



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

JANISE GISELLE CAETANO RODRIGUES

**COMPOSTOS DE COBRE COMO CLIVADORES DE DNA – UMA FERRAMENTA PARA
FINS BIOTECNOLÓGICOS**

FORTALEZA
2016

JANISE GISELLE CAETANO RODRIGUES

COMPOSTOS DE COBRE COMO CLIVADORES DE DNA – UMA FERRAMENTA
PARA FINS BIOTECNOLÓGICOS

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa

Coorientador: MSc. Edinilton Muniz Carvalho

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C131c Caetano Rodrigues, Janise Giselle.
Composto de cobre como clivadores de DNA : uma ferramenta para fins biotecnológicos / Janise Giselle Caetano Rodrigues. – 2016.
47 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2016.
Orientação: Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa .
Coorientação: Me. Edinilton Muniz Carvalho.

1. Compostos de Cobre . 2. Clivagem do DNA . 3. Radicais livres . I. Título.

CDD 661

JANISE GISELLE CAETANO RODRIGUES

COMPOSTOS DE COBRE COMO CLIVADORES DE DNA – UMA FERRAMENTA
PARAFINS BIOTECNOLÓGICOS

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 10 / 07 / 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Henrique Silva de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de França Lopes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr^a. Ana Claudia Silva Gondim
Universidade Federal do Ceará (UFC)

RESUMO

Embora a cisplatina e derivados de platina sejam agentes anticancerígenos eficientes, seus efeitos secundários e sua toxicidade tem limitado a sua utilização na quimioterapia do combate ao câncer. Por isso, estudos têm sido feitos para substituir essa droga por novos compostos à base de metais com maior eficácia, menor toxicidade e maior especificidade. Os compostos de cobre (Cu) são candidatos promissores para a próxima geração de fármacos anticâncer e têm sido extensivamente estudados, cuja atividade pode se dar pela geração de radicais livres levando a dano no DNA. Com o objetivo de investigar compostos à base de cobre que apresentem atividade nuclease como ferramenta para a degradação seletiva de DNA para fins analíticos e terapêuticos, foi realizado uma série de estudos utilizando complexos quadrado planar de Cu^{2+} , contendo 4 ligantes orgânicos (R1, R2, R3, R4). O plasmídeo pBR322 foi utilizado no ensaio de eletroforese em gel de agarose, sendo possível mostrar que os complexos de cobre foram capazes de clivar o DNA após irradiação com luz, interação com glutathione (GSH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sugerindo potencial citotóxico. Dentre os ativadores de clivagem, a GSH mostrou-se mais ativa que o H_2O_2 , onde os danos ao DNA foram bastante intensos, não sendo possível inclusive observar bandas de DNA remanescentes no gel. A fim de elucidar a dinâmica de clivagem dos complexos de cobre e quais espécies reativas estão envolvidas no mesmo, foram feitos ensaios acompanhados por espectroscopia de absorção na região do UV-vis. Para isso, utilizou-se uma mistura em condições fisiológicas contendo Azul de Nitrotetrazólio (NBT), agente específico para detecção de superóxido, complexos de cobre e GSH. Também foi analisado uma mistura contendo o NBT, complexos de cobre e H_2O_2 . Em todos os ensaios contendo os complexos e GSH foi observado a formação de formazan pela reação do NBT com superóxido. Tais resultados sugerem que os compostos apresentam atividade nuclease, e que um dos possíveis agentes promotores seria o radical superóxido. Na mistura contendo os complexos e H_2O_2 não ocorreu a formação da formazan, uma vez que os teste de clivagem de DNA nessas condições indicaram atividade nuclease, os resultados sugerem que o possível agente promotor da clivagem do DNA quando adicionado o H_2O_2 seria o radical hidroxila.

Palavras-chave: Compostos de cobre, Clivagem de DNA, Radicais Livres.

ABSTRACT

Although cisplatin and platinum derivatives are effective anticancer agents, their side effects and its toxicity has limited its use in cancer chemotherapy. Therefore, studies have been made to replace this by new drug compounds based on metals with higher efficacy, lower toxicity and greater specificity. The copper compounds (Cu) are promising candidates for the next generation of anticancer drugs and have been extensively studied, whose activity can occur by the generation of free radicals leading to DNA damage. In order to investigate compounds based on copper which exhibit nuclease activity as a tool for selective degradation of DNA to analytical and therapeutic purposes has been carried out a series of studies using square complex planar Cu^{2+} containing 4 organic ligands (R1, R2, R3, R4). Plasmid pBR322 was used in the electrophoresis test on agarose gel, it is possible to show that the copper complexes were capable of cleaving the DNA after irradiation with light, interaction with glutathione (GSH) and hydrogen peroxide (H_2O_2), suggesting potential cytotoxic. Among the cleavage activators, GSH was more active than H_2O_2 , where the DNA damage were quite intense, it is not even possible to observe remaining DNA bands in the gel. In order to elucidate the dynamics of cleavage of the complex of copper and reactive species which are involved in it, tests were made monitoring by absorption spectroscopy in the UV-vis range. For this, we used a mixture mixture under physiological conditions, containing Nitroblue Tetrazolium (NBT), specific agent for superoxide detection, copper complexes and GSH. Also analyzed was a mixture containing NBT copper complex and H_2O_2 . In all assays containing the complex and GSH was noted the formation of NBT formazan by reaction with superoxide. These results suggest that the compounds have nuclease activity, and that one of the promoters would be possible superoxide. In the mixture containing copper complex and H_2O_2 wasn't noted the formation of formazan, since the DNA cleavage test in these conditions pointed nuclease activity, the results suggest that the potential of promoter DNA cleavage when added H_2O_2 would be hydroxyl radical.

Keywords: Copper compounds, DNA Cleavage, Free radicals.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura tridimensional do DNA	11
Figura 2- Representação da estrutura química do esqueleto covalente do DNA, destacando a ligação fosfodiéster unindo os nucleotídeos.	12
Figura 3- Representação do pareamento entre os pares de base AT e CG por ligações de hidrogênio	13
Figura 4- Comparação das formas A, B e Z do DNA	14
Figura 5 – Estruturas químicas de Ligantes e Complexo de Cobre a) ligante 3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina b) primeira nuclease de cobre sintética [Cu-(phen) ₂] ⁺	15
Figura 6- Mecanismos de interação dos complexos metálicos com o DNA: a) interação por sulco, b) interação por intercalação e c) interação por inserção.....	17
Figura 7 – Plasmídeo pBR322.....	22
Figura 8 - Esquema do método de extração de DNA do Kit QIAprep Spin Miniprep Kit da QIAGEN.	22
Figura 9 - Ilustração das três formas do DNA plasmidial.....	23
Figura 10 – As três formas do DNA plasmidial e a sua diferenciação após eletroforese em gel de agarose.....	23
Figura 11 - Imagem do equipamento de fotodocumentação.....	25
Figura 12- Estudo de clivagem de DNA (FI, II e III) empregando-se DNA plasmidial e o complexo M ₁ e M ₂ no Claro (350 nm) e no Escuro por 2 horas.....	29
Figura 13 - Estudo de clivagem de DNA (FI, II e III) empregando-se DNA plasmidial e o complexo M ₃ e M ₄ no Claro (463 nm) e no Escuro por 2 horas.....	31
Figura 14- Clivagem do DNA plasmidial (6,4 ng/μL em cada poço) pelo complexo M ₁ em diferentes concentrações (300, 250, 100, 50, 25 e 10 μmol L ⁻¹) no claro (463nm) e no escuro por 2h de exposição.....	33
Figura 15- Clivagem do DNA plasmidial (6,4 ng/μL em cada poço) pelo complexo M ₂ em diferentes concentrações (300, 250, 100, 50, 25 e 10 μmol L ⁻¹) no claro (463nm) e no escuro por 2h de exposição.....	34
Figura 16- Clivagem do DNA plasmidial (6,4 ng/μL em cada poço) pelo complexo M ₃ em diferentes concentrações (300, 250, 100, 50, 25 e 10 μmol L ⁻¹) no claro (463nm) e no escuro por 2h de exposição.	35
Figura 17- Clivagem do DNA plasmidial (6,4 ng/μL em cada poço) pelo complexo M ₃ em diferentes concentrações (300, 250, 100, 50, 25 e 10 μmol L ⁻¹) no claro (463 nm) e no escuro	

por 2h de exposição.....	36
Figura 18 – Formação da Formazan a partir do Azul de Nitrotetrazólio (NBT)	37
Figura19 - Versão simplificada da ligação na molécula de oxigênio e seus derivados.....	38
Figura 20 – Variações espectrais na região do UV-Visível, da reação do NBT 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com a glutatona 1 mol L^{-1} em tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,0, medidas realizadas a cada 30s durante 1h.....	39
Figura 21 – Variações espectrais na região do UV-Visível, da reação do NBT 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com o complexo M ₄ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,0, medidas realizadas a cada 30s durante 1h.....	39
Figura 22 – Curvas cinéticas em 560 nm para conversão de NBT a Formazan, por meio da reação com O ₂ ^{•-} . Misturas reacionais contendo NBT (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$), GSH (1 mmol L^{-1}) e (A) M ₁ (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (B) M ₂ (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$), (C) M ₃ (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e (D) M ₄ (20 $\mu\text{mol L}^{-1}$). As reações ocorreram em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 a 37°C durante 60 minutos	40
Figura 23 – Mudança de cor ao ser adicionado o complexo, na esquerda pode-se observar a solução sem a adição do complexo e na direita com a adição do complexo	41.
Figura 24 – Variações espectrais na região do UV-visível, da reação do NBT 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$, H ₂ O ₂ 1 mmol L^{-1} e o complexo (A) M ₁ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (B) M ₂ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$, (C) M ₃ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e (D) M ₄ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,0, medidas realizadas a cada 30s durante 30min.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Adenina

C – Citosina

CDDP - Cisplatina, cis-diaminodicloroplatina (II)

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

FDA - Food and Drug Administration

GSH – Glutathiona

G - Guanina

T - Timina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Ácido Desoxirribonucleico.....	11
1.2	Complexos de Cobre.....	15
1.3	Interação do DNA por Complexos de Cobre.....	16
1.4	Atividade nucleasse dos complexos de cobre.....	18
1.5	O uso de complexos metálicos como ferramentas biotecnológicas.....	19
2	OBJETIVOS.....	20
2.1	Objetivo Geral.....	20
2.2	Objetivo Específico.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1	Reagentes	21
3.2	DNA plasmidial.	21
3.3	Eletroforese em gel de agarose	24
4	TÉCNICAS EXPERIMENTAIS E EQUIPAMENTOS	26
4.1	Teste da clivagem do DNA na Presença e Ausência de Luz	26
4.2	Efeito da Adição de Glutationa	26
4.3	Efeito da Adição de Peróxido de Hidrogênio	26
4.4	Avaliando a dependência da Clivagem do DNA com concentração dos complexos M ₁ , M ₂ , M ₃ e M ₄ na presença e ausência de luz.....	27
4.5	Monitoramento da Geração de Íon Superóxido.....	28
4.5.1	Monitoramento dos complexos M ₁ , M ₂ , M ₃ e M ₄ com Azul de Nitrotetrazólio (NBT) na Presença de Glutationa (GSH)	28

4.5.2	Monitoramento dos complexos M ₁ , M ₂ , M ₃ e M ₄ com NitroAzul de Tetrazólio (NBT) na Presença de Peróxido de Hidrogênio (H ₂ O ₂).....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1	Investigação da interação e clivagem do DNA na presença e ausência de luz, com peróxido de hidrogênio e glutathione dos complexos M ₁ e M ₂	29
5.2	Investigação da interação e clivagem do DNA na presença e na ausência de luz, com peróxido de hidrogênio e com glutathione dos complexos M ₃ e M ₄ ...	31
5.3	Efeito da Concentração estimulado por luz (463nm).....	32
5.4	Monitoramento da Geração de Superóxido.....	37
5.4.1	Monitoramento da Reação entre Glutathione e Complexos.....	38
5.4.2	Monitoramento da Reação com Peróxido de Hidrogênio.....	42
6	CONCLUSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

A cisplatina, cis-diaminodicloroplatina (II) (CDDP), foi descoberto em 1965 e obteve a aprovação do FDA (Food and Drug Administration) na década de 70 para o tratamento do câncer de testículos, ovários, pulmão, entre outros (CALLARI et al, 2014). A eficiência dos fármacos à base de platina é atribuída à formação de ligações cruzadas inter e intracadeia entre as bases nitrogenadas de guanina de DNA, causando uma cascata de interferências na replicação e transcrição do DNA, inibindo assim a proliferação das células tumorais e o crescimento do tumor (AMIR et al, 2016).

Embora a cisplatina e seus derivados sejam agentes anticancerígenos eficientes, seus efeitos secundários graves, como náuseas e insuficiência renal, e outras toxicidades tem limitado a sua mais ampla utilização na quimioterapia do combate ao câncer. Por isso, estudos têm sido feitos para substituir essa droga por novos compostos à base de metais com maior eficácia, menor toxicidade e maior especificidade (QI et al, 2015). Metais podem ser usados como agentes terapêuticos e de diagnóstico (CALLARI et al, 2014).

Compostos de cobre têm sido considerado como uma possível alternativa anticancerígena, devido às suas propriedades redox e a sua baixa toxicidade. A sua capacidade de induzir a clivagem oxidativa do DNA é outra característica positiva, e complexos de Cu estão entre as nucleases químicas mais extensamente estudados (JAIVIDHYA et al, 2012). Geralmente, a atividade de clivagem de DNA por complexos de cobre é observado na presença de oxidação ou redução de co-reagentes (CORREIA et al, 2015).

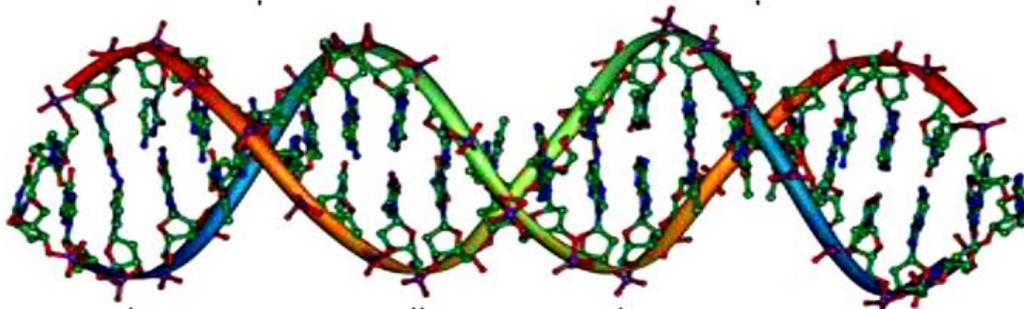
Os íons de Cu (II) podem atrasar a progressão do ciclo celular e induzir a morte de células cancerígenas (ASTON et al, 2000 e GRILLO; REIGOSA; DE MELE, 2009), por se ligarem ao DNA com uma elevada afinidade, promoverem a oxidação do DNA em condições de stress oxidativo (THEOPHANIDES; ANASTASSOPOULOU, 2002) e causar a apoptose em cultura de células de mamífero (NARAYANAN et al, 2001).

Apenas recentemente, verificou-se que as espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio ou radical superóxido, são reguladores importantes da morte celular. Particularmente, o H_2O_2 é implicado como um mediador da apoptose em células. O dano celular causado pelo H_2O_2 é provavelmente produzido numa parte através da produção de radical hidroxila que resulta da reação redox do H_2O_2 com íons de metais de transição (BUCHTÍK; TRÁVNÍČEK; VANČO, 2012).

1.1 Ácido desoxirribonucleico

O ácido desoxirribonucleico (DNA) pode ser considerado um polímero orgânico composto por várias subunidades monoméricas, os nucleotídeos. A estrutura tridimensional foi elucidada em 1953 por Watson e Crick que consiste em duas cadeias polinucleotídicas antiparalelas enroladas em torno de um eixo comum formando uma dupla-hélice (Figura 1). Os nucleotídeos são compostos por uma base nitrogenada, uma pentose e um fosfato (Figura 2) (NELSON e COX, 2014).

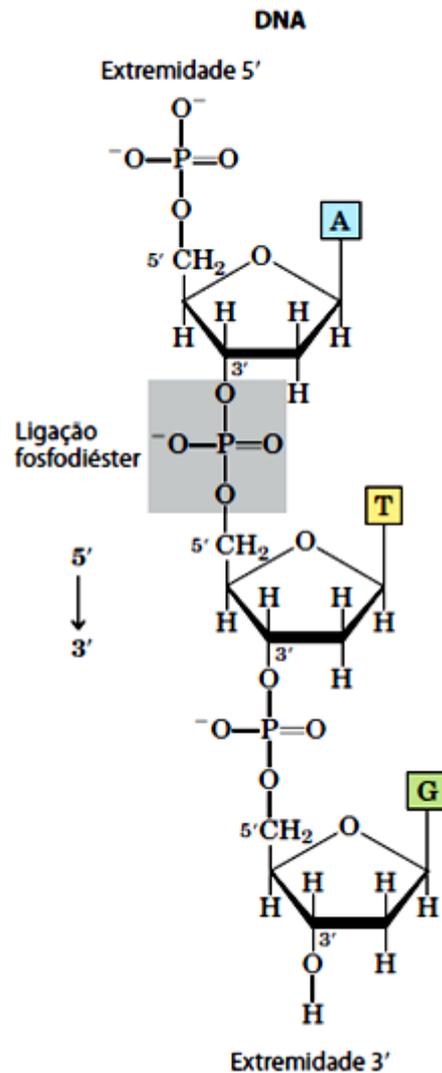
Figura 1 - Estrutura tridimensional do DNA



Fonte: SAIBERT, 2015

As bases nitrogenadas são compostos cíclicos contendo nitrogênio e são classificados em purínicas: guanina (G) e adenina (A); e pirimidínicas: citosina (C) e timina (T). A pentose do DNA contém 2'-desóxi-D-ribose, constituinte do ácido desoxirribonucleico e o grupo fosfato é responsável pela carga negativa do DNA. Os nucleotídeos encontram-se ligados entre si por uma ligação fosfodiéster por um grupo 5'-fosfato de um nucleotídeo ao grupo 3'-hidroxila do próximo nucleotídeo (Figura 2) (NELSON e COX, 2014).

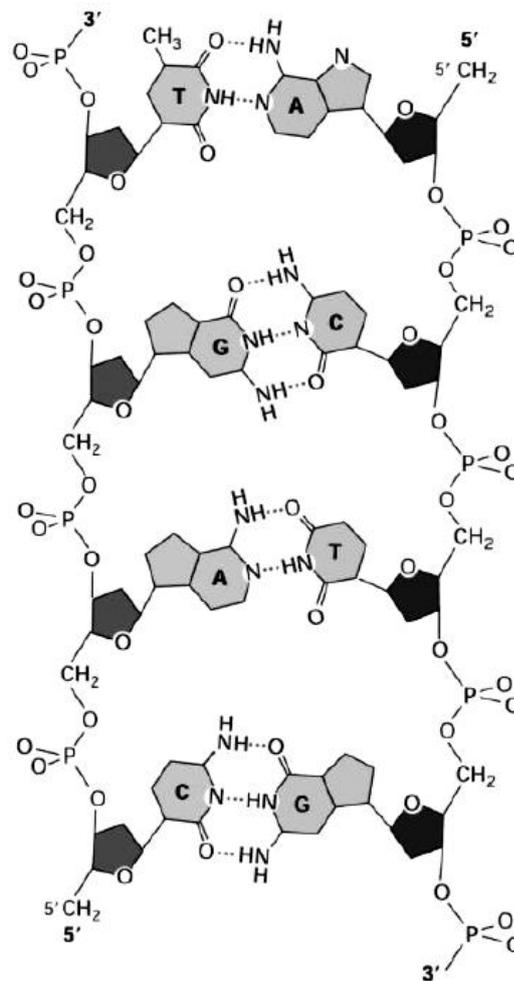
Figura 2 - Representação da estrutura química do esqueleto covalente do DNA, destacando a ligação fosfodiéster unindo os nucleotídeos.



Fonte: NELSON e COX, 2014.

As bases nitrogenadas estão pareadas entre si por ligações de hidrogênio, nos quais A liga-se especificamente a T por duas ligações de hidrogênio e G liga-se a C por três ligações de hidrogênio. O pareamento entre as bases purínicas e pirimidínicas por ligações de hidrogênio confere a estrutura tridimensional do DNA e mantém a dupla hélice, conferindo alta estabilidade (Figura 3) (NELSON e COX, 2014).

Figura 3 - Representação do pareamento entre os pares de base AT e CG por ligações de hidrogênio

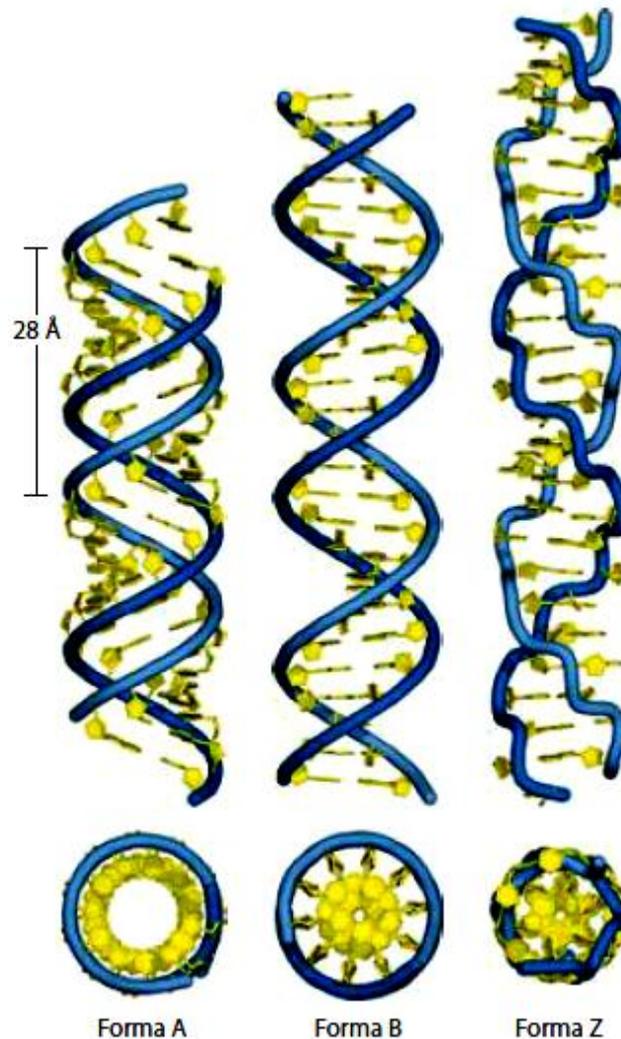


Fonte: BORTOLOTTI, 2015.

A estrutura do DNA proposta por Watson e Crick também pode assumir diferentes formas tridimensionais devido a possíveis rotações em torno de vários tipos de ligações no esqueleto açúcar-fosfato e possível alteração térmica produzindo alongamento, dobramento ou desnaturação das fitas, mantendo as suas propriedades-chaves: complementaridade das cadeias, cadeias antiparalelas e a exigência do pareamento AT e GC. Com isso, a estrutura do DNA pode adquirir 3 conformações: A-, B- e Z-DNA (Figura 4). A forma B é a mais conhecida e mais estável para a sequência aleatória da molécula de DNA sob condições fisiológicas. A forma A é favorecida sob condições de desidratação. O DNA é organizado na forma de dupla-hélice com sua orientação à direita, mas a hélice pode se mostrar mais larga e o número de bases por volta helicoidal ser de 11, em vez de 10,5 como no B-DNA. A forma Z apresenta a diferença mais radical da forma B, cujas hélices se mostram mais alongadas e

estreitas, a rotação da hélice é no sentido da mão esquerda, apresentando 12 pares de bases por volta da hélice e apresenta estrutura em zigue-zague (Figura 4) (NELSON e COX, 2014).

Figura 4 - Comparação das formas A, B e Z do DNA



Fonte: NELSON e COX, 2014

1.2 Complexos de Cobre

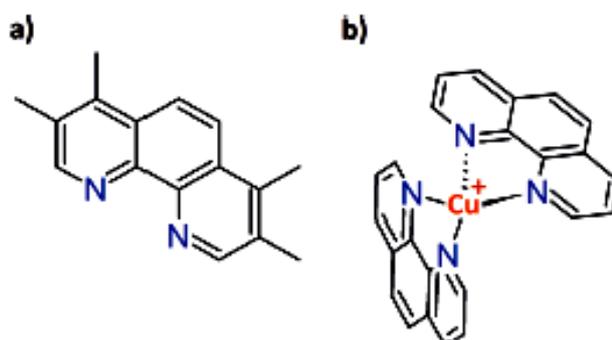
Os complexos de cobre têm sido alvos de diversos estudos na química bioinorgânica por ser um elemento essencial para o bom funcionamento do corpo humano, devido a sua presença em proteínas. Muitas enzimas dependem do cobre para as suas atividades estando envolvido em diversos processos biológicos, tais como no metabolismo energético, na respiração e na síntese de DNA (PERONTSIS et al, 2016; ANNARAJ;

BALAKRISHNAN; NEELAKANTAN, 2016).

Os complexos de cobre são amplamente estudados também devido as suas diversas aplicações desde na indústria quanto na área terapêutica no desenvolvimento de complexos de cobre contra parasitas e como agentes anticancerígenos (CHAN et al., 2016). Como agentes antitumorais, os complexos de cobre conseguem clivar o DNA pela oxidação direta através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), tais como o anion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou o oxigênio singlete (1O_2) mas também através da intercalação com pares de base do DNA (LIANG et al, 2014).

O complexo metálico obtido a partir de cloreto de cobre (II) e 3,4,7,8- tetrametil-1,10-fenantrolina (Figura 5.a), foi o primeiro composto de cobre a ser citado por Dwyer e colaboradores que apresentou propriedades antitumorais em ratos (DWYER et al, 1965). Mas o que fez despertar o interesse da comunidade científica por complexos de cobre interagindo com o DNA foi desenvolvimento da primeira nuclease sintética eficaz à base de cobre, $[Cu(phen)_2]^+$ (phen = 1,10-fenantrolina; Figura 5.b), capaz de clivar DNA de fita dupla por Sigman e colaboradores em 1979 (SIGMAN et al, 1979).

Figura 5 – Estruturas químicas de Ligantes e Complexo de Cobre a) ligante 3,4,7,8- tetrametil-1,10-fenantrolina b) primeira nuclease de cobre sintética $[Cu-(phen)_2]^+$



Fonte: BRISSOS; CAUBET; GAMEZ, 2015

1.3 Interação de Complexos Metálicos em DNA

Os complexos metálicos têm se tornado de grande interesse no desenvolvimento de agentes anticancerígenos devido a sua capacidade, sob condições fisiológicas, de se ligarem e reagirem com sítios específicos do DNA, ocorrendo a clivagem do mesmo (ANNARAJ; BALAKRISHNAN; NEELAKANTAN, 2016). No caso de genes cancerígenos, alguns complexos metálicos conseguem clivar o DNA através da quebra das suas fitas,

destruindo a capacidade do gene de se replicar (DEDE; OZMEN; KARIPCIN, 2009). A interação dos complexos metálicos com o DNA é um passo fundamental para que ocorra a clivagem do DNA (LIU, ZHU, TANG, 2016).

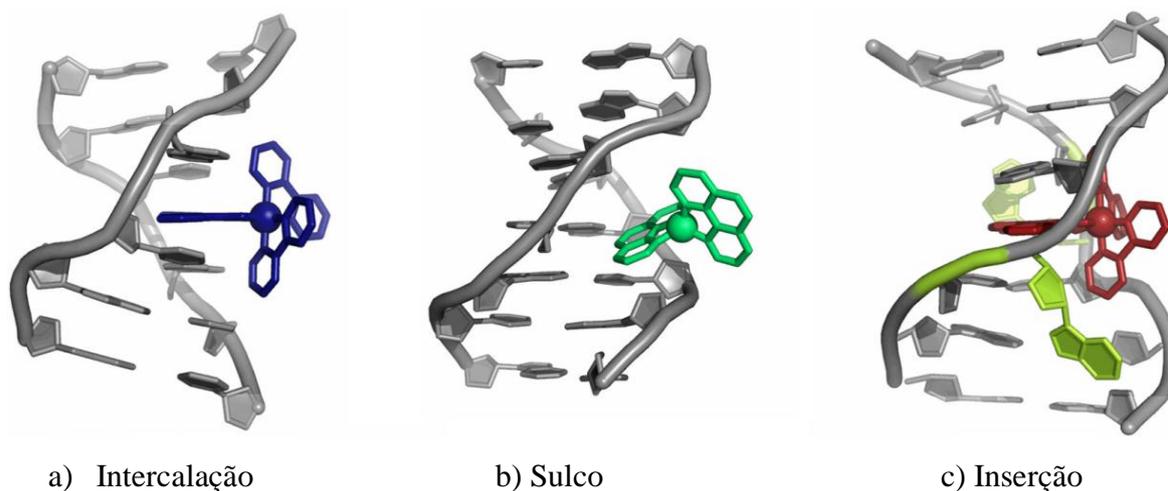
Os complexos metálicos podem interagir com o DNA através de ligações covalente, a partir da coordenação direta do metal, ou de forma não-covalente, guiada por ligantes orgânicos. As interações dos complexos metálicos por ligações não-covalentes podem ainda ser por intercalação, sulco ou inserção (Figura 6), sendo que a grande maioria dos complexos metálicos interagem com o DNA por sulcos ou intercalação (RAGHEB; ELDESOUKI; MOHAMED, 2015 e ZEGLIS; PIERRE; BARTON, 2007).

A interação por intercalação é a interação de empilhamento não covalente de uma molécula normalmente planar entre pares de bases de DNA. Tal intercalação pode dar origem à inibição da síntese *in vivo* de ácidos nucleicos e, portanto, pode encontrar numerosas aplicações medicinais, incluindo o desenvolvimento potencial de fármacos antitumorais. É escasso o complexo de cobre atuar como um intercalador de DNA, isso porque ele irá produzir espécies reativas de oxigênio que irá lesionar o DNA pela via oxidativa (BRISSOS; CAUBET; GAMEZ, 2015).

A interação por sulco envolve a totalidade ou uma parte do complexo metálico interagindo com um ou ambos sulcos do polinucleótido. A ligação por sulcos ocorre através de interação eletrostática, hidrofóbicas e van der Waals. Os complexos metálicos ligam-se no sulco menor e, dependendo da estrutura, pode apresentar uma preferência para sequências ricas em A/T (SMITH et al, 2013).

A interação por inserção é semelhante a inserção por intercalação, a diferença é que em vez do complexo metálico desenrolar o DNA e inserir o ligante entre dois pares de base intactas, ele ejeta um par de base com o seu ligante planar atuando como um substituto (ZEGLIS; PIERRE; BARTON, 2007).

Figura 6 - Mecanismos de interação dos complexos metálicos com o DNA: a) intercalação, b) interação por sulco e c) inserção



Fonte: ZEGLIS, 2007

Para que os complexos de cobre possam clivar o DNA, primeiramente, esses complexos necessitam interagir com o DNA. Essa interação normalmente inclui interação eletrostática, forte ligação covalente, intercalação, sulco de ligação, ligações de hidrogénio com ligantes, e, em seguida, a clivagem de DNA (LIAU; ZHU; TANG, 2016).

1.4 Atividade nuclease dos complexos de cobre

A clivagem de DNA pode ser considerada como uma reação enzimática que compreende vários processos biológicos, assim como a manipulação de material genético biotecnológico (REDDY et al, 2011).

O estudo e desenvolvimento de novas nucleases artificiais tem recebido grande interesse por parte dos pesquisadores devido às suas propriedades eletrônicas incomuns e reatividade química diversa e também devido as suas aplicações não só como agentes terapêuticos, mas também para o uso na pesquisa genômica (LIAU; ZHU; TANG, 2016).

A clivagem do DNA por nucleases químicas pode ocorrer através de dois processos: o processo hidrolítico ou oxidativo. A clivagem hidrolítica do DNA segue um caminho mecanístico, não necessitando da ação de agentes externos, esse tipo de clivagem é direcionado para as ligações fosfodiéster que ligam os nucleotídeos, e os produtos clivados podem ser passíveis de religação enzimática. Dentre os complexos metálicos, os complexos de cobre são um dos fortes candidatos a sua utilização como hidrolases sintéticas, devido às

fortes propriedades de ácidos de Lewis destes íons metálicos (LI et al, 2010).

A clivagem oxidativa requer a adição de um agente externo tal como luz ou um oxidante ou agente redutor para iniciar a clivagem, causando danos no açúcar e/ou na base nitrogenada resultando na formação de fragmentos de DNA que não podem ser religados, não sendo adequados para posterior manipulação enzimática devido à ausência das extremidades 3'-OH e 5'-OPO₃ (LI et al, 2010).

Entre os dois métodos, os agentes de clivagem hidrolítica apresentam alguma vantagem em relação aos agentes de clivagem oxidativa, por não necessitarem de um co-reagente para a sua ativação e, conseqüentemente podendo ser mais úteis no *design* de medicamentos enquanto que os agentes de clivagem oxidativa são mais utilizados no campo da biologia molecular (HEGG; BURSTYN, 1996).

Devido as suas propriedades redox e a sua elevada afinidade com as nucleobases, os complexos de cobre conseguem clivar o DNA, efetivamente, tanto oxidativamente quanto hidroliticamente (RAVICHANDRAN et al 2014).

1.5 O uso de complexos metálicos como ferramentas biotecnológicas

Os avanços nas áreas da genômica e biotecnologia tem estimulado a busca por novos instrumentos capazes de manipular o DNA. Apesar das enzimas de restrição serem bastante úteis, elas apresentam algumas desvantagens para a sua utilização devido ao alto custo e as suas curtas sequencias de reconhecimentos (4-6 pb), resultando em múltiplos sítios de clivagem e o restrito número de sequencias que podem ser clivadas é limitado por essas enzimas. Pequenas moléculas sintéticas que sejam capazes de ligar e clivar o DNA têm o potencial de ultrapassar tais problemas, tornando-se de grande interesse comercial devido a sua aplicabilidade como sondas de DNA estrutural e no método de DNA *footprinting* (RAGHEB; ELDESOUKI; MOHAMED, 2015 e DESBOUIS et al, 2012). Um exemplo é a utilização do complexo metálico de cobre bis (1,10-fenantrolina) como um reagente para *footprinting* de ácidos nucleicos e proteínas (GARCÍA-GIMÉNEZ et al, 2009).

Os agentes sintéticos capazes de clivar hidroliticamente os ácidos nucleicos têm cada vez mais atraído atenção devido as suas diversas aplicações como sondas conformacionais para determinar a estrutura do DNA, como agentes de restrição personalizados na biologia molecular, (MANCIN et al, 2005). Com isso, complexos metálicos com atividade nuclease podem encontrar aplicações como novas ferramentas biotecnológicas e agentes terapêuticos (DESBOUIS et al, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a interação e a clivagem do DNA por quatro complexos metálicos de cobre (II).

2.2 Objetivo Específico

Avaliar a clivagem de DNA:

1. Na presença e ausência de luz monocromática de 350 nm e 460 nm;
2. Com a adição de Peróxido de Hidrogênio e Glutathione;
3. A influência da concentração na atividade de clivagem do DNA;
4. Estudar a possível geração de superóxido proveniente da reação dos complexos com glutathione.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

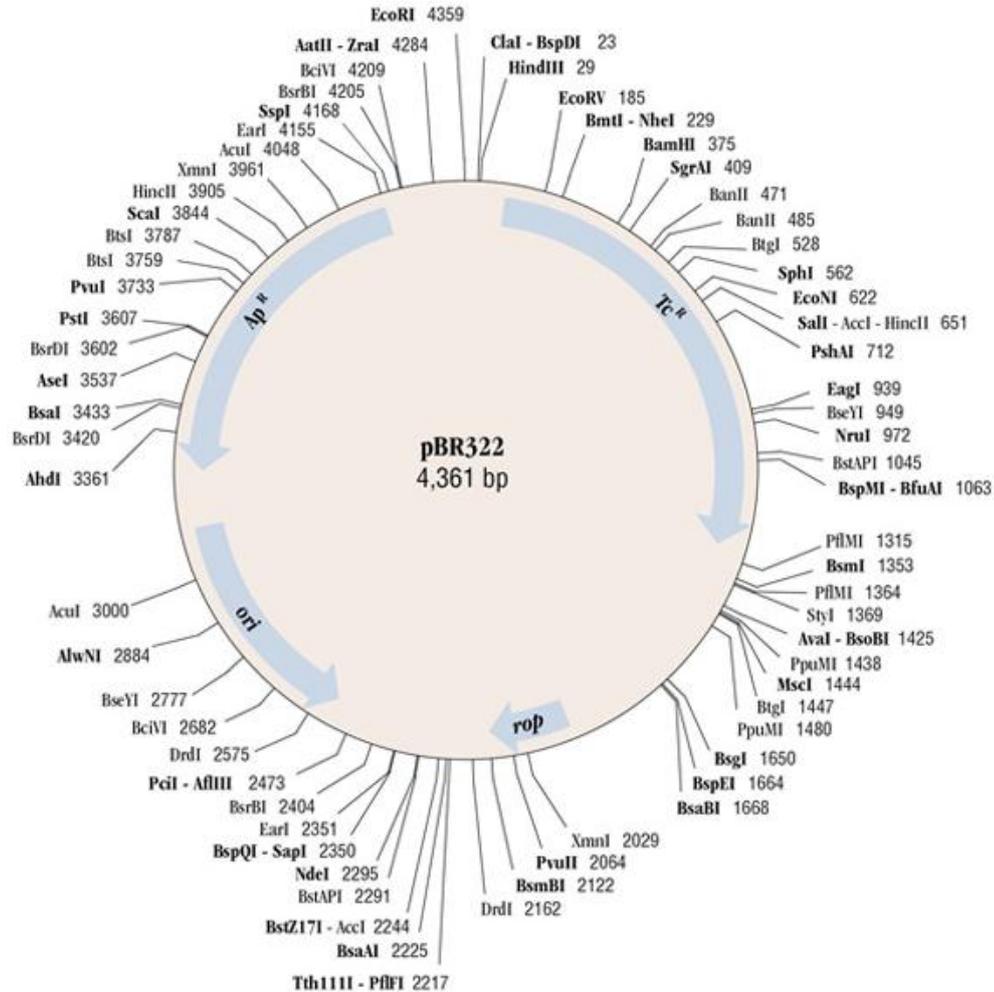
Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica sem qualquer purificação prévia. A água utilizada em todos os procedimentos foi obtida de um equipamento de ultrapurificação de água (Direct Q® 3UV com bomba da MILLIPORE).

Durante o presente trabalho foram utilizados quatro complexos quadrado planar de Cu^{2+} , contendo 4 ligantes bidentados (R1, R2, R3, R4), sendo cada composto identificado pelo par de ligante empregado. Por estarem em processo de patenteamento não será possível apresentar a estrutura química dos mesmos, sendo denominados como M1, M2, M3 e M4. Os complexos utilizados durante todo o trabalho foram sintetizados e caracterizados pela aluna Wendy Marina Toscano Queiroz de Medeiros e fornecidos pelo prof. Dr. Daniel de Lima Pontes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

3.2 DNA plasmidial

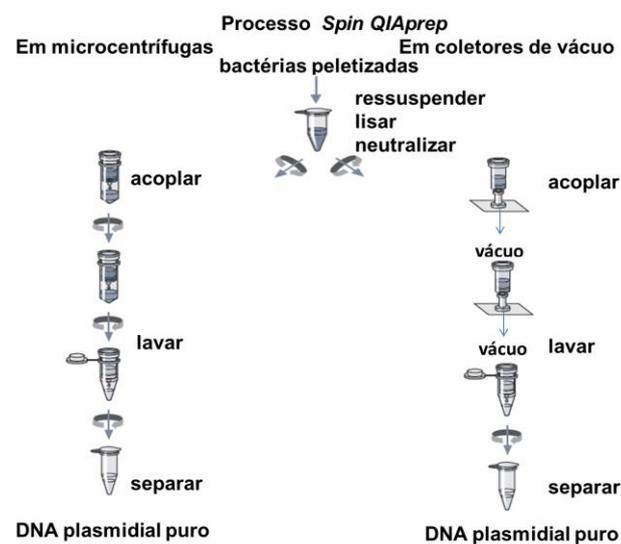
Para a realização dos experimentos foi utilizado como DNA modelo o plasmídeo pBR322 que apresenta o tamanho de 4.361 pares de bases, sendo sua massa molar de $2,86 \times 10^6$ Dalton. O plasmídeo foi obtido comercialmente da New England Biolabs® Inc, conforme a Figura 7 e posteriormente amplificado em bactéria *E.coli*, sendo utilizado o kit QIAprep Spin Miniprep da QIAGEN seguindo protocolo padrão do fabricante, conforme a Figura 8. A qualidade e concentração do DNA foram determinadas empregando-se espectroscopia de absorção na região do UV-visível [(A260nm) = 1 significa 50 ng/mL) e corrida eletroforética em gel de agarose 1%. A verificação da presença de proteínas na amostra foi feita por espectroscopia de absorção na região do ultravioleta e visível utilizando a razão de $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$, como parâmetro, onde se obteve o valor de 1,9 indicando que a amostra se apresentava livre de proteínas de acordo com a literatura ($1,8 < \text{razão} < 2,0$ indicam livre de proteínas).

Figura 7 – Plasmídeo pBR322



Fonte: New England Biolabs® Inc <<https://www.neb.com/products/n3033-pbr322-vector>>

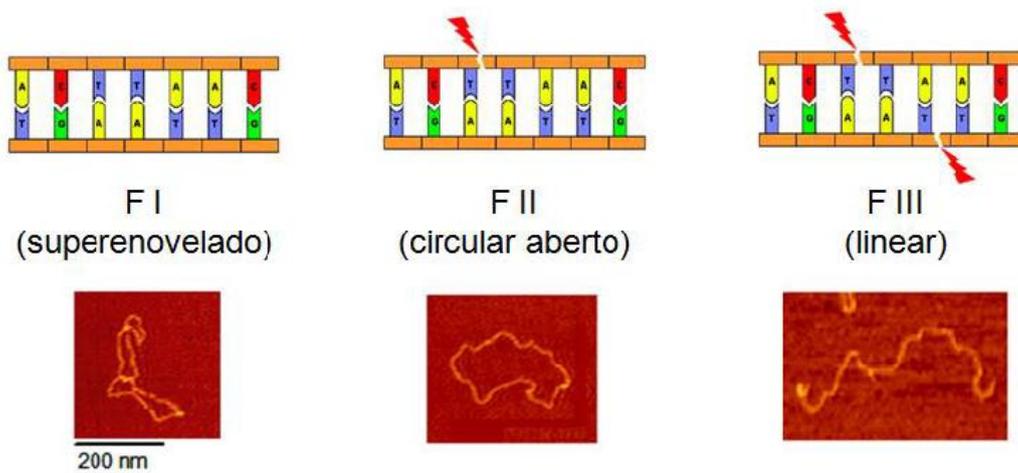
Figura 8 – Esquema do método de extração de DNA do Kit QIAprep Spin Miniprep.



Fonte: QIAGEN <<https://www.qiagen.com/br/resources/resourcedetail?id=89bfa021-7310-4c0f-90e0-6a9c84f66cee&lang=en>>.

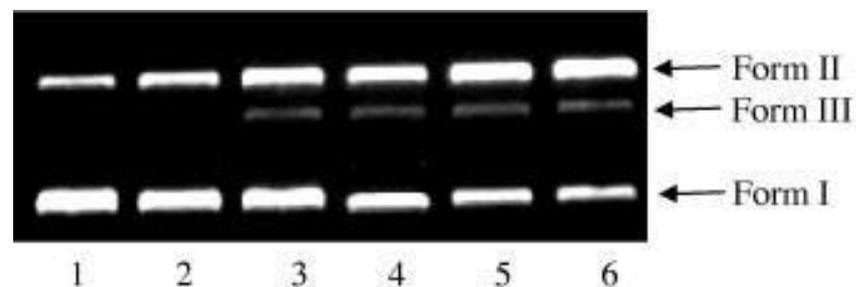
Quando o DNA plasmidial é submetido a eletroforese em gel de agarose, ele pode apresentar-se em 3 formas distintas e designadas como forma I ou F I, forma II ou F II e forma III ou F III. Quando intactas, as fitas do DNA plasmidial encontram-se altamente tensionadas, apresentando a forma I (F I), também chamada de superenovelado em que sua migração é mais rápida. Quando a fita I sofre um ou mais corte, ocorrerá um processo de relaxamento produzindo uma forma denominada de circular aberta (F II), tal forma apresenta migração mais lenta. No entanto, se ambas as cadeias são clivadas, o plasmídeo assume uma forma denominada de linear (F III) e irá migrar entre as fitas FI e FII, conforme as figuras 9 e 10 (Tabassum, 2011).

Figura 9 - Ilustração das três formas do DNA plasmidial.



Fonte: Bortolotto, 2006.

Figura 10 – As três formas do DNA plasmidial e a sua diferenciação após eletroforese em gel de agarose.



Fonte: Tabassum (2011).

3.3 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é o método padrão utilizado para separar, identificar, analisar, caracterizar e purificar fragmentos de DNA. O DNA pode ser visualizado por exame do gel empregando luz ultravioleta usando corante intercalante fluorescente, pois quando intercalados ao DNA esses corantes fluorescem.

Para que a molécula de DNA seja analisada através desse método é necessário que ela seja exposta a um campo elétrico, onde migrará para o eletrodo positivo na velocidade ou mobilidade eletroforética, proporcional a força do campo e a carga líquida da molécula (Martins, 2014).

A agarose é um polissacarídeo extraído de algas vermelhas do gênero *Rhodophyceae*. Este polissacarídeo consiste na repetição do dissacarídeo formado entre os resíduos de β -D-galactose (ligado pelas posições 1,3) e 3,6-anidro- α -L-galactose (ligado pelas posições 1,4), após dissolvido a quente gera uma malha semi-sólida ao se resfriar (Martins, 2014).

A preparação dos géis de agarose foi feita a partir da completa dissolução, sob aquecimento em forno de microondas, de 0,4g de agarose em 50 ml de tampão TAE 1X (Tris 89 mmol L⁻¹, ácido acético 89 mmol L⁻¹, EDTA 2 mmol L⁻¹ pH 8,0), obtendo-se uma concentração final de 0,8% (m/v). O tampão utilizado no preparo do gel foi o mesmo tampão adicionado na cuba eletroforética.

Foram realizados testes, em diferentes condições, para verificar a eficiência da clivagem do DNA pelos complexos, empregando-se DNA supernovelado (pBR322), num volume final de reação de 22 μ L, correspondendo a uma concentração final de DNA de 6,4ng/ μ L em cada poço. Em cada poço foi adicionado 18,9 μ L de uma solução pré-mix, contendo DNA plasmidial, TRIS-HCl e H₂O.

As amostras foram preparadas conforme descrito na literatura (Metzler-Nolte N., 2009) e, em seguida submetidas à eletroforese em gel de agarose por aproximadamente 1 hora e 10 minutos, ou até que a frente de migração do *Gel Loading* atingisse o final do gel, sob tensão constante de 70 volts e corrente variável de 55-65 mA. Para esses experimentos foi utilizada a fonte de corrente contínua Apelex modelo PS 305.

As bandas de DNA foram visualizadas e analisadas após aproximadamente 1 hora e meia de incubação com brometo de etídio, empregando-se o fotodocumentador Bio-Rad-GelDOC XR, conforme a figura 11. Foi utilizado marcador de fita linear, marcador 1 Kb de DNA linear da Life Technologies, InvitrogenTM.

Figura 11 - Imagem do equipamento de fotodocumentação.



Fonte: <<http://www.bio-rad.com/pt-br/product/gel-doc-xr-syste>>.

4 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

4.1 Teste de clivagem de DNA na presença e ausência de luz

Foram realizadas eletroforeses com o objetivo de comparar os efeitos provocados da ausência e presença de irradiação por 2h. Nos ensaios de irradiação foram utilizadas duas fontes de luz, uma na região de 350 nm (Reator Fotoquímico UNT 001 da UNITEC-LAB, lâmpadas de RPR 350 nm, Ct 06405 da Brantford, USA), e uma na região de 463 nm (Led azul Basetech com potência de 1,7 W).

O sistema utilizado para a irradiação foi um Reator Fotoquímico UNT 001 da UNITEC-LAB. Antes de inserir as amostras no reator, as lâmpadas foram ligadas previamente por 30 minutos para que tivéssemos a estabilização do sistema. As análises das corridas eletroforéticas foram realizadas em temperatura ambiente aproximadamente a 26°C.

Foram utilizados microtubos marcados para verificar se as amostras estavam evaporando devido ao possível aquecimento provocado pelas lâmpadas, não sendo verificado a evaporação significativa durante o experimento, logo eliminando tal interferência.

Ao término do período de incubação foi adicionado em cada amostra 4,4 µL de tampão de corrida Loading Buffer 5X concentrado (EDTA 0,25 mol L⁻¹, glicerol 50% e azul de bromofenol 0,01% - pH 8,0) e em seguida as amostras foram adicionadas nos poços formados no gel.

4.2 Efeito da adição da Glutathiona

Com o objetivo de verificar se os complexos apresentariam clivagem de DNA na presença de glutathiona (GSH), os complexos M₁, M₂, M₃ e M₄ foram incubados na concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, juntamente com DNA (6,4 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e GSH (1,8 mmol L^{-1}) por 2 horas.

4.3 Efeito da adição de peróxido de hidrogênio

Com o objetivo de verificar se os complexos apresentariam clivagem de DNA na presença de peróxido de hidrogênio, através da geração de radicais livres, os complexos M₁, M₂, M₃ e M₄ foram incubados nas concentrações de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, juntamente com DNA (6,4 $\text{ng}/\mu\text{L}$) e peróxido de hidrogênio (1,8 mmol L^{-1}) por 2 horas.

4.4 Avaliando a dependência da Clivagem do DNA com concentração dos complexos M₁, M₂, M₃ e M₄ na presença e ausência de luz

Para determinar a influência da concentração dos complexos na atividade de clivagem do DNA, foram testadas concentrações de 300, 250, 100, 50, 25 e 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ dos complexos na presença e na ausência de luz por 2 horas, foi utilizada uma lâmpada de 463 nm (led azul) para a irradiação das amostras.

Para determinar a extensão da degradação do DNA foi utilizado o software Quantity One 1-D Analysis versão 4.6.6 e aplicado um fator de correção 1,42 para as formas superenoveladas ou FI, devido à baixa capacidade do brometo de etídio para intercalar com o DNA na forma I, e conseqüentemente baixa emissão de fluorescência, em comparação com as formas II e III (HEGG; BURSTYN, 1996).

4.5 Monitoramento da Geração de Íon Superóxido

A fim de elucidar a dinâmica de clivagem dos complexos de cobre, e quais espécies reativas estão envolvidas no mesmo, foram realizados ensaios acompanhados por espectroscopia de absorção na região do UV-vis por meio do espectrofotômetro UV-VIS Hewlett Packard, photo-diode-array, modelo 8453 acoplado a um computador Pentium 166 MHz. Todas as medidas foram realizadas em cubetas de plástico com caminho óptico de 1 cm.

4.5.1 Monitoramento dos complexos M₁, M₂, M₃ e M₄ com Azul de Nitrotetrazólio (NBT) e Glutaciona (GSH)

Este ensaio foi realizado em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7, 500 µmol L⁻¹ de Azul de Nitrotetrazólio (NBT), 1mmol L⁻¹ de GSH e 10 µmol L⁻¹ de complexo. A intensidade da banda em 560nm foi acompanhada por 1h no espectrofotômetro na região do UV-vis, os espectros foram registados a cada 30s e os dados ajustados a uma curva cinética.

4.5.2 Estudo cinético dos complexos M₁, M₂, M₃ e M₄ com Azul de Nitrotetrazólio (NBT) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂)

Os espectros eletrônicos para a reação dos complexos com Azul de Nitrotetrazólio (NBT) e Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), foram obtidos em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7, 500 µmol L⁻¹ de Azul de Nitrotetrazólio (NBT), 1mmol L⁻¹ de H₂O₂ e 10 µmol L⁻¹ de complexo por meio do espectrofotômetro UV-vis.

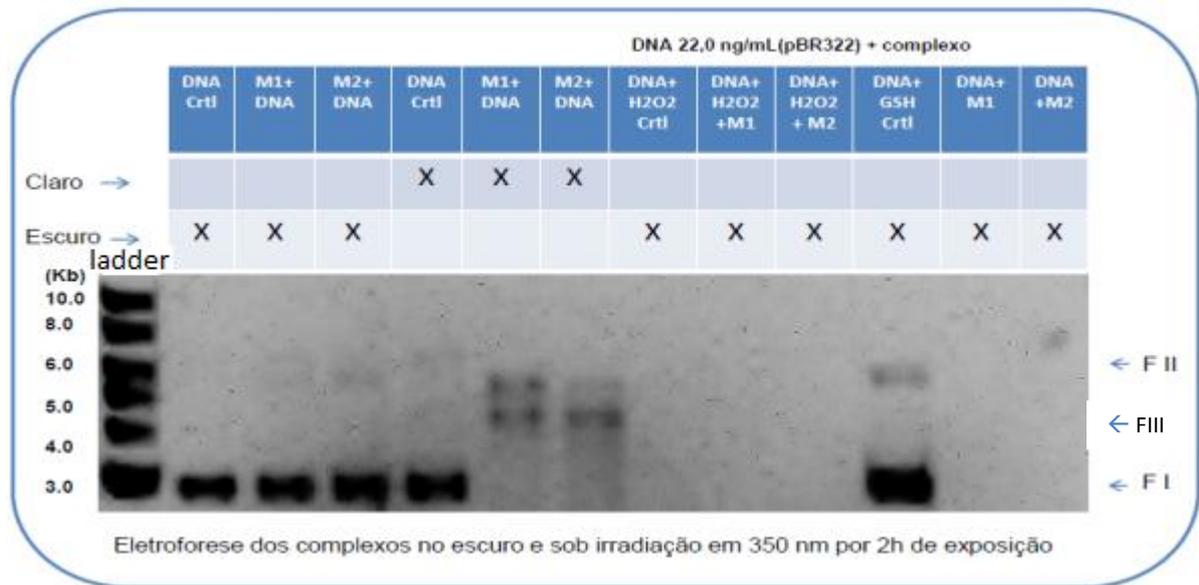
5 Resultados e Discussão

5.1 Investigação da Interação e Clivagem do DNA na Ausência e Presença de Luz, Peróxido de Hidrogênio e Glutaciona dos complexos M₁ e M₂

Foram realizadas misturas de DNA plasmidial com os complexos M₁ e M₂ e em seguida avaliadas a interação ou clivagem do DNA após 2h de incubação, conforme a figura 12.

Não foi possível observar indício de interação ou clivagem do DNA na ausência de luz com os complexos M₁ e M₂, sendo possível somente observar a Forma I (FI), não apresentando as outras formas FII e FIII as quais indicaria possível clivagem do DNA (M₁ + DNA e M₂ + DNA – Figura 12). Diante do fato dos compostos M₁ e M₂ não clivarem DNA nessas condições, pode-se ressaltar que os mesmos não apresentam a capacidade de promover quebra da dupla hélice por mecanismo hidrolítico.

Figura 12 - Estudo de clivagem de DNA (FI, II e III)) empregando-se DNA plasmidial e o complexo M1 e M2 no Claro (350 nm) e no Escuro por 2 horas



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas condições onde foi empregado luz (350 nm), observou-se que a irradiação não teve influência sobre o DNA (DNA ctrl – figura 12). Contudo, quando os complexos foram utilizados após a incubação por 2h foi observado formação da FIII juntamente com um “arrastado” de DNA. O “arrastado” foi observado com mais intensidade no poço onde foi empregado o complexo M₂, uma vez que esse arrastado ocorre devido a sucessivas quebras do DNA em fitas gradativamente menores, isso indica que o composto M₂ apresenta a capacidade de clivagem mais efetiva em comparação com o M₁.

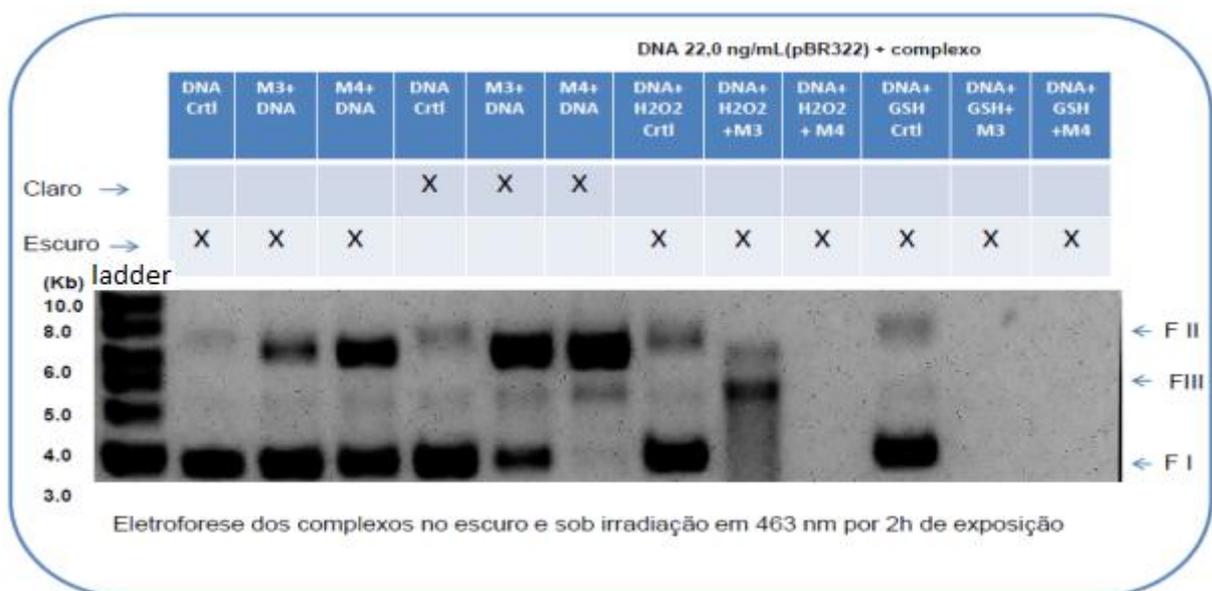
A glutatona (GSH, L-g-glutamyl-L-cisteína-glicina) é o principal composto tiol não proteico presente na maioria das células de mamíferos, variando em faixa de concentração de 0,1 - 10 mmol L⁻¹ (CLARKE, 2002). O tripeptídeo atua como um importante agente bio-reductor. Também desempenha funções biológicas importantes nos organismos, tais como síntese de DNA e proteínas, metabolismo e proteção das células (Narang et al, 2012).

Na presença de glutatona, a clivagem foi bastante intensa com os complexos M₁ e M₂, não sendo possível inclusive observar bandas de DNA remanescente no gel sugerindo completa degradação do DNA, conforme observado na figura 12 (DNA + GSH + M₁ e DNA + GSH + M₂).

5.2 Investigação da Interação e Clivagem do DNA na Ausência e Presença de Luz, Glutathiona e Peróxido de Hidrogénio dos complexos M₃ e M₄

Diferentemente dos compostos M₁ e M₂ descritos anteriormente, os complexos M₃ e M₄ foram capazes de provocar clivagem do DNA mesmo na ausência de luz, como ilustrado na figura 13 (M₃ + DNA (Dark) e M₄ + DNA (Dark)), com a formação da FII, indicando possível clivagem hidrolítica.

Figura 13 - Estudo de clivagem de DNA (FI, II e III)) empregando-se DNA plasmidial e o complexo M₃ e M₄ no Claro (463 nm) e no Escuro por 2 horas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na presença de luz, a clivagem M₃ e M₄ foi bastante eficiente após incubação por 2h sob irradiação de 463 nm em que houve a clivagem quase total da FI dando origem a FII com o complexo M₃ e total clivagem da FI dando origem a FII e FIII com o complexo M₄ (Figura 13 – DNA + M₃ (Claro) e DNA + M₄ (Claro)). Esse comportamento é bastante animador, uma vez que estes complexos apresentaram atividade nucleas nessas condições, os mesmos se mostram como promissores candidatos ao uso em terapia fotodinâmica do câncer, tendo destaque o composto M₄ que apresentou uma maior atividade clivadora.

Nas condições onde foi empregado peróxido de hidrogênio, foi possível observar a clivagem do DNA (Figura 13 – DNA + H₂O₂ ctrl), tal comportamento pode ser atribuído a decomposição do peróxido gerando radicais hidroxila. Ao analisarmos a imagem do gel, verifica-se a formação de FIII e de um arrastado com a adição do M₃ (Figura 13 – DNA + H₂O₂ + M₃). Com o complexo M₄ a clivagem foi ainda mais intensiva, não sendo

possível observar banda de DNA remanescente (Figura 13 – DNA + H₂O₂ + M₄). Novamente indicando que o composto M₄ possui atividade nuclease mais pronunciada que o M₃.

Na presença de glutathione, em ambos os poços que foram empregados os complexos M₃ e M₄ não foi possível observar bandas de DNA remanescente no gel sugerindo intensa atividade ao ponto de degradar todo o DNA nessas condições.

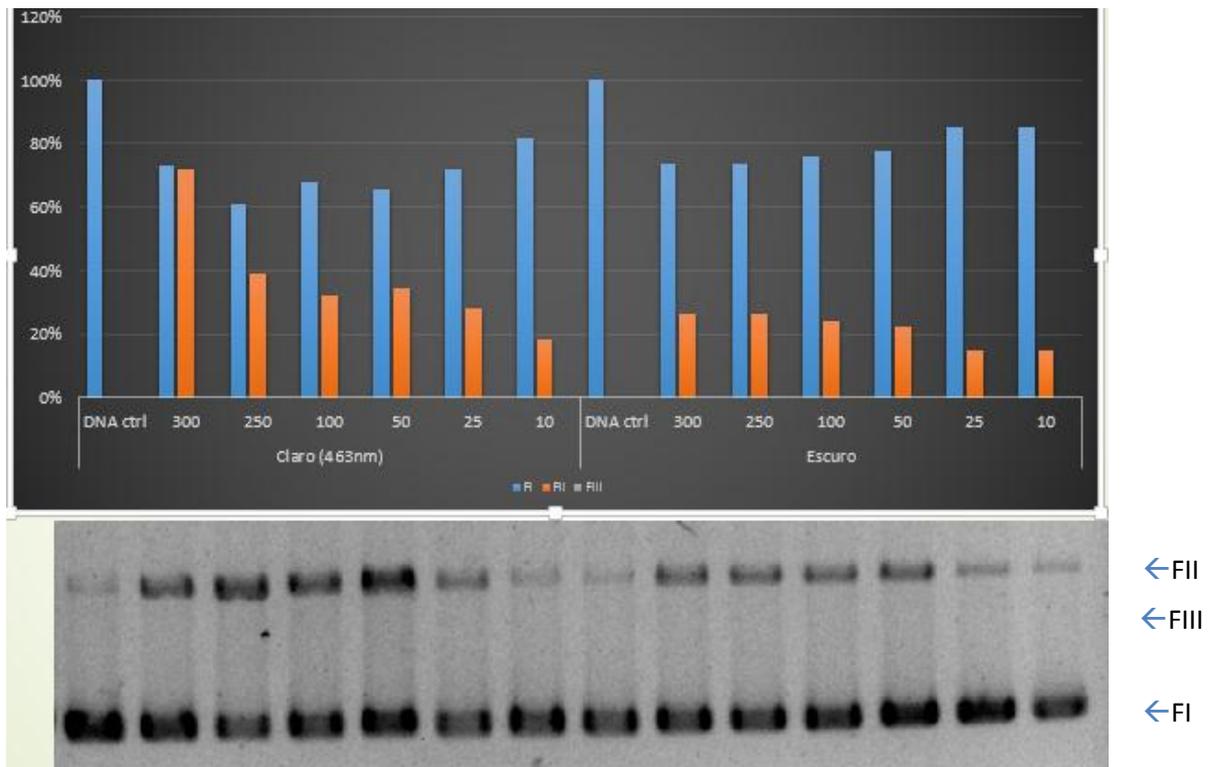
A clivagem de DNA pelos complexos M₁, M₂, M₃ e M₄ aqui descritos pode estar relacionado com a capacidade de tais compostos gerarem espécies reativas de oxigênio (ERO). Como foi verificado que os compostos em questão apresentaram atividade nuclease na presença de DNA, H₂O₂ e GSH, pode-se atribuir esse efeito a capacidade dos compostos de gerar intermediários reativos, por meio da alteração de seu estado redox quando associados a espécies biológicas H₂O₂ e glutathione (REED; DOUGLAS, 1991 e JORNEY; REICHHFIELD; COWAN, 2011).

5.3 Efeito da Concentração Estimulada por Luz (463nm)

Para verificar possíveis efeitos da interação entre os complexos e o DNA, na presença e na ausência de luz, foram preparadas misturas de DNA plasmidial e dos complexos nas concentrações de 300, 250, 100, 50, 25 e 10 μmol L⁻¹, sendo avaliado a sua interação e/ou clivagem de DNA após 2h de incubação na presença e na ausência de irradiação em 463nm.

Nessas condições, o complexo M₁ mostrou-se capaz de clivar DNA plasmidial na presença de luz, na imagem do gel obtido (Figura 14) é possível observar a presença tanto da fita FI quanto da FII, evidenciando a clivagem de DNA em que à medida que a concentração do complexo M₁ diminui ocorre uma diminuição da clivagem de DNA. Na ausência de luz, também é possível observar a presença de FI e FII, indicando clivagem de DNA, contudo a eficiência da clivagem foi menor quando comparado na presença de luz.

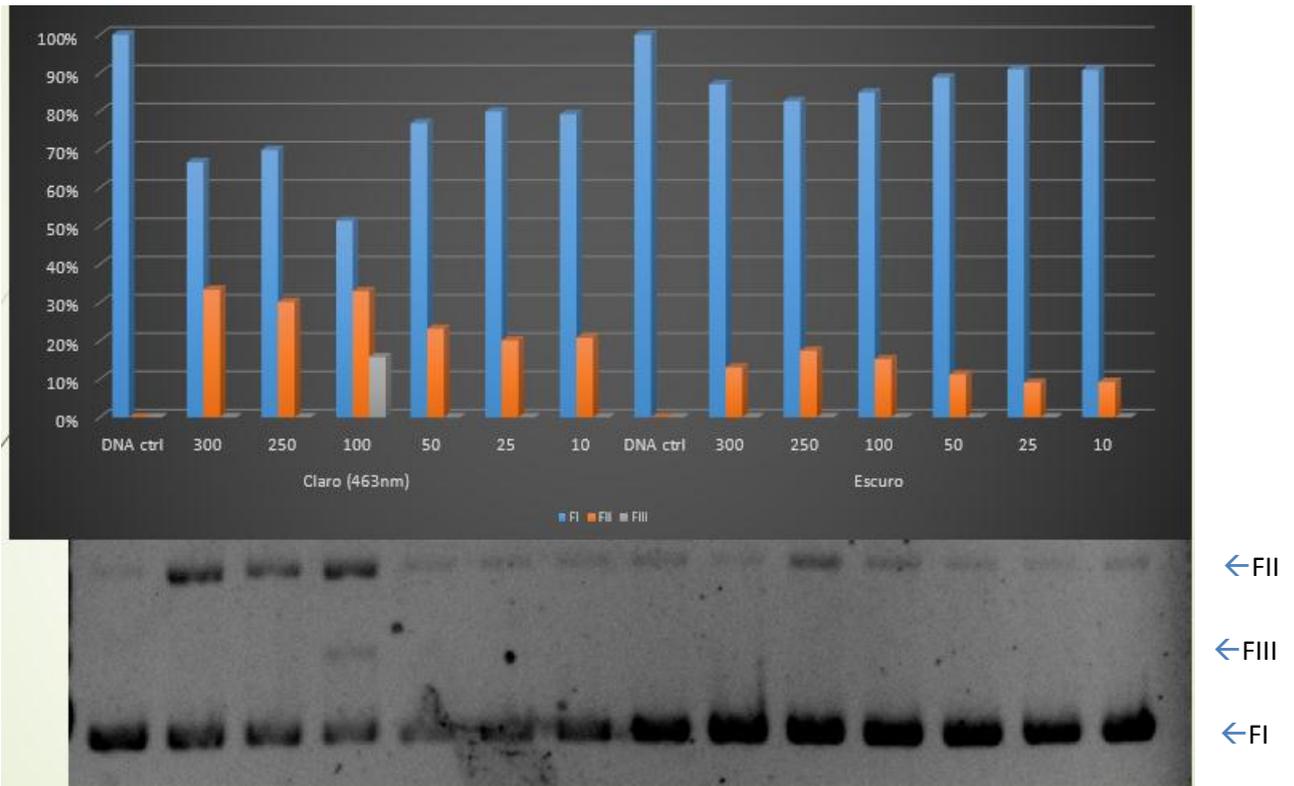
Figura 14 - Clivagem do DNA plasmidial (6,4 ng/ μ L em cada poço) pelo complexo M_1 em diferentes concentrações (300, 250, 100, 50, 25 e 10 μ mol L^{-1}) no claro (463 nm) e no escuro por 2h de exposição.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação ao complexo M_2 , na presença de luz ocorre clivagem de DNA de forma significativa nas concentrações de 300, 250 e 100 μ mol L^{-1} (Figura 15), enquanto que na ausência de luz é observado que na concentração de 250 μ mol L^{-1} ocorreu uma maior clivagem de DNA em comparação as outras concentrações.

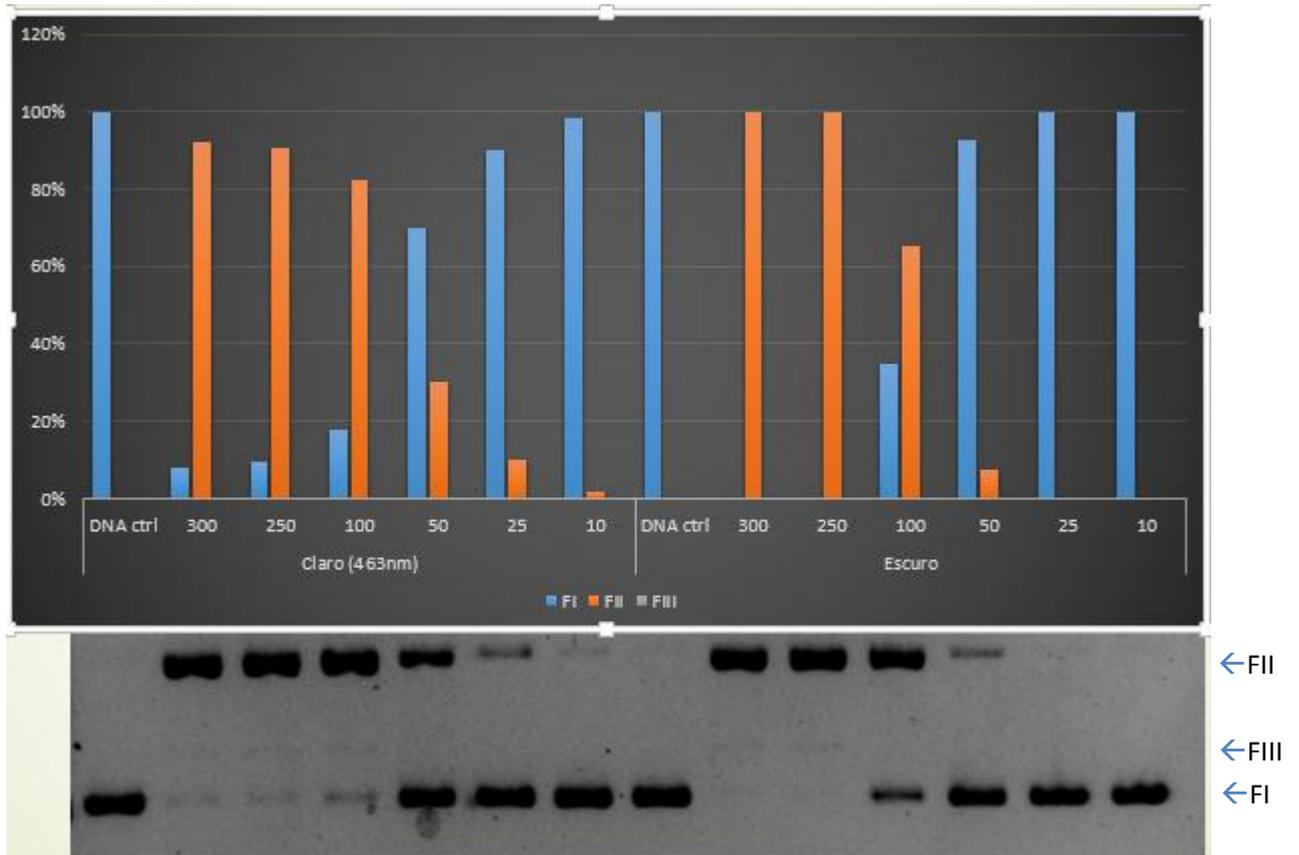
Figura 15 - Clivagem do DNA plasmidial (6,4 ng/ μ L em cada poço) pelo complexo M_2 em diferentes concentrações (300, 250, 100, 50, 25 e 10 μ mol L^{-1}) no claro (463 nm) e no escuro por 2h de exposição.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O complexo M_3 , em comparação com os outros complexos demonstrou ser mais ativo. Na concentração de 300 μ mol L^{-1} , após irradiação, o DNA plasmidial apresenta-se quase que totalmente clivado, com o surgimento de 92% da forma II. O complexo M_3 foi capaz de clivar o DNA de modo concentração-dependente, ou seja, à medida que a concentração do complexo aumenta no meio reacional aumenta a sua capacidade de clivar o DNA plasmidial, conforme observado na figura 16. Sem qualquer estímulo da luz, o complexo conseguiu clivar totalmente a FI dando origem a FII nas concentrações de 300 e 250 μ M. Assim, o complexo M_3 apresentou atividade nuclease com estímulo e sem estímulo da luz no comprimento de onda de 463nm.

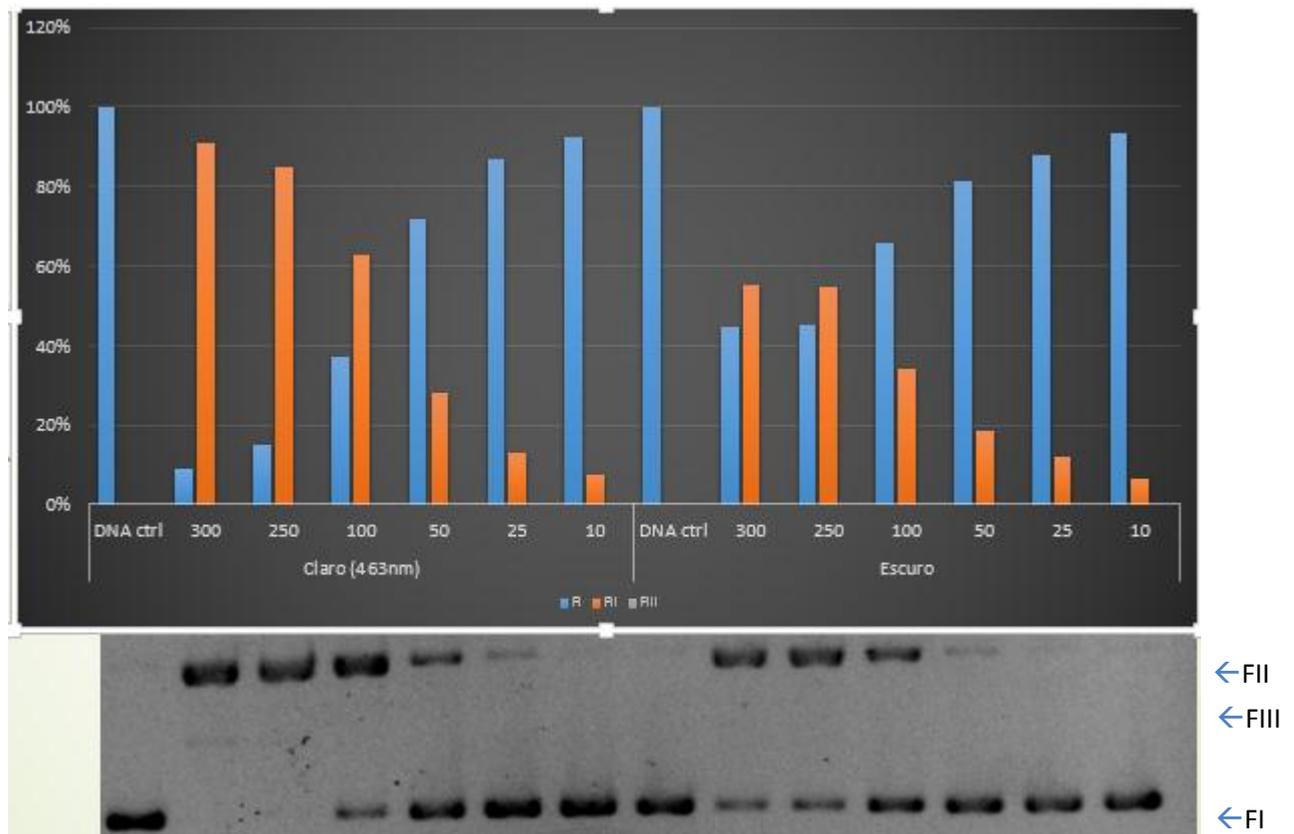
Figura 16 - Clivagem do DNA plasmidial (6,4 ng/ μ L em cada poço) pelo complexo M_3 em diferentes concentrações (300, 250, 100, 50, 25 e 10 μ mol L⁻¹) no claro (463nm) e no escuro por 2h de exposição.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O complexo M_4 também apresentou atividade nuclease com e sem estímulo da luz no comprimento de onda de 463 nm (Figura 17). Nas duas condições, com luz e sem luz, foi possível observar que a medida que a concentração do complexo diminui também ocorre uma diminuição da FII.

Figura 17 - Clivagem do DNA plasmidial (6,4 ng/μL em cada poço) pelo complexo M₄ em diferentes concentrações (300, 250, 100, 50, 25 e 10 μmol L⁻¹) no claro (463 nm) e no escuro por 2h de exposição.



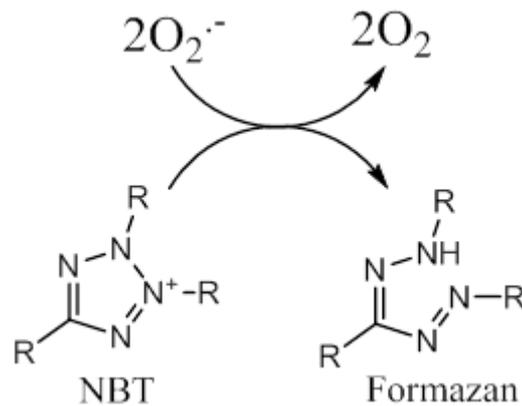
Fonte: Elaborado pelo autor.

Todos os complexos atuaram como clivadores do DNA por meio de excitação em 463 nm. Tendo destaque os complexos M₁ e M₂, quando comparados com o M₃ e M₄. Os compostos M₁ e M₂ foram capazes de clivar um percentual maior de DNA em condições de menor concentração, se mostrando como promissores agentes anticâncer em terapia fotodinâmica. Estudos preliminares já estão em andamento tendo como objetivo desvendar tal via mecanística.

5.4 Monitoramento de Geração de Superóxido

O Azul de Nitrotetrazólio (NBT) é um composto utilizado para a detecção de íon superóxido, no estado não reduzido, o NBT é um receptor de elétrons artificial solúvel com uma cor amarela. Após a redução por agentes redutores, por exemplo, superóxido, o NBT torna-se um composto azul, insolúvel, chamado de formazan, como mostra a figura 18, que eventualmente precipita. Este composto insolúvel pode ser medido por um aumento na absorção de luz a 560 nm (Zhang, 1992).

Figura 18 – Formação da Formazan a partir do Azul de Nitrotetrazólio (NBT).

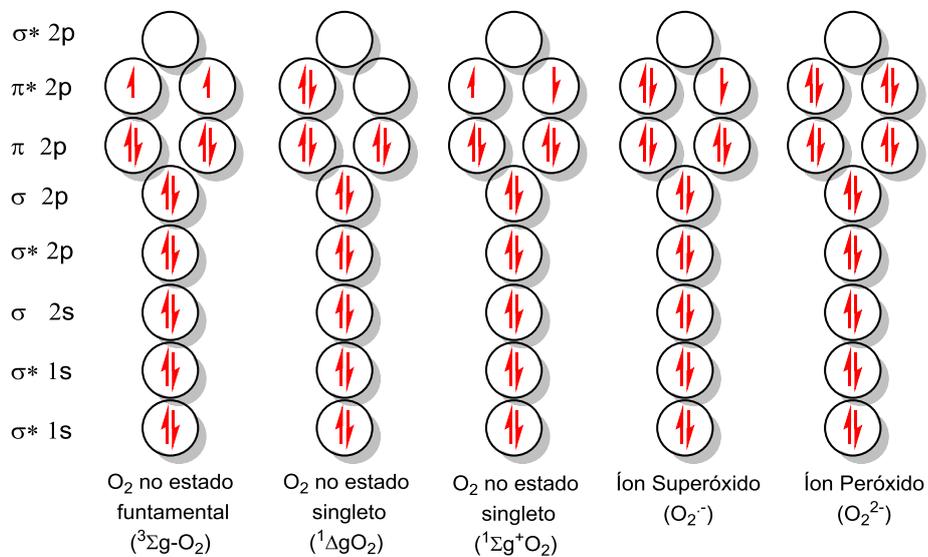


Fonte: Elaborado pelo autor.

5.4.1 Monitoramento da Reação entre Glutaciona e Complexos

O radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) é gerado pela redução de oxigênio molecular, por meio da adição de um elétron ao orbital π^*2p da molécula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Apesar de ser um fraco oxidante, o $\text{O}_2^{\bullet-}$ pode ocasionar sérios danos em biomoléculas, quando associado com outras espécies radiculares, o mesmo atua como redutor em reações contendo metais de transição, geralmente Fe e Cu (ESPEY et al, 2002).

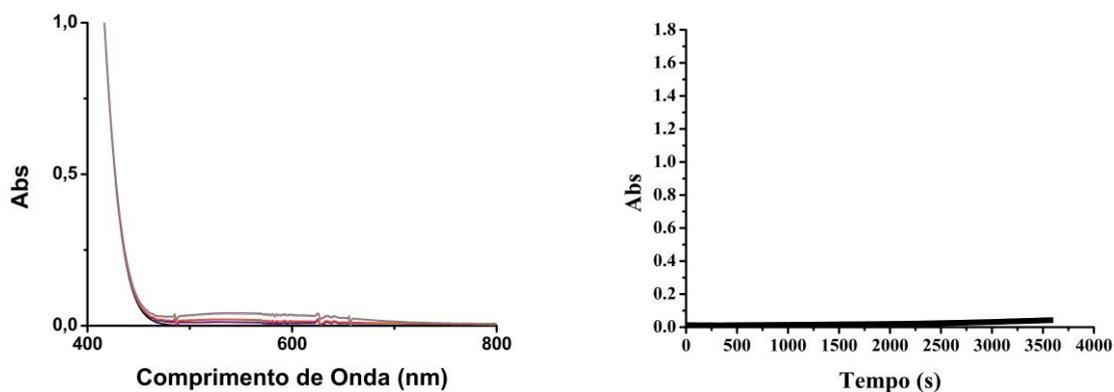
Figura19 - Versão simplificada da ligação na molécula de oxigênio e seus derivados.



Fonte: Adaptado da referência: HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015

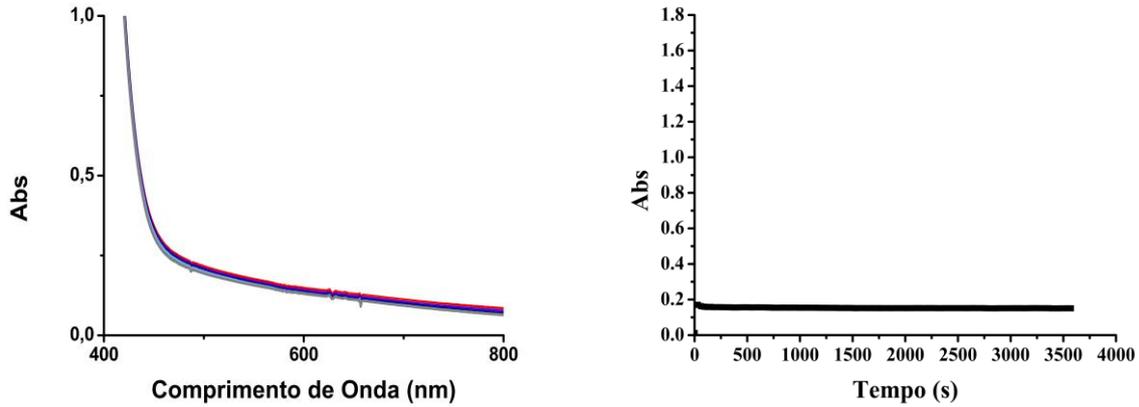
Ensaio *in vitro* têm demonstrado a redução do NBT a formazan pela espécie química $O_2^{\bullet-}$, como uma rota de estudo para verificar a possível atividade liberadora ou sequestradora de $O_2^{\bullet-}$ (SÁ et al 2015). A produção de $O_2^{\bullet-}$ pelo sistema complexo de cobre-GSH foi avaliada por meio da utilização de uma mistura contendo NBT, complexo de cobre e GSH. As reações foram monitoradas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 a 37°C durante 60 minutos. Antes dos experimentos utilizando os complexos, um controle reacional foi obtido para fins comparativos, para isso foi empregado uma mistura contendo todas as espécies citadas acima na ausência de GSH. Procurando garantir que a formação da formazan ocorre apenas na presença dos complexos e glutatona e não dos reagentes isolados, avaliou-se o efeito da glutatona e do complexo com o NBT separadamente. Através das figuras 20 e 21, é possível verificar que não ocorreu nenhuma mudança significativa, indicando que não há geração de superóxido em separado

Figura 20 – Variações espectrais na região do UV-Visível, da reação do NBT $500\mu\text{M}$ com a glutatona 1mmol L^{-1} em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, medidas realizadas a cada 30s durante 1h.



Fonte: Elaborado pelo autor

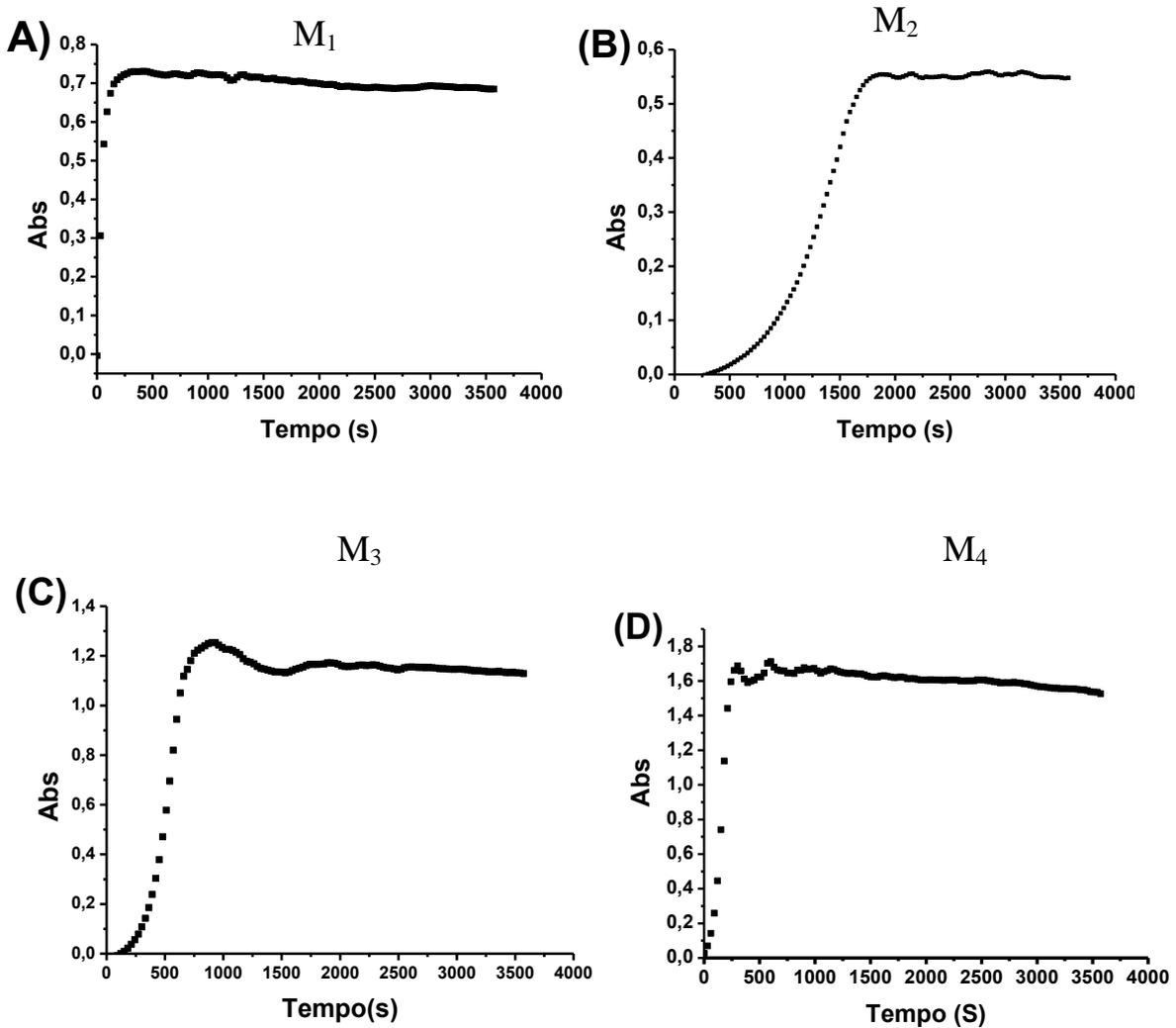
Figura 21 – Variações espectrais na região do UV-Visível, da reação do NBT $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ com o complexo M_4 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, medidas realizadas a cada 30s durante 1h.



Fonte: Elaborado pelo autor

A liberação de $\text{O}_2^{\bullet-}$ dos de cobre foi avaliada por meio da utilização de misturas contendo NBT ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$), os complexos de cobre $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ separadamente e GSH 1mmol L^{-1} . As reações foram monitoradas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 a 37°C durante 60 minutos. A Figura 22 mostra as curvas cinéticas em 560 nm para a conversão do NBT a formazan por meio da reação com $\text{O}_2^{\bullet-}$, possivelmente produzido da reação da GSH com os complexos M_1 , M_2 , M_3 e M_4 , respectivamente.

Figura 22 – Curvas cinéticas em 560 nm para conversão de NBT a Formazan, por meio da reação com $O_2^{\cdot-}$. Misturas reacionais contendo NBT ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$), GSH $1 \text{ (mmol L}^{-1})$ e (A) M_1 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$), (B) M_2 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$), (C) M_3 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (D) M_4 ($20 \mu\text{mol L}^{-1}$). As reações ocorreram em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 a 37°C durante 60 minutos.



Fonte: Elaborado pelo auto.

Todos os complexos reagiram com o NBT na presença da glutathiona, sugerindo que ocorre formação de superóxido. Foi possível observar a mudança de cor no final da reação, inicialmente tinha-se uma cor amarelada, cor característica do NBT mas ao ser totalmente convertido a formazan observou-se uma cor púrpura, como mostra a figura 23.

Figura 23 – Mudança de cor ao ser adicionado o complexo, na esquerda pode-se observar a solução sem a adição do complexo e na direita com a adição do complexo.



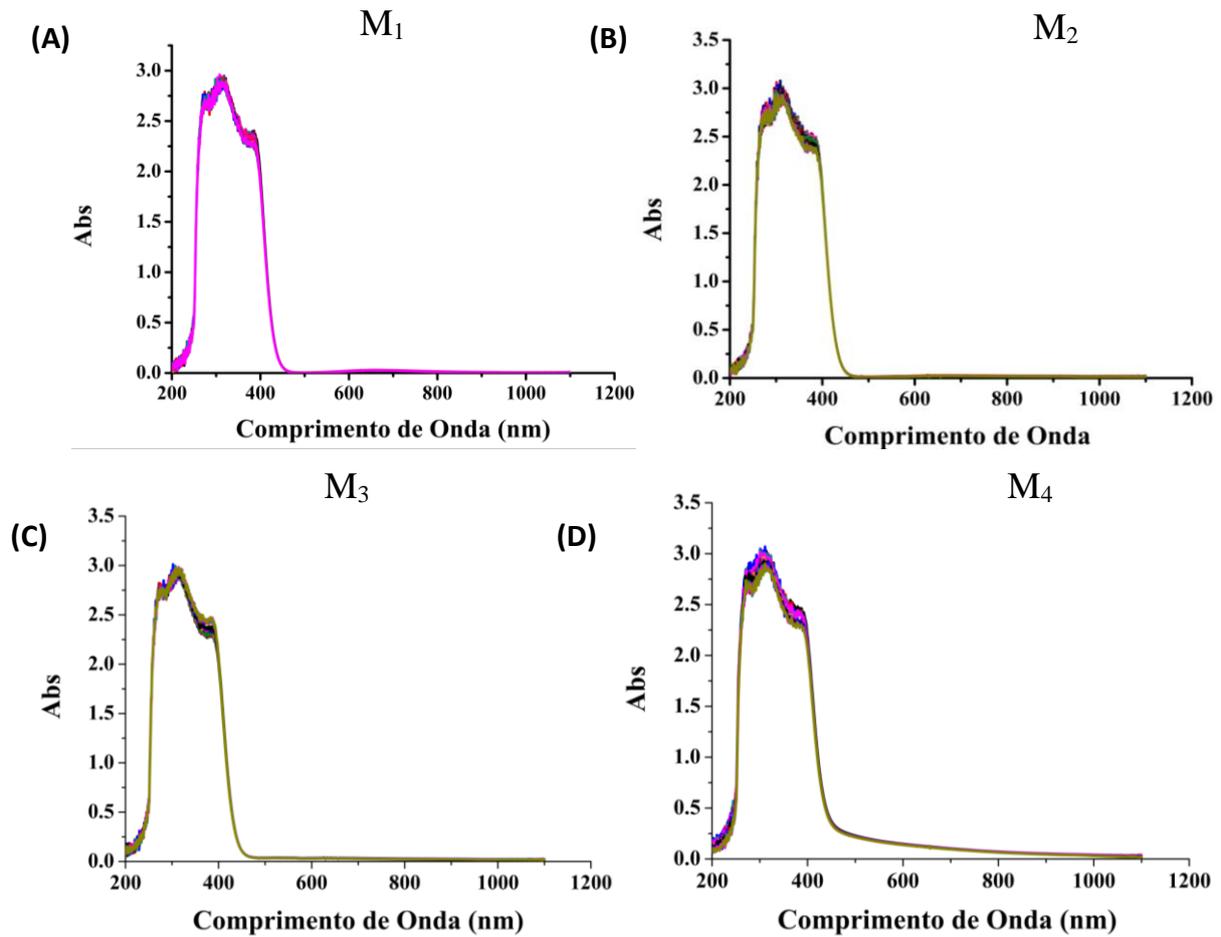
Fonte: elaborado pelo autor

Verificando as curvas, notou-se que no caso onde foi empregado o complexo M_4 foi a condição onde ocorreu a produção de formazan mais rapidamente, além disso, verificando a absorção das curvas, foi possível notar a produção de formazan em maior quantidade (1,7 Abs). Estes resultados corroboram com os resultados de degradação com DNA, uma vez que o composto M_4 , foi um dos complexos que apresentou maior atividade nucleásica.

5.4.2 Monitoramento da Reação com Peróxido de Hidrogênio

Com a finalidade de desvendar o mecanismo de clivagem dos complexos na presença de H_2O_2 , também foram realizados ensaios contendo os complexos na presença de NBT e peróxido de hidrogênio. A Figura 24 mostra os espectros de absorção na região do ultravioleta e visível para as misturas contendo NBT ($500 \mu\text{mol L}^{-1}$), H_2O_2 (1 mmol L^{-1}) e complexos de cobre ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Figura 24 – Variações espectrais na região do UV-visível, da reação do NBT $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, H_2O_2 1 mmol L^{-1} e o complexo (A) M_1 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, (B) M_2 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, (C) M_3 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (D) M_4 $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, medidas realizadas a cada 30s durante 30min



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao avaliar os resultados ilustrado na figuras 24 foi possível observar que o NBT não reagiu com o peróxido de hidrogênio, mesmo quando na presença dos complexos indicando que a clivagem do DNA não ocorre devido a produção do radical superóxido, mas sim devido a outro tipo de radical livre, possivelmente radicais hidroxila. Novos estudos devem ser realizados com a finalidade de confirmar a produção de tal radical.

6. CONCLUSÃO

Os experimentos empregados mostraram a interação e clivagem dos complexos com o DNA em que a clivagem quando adicionado a glutatona e o peróxido de hidrogênio, ocorre possivelmente devido a formação de radicais livres como por exemplo superóxido e radical hidroxila.

Ao aumentar a concentração dos complexos até $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ todos os complexos apresentaram clivagem ao serem irradiados no comprimento de onda de 463 nm mas apenas os complexos M_3 e M_4 apresentaram melhor clivagem, conseguindo clivar mais que 50% da fita I. Uma vez que os complexos M_3 e M_4 provocaram a clivagem de DNA na ausência de quaisquer agentes externos, o mecanismo de clivagem pode ser através de uma via hidrolítica.

Foram feitos estudos com o NitroAzul de Tetrazólio (NBT), com o intuito de elucidar a mecanística de clivagem do DNA que indicaram que geração de superóxido é o possível mecanismo de clivagem do DNA e de acordo com os resultados demonstrados possivelmente a atividade nucleasse dos complexos ocorre devido a geração de radicais superóxido.

Os experimentos realizados empregando eletroforese demonstraram que os complexos M_3 e M_4 conseguem clivar o DNA sem qualquer estímulo de um agente externo como GSH, luz ou H_2O_2 , indicando que possivelmente o mecanismo de clivagem ocorre por via hidrolítica.

Uma vez que na mistura contendo H_2O_2 , complexo de cobre e NBT, não ocorreu a formação de formazan, e os testes de DNA nessas condições apresentaram atividade nucleasse, pode-se dizer que um possível agente reativo gerado nessas condições é o radical hidroxilo, visto que a literatura reporta a formação do mesmo, por meio da reação entre complexos de cobre e H_2O_2 .

Já os testes com GSH, complexo de cobre e NBT, demonstraram a formação de formazan, indicativo de produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Diante disso, temos que a clivagem de DNA provavelmente ocorreu graças a geração de radical superóxido. Esse resultado mostra-se bastante promissor já que o tiol é encontrado em quantidades significativas no meio biológico.

A GSH atua como um protetor celular reagindo com espécies danosas ao DNA, mas mesmo tendo essa função protetora foi observado a clivagem do DNA com todos os complexos.

Diante dos resultados de irradiação (463 nm) podemos ordenar os complexos de cobre na seguinte ordem de reatividade: $M_1 > M_2 > M_3 > M_4$. Já os ensaios utilizando H_2O_2 e GSH indicaram a seguinte ordem de reatividade $M_1 < M_2 < M_3 < M_4$. Estes estudos abriram

outras interessantes perspectivas, tal como o estudo do mecanismo da reação dos complexos e glutatona em diferentes condições de pH, investigação dos produtos de hidrólise dos complexos em meio tamponado, e ensaios de eletroforese empregando GSH em meio anaeróbico, com o intuito de avaliar o possível efeito do O₂ no mecanismo de clivagem.

Além disso, será interessante e de extrema importância determinar, de forma precisa, os produtos radicalares gerados quando empregado os complexos na presença de luz, glutatona e H₂O₂ por espectroscopia de absorção na região do UV-Vis e ressonância paramagnética eletrônica (EPR), ambos experimentos utilizando espécies seletivas para cada radical (*spin traps* e probes fluorescentes, ex. N-(4-piridilmetileno)-tert-butilamina-N,N'-dióxido (POBN) e 3'-(*p*-aminofenil) fluoresceína (APF) - seletivos para radical hidroxila. Por fim, tem-se como objetivos futuros também, reavaliar os ensaios de atividade microbicida dos complexos e obtenção de IC₅₀ para todos os ensaios de DNA.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, W. B.; **Atividade Nucleásica do Complexo trans-[Ru(II)Cl₂(nic)₄] Sobre o Ácido Desoxirribonucléico “*in vitro*”e “*in vivo*”**. 2006, 97 f. Monografia (Bacharel em Farmácia) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma. 2006.

AMIR, Muhammad Kashif et al. Anticancer activity, DNA-binding and DNA-denaturing aptitude of palladium (II) dithiocarbamates. **Inorganica Chimica Acta**, v. 451, p. 31-40, 2016.

ANNARAJ, B.; BALAKRISHNAN, C.; NEELAKANTAN, M. A. Synthesis, structure information, DNA/BSA binding affinity and in vitro cytotoxic studies of mixed ligand copper (II) complexes containing a phenylalanine derivative and diimine co-ligands. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 278-291, 2016.

ASTON, N. S. et al. Copper toxicity affects proliferation and viability of human hepatoma cells (HepG2 line). **Human & experimental toxicology**, v. 19, n. 6, p. 367-376, 2000.

BORTOLOTTO, Tiago. **Interação e clivagem de DNA por novos complexos mononucleares de Cu (II) e binucleares de Fe (III) Zn (II)**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

BUCHTÍK, Roman; TRÁVNÍČEK, Zdeněk; VANČO, Ján. In vitro cytotoxicity, DNA cleavage and SOD-mimic activity of copper (II) mixed-ligand quinolinonato complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 116, p. 163-171, 2012.

BRISSOS, Rosa F.; CAUBET, Amparo; GAMEZ, Patrick. Possible DNA-Interacting Pathways for Metal-Based Compounds Exemplified with Copper Coordination Compounds. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 2015, n. 16, p. 2633-2645, 2015.

CHAN, Cheang Wei et al. Structural characterization, ROS-inductive and proteasome inhibitory properties of ternary and binary copper (II) complexes of N²-and N²O²-ligands. **Inorganica Chimica Acta**, v. 450, p. 202-210, 2016.

CALLARI, Manuela et al. Polymers with platinum drugs and other macromolecular metal complexes for cancer treatment. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 9, p. 1614-1643, 2014.

Clarke, M. J. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 232 (1-2), 69–93.).

CORREIA, Isabel et al. Vanadium (IV) and copper (II) complexes of salicylaldimines and aromatic heterocycles: Cytotoxicity, DNA binding and DNA cleavage properties. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 147, p. 134-146, 2015.

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

DEDE, Bulent; OZMEN, Ismail; KARIPCIN, Fatma. Synthesis, characterization, catalase functions and DNA cleavage studies of new homo and heteronuclear Schiff base copper (II) complexes. **Polyhedron**, v. 28, n. 18, p. 3967-3974, 2009.

DWYER, F. P. et al. Inhibition of landschuetz ascites tumour growth by metal chelates derived from 3, 4, 7, 8-tetramethyl-1, 10-phenanthroline. **British journal of cancer**, v. 19, n. 1, p. 195, 1965.

ESPEY, Michael G. et al. Focusing of nitric oxide mediated nitrosation and oxidative nitrosylation as a consequence of reaction with superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 17, p. 11127-11132, 2002.

GARCÍA-GIMÉNEZ, José Luis et al. Oxidative nuclease activity of ferromagnetically coupled μ -hydroxo- μ -propionato copper (II) complexes $[\text{Cu}_3(\text{L})_2(\mu\text{-OH})_2(\mu\text{-propionato})_2](\text{L} = \text{N}(\text{pyrid-2-ylmethyl})\text{R-sulfonamidato}, \text{R} = \text{benzene, toluene, naphthalene})$. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 103, n. 2, p. 243-255, 2009

GRILLO, C. A.; REIGOSA, M. A.; DE MELE, M. Fernández Lorenzo. Effects of copper ions released from metallic copper on CHO-K1 cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 672, n. 1, p. 45-50, 2009.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. Free radicals in biology and medicine. 1985, 331-332

HEGG, Eric L.; BURSTYN, Judith N. Copper (II) macrocycles cleave single-stranded and double-stranded DNA under both aerobic and anaerobic conditions. **Inorganic Chemistry**, v. 35, n. 26, p. 7474-7481, 1996.

LI, Dong-Dong et al. Four new copper (II) complexes with 1, 3-tpbd ligand: Synthesis, crystal structures, magnetism, oxidative and hydrolytic cleavage of pBR322 DNA. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 104, n. 4, p. 431-441, 2010.

LIANG, Jie-Wen et al. Synthesis, DNA interaction and anticancer activity of copper (II) complexes with 4'-phenyl-2, 2': 6', 2''-terpyridine derivatives. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 141, p. 17-27, 2014.

LIU, Chunmei; ZHU, Yanyan; TANG, Mingsheng. Theoretical studies on binding modes of copper-based nucleases with DNA. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 64, p. 11-29, 2016.

JAIVIDHYA, Paramasivam et al. Efficient DNA cleavage mediated by mononuclear mixed ligand copper (II) phenolate complexes: the role of co-ligand planarity on DNA binding and cleavage and anticancer activity. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 114, p. 94-105, 2012.

JOYNER, J.; REICHFIELD, J.; COWAN, J. Factors Influencing the DNA Nuclease Activity of Iron, Cobalt, Nickel, and Copper Chelates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, n. 39, p. 15613–15626, 2011.

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

MARTINS, Patrícia Helenita Rocha. **Avaliação de Interação e Clivagem de Dna por Complexos de Rutênio**. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará

METZLER-NOLTE, Nils; SCHATZSCHNEIDER, Ulrich. **Bioinorganic chemistry: a practical course**. Walter de Gruyter, 2009.

NARANG, Jagriti et al. Silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline film for amperometric glutathione biosensor. **International journal of biological macromolecules**, v. 50, n.3, p. 672-678, 2012.

NARAYANAN, Vijaya S.; FITCH, Cheryl A.; LEVENSON, Cathy W. Tumor suppressor protein p53 mRNA and subcellular localization are altered by changes in cellular copper in human Hep G2 cells. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 5, p. 1427-1432, 2001.

NELSON, David L.; COX, Michael M. Princípios de bioquímica de Lehninger. 6ª. Ed.:**Porto Alegre: Artmed**, 2014.

PERONTSIS, Spyros et al. Characterization and biological properties of copper (II)-ketoprofen complexes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v 162, p. 22-30, 2016.

QI, Jinxu et al. Synthesis of four binuclear copper (II) complexes: Structure, anticancer properties and anticancer mechanism. **European journal of medicinal chemistry**, v. 96, p. 360-368, 2015.

RAGHEB, Mohamed A.; ELDESOUKI, Mohamed A.; MOHAMED, Mervat S. DNA binding, photo-induced DNA cleavage and cytotoxicity studies of lomefloxacin and its transition metal complexes. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 138, p. 585-595, 2015.

RAVICHANDRAN, J. et al. Antioxidant, DNA binding and nuclease activities of heteroleptic copper (II) complexes derived from 2-((2-(piperazin-1-yl) ethylimino) methyl)-4-substituted phenols and diimines. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 785-793, 2014.

REED, Celia J.; DOUGLAS, Kenneth T. Chemical cleavage of plasmid DNA by glutathione in the presence of Cu (II) ions. The Cu (II)-thiol system for DNA strand scission. **Biochemical Journal**, v. 275, n. 3, p. 601-608, 1991.

REDDY, Pulimamidi Rabindra et al. Synthesis, structure, DNA binding and cleavage properties of ternary amino acid Schiff base-phen/bipy Cu (II) complexes. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 105, n. 12, p. 1603-1612, 2011.

SÁ, Denise S. et al. Non-nitric oxide based metallovasodilators: synthesis, reactivity and biological studies. **Dalton Transactions**, v. 44, n. 30, p. 13633-13640, 2015.

SAIBERT, Cristine. **Interação e clivagem de DNA por complexos binucleares de cobre (II) com ligantes contendo o grupo triazina e cadeias laterais funcionalizadas**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina.

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

SZACILOWSKI, Konrad et al. Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. **Chemical reviews**, v. 105, n. 6, p. 2647-2694, 2005.

SMITH, J. A. et al. Noncovalent DNA binding of metal complexes, p. 709-750, 2013.

TABASSUM, Sartaj et al. Carbohydrate-conjugate heterobimetallic complexes: synthesis, DNA binding studies, artificial nuclease activity and in vitro cytotoxicity. **Carbohydrate research**, v. 346, n. 18, p. 2886-2895, 2011.

THEOPHANIDES, T.; ANASTASSOPOULOU, J. Copper and carcinogenesis. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 42, n. 1, p. 57-64, 2002.

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

ZHANG, Hui; AGARDH, Elisabet; AGARDH, Carl-David. Nitro blue tetrazolium staining: a morphological demonstration of superoxide in the rat retina. **Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology**, v. 231, n. 3, p. 178-183, 1993.