sem período de incubação estão demonstrados na figura 51 A, B e C respectivamente. Todos os compostos apresentaram uma tendência a hiperchromismo. O composto 4 apresentou uma redução de absorvância (hipocromismo) na concentrações mais baixas de proteína que reverteu nas concentrações mais altas. Os compostos 5 e 6 apresentaram hiperchromismo em todas as concentrações testadas, tendo este uma tendência a redução nas concentrações mais elevadas.

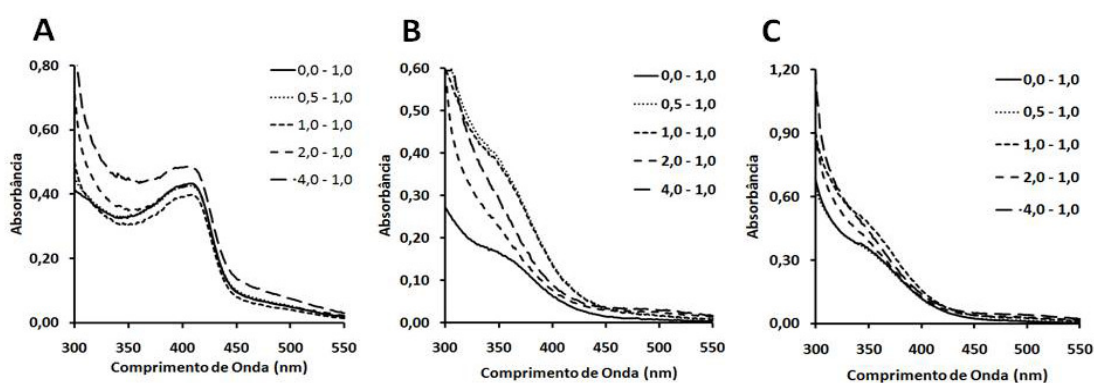


Figura 51: Interação dos compostos 4 (A) 5 (B) 6 (C) com proteína albumina de soro bovino observada por espectrofotometria sem período de incubação

4.2.9.2 Interação dos compostos 4, 5 e 6 com proteína BSA observada por espectrofotometria após período de incubação

Os resultados das análises da interação dos compostos 4, 5 e 6 com proteína BSA após o período de incubação de 6 horas estão demonstrados na figura 52 A, B e C. Os três compostos apresentaram maiores absorbâncias quando incubados em presença de BSA em todas as concentrações quando comparadas com as incubações controle (sem proteína). Comparando estas incubações controle com os resultados obtidos nos controles sem incubação, pode-se observar que o ocorrido foi na verdade um decréscimo de absorbância após as incubações. Estes resultados indicam que estes compostos podem ser instáveis em soluções tamponadas em pHs próximos ao fisiológico (Figura 53) e que a sua interação com proteína ou DNA tende a aumentar sua estabilidade.

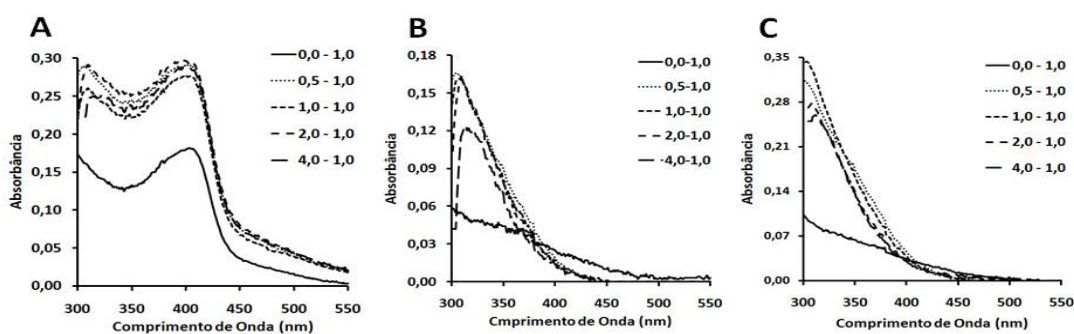


Figura 52: Interação dos compostos 4 (A) 5 (B) 6 (C) com proteína albumina de soro bovino em concentrações variadas observada por espectrofotometria após com período de incubação de 6 horas a 50°C em pH 7,0

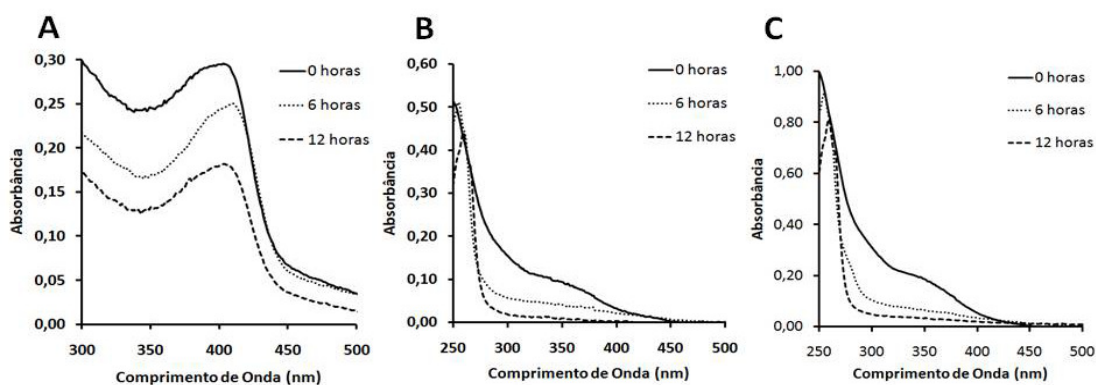


Figura 53: Estabilidade dos compostos 4 (A) 5 (B) 6 (C) incubados em tampão HEPES pH 8,0 a 50°C durante 0, 6 e 12 horas

4.2.10 Interação dos compostos 4, 5 e 6 com proteína albumina de soro bovino observada por dicroísmo circular

Os resultados da análise da interação dos compostos 4, 5 e 6 com proteína albumina de soro bovino observada por dicroísmo circular estão expressos na figura 54. Os compostos 4, 5 e 6 apresentaram capacidade de interação com a proteína BSA como pode ser observado pelo aumento de torção das α -hélices demonstrada pelo aumento de sinal no pico de 220nm.

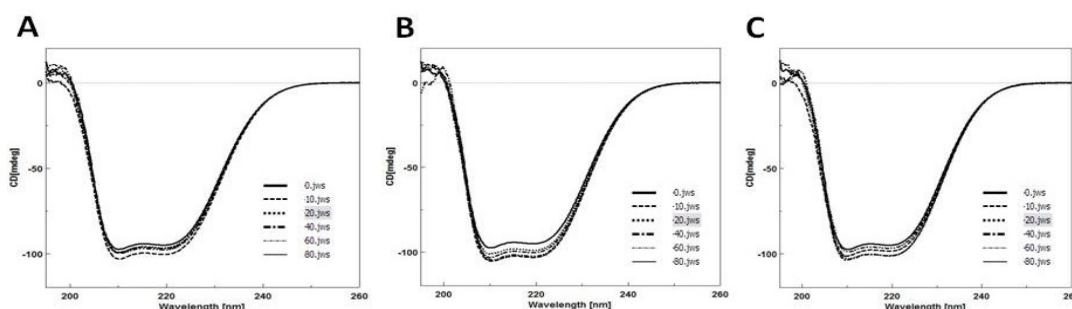


Figura 54: Interação dos compostos 4 (A) 5 (B) e 6 (C) com proteína albumina de soro bovino observada por dicroísmo circular. As incubações foram realizadas com concentração de 10 μ M de BSA e 0 a 80 μ M dos compostos

4.2.11 Atividade genotóxica dos compostos 4, 5 e 6

O compostos 4, 5 e 6 foram testados quanto a sua atividade genotóxica através de teste cometa em modelos de linfócitos humanos em presença e ausência de nutrientes. Testes em camundongos não foram realizados em virtude de falta de tempo hábil.

4.2.11.1 Atividade genotóxica do composto 4 em sangue humano total e leucócitos isolados

Sangue humano total e leucócitos isolados obtidos conforme descrito nos itens 30.10.2.1 e 30.10.2.2 foram incubados com o composto nas concentrações de 0, 25, 50, 100 e 200 μ M a 37 $^{\circ}$ C por 1,5 hora. Água destilada, tampão PIPES foram utilizados como controles negativos e peróxido de hidrogênio como positivo.

Em incubações com sangue total humano os resultados de índice de dano (Figura 55 A) e freqüência de dano (Figura 55 B) demonstram que o composto 4 apresenta atividade genotóxica nas concentrações de 100 e 200 μM . Em incubações com leucócitos isolados o mesmo composto apresentou diferenças significativas de índice de dano e freqüência de dano ao DNA (Figura 55 C e D respectivamente) quando comparado com o controle negativo nas concentrações de 100 e 200 μM . O controle positivo não apresentou valores significativos.

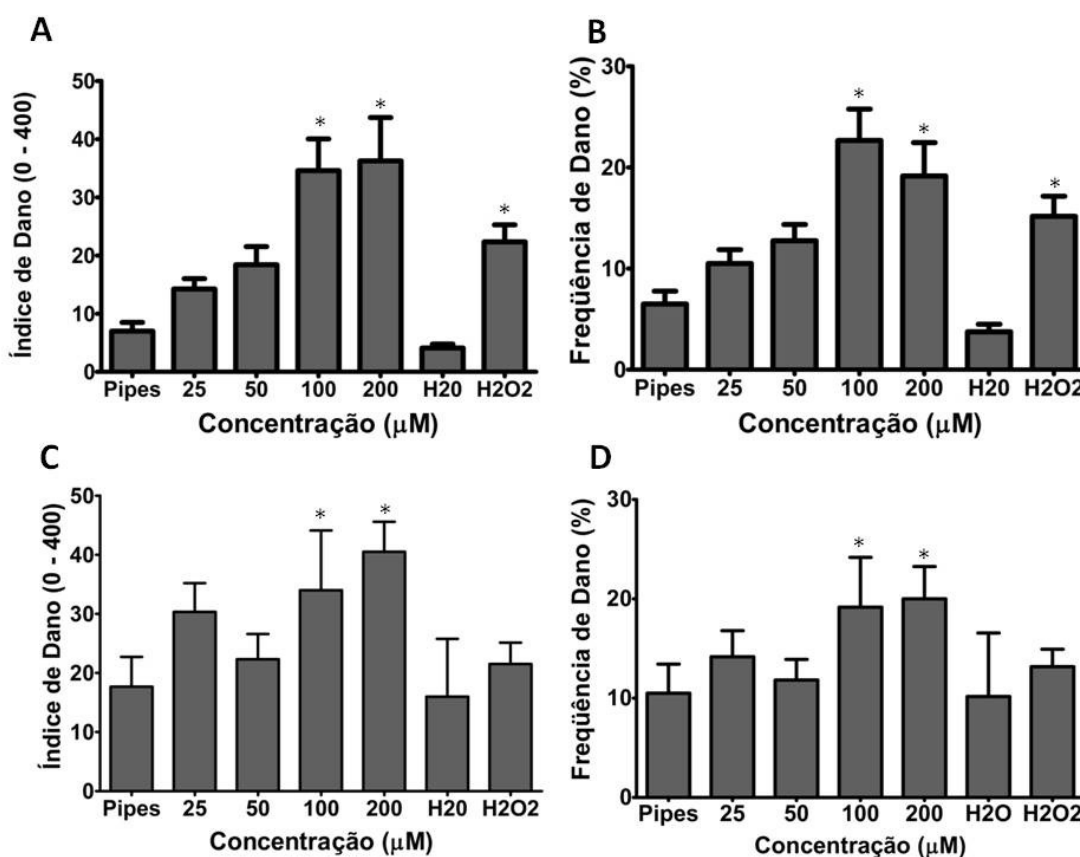


Figura 55: Atividade genotóxica do composto 4 em sangue humano total e leucócitos isolados

4.2.11.2 Atividade genotóxica do composto 5 em sangue humano total e leucócitos isolados

Sangue humano total e leucócitos isolados obtidos conforme descrito nos itens 30.10.2.1 e 30.10.2.2 foram incubados com o composto nas concentrações de 0, 25, 50, 100 e 200 μM a 37° C por 1,5 hora. Água destilada, tampão PIPES foram utilizados como controles negativos e peróxido de hidrogênio como positivo.

Em incubações com sangue total humano os resultados de índice de dano (Figura 56 A) e frequência de dano (Figura 56 B) demonstram que o composto 5 apresenta atividade genotóxica na concentração de 100 e 200 μM . Em incubações com leucócitos o mesmo composto apresentou diferenças significativas de índice de dano ao DNA (Figura 56 C) e frequência de dano ao DNA (Figura 56 D) quando comparado com o controle negativo somente na concentração de 200 μM .

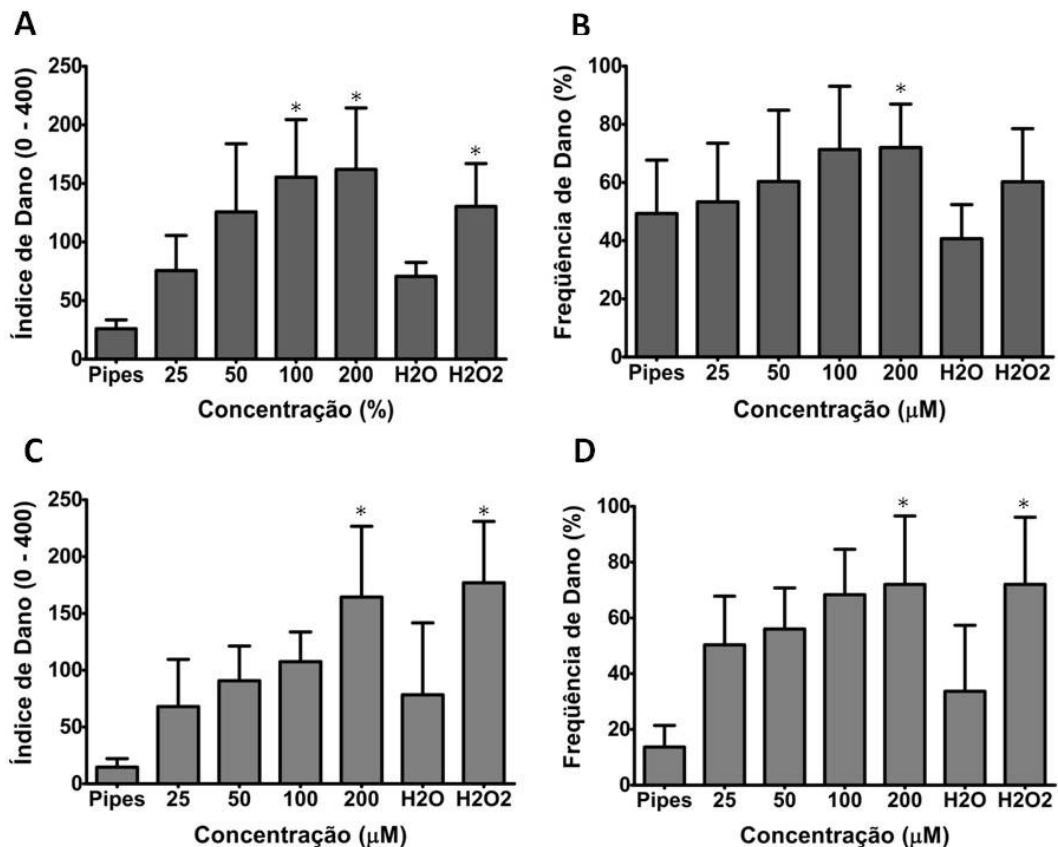


Figura 56: Atividade genotóxica do composto 5 em sangue humano total e leucócitos isolados

4.2.11.3 Atividade genotóxica do composto 6 em sangue humano total e leucócitos isolados

Sangue humano total e Leucócitos isolados obtidos conforme descrito nos itens 30.10.2.1 e 30.10.2.2 foram incubados com o composto nas concentrações de 0, 25, 50, 100 e 200 μM a 37° C por 1,5 hora. Água destilada, tampão PIPES foram utilizados como controles negativos e peróxido de hidrogênio como positivo.

Em incubações com sangue total humano os resultados de índice de dano (Figura 57 A) e frequência de dano (Figura 57 B) demonstram que o composto 6 apresenta atividade genotóxica na concentração de 25 e 50 μM e controle positivo indicando provável ação tóxica em concentrações mais elevadas. Em incubações com leucócitos o mesmo composto apresentou diferenças significativas de índice de dano ao DNA (Figura 57 C) e frequência de dano ao DNA (Figura 57 D) quando comparado com o controle negativo em todas concentrações testadas.

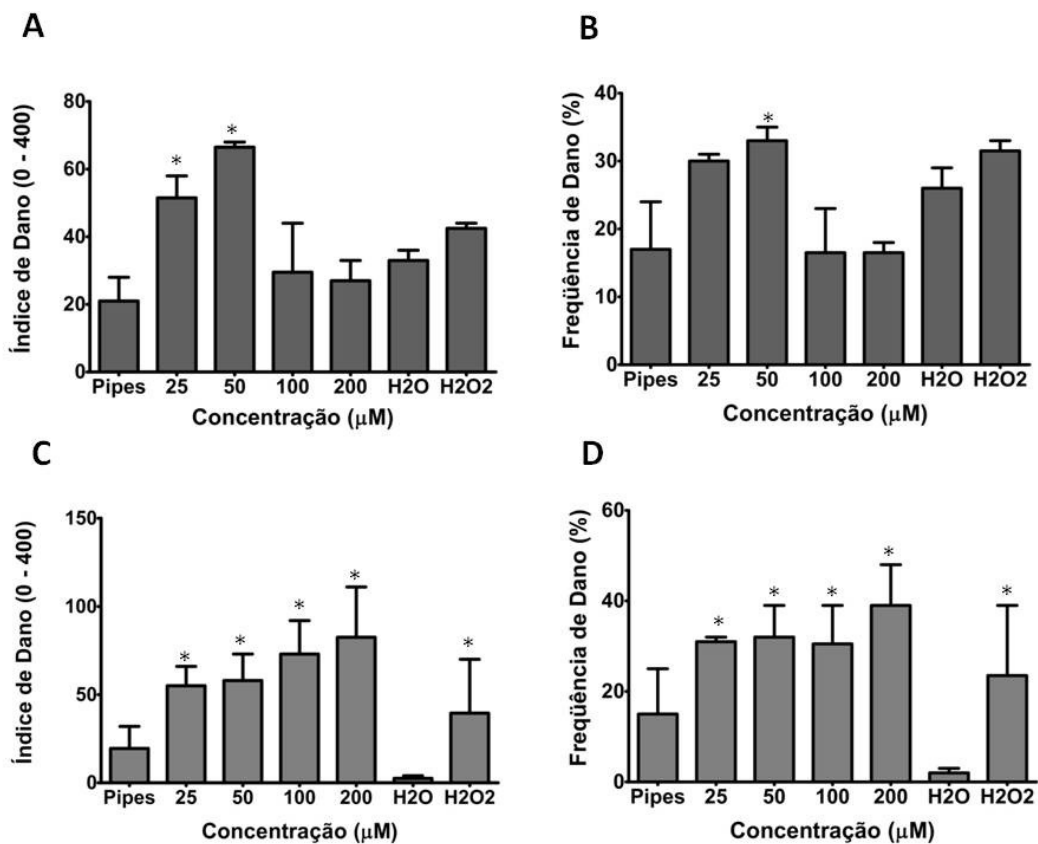


Figura 57: Atividade genotóxica do composto 6 em sangue humano total e leucócitos isolados

4.2.12 Atividade antibacteriana dos compostos 4, 5 e 6 em meio líquido

Inóculos bacterianos das espécies *Escherichia coli* (gram -) e *Staphylococcus aureus* (gram +) foram incubadas em meio líquido em presença de diferentes concentrações dos compostos 4, 5 e 6. A inibição de crescimento bacteriano promovida pelos três compostos está expressa na figura 58 A, B e C respectivamente. Pode se observar que os três compostos têm atividade frente às

bactérias testadas. A sensibilidade das bactérias *S. aureus* e *E. coli* é semelhante frente aos compostos 4 e 6 mas a bactéria *S. aureus* é bem mais sensível que *E. coli* quando expostas ao composto 5. Em nenhum dos casos foi possível observar uma inibição total de crescimento bacteriano.

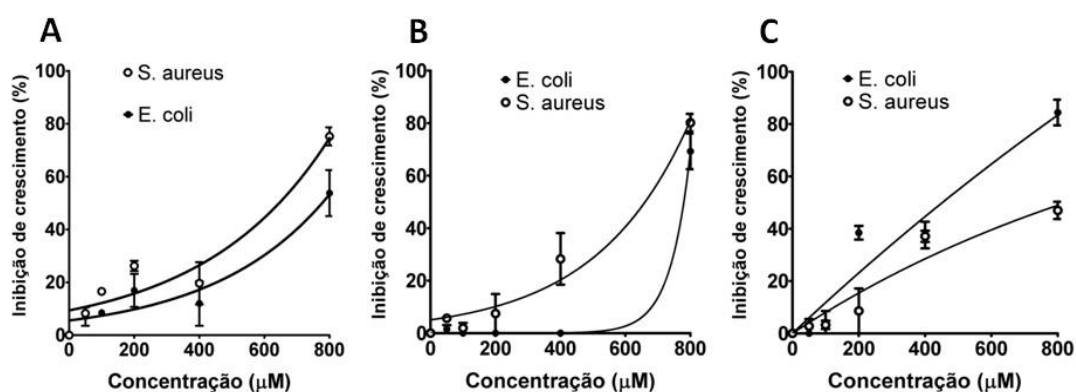


Figura 58: Atividade antibacteriana dos compostos 1, 2 e 3 (A, B e C) frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em meio líquido. A inibição do crescimento é expressa como inibição percentual de densidade óptica (OD_{600})

4.3 COMPOSTOS BINUCLEARES DE FE(II) 7, 8, 9 E 10

Os compostos 7, 8, 9 e 10 (FeZnMe, FeZnH, FeZnBr e FeZnNO₂ respectivamente) tiveram sua caracterização de atividade biológica realizada por Severino (2007), onde os parâmetros principais de atividade biológica foram estabelecidos tais como capacidade de quebras DNA plasmidial e as condições nas quais esta capacidade melhor pode ser demonstrada.

Neste trabalho novos parâmetros foram testados visando ampliar o conhecimento referente a atividade destes compostos.

4.3.1 Atividade de clivagem de DNA dos compostos 7, 8, 9 e 10 em presença de distamicina

Os compostos foram incubados na presença de distamicina, que é um competidor pela cavidade menor do DNA, durante 8 horas a 50°C. O efeito da competição pela cavidade menor pode ser observado na figura 59. Somente foi

observada inibição dos compostos 7 e 10, apesar desta ser menor quando comparada a outros compostos utilizados neste trabalho. Os compostos 8 e 9 não demonstraram nenhuma inibição perceptível nas concentrações testadas.

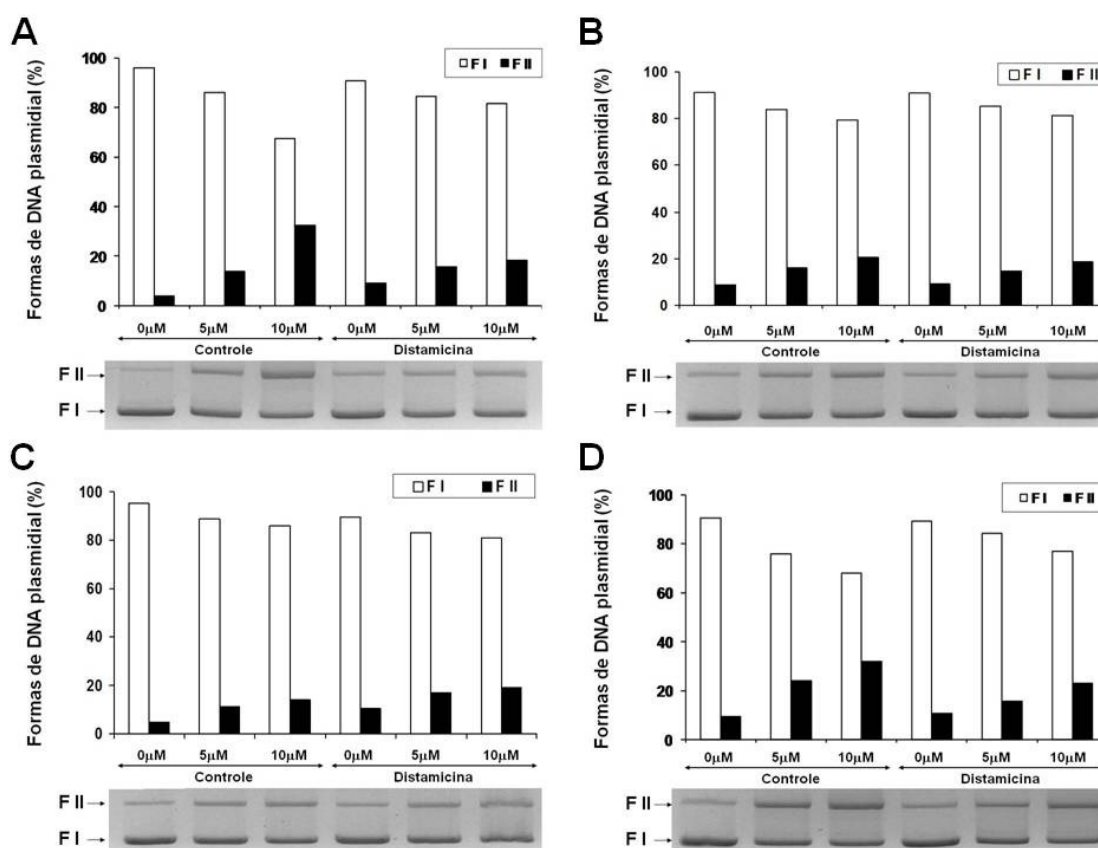


Figura 59: Incubação dos compostos 7 (A), 8 (B), 9 (C) e 10 (D) em presença e ausência de distamicina. Foi observada inibição nos compostos 7 e 10

4.3.2 Atividade dos compostos 7, 8, 9 e 10 em presença de DMSO

Os compostos 7, 8, 9 e 10 foram incubados na presença de DMSO que atua como seqüestrador de radicais hidroxila necessários a atividade oxidativa de muitas nucleases. As incubações foram realizadas a 50 °C pelo período de 8 horas. Somente o composto 9 sofreu inibição perceptível, sendo que os demais apresentaram resultados semelhantes ao controle quando incubados em presença de DMSO (Figura 60). Estes resultados indicam uma provável atividade hidrolítica dos compostos 7, 8 e 10 com exceção do composto 9 que pode também possuir sua atividade oxidativa, mas não vinculada a formação de radicais hidroxila.

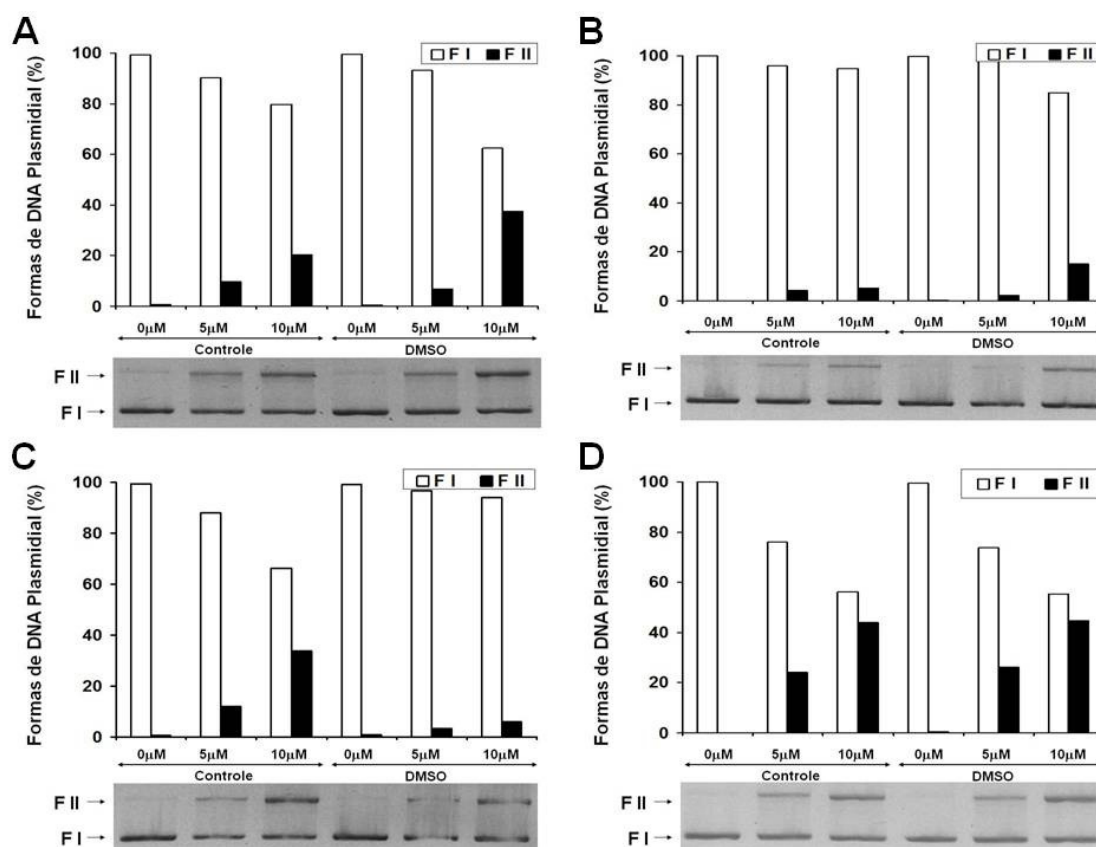


Figura 60: Análise da atividade de clivagem de DNA dos compostos 7, 8, 9 e 10 (A, B, C e D) incubados na presença de DMSO que atua como seqüestrador de radicais hidroxila. Somente o composto 9 demonstrou redução perceptível de atividade indicando possível atividade oxidativa vinculada a radicais hidroxila

4.3.3 Atividade dos compostos 7, 8, 9 e 10 em presença e ausência de oxigênio atmosférico

Os compostos 7, 8, 9 e 10 foram incubados em presença e ausência de oxigênio atmosférico com o objetivo de verificar a forma pela qual o composto executa o corte da molécula de DNA. A atmosfera livre de oxigênio é obtida pelo refluxo de argônio e caracterizada pela ausência de atividade catalítica da substância [Fe(EDTA)] que necessita de oxigênio livre para gerar EROS. As incubações foram realizadas a 50 °C pelo período de 2 horas em pH 6,5. Nenhuma inibição significativa pode ser observada na incubação em atmosfera de argônio para todos os compostos provavelmente pela incapacidade de atingir concentrações eficientes nas condições de incubação indicadas para este procedimento (Figura 61).

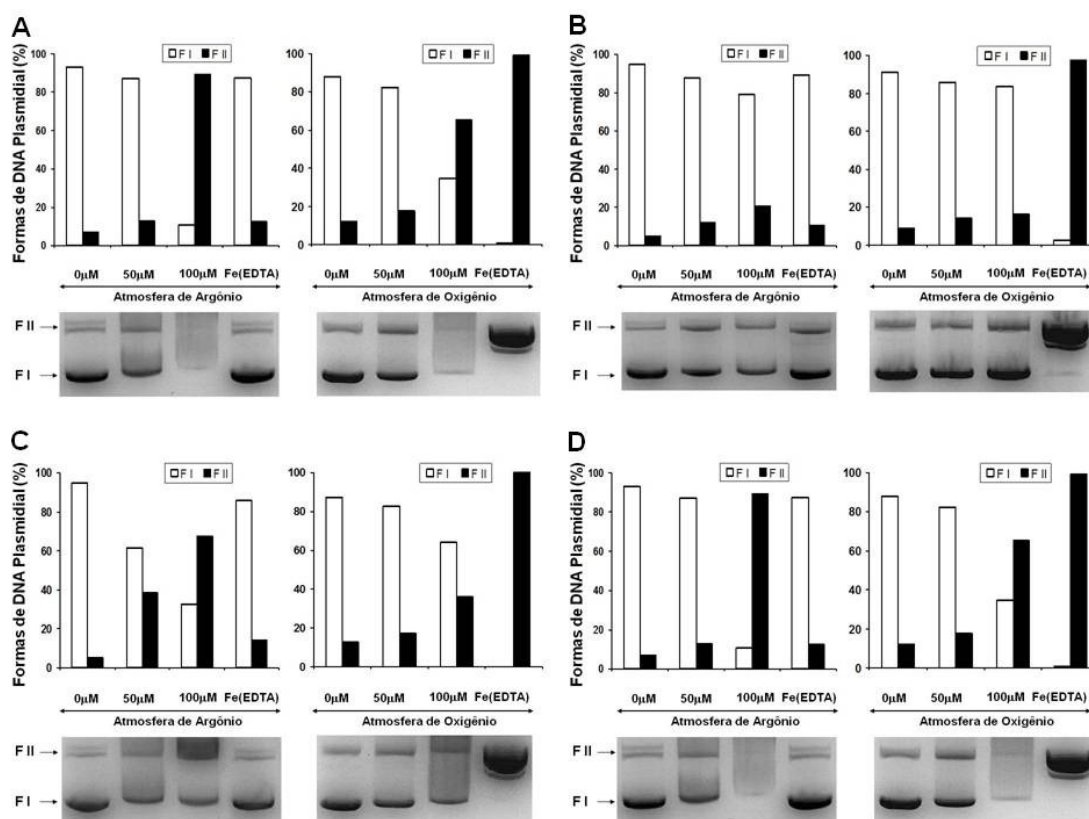


Figura 61: Análise da atividade de clivagem de DNA dos compostos 7, 8, 9 e 10 (A, B, C e D) incubados na presença e ausência de oxigênio. Nenhuma conclusão objetiva foi obtida devido à impossibilidade de serem obtidas condições ótimas de incubação

4.3.4 Análise da cinética da reação de corte da molécula de DNA pelos compostos 7, 8, 9 e 10

Os compostos 7, 8, 9 e 10 foram incubados com DNA em concentrações que variavam de 0 a 30 μM a 50 °C e alíquotas foram retiradas a cada 60 minutos a partir do momento de início da reação, quando também foi retirada uma alíquota, até que se completassem 5 horas. As amostras foram tratadas como descrito no item 3.2.6. Os resultados gráficos obtidos estão demonstrados na figura 62 e os valores de K_{cat} , K_m , eficiência catalítica e incremento da degradação da molécula de DNA vezes constam da tabela 5.

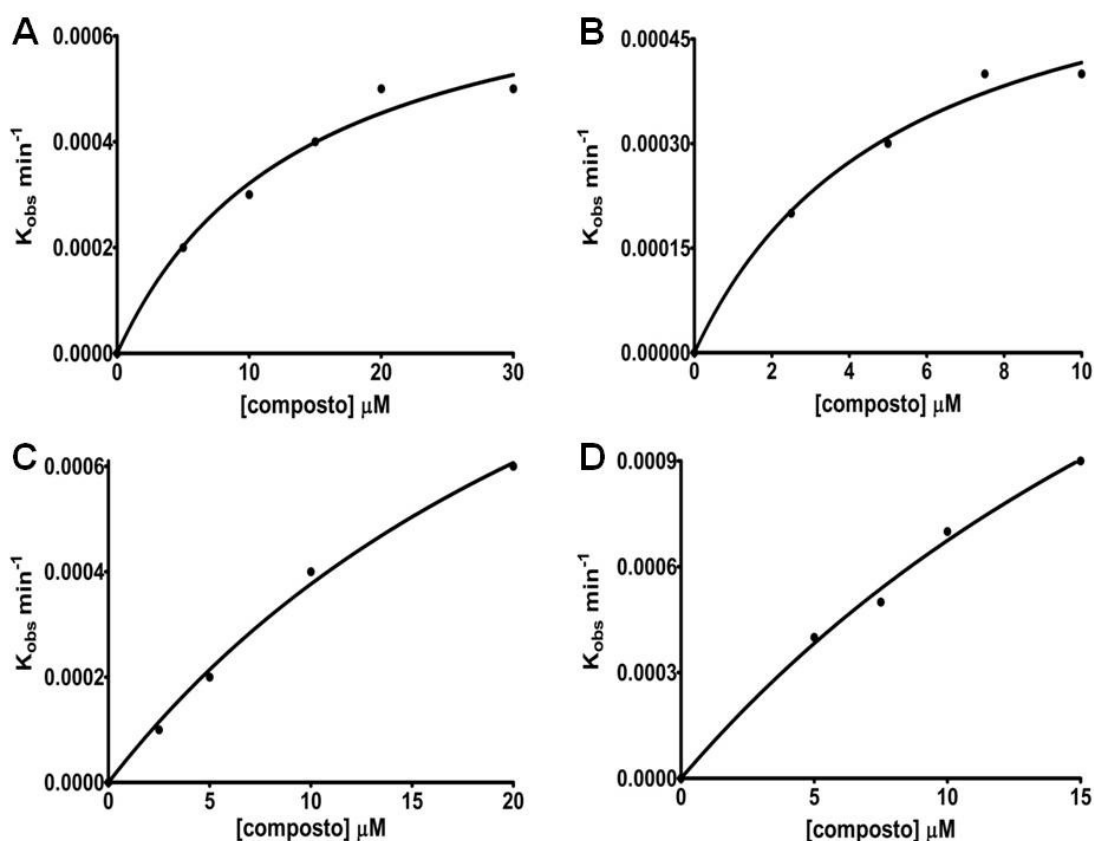


Figura 62: Análise da cinética pseudo-michaeliana dos compostos FeZnMe, H, Br e NO₂ (A, B, C e D) nas concentrações indicadas

Tabela 5: Análise da cinética de reação de corte da DNA plasmidial pelos compostos 7, 8, 9 e 10

Composto	K_m $\mu\text{mol.L}^{-1}$	K_{cat} (h^{-1})	eficiência catalítica $(\text{mol}^{-1}.\text{h}^{-1})$	Incremento de degradação
7	14,10	0,04644	3293,62	$1,29 \cdot 10^6$
8	5,35	0,03832	7107,01	$1,06 \cdot 10^6$
9	31,44	0,09366	2979,01	$2,60 \cdot 10^6$
10	32,05	0,17020	5309,20	$4,73 \cdot 10^6$

4.3.5 Atividade antibacteriana dos compostos 7, 8, 9 e 10 em meio líquido

Inóculos bacterianos das espécies *Escherichia coli* (gram -) e *Staphilococcus aureus* (gram +) foram incubadas em meio líquido em presença de diferentes concentrações dos compostos 7, 8, 9 e 10. A inibição de crescimento bacteriano destas bactérias está expressa na figura 63 A, B, C e D respectivamente.

Pode se observar que os quatro compostos tem atividade frente às bactérias *S. aureus* e *E. coli*. As concentrações inibitórias mínimas são 200 e 400 μM respectivamente para o composto 7, 400 μM para o composto 8, 200 μM para o composto 9 e 100 e 200 μM para o composto 10 sendo este último o que apresentou atividade mais pronunciada.

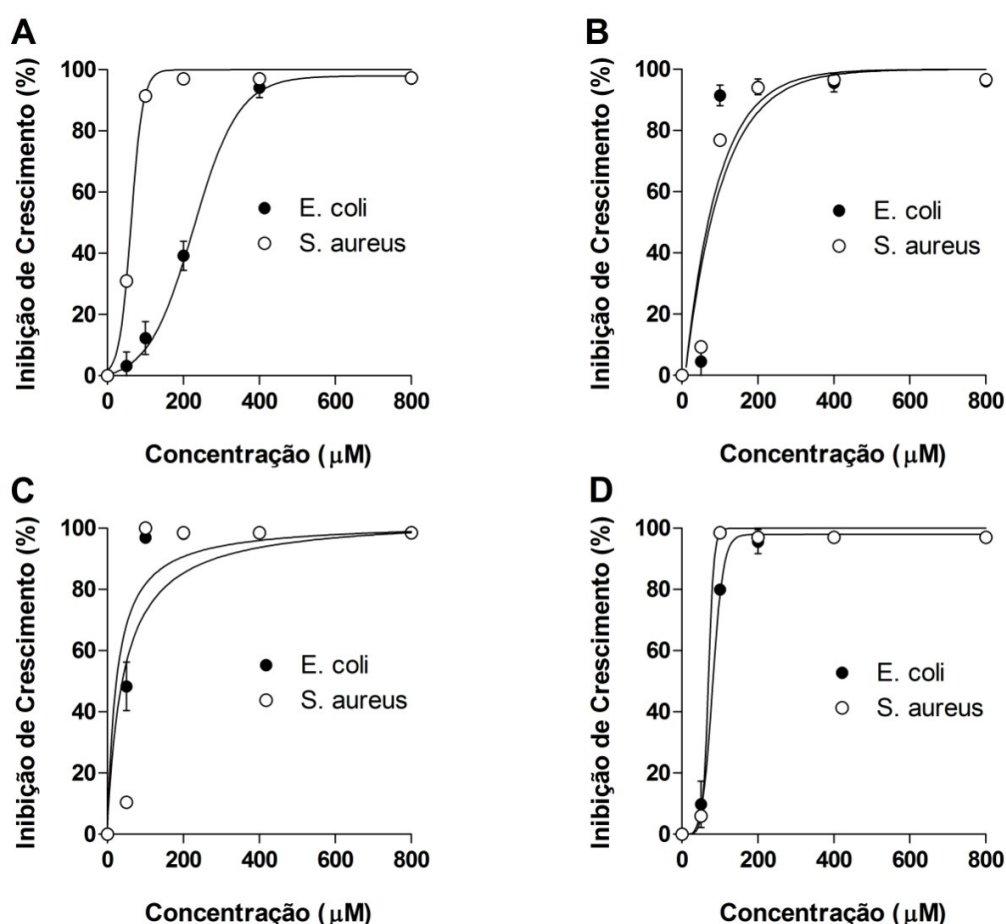


Figura 63: Atividade antibacteriana dos compostos 7, 8, 9 e 10 (A, B, C e D) frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em meio líquido. A inibição do crescimento é expressa como inibição porcentual de densidade óptica (OD_{600})

4.4 COMPOSTOS MONONUCLEARES DE FERRO (II)

Estes compostos, com ligantes derivados de fenantrolina, foram descritos no item 3 e foram divididos em dois grupos. O primeiro grupo é caracterizado por um ferro(II) complexado a uma unidade do ligante e quatro moléculas de água e é representado somente pelo composto 11 $[\text{Fe}(\text{dpq-dTzol})_2(\text{OH}_2)_2]^{+2}$. O segundo grupo é constituído por compostos coordenados de um átomo de ferro(II) complexados a

três unidades de ligantes que ocupam todas as posições de coordenação do metal, a saber composto 12 ($[\text{Fe}(\text{dpq})_3]^{+2}$), composto 13 ($[\text{Fe}(\text{dppz})_3]^{+2}$) e composto 14 ($[\text{Fe}(\text{dpqQX})_3]^{+2}$). Este segundo grupo também apresenta como característica fotosensibilização com luz visível.

4.4.1 Atividade de clivagem de DNA do composto 11 dependente de pH e concentração

O composto 11 foi testado em sua atividade em pHs variando de 6,0 a 8,0 e os resultados são apresentados na figura 64. Foi utilizado o tampão PIPES na concentração de 10 mM para os pHs 6,0 a 7,5 e HEPES na concentração de 10 mM para os pHs de 7,0 a 8,0 em incubações de 16 horas a 50° C. A atividade do composto pode ser observada nestes testes em todos os pHs testados. Nos dois tampões utilizados a atividade do composto foi maior nos pHs mais ácidos e também pode-se observar a maior atividade do composto 11 em tampão HEPES.

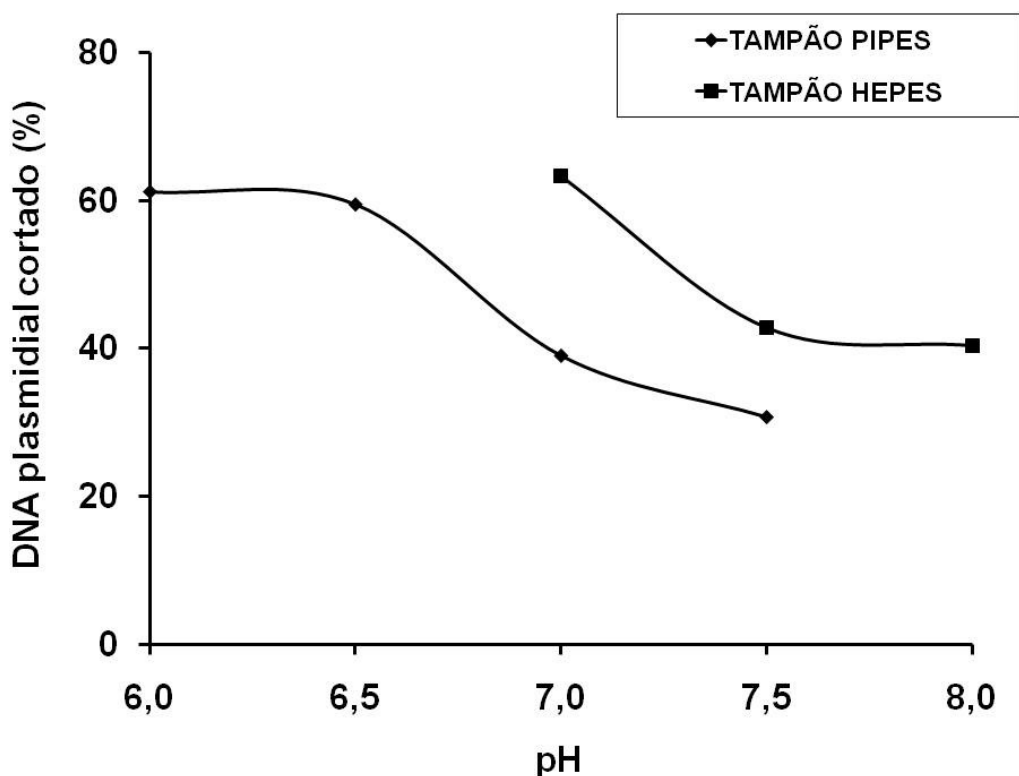


Figura 64: Análise de atividade de clivagem de DNA observada pela proporção de DNA plasmidial quebrado pelo composto 11 em diferentes pHs. A concentração utilizada para confecção desta figura foi de 10 μM . Também pode ser observada a maior atividade do composto em tampão HEPES e em pHs mais ácidos

O aumento da concentração do composto no intervalo utilizado (0 a 80 μM) em incubações de 16 horas a 50 °C em tampão HEPES reflete em um aumento da atividade de clivagem de DNA do composto nos três pHs testados (Figura 65). A ausência da forma superenovelada de DNA plasmidial na concentração de 20 μM do composto 11 em pH 7,0 novamente evidencia a maior atividade em pHs mais ácidos.

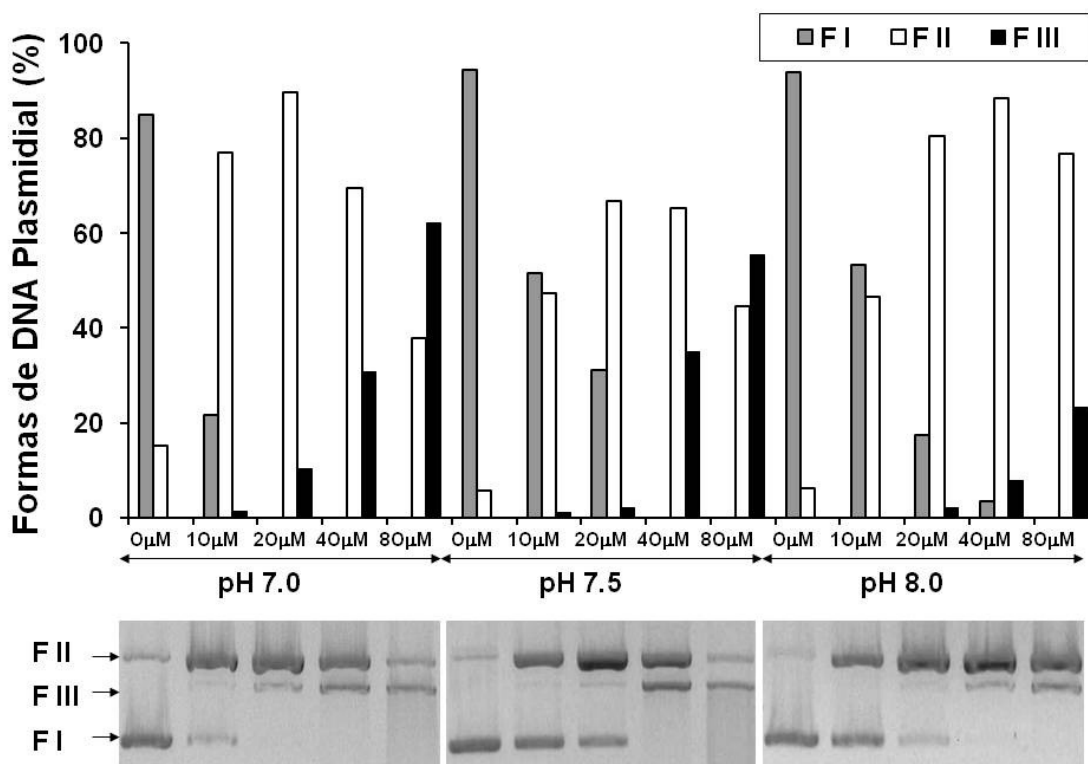


Figura 65: Análise de atividade de clivagem de DNA observada pela proporção de DNA plasmidial cortado pelo composto 11 em diferentes concentrações (0 a 80 μM). O composto apresenta atividade dependente de concentração e de pH sendo esta maior em maiores concentrações e pHs mais ácidos

4.4.2 Atividade de clivagem de DNA do ligante dpq-dTzol não complexado

A atividade de clivagem de DNA do ligante dpq-dTzol não complexado ao ferro(II) foi determinada por incubações de 16 horas a 50 °C em tampão HEPES pH 7,0. Os resultados estão expressos na figura 66 e indicam a ausência de atividade deste ligante quando não complexado com o metal. Uma provável interação do ligante com o DNA pode ser observada pelo aumento da estabilidade do plasmídeo em presença de concentrações maiores da substância.

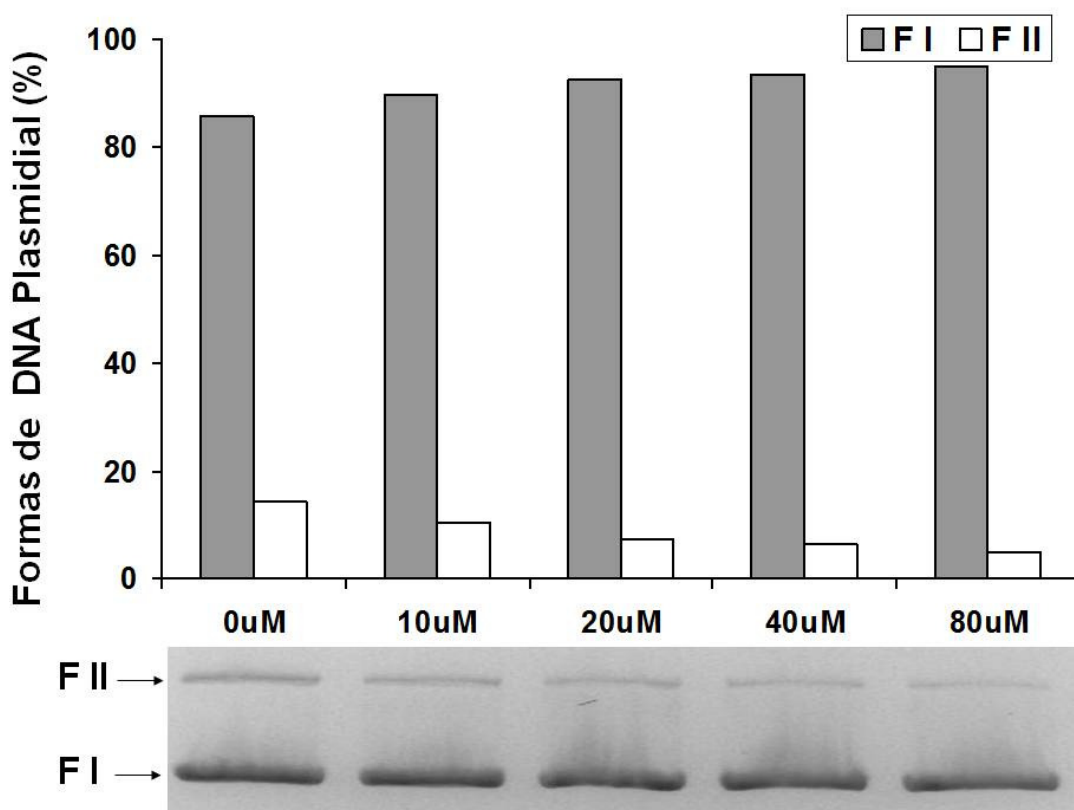


Figura 66: Atividade de clivagem de DNA do ligante dpq-dTzol sobre DNA plasmidial em tampão HEPES pH 7,0. Os resultados indicam ausência de atividade e uma provável interação da substância com a dupla fita em concentrações crescentes do ligante

4.4.3 Atividade de clivagem de DNA do composto 11 em presença de distamicina

O composto foi incubado na presença de distamicina, que é um competidor pela cavidade menor do DNA, durante 2 horas a 50°C em tampão HEPES pH 7,0. O efeito da competição pela cavidade menor pode ser observado na figura 67, onde está demonstrada a ausência de qualquer efeito inibitório na atividade de clivagem de DNA do composto 11, evidenciando atividade baseada em interação com o DNA através da cavidade maior da molécula ou de interação eletrostática.

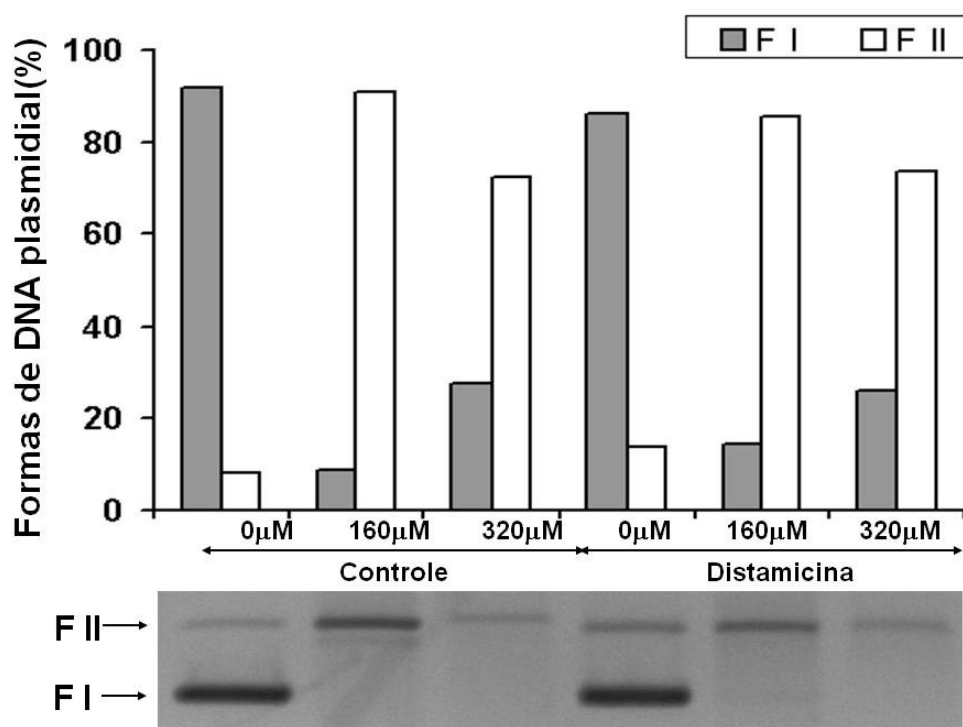


Figura 67: Incubação dos compostos 11 em presença e ausência de distamicina evidenciando atividade baseada em interação com o DNA através da cavidade maior da molécula ou de interação eletrostática

4.4.4 Atividade do composto 11 em presença e ausência de oxigênio atmosférico

O composto 11 foi incubado em presença e ausência de oxigênio atmosférico com o objetivo de verificar a forma pela qual o composto executa o corte da molécula de DNA. A atmosfera livre de oxigênio é obtida pelo refluxo de argônio e caracterizada pela ausência de atividade catalítica do sistema Fe(EDTA) que necessita de oxigênio livre para gerar EAS. As incubações foram realizadas a 50 °C pelo período de 2 horas em tampão HEPES pH 7,0. Os resultados demonstram que o composto 11 tem atividade hidrolítica, pois nenhuma redução significativa da mesma foi observada em atmosfera de argônio (Figura 68).

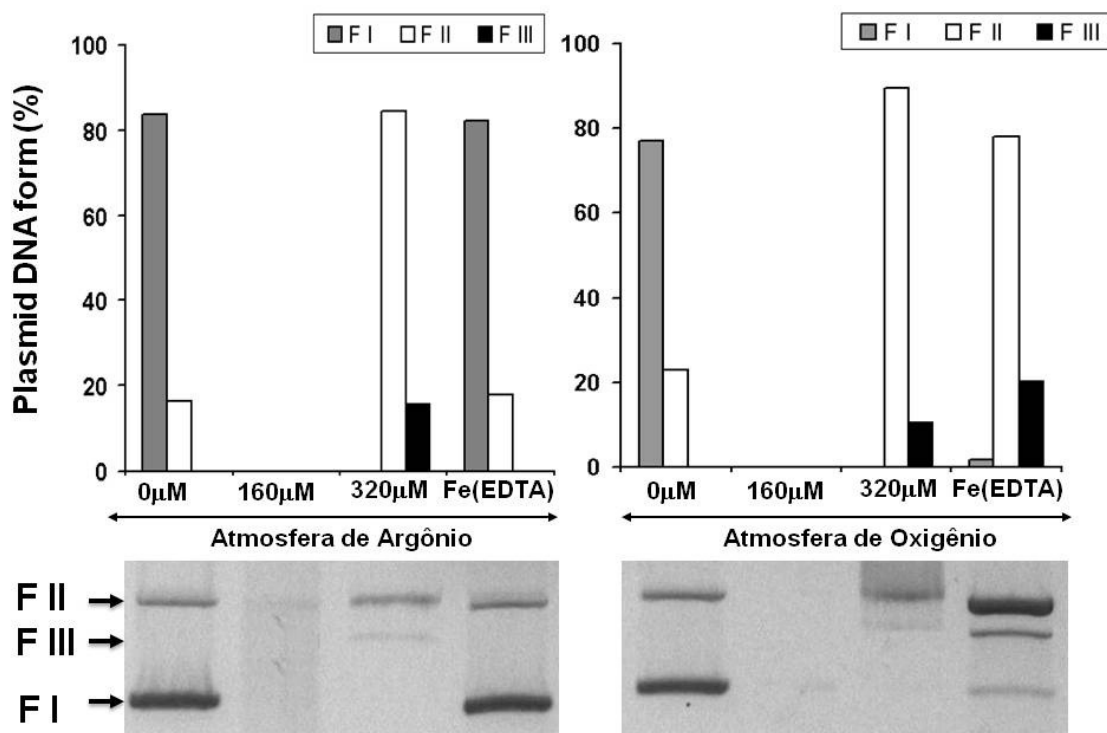


Figura 68: Incubação dos compostos em presença e ausência de oxigênio atmosférico caracterizando a atividade hidrolítica do composto 11 sobre a molécula de DNA

4.4.5 Análise da cinética da reação de corte da molécula de DNA pelo composto 11

O composto 11 foi incubado com DNA em concentrações que variavam de 0 a 160 μM a 50 °C em tampão HEPES pH 7,0 e alíquotas foram retiradas a cada 15 minutos a partir do momento de início da reação, quando também foi retirada uma alíquota, até que se completassem 90 minutos. As amostras foram tratadas como descrito no item 4.6.6. Os resultados obtidos estão demonstrados na figura 69 e os valores de K_m , K_{cat} , eficiência catalítica e incremento da degradação da molécula de DNA constam da tabela 6.

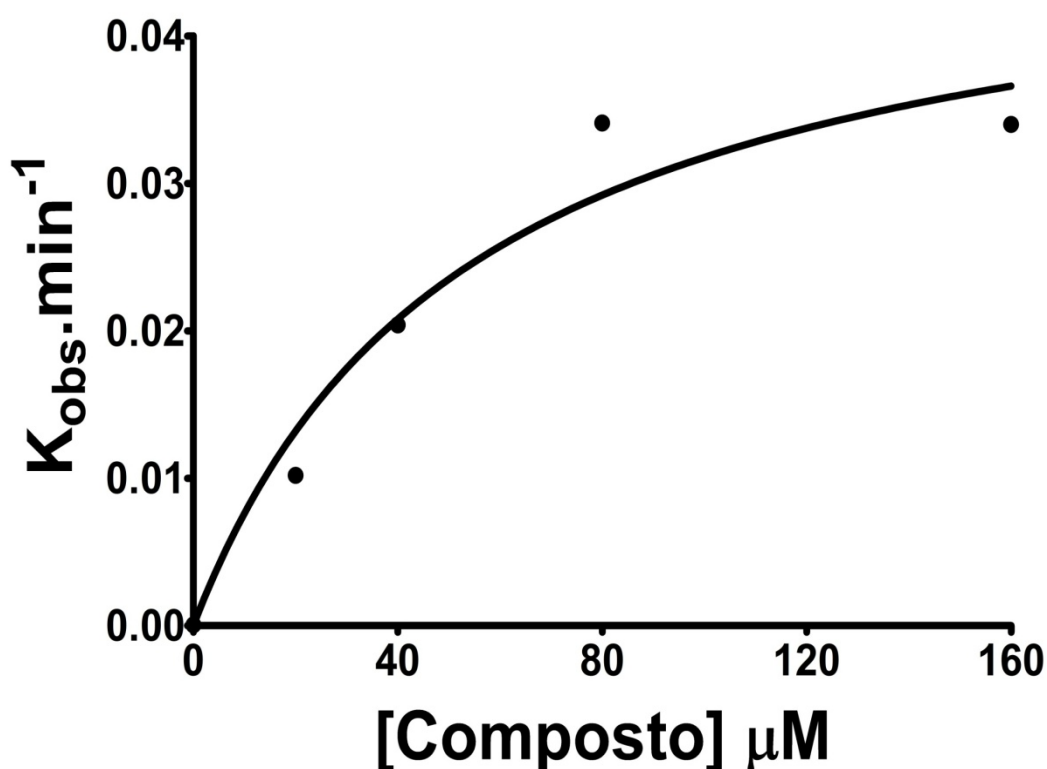


Figura 69: Análise da cinética pseudo-michaeliana do composto 11

Tabela 6: Análise da cinética de reação de corte da DNA plasmidial pelo composto 11

Composto	K _m (μmol.L ⁻¹)	K _{cat} (h ⁻¹)	eficiência catalítica (mol ⁻¹ .h ⁻¹)	Incremento de degradação
11	54,26	2,9406	5419,46	8,17.10 ⁷

4.4.6 Cálculo da especificidade de sítio de corte de DNA do composto 11

A razão entre cortes simples e duplos foi calculada conforme Cowan, Collis e Grigg (1987). Também foi calculada a razão de número de cortes por μmol. Os resultados estão expressos na tabela 7 como média acompanhada de desvio padrão.

Os resultados obtidos demonstram um padrão aleatório de cortes de DNA revelando que o composto 11 produz quebras de modo inespecífico. As razões de cortes por concentração de composto indicam grande atividade do complexo.

Tabela 7: Razão entre cortes simples e duplos razões de número de cortes por μmol calculadas para os três compostos 11

Composto	n1	n2	n1/n2	n1/[comp]
11	1,66 \pm 0,27	0,02 \pm 0,01	72,57 \pm 3,27	0,03 \pm 0,01

4.4.7 Atividade de clivagem de proteína do composto 11

O composto 11 foi testado frente à proteína albumina de soro bovino (BSA) nas concentrações de 0, 12,5, 25,0 e 50,0 μM com o objetivo de determinar a presença de atividade de clivagem de proteína e conseqüente interação composto proteína. O composto 11 não apresentou, nas concentrações testadas, atividade de clivagem de proteína detectável (Figura 70).

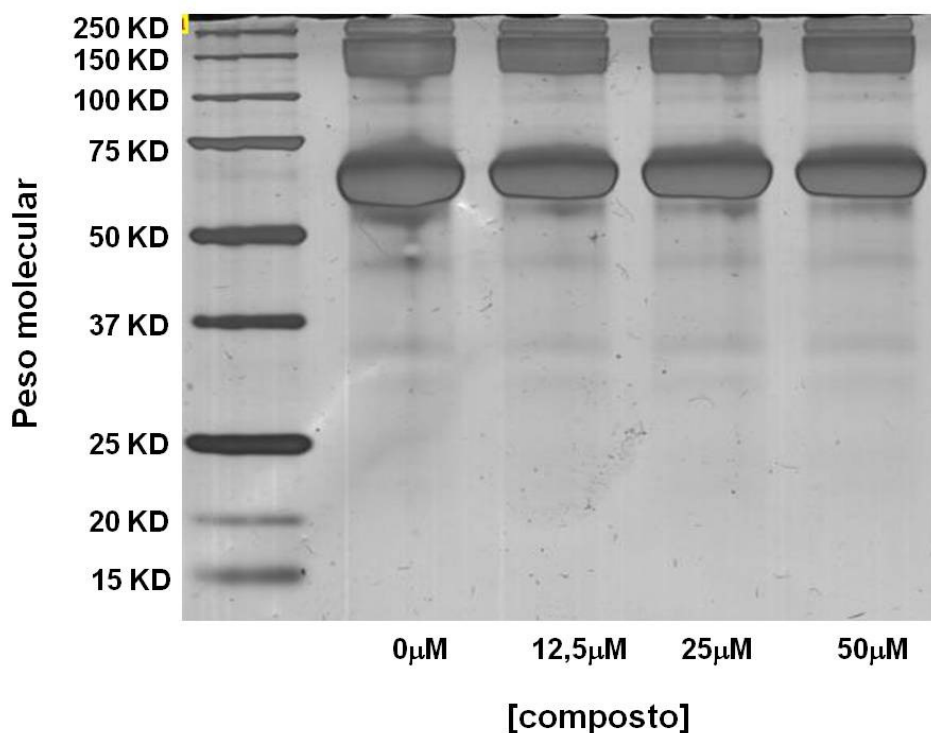


Figura 70: Análise da atividade de clivagem de proteína do composto 11 incubados 6 horas a 50°C com proteína BSA em concentrações crescentes. Não foi encontrada, nas concentrações testadas, atividade de clivagem de proteína detectável

4.4.8 Atividade antibacteriana do composto 11 em meio líquido

Inóculos bacterianos das espécies *Escherichia coli* (gram -) e *Staphylococcus aureus* (gram +) foram incubadas em meio líquido em presença de diferentes concentrações do composto 11 (0, 50, 100, 200, 400 e 800 μM). A inibição de crescimento bacteriano destas bactérias está expressa na figura 71. Pode se observar que o composto tem maior atividade frente a bactéria *S. aureus* quando comparada com *E. coli*. Em nenhuma concentração foi possível observar uma inibição total de crescimento bacteriano frente às bactérias testadas.

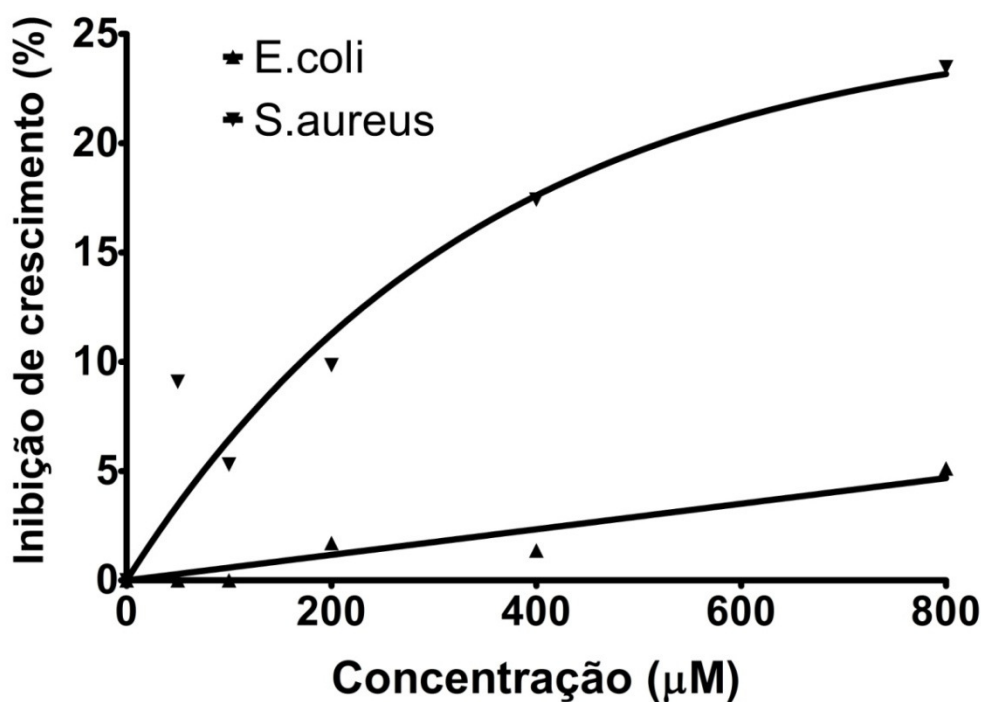


Figura 71: Atividade antibacteriana do composto 11 frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em meio líquido. A inibição do crescimento é expressa como inibição porcentual de densidade óptica (OD_{600})

4.4.9 Atividade de clivagem de DNA dos compostos 12, 13 e 14 dependente da presença ou ausência de luz visível e de concentração

Os compostos 12, 13 e 14 foram testados quanto a sua atividade em presença e ausência de luz visível e os resultados são apresentados na figura 72. Foi utilizado o tampão HEPES pH 7,5 em incubações de 2 horas a 37°C . Todos os

compostos apresentaram atividade de clivagem de DNA tanto em presença como na ausência de luz visível, mas esta sempre foi maior na primeira situação. Podem ser observados aumentos de atividade proporcionais ao aumento de concentração dos complexos 13 e 14; já o complexo 12 aparentemente não apresenta aumento de atividade quando tem sua concentração aumentada tanto em presença como na ausência de luz. Os compostos 13 e 14 apresentaram atividade semelhantes de degradação de DNA e muito superiores ao composto 12.

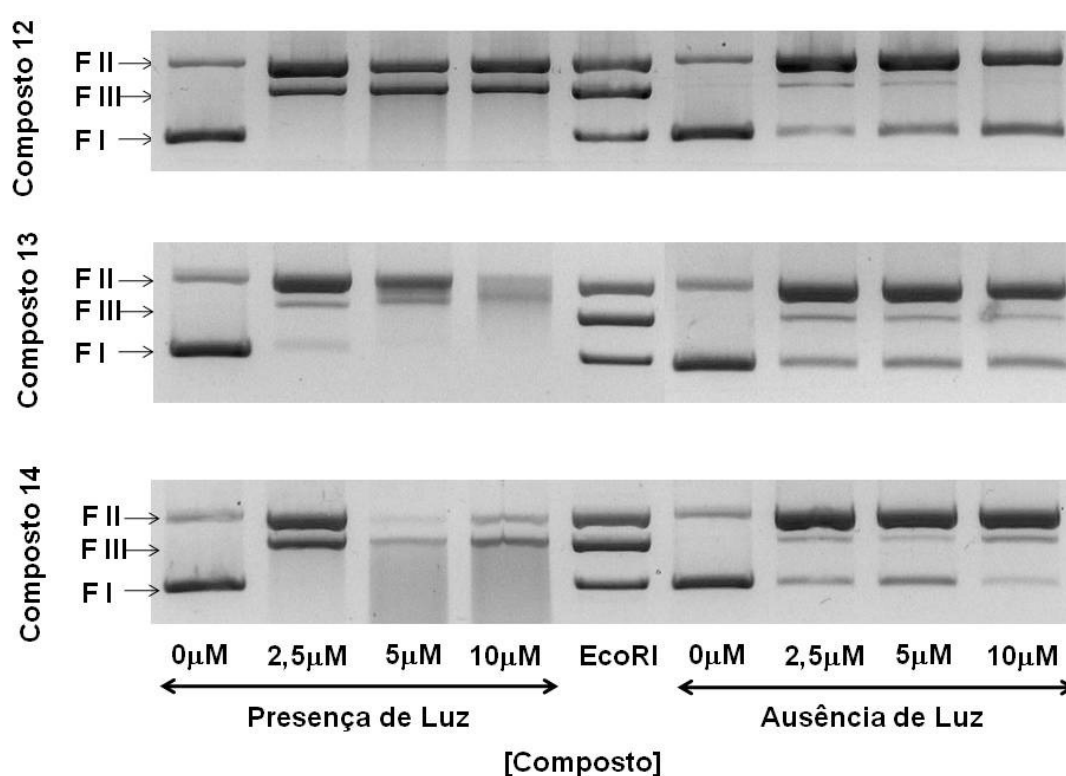


Figura 72: Análise de atividade de clivagem de DNA observada pelo aumento de DNA plasmidial quebrado pelos compostos 12, 13 e 14 em diferentes concentrações em presença e ausência de luz visível. Pode ser observada a maior atividade em presença de luz visível e dos compostos 13 e 14 em relação ao composto 12

4.4.10 Atividade de clivagem de DNA dos compostos 12, 13 e 14 em presença de DMSO e distamicina

Os compostos 12, 13 e 14 foram incubados na presença de distamicina, que é um competidor pela cavidade menor do DNA e na presença de DMSO que atua como seqüestrador de radicais hidroxila necessários a atividade oxidativa de

muitas nucleases. As incubações foram realizadas durante 2 horas a 37° C em presença de luz visível. O efeito da inibição pela presença de DMSO e a competição pela cavidade menor promovida pela distamicina podem ser observados na figura 73. Observa-se a ausência de qualquer efeito inibitório na atividade de clivagem de DNA pelo DMSO para todos os compostos e inibição por distamicina somente para o composto 12. Estes resultados indicam que os compostos provavelmente agem por uma via oxidativa independente da formação de radicais OH[•]. A inibição por distamicina ocorre somente pela menor molécula, provavelmente devido à maior afinidade desta pelo ambiente confinado da cavidade menor quando comparada com suas similares que possuem estruturas planares mais longas, mais adaptadas a intercalação entre pares de bases via cavidade maior.

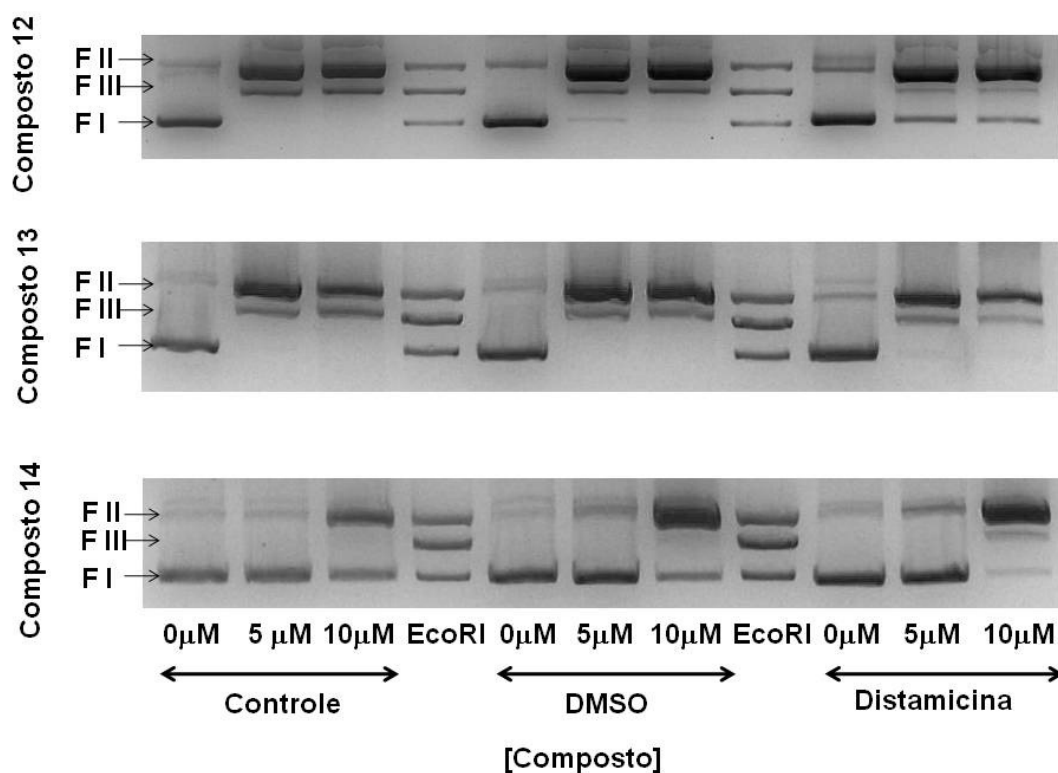


Figura 73: Resultados da incubação dos compostos 12, 13 e 14 em presença de DMSO e distamicina. Pode ser observada a ausência de qualquer efeito inibitório na atividade de clivagem de DNA pelo DMSO para todos os compostos e inibição por distamicina somente para o composto 12

4.4.11 Atividade de clivagem de proteína dos compostos 12, 13 e 14

Os compostos 12, 13 e 14 nas concentrações de 0, 12,5, 25,0 e 50,0 μM foram testados frente a proteína albumina de soro bovino (BSA) com o objetivo de determinar a presença de atividade de clivagem de proteína e conseqüente interação composto/proteína. As incubações foram realizadas por 2 horas a 37°C na presença e ausência de luz visível. Os compostos 12, 13 e 14 apresentaram atividade de clivagem de proteína somente em presença de luz. Esta é detectável através da formação de bandas com peso molecular menor em todas as concentrações testadas. Na ausência de luz nenhuma atividade significativa pode ser detectada (Figura 74).

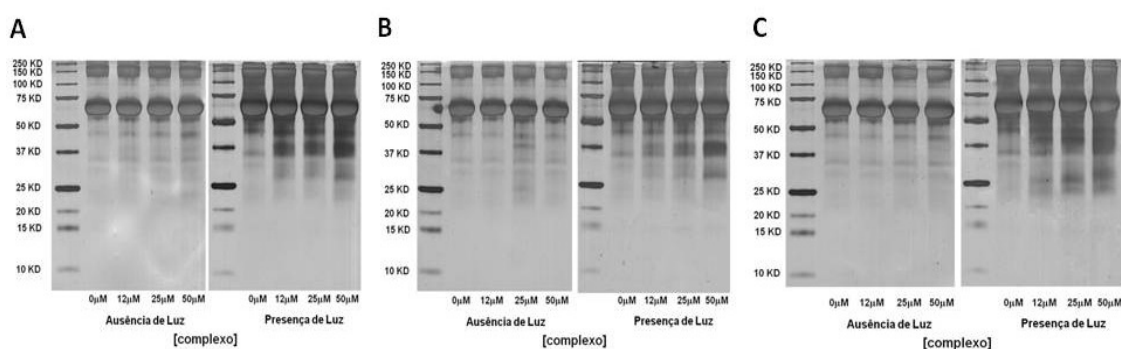


Figura 74: Análise da atividade de clivagem de proteína dos compostos 12 (A), 13 (B) e 14 (C) incubados 2 horas a 37° C em pH 7,5 com proteína BSA em concentrações crescentes. Somente foi encontrada atividade nas incubações realizadas na presença de luz

4.4.12 Atividade antibacteriana dos compostos 12, 13 e 14 em meio líquido

Inóculos bacterianos das espécies *Escherichia coli* (gram -) e *Saphilococcus aureus* (gram +) foram incubados em meio líquido em presença de diferentes concentrações dos compostos 12, 13 e 14 (0, 5, 10, 20, 40 e 80 μM). A inibição de crescimento bacteriano destas bactérias está expressa na figura 75 respectivamente. Pode se observar que os compostos tem maior atividade frente a bactéria *S. aureus* quando comparada com *E. coli*. Em nenhuma concentração foi possível observar uma inibição total de crescimento bacteriano frente às bactérias testadas.

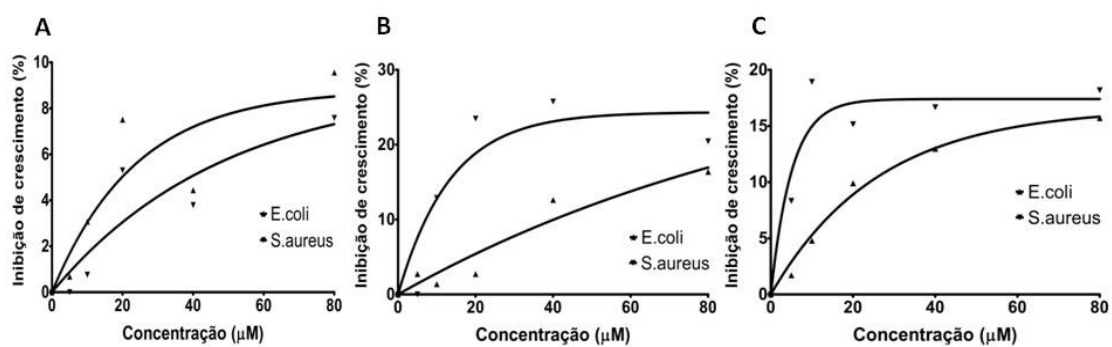


Figura 75: Atividade antibacteriana dos compostos 12 (A), 13 (B) e 14 (C) frente as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* em meio líquido. A inibição do crescimento é expressa como inibição percentual de densidade óptica (OD_{600}) demonstrando que os compostos tem maior atividade frente a bactéria *S. aureus* quando comparada com *E. coli*

5 DISCUSSÃO

5.1 Compostos Binucleares de Cobre [Cu₂(μ-OH)L₂]

Estes complexos, miméticos de catecol oxidases, apresentaram atividades variadas sobre os substratos testados. As catecol-oxidases são enzimas comuns em plantas pertencentes a classes das oxiredutases que contém um centro dinuclear de cobre. Quando avaliados como nucleases todos demonstraram atividade, embora com capacidades diferentes como demonstrado nas figuras 28, 29 e 33 e na tabela 1. Surpreendentemente o complexo Cu₂(μ-OH)₂, que é um híbrido dos outros apresenta a atividade mais proeminente caracterizada pelo seus valores de cinética de reação. Nos testes por inibição por distamicina (Figura 30) (HIRAKU, OIKAWA, KAWANISHI, 2002) os compostos 1 e 2 sofreram inibição caracterizando atividade através do sulco menor e o composto 3 que não sofreu inibição tem provavelmente atividade baseada em outra forma de interação podendo ser eletrostática ou intercalante de sulco maior (ZELIGS et al,2007). Os dois primeiros compostos foram testados quanto a forma de sua atividade de clivagem de DNA (Figuras 31 e 32) e ambos apresentam atividade hidrolítica mas uma atividade oxidativa característica pode ser observada para o composto 2. Estes resultados podem ser verificados através dos experimentos em atmosfera livre de oxigênio (Figura 32), onde a ausência deste não inibe a atividade do composto 1 mas tem eficiência parcial sobre a atividade do composto 2. A atividade oxidativa do composto é provavelmente livre da formação de radicais OH, pois a incubação do complexo em presença de DMSO não afetou sua atividade (Figura 31). A inibição observada, ainda que não total, é exatamente no complexo de maior atividade sugerindo que esta esteja ligada a um ganho em sua capacidade oxidativa. O resultado indicando uma atividade de clivagem de DNA mista poderia ser esperado uma vez que a atividade catecolásica é eminentemente oxidativa.

A partir de um pH de 6,2 a forma predominante do composto 1 em solução (REY et al, 2009), e provavelmente também dos outros dois compostos, está relacionado a formação da estrutura μ-hidroxo do mesmo, que em pHs mais baixos se apresenta protonada. Esta forma pode estar intimamente relacionado ao pico de atividade de clivagem de DNA encontrado próximo e acima este pH (Figura 28). A partir de dados espectrofotométricos juntamente com dados cinéticos foi proposto

que o DNA se liga ao composto 1 através de um átomo de oxigênio em uma forma monodentada. Este deve envolver como fator limitante, um ataque intra-molecular do íon hidróxido que faz a ponte entre os dois átomos de cobre do composto resultando na hidrólise da ligação P-O do substrato. Deve ser notado que os dados cinéticos obtidos por Rey et al. (2007) utilizando BDNPP (bis(2,4-dinitrophenyl)phosphate) com um pK_a de $6.0 \pm 0,02$ estão em concordância com estes. A forma de atuação do composto 2 deve pelo menos em parte obedecer aos mesmos critérios mas provavelmente a alteração na forma da molécula leva a uma atuação em um sítio diferenciado do DNA que possibilita um ataque oxidativo responsável pelo aumento de atividade deste composto. Já o composto 3 teve sua atividade extremamente reduzida também provavelmente devido a alterações da estrutura do ligante (JIANG et al, 2007). Estes resultados são corroborados pelos cálculos cinéticos dos complexos que colocam os dois primeiros entre os complexos mais ativos quando comparados com os descritos na literatura (SREEDHARA, FREED e COWAN, 2000; LIU et al, 2004; JIANG et al, 2007). As razões de cortes simples e duplos calculados conforme descrito por Cowan, Collis e Grigg (1987), calculadas para os compostos 1 e 2 (Tabela 2) levam a conclusão que estes compostos realizam muitos cortes aleatórios até linearizarem a molécula e atuam de maneira inespecífica sobre o DNA sendo o segundo pouco menos específico que o primeiro. Estes valores não puderam ser calculados para o composto 3 pois este não apresentou cortes duplos suficientes nas concentrações testadas. Os valores de cortes simples por μmol de composto demonstram a maior atividade do composto 2 e a baixa atividade de 3 (Tabela 2).

Estudos de espectrofotometria realizados com os compostos incubados com CT-DNA (Figura 34) reforçam os dados obtidos com a interação com DNA plasmidial observada em gel de eletroforese. O hipocromismo demonstrado por todos os compostos sugere um processo de transferência de carga quando da interação com o substrato (DIMITRAKOPOULOU et al, 2007). O composto 2 mostra já interagir com DNA em concentrações menores que os outros dois complexos. Diferentemente dos resultados eletroforéticos o composto 3 parece interagir fortemente com o CT-DNA em concentrações mais altas. Este resultado leva a suposição que a estrutura do composto 3 apesar de manter sua capacidade de ligação com a o DNA coloca seu centro ativo em uma posição desvantajosa para que este possa clivar a molécula.

Nos estudos de interação com proteína os compostos 1 e 2 demonstraram clivar a proteína BSA provavelmente em um sítio específico pois são formadas bandas peptídicas de tamanhos específicos de aproximadamente 38 KD e 28 KD (Figura 35). Cabe salientar que ambos os complexos formam estruturas semelhantes levando a crer que o modo de atuação é provavelmente o mesmo. Estes resultados são semelhantes aos descritos por Oliveira et al (2005) com compostos mononucleares de cobre (II). O composto 3 não levou a formação de nenhuma banda mas sim a um aumento de massa da proteína original. Este resultado demonstra interação com a proteína, mas incapacidade de gerar cortes de maneira semelhante ao da molécula de DNA.

Estudos espectrofotométricos apresentam resultados que demonstram que os complexos interagem com a proteína (Figura 36). Os compostos 1 e 2 apresentam um hipercromismo crescente, proporcional ao aumento de concentração de proteína, excetuando-se para a concentração de 200 μM que provavelmente indica um limite de atividade do composto. Os compostos 2 e 3 apresentam uma alteração batocrômica de λ_{354} para λ_{361} e λ_{412} para λ_{428} respectivamente que são atingidas na maior concentração para o composto 2 e na menor concentração para o composto 3. O resultado para o último composto indica provavelmente uma saturação dos sítios de ligação deste com a proteína (DIMITRAKOPOULOU et al, 2007). Nos experimentos realizados com período de incubação (Figura 39) os compostos 1 e 2 revelaram a extinção da banda original após a incubação de λ_{360} e λ_{350} e a formação de um novo pico em λ_{437} e λ_{410} respectivamente. O ponto isobéptico detectado demonstra a transição da forma original do composto para uma nova estrutura formada através do processo de clivagem da proteína e que somente duas formas desta substância estão envolvidas. Este fato indica que o complexo está interagindo com a proteína provavelmente de forma covalente ligando-se a mesma provavelmente de maneira irreversível. O composto 3 apresentou resultados semelhantes aos dos experimentos sem período de incubação corroborando com os resultados anteriores que demonstram que o composto interage com a molécula de proteína mas não possui a habilidade de clivar a mesma.

Os estudos de dicroísmo circular (Figura 38) realizados apontam para resultados semelhantes onde os compostos 1, 2 e 3 demonstram, através da

diminuição de alfa-hélices, sua capacidade de interagir com a proteína BSA. Estes resultados estão em concordância com outros resultados obtidos por Gharagozlou e Boghaei (2008) com compostos de zinco os quais também promoveram redução do sinal característico de alfa-hélices. O composto tem sua capacidade de precipitar a proteína em solução, demonstrada pela alteração da curva na maior concentração testada.

Também foram descritos para o composto 1 dados de absorção e ligação do mesmo com a molécula de DNA em culturas de células, através dos quais pode-se observar que o complexo é prontamente absorvido pelas células em minutos e que este forma adutos com o DNA destas. Estes fatos podem estar intimamente ligados a atividade de inibição de crescimento. Dados de citotoxicidade em duas linhagens de células tumorais, GLC4 e K562, foram observados e foram obtidos valores de IC₅₀ de 14,83 e 34,21 µM respectivamente (REY et al, 2009).

Os resultados de atividade genotóxica, cinética de dano e reparação de DNA obtidos para o composto 1 estão em concordância com os dados descritos por Rey et al. (2009). O complexo é absorvido pelas células leucocitárias de sangue periférico tanto humano como de camundongos e em questão de minutos a horas promovem danos sobre as moléculas de DNA detectáveis com o teste cometa (Figura 39). Em camundongos os danos ao DNA atingem seu ápice em 30 e 60 minutos para as concentrações de 100 e 50 µM respectivamente, detectando-se logo após uma redução dos mesmos que é característica dos processos celulares de reparação de DNA (Figura 41). O composto 2 apresenta resultados semelhantes para células humanas (Figura 40) somente necessitando de intervalos maiores de tempo para atuar em camundongos provavelmente devido a uma dificuldade maior de absorção pela célula ocasionada pela alteração da estrutura da molécula (Figura 41). Estes resultados aliados aos obtidos por Rey et al (2009) demonstram que os compostos tem atividade genotóxica e esta está provavelmente ligada diretamente a capacidade dos compostos de interagir com o DNA *in vivo*.

Nos testes de inibição de crescimento bacteriano (Figura 42) os três complexos apresentaram resultados semelhantes sendo capazes de inibir o crescimento da bactéria gram+ *Staphilococcus aureus* mas apresentaram pouca ou nenhuma atividade sobre a bactéria gram- *Escherichia coli*. Estes resultados indicam que diferenças de metabolismo ou de parede celular, provavelmente influenciando no transporte, podem estar vinculadas a atividade *in vivo* destes. Dimitrakoupoulou et

al, (2007) sugere que a atividade antimicrobiana dos compostos pode estar ligada ao tamanho dos centros metálicos em uma relação direta. Este fato pode explicar o motivo pelo qual os três complexos que possuem sua estrutura metálica idêntica apresentam resultados semelhantes.

5.2 Compostos de Fe(II) 4, 5 e 6

Os compostos 4, 5 e 6 demonstraram atividade de clivagem de DNA em todos os pHs testados, mas tiveram sua maior atividade em torno do pH 7,0 (Figura 43). Da mesma maneira os três compostos apresentaram correlações diretas de concentração e atividade em pH 7,0 (Figura 44) e inibição por distamicina (Figura 45) indicando que a atividade de clivagem de DNA destes dependem de suas concentrações e atuam preferencialmente através da cavidade menor do DNA. Quando testados frente ao quelante de radicais hidroxila, DMSO, nenhuma inibição significativa foi encontrada para os três compostos (Figura 46). Quando testados em presença e ausência de oxigênio o composto 4 não teve sua atividade inibida mas os seus análogos 5 e 6 apresentaram uma inibição parcial demonstrando a presença de atividade oxidativa (Figura 47). A atividade do primeiro composto é hidrolítica, dos seguintes é mista, independente de radicais hidroxila, que provavelmente deve-se a alterações presentes na estrutura dos ligantes aonde o primeiro possui sulfatos em posições ocupadas por átomos de cloro nos outros dois. A atividade provavelmente oriunda da ponte μ -oxo nos compostos 4 e 6 ou da molécula de água coordenada ao ferro no composto 5 e provavelmente suas diferenças de atividade devem-se a presença de sulfatos no composto 4 e cloros nos compostos 5 e 6. No entanto existe uma forte possibilidade destes compostos, quando em solução, terem estes radicais trocados por moléculas de água, sendo então estas diferenças provavelmente resultantes da atuação destes radicais em solução.

Os valores catalíticos calculados para estes complexos (Figura 48 e tabela 3) os colocam como complexos de alta atividade. Os valores de incremento de degradação do DNA ($3,39 \cdot 10^8$, $2,78 \cdot 10^8$ e $1,92 \cdot 10^8$ respectivamente) são superiores a muitas descritas na literatura até o presente momento (SREEDHARA, FREED e COWAN, 2000; LIU et al, 2004; JIANG et al, 2007). Os valores de cortes simples (n1) e duplos (n2) obtidos para os complexos que resultam em razões n1/n2 bastante

reduzidos indicam uma especificidade de corte destes compostos pois os mesmos executam o segundo corte bem próximo ao primeiro (Tabela 4).

Em estudos espectrofotométricos dos compostos incubados com CT-DNA por 12 horas a 50°C os resultados apresentaram-se inusitados (Figura 49). O composto 4 apresentou para as concentrações menores de CT-DNA um hipocromismo, mas quando incubado com 200 µM do mesmo (4-1 de composto) um hipercromismo foi detectado. Nos testes realizados com os compostos 5 e 6 todas as concentrações de CT-DNA apresentaram hipercromismo quando comparada com a incubação controle que havia perdido sua forma característica. Estes resultados aliados aos obtidos por estudos espectrofotométricos com proteína BSA (Figura 52), que mostraram-se bastante semelhantes, levam a conclusão que estes compostos são instáveis em solução de pH 7,0 a 50°C, conforme pode ser observado na figura 53, mas que a presença de um substrato (DNA ou proteína) e a ligação dos compostos a estes estabiliza, pelo menos parcialmente, sua estrutura. A interação com proteína BSA sem período de incubação (Figura 51) mostra através do hipercromismo observado que os compostos interagem com esta em sua forma original. Estes resultados associados com os estudos eletroforéticos de fragmentação da proteína BSA pelos compostos (Figura 50) e aos estudos de dicroísmo circular onde um aumento de alfa-hélices pode ser observado (Figura 54) demonstram a capacidade destes de interagir com a proteína alterar sua estrutura e fragmentá-la em locais específicos. Estes resultados estão em concordância com resultados obtidos por Oliveira et al (2005) e Dimitrakoupoulou et al, (2007).

Estas atividades, de clivagem de DNA e de clivagem de proteína, levaram a possibilidade de estudos dos efeitos destes compostos *in vivo*. Testes de genotoxicidade foram executados com os três compostos em incubações contendo sangue humano total e leucócitos isolados da mesma amostra. Os resultados obtidos demonstram que os compostos são capazes de interagir com estas células e direta ou indiretamente promover dano ao DNA das mesmas em concentrações de 100 a 200 µM para os compostos 4 e 5 e em todas as concentrações testadas para o composto 6, sendo este caracterizado como mais ativo (Figuras 61,62 e 63 respectivamente). Nos testes de inibição de crescimento bacteriano os compostos foram eficientes em inibir parcialmente o crescimento das bactérias *Escherichia coli* (gram-) e *Staphilococcus aureus* (gram +) mas não foi possível encontrar nas condições testadas uma concentração inibitória mínima (Figura 58).

5.3 Compostos Binucleares de Fe(II)Zn(III)R 7, 8, 9 e 10

Estes são compostos miméticos estruturais e funcionais de fosfatases ácidas púrpuras que são as únicas metal-hidrolases que necessitam de um sítio ativo heterovalente. O composto 8 descrito por Neves et al, (2007) teve sua estrutura cristalina descrita juntamente com sua atividade de hidrolase sobre o substrato ativado 2,4-bis(dinitrofenil)fosfato e seu modo de ação foi determinado de descrito como primeiramente a ligação de uma unidade do composto ao fósforo através da substituição da água ligada ao zinco e posteriormente da oxidrila ligada ao ferro. Também foi descrito que a ponte μ -hidroxo que une os dois metais é menos ativa que seu a oxidrila ligada ao ferro.

Em estudos posteriores o composto 8 juntamente com os outros três complexos, foram caracterizados quimicamente, tiveram suas atividades frente a BDNPP, DNA (este trabalho) e células cancerosas das linhagens GLC4 e K562 (PERALTA et al., em redação). Nestes estudos demonstrou-se que a forma presente dos compostos é $[(OH)Fe(\mu-OH)Zn(OH_2)]$ que fornece um excelente nucleófilo através do OH coordenado ao centro de Fe(III). Esta característica é também fortemente influenciada pelos grupos para (R) substituintes no fenolato terminal do Fe(III). Estes substituintes devido as suas características de doadores dos radicais Me e H e aceptores dos radicais Br e NO_2 estabilizam o ferro nas formas Fe(III) e Fe(II) respectivamente, fato este que pode influenciar decisivamente no modo de atuação da molécula sobre seus substratos.

Os compostos foram analisados quanto a sua atividade de clivagem de DNA em presença de distamicina (Figura 59) e demonstrou-se que os compostos 8 e 9 atuam provavelmente através do sulco maior e os compostos 7 e 10 atuam pelo menos em parte através do sulco menor. Estes também foram incubados em presença de DMSO que é quelante de radicais OH (Figura 60) e somente o composto 9 foi inibido pela substância. Os outros possuem ou atividade hidrolítica ou oxidativa livre de radicais OH. Nos dados de cinética enzimática sobre o substrato ativa BDNPP que é degradado eminentemente por hidrólise obtidos por Peralta et al., (em redação) a atividade dos compostos pode ser retratada como $7 > 8 > 9 > 10$, mas quando dados cinéticos de suas atuações enzimáticas sobre DNA plasmidial foram observados a situação se inverte sendo os últimos mais ativos que os primeiros e principalmente o composto 10, o mais ativo de todos (Figura 62 e Tabela

5). A maior atividade do composto 9 pode ser explicada pela sua atividade oxidativa que não pode ser observada sobre o substrato BDNPP ou pelo potencial redox do par $\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L-Br}/\text{Fe}^{\text{II}}\text{Zn}^{\text{II}}\text{L-Br}$ que está deslocado para o anodo quando comparada com os compostos 7 e 8. Já a atividade maior do composto 10 não pode ser explicada a menos que este apresente uma atividade oxidativa independente da formação de radicais OH pois os experimentos em atmosfera livre de argônio mostraram-se inconclusivos (Figura 61). Os dados de inibição de crescimento das linhagens celulares GLC4 e K562 estão em plena concordância com os dados cinéticos de atividade de clivagem de DNA demonstrando que a atividade citotóxica é dependente da atividade de clivagem de DNA e que estes compostos são absorvidos pelas células. Os resultados de inibição de crescimento bacteriano (Figura 63) estão em plena concordância com os resultados obtidos para IC_{50} e atividade de clivagem de DNA sobre DNA plasmidial mais uma vez reforçado a importância dos grupos substituintes na atividade dos compostos.

5.4 Compostos mononucleares de Fe(II)

A química do $[\text{Ru}(\text{bipy})_3]^{2+}$ estimulou a preparação e caracterização de outros compostos polipiridínicos com o objetivo de elucidar os efeitos da estrutura dos ligantes nos potenciais redox, reatividade em estados excitados emissão de luminescência fotoativação entre outros. Isto promoveu um grande desenvolvimento do conhecimento de atuação e os colocou como candidatos para uma grande quantidade de aplicações entre elas como sondas para biomoléculas tais como DNA e proteínas (O'DONOGHUE et al, 2005). Vários estudos revelaram que a modificação dos ligantes modificam as capacidades de ligação, localização e afinidades possibilitando a exploração de conformações valiosas para a criação de ferramentas biotecnológicas ou novos fármacos. Em geral a extensão da planaridade da fenantrolina nos seus sítios 5 e 6 aumentam a força de interação dos compostos com o DNA (MAITY et al, 2008; PATRA, NETHAJI, CHACRAVARTY, 2007; JIANG et al.2007).

O composto 11 foi testado quanto a sua atividade em diferentes pHs e concentrações nos tampões PIPES e HEPES (Figuras 64 e 65) e demonstrou ter

maior atividade em pHs mais ácidos provavelmente devido a deprotonação dos ligantes sofrida em pHs mais elevados. Também demonstrou uma correlação entre atividade e concentração apresentando sua maior atividade na maior concentração testada (80 μ M) e sua atividade foi maior em presença do tampão HEPES quando comparado ao tampão PIPES provavelmente devido à maior força iônica deste. O composto também não foi inibido pela presença de distamicina (Figura 67) que compete pela cavidade menor do DNA (HIRAKU, OIKAWA, KAWANISHI, 2002) demonstrando sua interação com esta pela cavidade maior, característica de agentes intercaladores (ERKKILA, ODOM, BARTON 1999).

Em ausência de oxigênio (Figura 68) a atividade do composto sobre a molécula de DNA não foi inibida e uma vez que a atividade do [Fe(EDTA)] demonstrou inibição total como esperado pode-se caracterizar a atividade do complexo como hidrolítica (SCARPELLINI et al, 2003). Esta atividade tem sua provável origem nas moléculas de água coordenadas ao Fe(II) descritas na estrutura que são posicionadas de forma favorável pelos tetrazóis que altamente carregados tornam-se eficientes intercalantes (MIRANDA, 2008). Estas suposições são reforçadas pelos resultados obtidos com a incubação de DNA em presença do ligante isolado que não apresentou nenhuma atividade de clivagem de DNA (Figura 66) demonstrando a necessidade do íon Fe(II) e suas águas coordenada como nucleófilos.

Experimentos de cinética Pseudo-Michaeliana (Catalista>>substrato) (SREEDHARA, COWAN, 2001) foram realizados (Figura 69 e tabela 6) demonstrando que este composto tem uma atividade sobre o DNA situada entre as mais altas descritas na literatura (SREEDHARA, FREED e COWAN, 2000; LIU et al, 2004; JIANG et al, 2007). No entanto esta atividade não pode ser considerada como sitio específica pois as razões de corte simples e duplos apresentam números elevados classificando o composto como não específico.

Este composto não apresentou atividade de clivagem de proteína (Figura 70) sobre a proteína BSA nas condições testadas podendo caracterizar o mesmo como ácido nucléico específico necessitando para a confirmação que mais testes sejam realizados. A atividade antibacteriana do mesmo (Figura 71) também pode ser considerada não significativa tendo o mesmo atuado somente sobre a bactéria *Staphilococcus aureus* e não promovendo sua inibição de crescimento em mais de 25%.

Os compostos 12, 13 e 14 tiveram sua atividade testada em presença e ausência de luz e diferenças significativas foram encontradas (Figura 72). A presença de luz levou a uma maior atividade de todos os compostos sendo que as eficiências de clivagem dos mesmos pode ser descrita como $14 > 13 > 12$. Trabalhos utilizando compostos de cobre (II) onde os ligantes Bipyridina (bipy), fenantrolina (phen), dipyrído[3,2-*f*:2',3'-*h*]quinoxaline (dpq) e dipyrído[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine (dppz) associados a ferroceno (MAITY et al, 2008), S-metil-L-cisteína (PATRA, NETHAJI, CHACRAVARTY, 2007) e l-lisina (PATRA, NETHAJI, CHACRAVARTY, 2005), obtiveram resultados semelhantes. Todos os compostos testados pelos autores apresentaram atividade de clivagem de DNA e tiveram suas eficiências aumentadas por fotosensibilização por luz visível em comprimentos de onda do vermelho ou próximos. No trabalho utilizando o composto conjugado a ferroceno os resultados de atividade colocam o composto coordenado a dppz como o mais ativo dentre os testados, resultado este que está em concordância com este trabalho. Já na série de compostos conjugados a S-metil-L-cisteína o composto coordenado a dpq demonstrou maior atividade que o coordenado a dppz em uma inversão dos resultados obtidos tanto por Maity et al (2008) e neste trabalho. Esta inversão é provavelmente devida aos efeitos destes conjugados que podem alterar a capacidade de interação com DNA bem como da posição do centro ativo em relação ao substrato ou até mesmo incrementar a fotoativação. Nos resultados obtidos neste trabalho uma vez que todos compostos possuem somente um tipo de ligante fica clara a relação entre planaridade e eficiência catalítica conforme descrito por Jiang et al (2007). Nos experimentos utilizando DMSO como quelante de radicais OH não foi observada nenhuma inibição por parte desta substância (Figura 73). Uma vez que uma atividade hidrolítica está descartada pela estrutura da própria molécula (MIRANDA, 2008) esta atividade é provavelmente devida a formação de outra espécie ativa de oxigênio. Patra, Nethaji, Chakravarty (2005) após experimentos com azida sódica e histidina sugerem que os compostos testados contendo dpq e dppz como ligantes atuam de maneira oxidativa através da formação de oxigênio singlet, sendo esta uma alternativa para a atividade dos compostos testados neste trabalho. Nos testes realizados em presença de distamicina somente o composto $[\text{Fe}(\text{dpq})_3]^{+2}$ apresentou inibição pela substância (Figura 73). Este resultado está em concordância com a forma do ligante (JIANG et al, 2007) que no caso do dpq tem

pouca capacidade de atuar como intercalante e muito mais provavelmente como ligante de cavidade menor (ZELIGS et al, 2007).

Experimentos realizados em presença de proteína BSA (Figura 74) demonstraram que a atividade de clivagem de proteína dos três compostos é dependente da fotoativação dos mesmos, pois nenhuma atividade foi detectada nas concentrações testadas na ausência de luz. A formação de bandas de tamanhos característicos sugere uma especificidade de sítio de corte e mais experimentos devem ser realizados para confirmação desta possibilidade. Maity et al (2007) testou a atividade de clivagem de proteína de compostos de cobre(II) contendo conjugados de ferroceno e os ligantes bipy, phen, dpq e dppz e não encontrou nenhuma atividade em incubações realizadas no escuro mas encontrou atividade para o compostos contendo o ligante dppz quando exposto a luz ultravioleta caracterizando este como dependente de fotoativação em concordância com os resultado obtidos neste trabalho. Não foram realizadas pelos autores experimentos utilizando luz visível o que dificulta comparações com os dados deste trabalho que provavelmente geraram os dados conflitantes dos compostos contendo o ligante dpq.

A atividade antibacteriana dos compostos foi observada (Figura 75) e demonstrou-se fraca sendo o mais ativo o composto 13. Todos complexos tiveram maior atividade sobre a bactéria E. coli que pode estar ligada a presença da membrana externa de característica lipídica bem mais sensível a oxidação que a parede celular formada de peptidoglicanos das bactérias gram positivas.

6 CONCLUSÕES

Os compostos 1, 2 e 3 ($[\text{Cu}_2(\mu\text{-OH})\text{L}_2]$), miméticos de catecol-oxidases, demonstraram atividades de clivagem de DNA e de clivagem de proteína variadas dependentes da estrutura de seus ligantes além de sua já caracterizada promiscuidade catalítica. Também demonstraram atividade em sistemas vivos caracterizadas pelas atividades genotóxica em células humanas e de camundongos e citotóxica em células bacterianas além das linhagens de células tumorais testadas por Rey et al, (2009). Estas características, associadas à capacidade do mesmo de ser prontamente absorvido pelas células tornam estes complexos motivo de estudos a serem realizados tanto como objetivo de produzir novas ferramentas biotecnológicas bem como de novos fármacos principalmente no tratamento de neoplasias. Novos ligantes ou modificações realizadas nos já existentes podem fazer com que substâncias potentes e comercialmente viáveis possam ser desenvolvidas.

Os compostos 4, 5 e 6, mono e binucleares de Fe(II), apresentaram atividade de clivagem de DNA e de clivagem de proteína bastante intensa estando entre os mais ativos compostos já descritos. Como calculado pelas razões de quebras simples e duplas atuam de maneira específica sobre o DNA e provavelmente também sobre proteína como demonstrada pela formação de bandas com tamanhos específicas. Possuem atividade *in vivo* como demonstrado pelas atividades genotóxica em células humanas e de camundongos e citotóxica em células bacterianas. No entanto maiores estudos no que se refere a sua estabilidade em solução devem ser executados.

Os compostos 7, 8, 9 e 10, binucleares de FeZnR tiveram seus prováveis modos de ação e cinética de reação determinados bem como suas atividade sobre células bacterianas podendo em termos de eficiência serem descritos da seguinte maneira: $10 > 9 > 8 > 7$. O resultados obtidos estão em concordância com os obtidos em teses de citotoxicidade por Peralta et al. (em redação) mas apresentam discrepâncias quando comparados com a atividade dos compostos sobre o substrato ativado BDNPP (NEVES et al, 2007) sobre o qual os dois primeiros tiveram atividade reduzida. Este resultado se deve provavelmente a atividade oxidativa destes compostos que não pode ser observada sobre este substrato.

Os compostos mononucleares de Fe(II) com ligantes derivados de fenantrolina foram divididos em dois grupos. O primeiro que consiste do composto

11, o qual não foi testado em presença de luz demonstrou atividade de clivagem de DNA de grande eficiência de forma hidrolítica mas ausência de atividade de clivagem de proteína e atividade antibacteriana não significativa. Estudos de sua atividade em presença de luz visível bem como estudos espectrofotométricos podem ser realizados para melhor elucidar sua capacidade de interagir com DNA e proteína. Os compostos 12, 13 e 14 tiveram sua atividade testada em presença e ausência de luz e diferenças significativas foram encontradas. A presença de luz levou a uma maior atividade de clivagem de DNA e ao desenvolvimento de atividade de clivagem de proteína de todos os compostos. Estes agem provavelmente de maneira oxidativa livre da formação de radicais OH. Sua atividade antibacteriana não foi significativa. Estudos complementares com quelantes de diferentes formas de espécies reativas de oxigênio e cálculos de cinética de reação são necessários para complementar os dados existentes. Experimentos de citotoxicidade e genotoxicidade são também relevantes para melhor compreender a atuação destes compostos em sistemas biológicos.

BIBLIOGRAFIA

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. **Short Protocols in Molecular Biology**, 5th Edition. 2002. 1504 pp p.

BALDINI, M.; BELICCHI-FERRARI, M.; BISCEGLIE, F.; PELOSI, G.; PINELLI, S.; TARASCONI, P. Cu(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: the case of 5-formyluracil. Synthesis, characterization, X-ray structures, DNA interaction studies, and biological activity. **Inorganic Chemistry**, (2003) 42, 6:2049-2055.

BALES, B. C.; KODAMA, T.; WELEDJI, Y. N.; PITIÉ, M.; MEUNIER, B.; GREENBERG, M. M. Mechanistic studies on DNA damage by minor groove binding copper-phenanthroline conjugates. **Nucleic Acids Research** (2005) 33, 16:5371-5379.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Bioquímica. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, (2008). 1059 p.

BRANUM, M. E.; TIPTON, A. K.; ZHU, S.; QUE, JR. L. Double-strand hydrolysis of plasmid DNA by Dicerium complexes at 37 °C. **J. Am. Chem. Soc.** (2001), 123 1898-1904.

CHAND, D. K.; SCHNEIDER H-J.; BENCINI, A.; BIANCHI, A.; GIORGI, C. CIATTINI, S.; VALTANCOLI, B. Affinity and nuclease activity of macrocyclic polyamines and their CuII complexes. **Chem. Eur J.** 2000, 6: 4001.

CHANDRAYAN, S. K.; DHAUNTA, N.; GUPTASARMA, P. Expression, purification, refolding and characterization of a putative lysophospholipase from *Pyrococcus furiosus*: Retention of structure and lipase/esterase activity in the presence of water-miscible organic solvents at high temperatures. **Protein Expression and Purification.** (2008), 59: 327–333

CLARKE, M. J. Ruthenium Metallopharmaceuticals. **Coordination Chemical Reviews** 236 (2003) p. 209-233.

COWAN, R.; COLLIS, C. M.; GRIGG, G. W. Breakage of double-stranded DNA due to single-stranded nicking. **J Theor Biol.** (1987) Jul 21;127(2):229-45.

COWAN, J. A. Metal activation of enzymes in nucleic acid biochemistry. (1998), **Chem. Rev.** 98:1067-1088.

_____. Chemical Nucleases. **Current Opinion in Chemical Biology**, (2001) 5:634-642.

DIMITRAKOPOULOU, A.; DENDRINOUSAMARA, C.; PANTSAZAQUI, A. A.; RAPTOPOULOU, C.; TERZIS, A.; SAMARAS, E.; KESSISSOGLU, D. P. Interaction of Fe(III) with herbicide-carboxylato ligands. Di-, tri- and tetra-nuclear compounds: Structure, antimicrobial study and DNA interaction. **Inorganica Chimica Acta** (2007) 360 546–556

Duclos, C. C. A. O modelo da dupla hélice / Biologia molecular www.biomol.org/historia/prodpuplahelice.shtml, 2004. Acessada em 20/10/2009.

ERDTMANN, B. A Genotoxicidade Nossa de Todos os Dias. In: SILVA, Juliana da; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Editora Alcance, 2003. p. 23-47.

ERKKILA, K. E.; ODOM, D. T.; BARTON, J. K. Recognition and Reaction of Metallointercalators with DNA. **Chemical Reviews**, (1999). 99, 9:2777-2795.

FU, D.; YU, M.; TAN, T.; ZHOU, X.; Separation, characterization and catalytic properties of Lip2 isoforms from *Candida* sp.. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, (2008) artigo em impressão.

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

GHARAGOZLOU, M.; BOGHAEI D. M. Interaction of water-soluble amino acid Schiff base complexes with bovine serum albumin: Fluorescence and circular dichroism studies. **Spectrochimica Acta Part A** (2008) 71: 1617–1622

GONZALEZ-ALVAREZ, M. ALZUET, G.; BORRÁS, J.; MACÍAS, B.; CASTIÑEIRAS, A. Oxidative cleavage of DNA by a new ferromagnetic linear trinuclear copper(II) complex in the presence of H₂O₂/sodium ascorbate. **Inorganic Chemistry**, (2003) 42, 9: 2992-2998.

HEGEDUS, L. S.; GREENBERG, M. M.; WENDLING, J. J.; BULLOCK, J. P. Synthesis of 5,12-dioxocyclam nickel (II) complexes having quinoxaline substituents at the 6 and 13 positions as potential DNA bis-intercalating and cleaving agents. **Journal of Organic Chemistry** (2003) 68, 11:4179-4188

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**, (1998). 173, 1: 133-165.

HIRAKU, Y; OIKAWA, S.; KAWANISHI, S. Distamycin A, A minor groove binder, changes enediyne-induced DNA cleavage sites and enhances apoptosis. 2002, **Nucleic Acid Research**. Supl No2 95-96

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

KELLY, J. J.; CHERNOV, B. K.; TOVSTANOVSKY, I.; MIRZABEKOV, A. D.; BAVYKIN, S. G. Radical-generating coordination complexes as tools for rapid and effective fragmentation and fluorescent labeling of nucleic acids for microchip hybridization. **Analytical Biochemistry**, (2002) 311, 2: 103-118.

LANZMASTER, M.; NEVES, A; BORTOLUZZI, A. J.; AIRES, V. V. E.; SZPOGANICZ, B.; TEREZI, H.; SEVERINO, P. C.; FULLER, J. M.; DREW, S. C. GAHAM, L. R.; HANSON, G.R.; RILEY, M. J. E.; SCHENK, G. A new heterobinuclear Fe^{III}Cu^{II} complex with a single terminal Fe^{III}-O(phenolate) bond. Relevance to purple acid phosphatases and nucleases. **J. Biol. Inorg. Chem** (2005) 10:319-332.

LEE, T. Y.; SUH, JUNGHUN. Target-selective peptide-cleaving catalysts as new paradigm in drug design. **Chem Soc. Rev.** (2009), 38:1949-1957.

LIU, CHANGLIN; WANG, MING; ZHANG, TIANLE; SUN, HONGZHE; DNA hydrolysis promoted by di- and multi-nuclear metal complexes. **Coord. Chem. Rev.** (2004) 248 147–168.

MAITY, B.; ROY, M.; SAHA, S.; CHAKRAVARTY, A. R. Photoinduced DNA and Protein Cleavage Activity of Ferrocene-Conjugated Ternary Copper(II) Complexes. **Organometallics**, (2009), 28, 5: 1495-1505.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Follow-up Study of the Genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and skingle cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research** (2000). 471 p. 21-27.

MANCIN, F.; SCRIMIN, P.; TECILLA, P.; TONELLATO, U. Artificial metallonucleases. **Chem. Commun.**, (2005) 2540–2548.

MIRANDA, F. S. Desenvolvimento de estudo teórico de novos ligantes derivados da 1,10-Fenantrolina e seus complexos de ferro(II). 2008. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis.

MITIC, N.; SMITH, S. J.; NEVES, A.; GUDDAT, L. W.; GAHAM, L. R.; SHENK, G. The catalytic mechanisms of binuclear metallohydrolases. **Chem. Rev.** (2006) 106:3336-3363.

NAVARRO, M.; CISNEROS-FAJARDO, E. J.; FERNANDES-MESTRE, M.; ARRIECHE, D.; MARCHAN, E. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)₂]BF₄. **Journal of Inorganic Biochemistry**, (2003) v. 97, n. 4, p. 364-369.

NELSON, D.; COX, M. M. Lehninger: Principles of Biochemistry, 3^a edição (2000), Worth Publishers.

NEVES, A.; LANZMASTER M.; BORTOLUZZI, A. J., PERALTA, R. A.; CASELLATO, A.; CASTELLANO, E. E.; HERRALD, P.; RILEY, M. J.; SCHENK, G. An unprecedented Fe(III)(μ -OH)Zn(II) complex that mimics the structural and functional properties of purple acid phosphatases. **JACS**, (2007), 129, 7486-7487

O'DONOGHUE, K.; PENEDO, J. C.; KELLY, J. M.; KRUGUER, P. E. Photophysical study of a family of [Ru(phen)₂(Mendpq)]²⁺ complexes in different solvents and DNA: a specific water effect promoted by methyl substitution. **Dalton Transactions**, (2005) 6:1123-1128.

OLIVEIRA, M. C. Nucleases Sintéticas: Caracterização Bioquímica e Mecanismo de Ação Sobre DNA. 2006. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis.

OLIVEIRA, M. C. B.; Scarpellini, M.; Neves, A.; Terenzi, H.; Bortoluzzi, A. J.; Szpoganics, B.; Greatti, A.; Mangrich, A. S. Souza, E. M.; Fernandez, P. M.; Soares, M R.. Hydrolytic Protein Cleavage Mediated by Unusual Mononuclear Copper(II) Complexes: X-ray Structures and Solution Studies. **Inorg. Chem.** 2005, 44, 921-929

PATRA, A. K.; NETHAJI, M.; CHAKRAVARTY, A. R. Synthesis, crystal structure, DNA binding and photo-induced DNA cleavage activity of (S-methyl-L-cysteine)copper(II) complexes of heterocyclic bases. **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2007. Volume 101, Issue 2, Pages 233-244

PATRA, A. K.; NETHAJI, M.; CHAKRAVARTY, A. R. Red-light photosensitized cleavage of DNA by (L-lysine)(phenanthroline base)copper(II) complexes. **Dalton Trans.** (2005), 21, 16:2798-2804

PARRILHA, G. L. Síntese e caracterização de compostos mono e binucleares de ferro de relevância bioinorgânica, 2008. Dissertação de mestrado, Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, Campos Goitacazes.

PERALTA, R. A. **Novos complexos binucleares de cobre(II) e de ferro(III) zinco(II) : biomiméticos sintéticos para catecol oxidase e para fosfatases ácidas púrpuras.** 2005. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-graduação em Química - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

PARRILHA, G. B.; FERNANDES C.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, M. S.; PICH, C. T.; TEREZI, H.; HORN JR. A. A new L-oxo di-iron complex with suitable features to mimic metallohydrolase activity: X-ray molecular structure, aqua solution behavior and nuclease activity of the complex [Fe(HPCINOL)(SO₄)₂-L-oxo. **Inorganic Chemistry Communications** (2008) 11:643–647

PAULA, M. M. S.; PICH C. T.; PETRONILHO, F.; DREI, L. B.; RUDNICKI, M.; OLIVEIRA, M. R.; MOREIRA, J. C. F.; HENRIQUES, J. A. P.; FRANCO, C. V.; PIZZOL, F. D. Antioxidant activity of new ruthenium compounds. **Redox Rep.** (2005) 10, 3:139-43

PERALTA, R. A.; BORTOLUZZI, A. J.; SOUZA, B.; JOVITO, R.; XAVIER, F. R.; COUTO, R. A. A.; CASELLATO, A.; FARUK.; DICK, A.; GAHAN, L. R.; SCHENK, G.; HANSON, G. R. PAULA, F. C. S. PEREIRA-MAIA, E. C.; MACHADO, S. P.; SEVERINO, P. C.; PICH, C. T.; FISCHER, F. L.; TEREZI, H.; CASTELLANO, E. E.; NEVES, A.; RILEY. M. J. The Electronic Structure and Spectro-Structural Correlations of Fe^{III}Zn^{II} Biomimetics for Purple Acid Phosphatases: Relevance to DNA Cleavage and Cytotoxic Activity. Em redação.

PUENTE, X. S.; SANCHEZ L.M.; OVERALL C. M.; LOPEZ-OTIN, C. Human and Mouse Proteases: a Comparative Genomic Approach. **Nat Rev Genet** (2003). 4:544-558.

PUENTE X. S.; LOPEZ-OTIN, C. A Genomic Analysis of Rat Proteases and Protease Inhibitors. **Genome Biol** (2004). 14:609-622.

REEDJIK, J. New Clues for Platinum Antitumor Chemistry: Kinetically Controlled Metal Binding to DNA. **PNAS**. (2003) 100-7: 3611-3616.

ROELFES, G.; BRANUN, M. E.; WANG, L.; QUE. L. J.; FERINGA B. L. Efficient DNA cleavage with an iron complex without added reductant. **J. Am. Chem. Soc** (2000). 122: 11517-11518.

REY, N. A.; NEVES, A.; BORTOLUZZI, A. J.; PICH, C. T.; TEREZI, H. Catalytic Promiscuity in Biomimetic Systems: Catecholase-like Activity, Phosphatase-like Activity, and Hydrolytic DNA Cleavage Promoted by a New Dicopper(II) Hydroxo-Bridged Complex. **Inorg. Chem.** (2007), 46:348-350

REY, N. A. **Novos ligantes binucleantes e seus complexos metálicos do tipo $Cu^{II}-(\mu-OH)-Cu^{II}$: 1) modelos estruturais para o sítio ativo das catecol oxidases e 2) análogos sintéticos com atividade redox e/ou hidrolítica.** 2008. Tese de Doutorado, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

REYNA, N. A.; SILVA, P. P.; PAULA, F.C.; SILVEIRA, J. N.; BOTELHO, F. V.; VIEIRA, L. Q.; PICH, C. T.; TEREZI, H.; PEREIRA-MAIA, E. C. A synthetic dinuclear copper(II) hydrolase and its potential as antitumoral: cytotoxicity, cellular uptake, and DNA cleavage. **J Inorg. Biochem.** (2009) 103, 10:1323-30.

RIBEIRO, L. R.; et al. Mutagênese Ambiental. Canoas Ed Ulbra, 2003 356p.

SCARPELLINI, M. L.; NEVES, A.; HÖRNER, R.; BORTOLUZZI, A. J.; SZPOGANICS, B.; ZUCCO, C.; NOME, R. A. N.; DRAGO, V.; MANGRICH, A. S.; ORTIZ, W. A.; PASSOS, W. A. C.; OLIVEIRA, M. C. B. E TEREZI, H. Phosphate Diester Hydrolysis and DNA Damage Promoted by New *cis*-Aqua/Hydroxy Copper(II) complexes Containing tridentate Imidazole-rich Ligands. **Inorganica Chimica Acta**, (2003). 42 : 8353-8365.

SEVERINO, P. C. Atividade de modelos biomiméticos de fosfatases ácidas púrpuras sobre ácidos nucléicos. 2008. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis.

SILVA, J. FREITAS T. R. O.; HEUSER, V.; MARINHO, J. R.; BITTENCOURT, F.; CERSKI, C. T. S.; KLIEMANN, L. M.; ERDTMANN, B. Effects of chronic exposure to coal in wild rodents (*Ctenomys torquatus*) evaluated by multiple methods and tissues. **Mutation Research** (2000), 470, 39-41, 2000.

SPEIT, G.; TRENZ, C.; SCHUTZ, P.; ROTHFUß, A.; MERK, O. The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. **Toxicology Letters** (1999) 110:73–78

SREEDHARA, A.; FREED, J. D.; COWAN, J. A. Efficient inorganic deoxyribonuclease enhancement in enzyme like DNA cleavage. **J. A. Chem. Soc.** 2000 122: 8814 - 8824.

SREEDHARA, A. E COWAN, J. A. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. **J Biol Inorg Chem** (2001) 6:337 - 347.

TERENZI, A.; BARONE, G.; SILVESTRI, A.; GIULIANI, A. M.; RUGGIRELLO, A.; LIVERI, V. T. The interaction of native calf thymus DNA with Fe^{III}-dipyrido[3,2-*a*:2',3'-*c*]phenazine **Journal of Inorganic Biochemistry**, 2009. 103, 1:1-9.

TERENZI, H.; ALZARI, P. M.; ZAKIN, M. M. Structural features involved in the formation of a complex between the monomeric or the dimeric form of the Rev-erb β DNA-binding domain and its DNA reactive sites. **Biochemistry**, (1998) 37, 33: 11488-11495, 1998.

VILLELA, I. V.; et al. Bioensaios para Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental. In: Genética Toxicológica. SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P.. Porto Alegre. Editora Alcance, (2003). 147-161.

WILCOX, D. E. Binuclear metallohydrolases. **Chem Rev.** (1996), 96:2435-2458

YANG, W.; LEE, J. Y.; NOWOTNY, M. Making and breaking nucleic acids: Two-Mg²⁺-ion catalysis and substrate specificity. **Molecular Cell** (2006), 22, 5-13

ZELIGS, B. M.; PIERRE V. C.; BARTON, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. **Chem. Commun.**, (2007) 4565–4579

ZAHA, A. *Biologia Molecular Básica*. 3ª edição, Porto Alegre. Editora Mercado Aberto, 2001. p. 126-124.

ZHANG, S.; ZHU, Y.; TU, C.; WEI, H.; YANG, Z.; LIN, L.; DING, J.; ZHANG, J.; GUO, Z. A novel cytotoxic ternary copper(II) complex of 1,10-phenanthroline and l-threonine with DNA nuclease activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**, (2004), 98, 12:2099-2106.

WANG, X.-L.; CHAO, H.; LI, H.; HONG, X.-L.; JI, L. -N.; LI, X. -Y. Synthesis, crystal structure and DNA cleavage activities of copper(II) complexes with asymmetric tridentate ligands. **Journal of Inorganic Biochemistry** (2004) 98, 3:423-429

ANEXOS

**PRÊMIO PAINEL**

A Sociedade Brasileira de Genética concede a CLAUD TRÖGER PICH, o Prêmio PÓS-GRADUAÇÃO de melhor trabalho na área de MUTAGÊNESE, intitulado "**INTERAÇÃO COM DNA E ATIVIDADE NUCLEÁSICA DO COMPLEXO BINUCLEAR DE COBRE [CU₂(μ-OH)(C₂₇H₃₃ON₆)(CLO₄)₂]⁺**", autoria de PICH, CT; ALMEIDA, WB; REY, NA; NEVES, A; TEREZI, H, apresentado durante o 53º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, em Águas de Lindóia – SP, período de 02 a 05 de setembro de 2007

Patrocínio: Sociedade Brasileira de Genética

MU066


Horácio Schneider
Presidente da SBG


Nilce Maria Martinez Rossi
1ª Secretária da SBG

**Certificado**

A Sociedade Brasileira de Genética declara que o trabalho intitulado "**INTERAÇÃO COM ADN E ATIVIDADE NUCLEÁSICA DO COMPLEXO BINUCLEAR DE COBRE [CU₂(μ-OH)(C₂₇H₃₃ON₆)(CLO₄)₂]⁺**", autoria de PICH, CT; ALMEIDA, WB; REY, NA; NEVES, A; TEREZI, H, foi apresentado no 53º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, em ÁGUAS DE LINDÓIA - SP, no período de 02 a 05 de setembro de 2007

MU066


Horácio Schneider
Presidente da SBG


Nilce Maria Martinez Rossi
1ª Secretária da SBG