



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL

CAMPUS CERRO LARGO

CURSO DE QUÍMICA LICENCIATURA

MONIQUE ALESSANDRA WOJCIECHOWSKI

**ESTUDO DA CLIVAGEM DE DNA POR COMPLEXOS METÁLICOS QUE ATUAM
COMO NUCLEASES SINTÉTICAS**

CERRO LARGO

2018

MONIQUE ALESSANDRA WOJCIECHOWSKI

**ESTUDO DA CLIVAGEM DE DNA POR COMPLEXOS METÁLICOS QUE ATUAM
COMO NUCLEASES SINTÉTICAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado
como requisito para obtenção do grau de Licenciado em
Química na Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Boneberger Behm

CERRO LARGO

2018

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

Wojciechowski, Monique Alessandra
ESTUDO DA CLIVAGEM DE DNA POR COMPLEXOS METÁLICOS QUE
ATUAM COMO NUCLEASES SINTÉTICAS/ Monique Alessandra
Wojciechowski. -- 2018.
72 f.

Orientador: Mariana Boneberger Behm.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Química
Licenciatura , Cerro Largo, RS, 2018.

1. Clivagem DNA. 2. Complexos metálicos. 3. Nucleases
sintéticas. I. Behm, Mariana Boneberger, orient. II.
Universidade Federal da Fronteira Sul. III. Título.

MONIQUE ALESSANDRA WOJCIECHOWSKI

ESTUDO DA CLIVAGEM DE DNA POR COMPLEXOS METÁLICOS QUE ATUAM
COMO NUCLEASES SINTÉTICAS

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado
como requisito para obtenção do grau de Licenciado em
Química na Universidade Federal da Fronteira Sul.

Este trabalho de conclusão foi defendido e aprovado pela banca em:

09/07/18

BANCA EXAMINADORA:



Profa. Dra. Mariana Boneberger Behm - UFFS
Orientadora



Profa. Dra. Rosalia Andrighetto - UFFS



Profa. Ms. Ana Paula Harter Vaniel - UPF

Dedico este trabalho aos meus pais, Sandra e Silvestre, e ao meu irmão Rafael. Todo o meu esforço é por vocês e para vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me dar a vida, mais de uma vez.

A toda a minha família, por todo o apoio, incentivo e amor em todos estes anos de estudo e dedicação.

A minha orientadora, Mariana Boneberger Behm, por sua orientação, ajuda e alegria, sem você não seria possível a realização deste trabalho, você é uma inspiração, a você minha eterna gratidão.

A todos meus colegas e amigos que sempre estiveram ao meu lado nos momentos bons e ruins.

A todos os professores que contribuíram com a minha formação.

A Universidade Federal da Fronteira Sul pela formação de excelente qualidade.

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo a ampliação de conhecimentos na área da química bioinorgânica, mais especificamente, os complexos metálicos que atuam como nucleases sintéticas clivando as ligações do DNA e que possam auxiliar no tratamento do câncer. Para isto, realizou-se uma revisão bibliográfica em livros, artigos, teses e dissertações que relatam como complexos realizam a clivagem do DNA, e quais as análises realizadas para compreender esse comportamento. Procurou-se o que há de mais atual no estudo desses complexos (nucleases sintéticas). Após a busca na literatura, escolheu-se dois artigos contendo complexos dinucleares para análise, um deles relata o estudo do complexo $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{LP2})(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})]$, denominado de complexo FeZn, que mimetiza a enzima fosfatase ácida purpura (PAP), e realiza a clivagem do DNA pelo método hidrolítico. O segundo artigo relata o estudo do complexo dinuclear de cobre(II), $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2(\text{dpam})]$, denominado de Cu₂, que mimetiza a enzima tirosinase pelo método oxidativo para a atividade de clivagem.

Palavras-chave: Clivagem. Complexos metálicos. DNA. Nucleases.

ABSTRACT

This work aimed to broaden knowledge in the area of bioinorganic chemistry, more specifically, metallic complexes that act as synthetic nucleases cleaving the bonds of DNA and that can assist in the treatment of cancer. For this, a bibliographical revision was carried out in books, articles, theses and dissertations that report how complexes perform the cleavage of the DNA, and which analyses performed to understand this behavior. The most current in the study of these complexes (synthetic nucleases) was sought. After the search in the literature, two articles were chosen containing complex dinuclears for analysis, one of them reports the study of the complex $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{LP}2)(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})]$, called the FeZn complex, which mimics the enzyme phosphatase acid purple (PAP), and performs the Cleavage of the DNA by the Hydrolytic method. The second article reports the study of the copper(II) dinuclear complex, $[\text{Cu}_2(\text{Apyhist})_2(\text{dpam})]$, called Cu₂, which mimics the enzyme tyrosinase by the oxidative method for its cleavage activity.

Keywords: Cleavage. DNA. Metallic complexes. Nucleases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Dupla fita do DNA.....	23
Figura 2 – Composição de um nucleotídeo.....	23
Figura 3 – Os 5 tipos de bases nitrogenadas do DNA.....	24
Figura 4 – Ligação fosfodiéster.....	25
Figura 5 – Pareamento das bases nitrogenadas do DNA.....	25
Figura 6 – DNA plasmidial supertorcido e relaxado.....	26
Figura 7 – As três formas de DNA plasmidial e suas eletroforeses.....	27
Figura 8 – Sítio ativo das PAPs.....	31
Figura 9 – Sítio ativo da tirosinase.....	32
Figura 10 – Sequências de reconhecimento de algumas endonucleases de restrição tipo II....	34
Figura 11 – Tipos de interações entre do DNA e complexos metálicos.....	35
Figura 12 – Coordenação favorecida nos átomos das bases nitrogenadas, como o N ₇ da adenina e guanina e O ₂ da timina.....	36
Figura 13 – Mecanismo de clivagem hidrolítica do DNA liberando os terminais R-OH e R-O-PO ₃	37
Figura 14 – Mecanismo da clivagem hidrolítica da ligação fosfodiéster do DNA	38
Figura 15 – Clivagem oxidativa do DNA formando produtos radicalares.....	39

Figura 16 – Mecanismo de clivagem oxidativa do DNA.....	39
Figura 17 – Representação da entrada da cisplatina na célula e sua ligação com o DNA.....	41
Figura 18 – Estrutura da agarose.....	44
Figura 19 – Aplicação da amostra de DNA em gel de agarose.....	45
Figura 20 – Imagem de eletroforese em gel após a exposição do gel à luz Ultravioleta (UV-VIS).....	45
Figura 21 – Estrutura proposta do complexo FeZn.....	51
Figura 22 – Dependência do pH na hidrólise do substrato BDNPP.....	52
Figura 23 - Demonstração das interação do complexo A com o substrato BDNPP.....	53
Figura 24 – Efeito da concentração do substrato em pH 6,5.....	54
Figura 25 – Mecanismo de clivagem hidrolítica da ligação fosfodiéster do BDNPP pelo complexo FeZn.....	55
Figura 26 – Dependência do pH na clivagem do DNA plasmidial na concentração de 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do complexo A por 16 horas em 37°C.....	56
Figura 27 – Dependência da concentração do complexo na clivagem do DNA plasmidial em pH 7,0 por 16 horas em 37°C.....	57
Figura 28 – Efeito de espécies reativas de oxigênio (ROS) na clivagem do substrato BDNPP em 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do complexo por 16 horas em 37°C.....	57
Figura 29 – Parâmetros cinéticos da reação de clivagem do DNA plasmidial em 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ do complexo FeZn monitorados por 8 horas a 37°C em pH 7,0.....	58

Figura 30 – Proposta de ligação do complexo FeZn com as bases do DNA.....	58
Figura 31 – Dnase I footprinting para o complexo FeZn.....	59
Figura 32 – Estrutura proposta do complexo Cu ₂	60
Figura 33 – Curvas de comparação da atividade catalítica dos complexos de cobre (II) frente a oxidação da <i>L</i> -Dopa.....	61
Figura 34 – Dependência da concentração da oxidação da <i>L</i> -Dopa com a concentração dos complexos de cobre.....	62
Figura 35 – Gel de agarose do plasmídeo da DNA pBluescript II KS (+/-).....	63
Figura 36 – Razão da [forma II] / [forma I] do DNA dos complexos Cu1 e Cu2 em DNA plasmidial (36 ng/ μ L); DNA + H ₂ O (125 μ mol.L ⁻¹).....	63
Figura 37 – Viabilidades celulares da TM1MN3 (A) e da B116F10 (B) em diferentes concentrações para os complexos Cu1 e Cu2.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição média de um humano adulto normal de 70 kg de peso.....	22
Tabela 2 – Classificação das metalonucleases.....	30
Tabela 3 – Íons metálicos e ligantes presentes nos complexo analisados e suas fórmulas	48
Tabela 4 – Valores calculados pela análise elementar do complexo FeZn, FeZnC ₇₅ H ₇₉ N ₇ Cl ₅ O ₁₆	49
Tabela 5 – Valores de frequências de IV (cm ⁻¹) para o complexo FeZn, utilizando pastilhas de KBr.....	50
Tabela 6 – Parâmetros cinéticos da clivagem obtidos pela equação de Michaelis-Menten.....	53
Tabela 7 – Valores calculados pela análise elementar do complexo Cu ₂ , C ₃₈ H ₄₄ H ₁₀ Cu ₂ C ₁₄ O ₁₆	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – adenina

ACS – American Chemical Society

ASN – Aspargina

ASP - Aspartato

ATP – adenosina trifosfato

BDNPP – substrato bis(2,4-dinitrofenil) fosfato

°C – graus Celsius

CCR - componente curricular

C – citosina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

E. coli – *Escherichia coli*

F I – forma supertorcida de um plasmídeo

F II – forma circular aberta de um plasmídeo

F III – forma linear de um plasmídeo

G – energia livre de Gibbs

G – guanina

H – entalpia

HIS - Histidina

INCA – Instituto do câncer José de Alencar

IV – infravermelho

Kb – quilo pares de bases = 1.000 bp

Kcat – constante catalítica

KM – constante de afinidade

Kcat / KM –eficiência catalítica.

Kobs – taxa de clivagem

LMCT – transferência de carga de ligante para metal

OM – orbital molecular

pb – par de bases

pH – potencial hidrogeniônico

PAPs – Fosfatases Ácidas Púrpuras

Redox – redução e oxidação

RNA – Ácido Ribonucleico

ROS – espécies reativas de oxigênio

[S] – concentração de substrato

S – entropia

T – timina

TYR - Tirosina

U – uracila

UV-VIS – ultravioleta – visível

V_0 – velocidade inicial

V_{\max} – velocidade máxima

LISTA DE SÍMBOLOS

ϵ - absorbância molar

c - concentração

Δ - delta

π^* - antiligante

σ - ligante

n - não ligante

ν - estiramento

δ - deslocamento

λ - comprimento de onda

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
3	JUSTIFICATIVA	20
4	REFERENCIAL TEÓRICO	21
4.1	QUÍMICA BIOINORGÂNICA.....	21
4.2	DNA.....	22
4.3	PLASMÍDEOS.....	26
4.4	CÂNCER.....	27
4.5	ENZIMAS.....	28
4.5.1	Metaloenzimas	29
4.5.1.1	Fosfatase ácida púrpura (PAP).....	30
4.5.1.2	Tirosinase.....	31
4.5.2	Equação de Michaelis-Menten	32
4.6	COMPLEXOS METÁLICOS.....	32
4.7	NUCLEASES.....	33
4.7.1	Nucleases naturais	33
4.7.2	Nucleases sintéticas	34
4.8	ASPECTOS IMPORTANTES PARA O ESTUDO DA CLIVAGEM DO DNA.....	35
4.8.1	Tipos de interação entre complexos metálicos e DNA	35
4.8.2	Métodos de clivagem	36
4.9	COMPLEXOS METÁLICOS QUE CLIVAM O DNA.....	39
4.9.1	Cisplatina	39

4.9.2	Complexos contendo dois centros metálicos.....	42
4.10	TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO E INSTRUMENTAÇÃO.....	42
4.10.1	Análise Elementar.....	42
4.10.2	Espectroscopia de absorção ultravioleta-visível (UV-VIS).....	42
4.10.3	Espectroscopia de Infravermelho (IV).....	43
4.10.4	Eletroforese em gel de agarose.....	44
4.10.5	DNA Footprinting.....	46
5	METODOLOGIA.....	47
6	ESTUDOS DOS COMPLEXOS SELECIONADOS NA LITERATURA.....	48
6.1.1	COMPLEXO FeZn.....	49
6.1.2	COMPLEXOS Cu ¹ e Cu ²	59
7	CONSIDERAÇÕES.....	67
	REFERÊNCIAS.....	68
	ANEXOS.....	73

1 INTRODUÇÃO

A química é uma ciência abrangente, capaz de explicar desde a mínima parte constituinte do universo (o átomo) até os mais complexos dos seres, e como ocorre o seu funcionamento. Além de fornecer as explicações para diversas das dúvidas do ser humano, ela ainda é utilizada para buscar soluções para outros problemas que estão presentes na vida de todos, como: “melhoria no tratamento da saúde, conservação dos recursos naturais, proteção do meio ambiente e suprimento de nossas necessidades diárias de alimentos, vestuário e moradia” (BROWN; LeMAY; BURSTEN, 2005, p. 02).

O presente trabalho abrange a química em sua forma bioinorgânica, uma área interdisciplinar entre a química inorgânica e a bioquímica, que estuda as propriedades, funções, metabolismo e aplicações de íons metálicos em sistemas biológicos. A bioinorgânica possui dois objetivos principais: o estudo dos íons metálicos de origem natural em sistemas biológicos e a introdução destes íons metálicos, a partir do uso de metalofármacos, nos sistemas biológicos (BENITE; MACHADO; BARREIRO, 2007).

Vários estudos já foram e continuam sendo realizados nesta área, tendo em vista que a química bioinorgânica se tornou muito promissora na área da química medicinal e engenharia genética já possuindo algumas descobertas revolucionárias, como a cisplatina, composto de coordenação aplicado no tratamento do câncer.

Os íons metálicos nos sistemas biológicos e na natureza nunca se encontram como espécies livres. Eles sempre estão ligados as moléculas do solvente ou as biomoléculas e outras espécies químicas, formando complexos. A química envolvida e descrita por Alfred Werner em 1892. Em termos simples, o íon metálico atua como um centro (M) que atrai os ligantes (L), formando ligações por meio de forças eletrostáticas ou por compartilhamento de elétrons (covalência) (TOMA, 2015, p. 73).

Por ser um componente de nosso sistema biológico, o ácido desoxirribonucleico (DNA) é um dos principais alvos de pesquisas bioinorgânicas. “A descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick em 1953 foi um evento significativo na ciência” (NELSON; COX, 2011, p. 277) pois a partir disto foi desvendada a real importância que o DNA possui para todos os sistemas biológicos, sendo o responsável por carregar todas as características hereditárias dos seres e que basicamente controla todas as atividades celulares (BORTOLOTTI, 2015).

Como o repositório da informação genética, o DNA ocupa uma posição única e central entre as macromoléculas biológicas. As sequências de nucleotídeos do DNA codificam a estrutura primária de todos os RNAs e proteínas celulares e, por meio das enzimas, afeta indiretamente a síntese de todos os outros constituintes celulares. Essa

passagem de informação do DNA para o RNA e para a proteína guia o tamanho, a forma e o funcionamento de todos os seres vivos (NELSON; COX, 2011, p. 975).

O funcionamento do nosso corpo exige a ocorrência de uma série de reações, geralmente mediadas por enzimas. Enzimas são proteínas catalisadoras, que atuam aumentando a velocidade das reações (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

De acordo com Champe, Harvey e Ferrier (2006) “A descoberta de um grupo especial de enzimas bacterianas, chamadas endonucleases de restrição (enzimas de restrição), que clivam a dupla fita de DNA em fragmentos menores e mais fáceis de se trabalhar, abriu o caminho para a análise do DNA (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006, p. 445).

As enzimas possuem sítios ativos (regiões específicas de ligação), que muitas vezes são formados por complexos metálicos. Íons metálicos também possuem papel fundamental em sistemas biológicos, podendo atuar de várias formas, como: favorecendo a interação com ânions, por apresentar caráter catiônico, atraindo elétrons de outras espécies, atuando na transferência de elétrons. Devido aos seus estados de redução e oxidação (redox) acessíveis e versáteis também proporcionam uma geometria ou conformação pertinente a atividade da proteína (TOMA, 2015).

Segundo Toma (2015),

O íon metálico pode modificar a reatividade da espécie coordenada, por meio dos efeitos eletrônicos que afetam o comportamento ácido-base, o potencial redox e a estabilidade química do sistema. Esses efeitos são mais relevantes nos processos de catálise enzimática e têm como aliado especial o comportamento cinético dos íons metálicos, que difere acentuadamente do comportamento observado com os compostos orgânicos. Assim, os íons metálicos podem exercer funções catalíticas, de natureza hidrolítica, organometálica ou por meio da transferência de elétrons (redox) (TOMA, 2015, p. 93-94).

O enfoque neste trabalho foi dado às nucleases sintéticas que atuam como metaloenzimas (enzimas que possuem um íon metálico em seu sítio ativo), que são capazes de interagir com o DNA ligando-se e promovendo a clivagem (quebrando) da dupla-fita de DNA. Fazendo assim com que a célula não possa mais se replicar. Esse aspecto possui enorme importância para a química medicinal, pois é o DNA que carrega toda a informação genética, com a quebra das suas ligações pode fazer com que células “doentes” parem sua replicação no organismo, por exemplo.

Por meio das interações que são promovidas pelos complexos com o DNA, muitos resultados podem ser obtidos nas células humanas. Vários estudos com complexos metálicos estão sendo realizados visando estas interações para a quebra das ligações entre o DNA, umas

das consequências dessa quebra é o impedimento da replicação celular, o que causa a morte das células de onde o DNA foi afetado. Esse resultado pode ser muito útil no tratamento de várias doenças, incluindo o câncer.

Câncer é o nome dado a várias doenças, caracterizadas por uma reprodução descontrolada de células, que culminam em um mau funcionamento do corpo. O tratamento mais utilizado para esta doença é o uso de drogas que destroem células que se reproduzem de maneira incorreta (SHRIVER et al. 2008, p.784).

O câncer é resultado do crescimento desordenado de células anormais, que podem se espalhar pelo organismo. O tratamento, por meio da quimioterapia, é uma das alternativas, ao lado da remoção cirúrgica e da radioterapia. Como todos os tratamentos, a quimioterapia é voltada para a destruição seletiva ou interrupção da multiplicação das células malignas (TOMA, 2015, p. 227).

“O complexo *cisdiaminodicloroplatina(II)*, também conhecido como cisplatina, é uma das drogas mais utilizadas no tratamento de diversos tipos de câncer, sendo uma referência para a comparação da eficiência com novos medicamentos anticâncer” (TOMA, 2015, p. 228).

A cisplatina ainda é utilizada em larga escala na medicina atual, mas como a mesma apresenta efeitos colaterais, novas drogas com os mesmos princípios ativos, porém que apresentem diminuição de toxicidades vem sendo estudadas. “Atualmente, estão no mercado, além da cisplatina, a carboplatina, que entrou em uso clínico em 1989, e a oxaliplatina, recentemente aprovada para uso clínico” (TOMA, 2015, p. 229)

O maior desafio enfrentado para os pesquisadores da quimioterapia do câncer é desenvolver complexos que afetem somente as células malignas, deixando as células saudáveis sem danos (SHRIVER et al., 2008).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo fazer uma revisão bibliográfica relacionada aos complexos metálicos que possuem como característica clivar o DNA.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar um levantamento do que há de atual sobre complexos metálicos que clivam o DNA;
- Analisar complexos metálicos que atuam como metaloenzimas, no que diz respeito as nucleases metálicas;
- Fazer uma revisão teórica dos assuntos relacionados ao DNA e aos complexos metálicos;
- Estudar os principais termos, técnicas e procedimentos para entender melhor como se caracterizam os complexos metálicos (nucleases);
- Compreender de que modo as nucleases metálicas clivam as ligações do DNA.

3 JUSTIFICATIVA

O interesse por esse assunto se deu no decorrer do componente curricular (CCR) de Química Bioinorgânica, que é ofertada aos discentes do curso de Química Licenciatura da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Cerro Largo.

No decorrer da disciplina percebeu-se a enorme importância dos íons metálicos aos seres humanos e suas diversas utilidades dentro da Química Inorgânica Medicinal. Porém a Química Bioinorgânica em nosso curso é ofertada apenas como um CCR optativo, possuindo carga horária de 2 créditos semanais. Tendo em vista que este tempo não foi suficiente para a elucidação de todas as dúvidas e o interesse na área foi grande, buscou-se trabalhar mais a fundo com o assunto que gerou grande curiosidade, a clivagem de DNA por complexos metálicos.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 QUÍMICA BIOINORGÂNICA

A química inorgânica biológica, também conhecida como química bioinorgânica, encarrega-se dos elementos inorgânicos e dos complexos metálicos quando o objetivo é que eles sejam utilizados na biologia. Os principais estudos são referentes as características e capacidades que estes íon de metais adquirem quando utilizados em organismos vivos (SHRIVER et al., 2008, p. 733).

Reedij (2013), diz que:

Os íons metálicos desempenham um papel essencial nos sistemas vivos, tanto no crescimento quanto no metabolismo. O reconhecimento da importância dos metais nos sistemas biológicos começou no início dos anos 1960, mas já era conhecido desde 1930 que metais estão presentes em enzimas e proteínas, como na hemoglobina, nos citocromos e na primeira enzima cristalizada urease (REEDIJK, 2013, p. 01).

A química bioinorgânica encarrega-se do planejamento, da síntese e da caracterização estrutural e físico-química de análogos sintéticos para sítios ativos de metaloproteínas, membranas e ácidos nucleicos. A bioquímica, por sua vez, determina a reatividade e o mecanismo pelos quais estes compostos sintéticos interagem com as biomoléculas isoladas e a sua influência em células e organismos vivos.

Alguns íons metálicos, conhecidos como elementos traços, são essenciais para o bom funcionamento de nosso organismo. Eles atuam em diversas funções, alguns deles são ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), magnésio (Mg), cobalto (Co), cromo (Cr), vanádio (Vn) e selênio (Se). A tabela 1 apresenta os elementos presentes na composição do corpo humano, tomando como base as proporções em um adulto com massa de 70 quilogramas (kg).

Tabela 1: Composição média de um humano adulto normal de 70 kg de peso

	Elemento	Gramas (g) / 70 kg.peso
Elementos majoritários	O	43.500
	C	12.600
	H	7.000
	N	2.100
	Ca	1.050
	P	700
	S	175
	K	140
	Na	105
	Cl	105
	Mg	35
	Elementos-traços	Fe
Zn		2,3
Cu		0,1
F, Si, B, Br		<0,5
Elementos ultramicro-traços	V, Mn, Ni	?
	Cr, Co, Mo	?
	Se, As, I	?

Fonte: BARAN, 2005.

Uma das utilidades dos íons metálicos no corpo humano é a constituição das metaloproteínas, estas definidas por Shriver et al. (2008) como sendo:

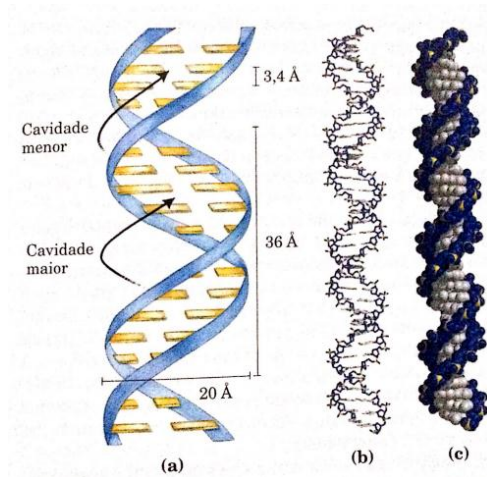
Metaloproteínas que contêm um ou mais íons metálicos, realizam uma grande variedade de funções específicas. Essas funções incluem oxidação e redução (nas quais os elementos mais importantes são Fe, Mn, Cu e Mo, reações de rearranjo radicalares e transferência de grupos metila (CO), hidrólise (Zn, Fe, Mg, Mn e Ni) e processamento do DNA (Zn) (SHRIVER et al., 2008, p. 737).

4.2 DNA

A estrutura correta do DNA proposta por Watson e Crick no ano de 1953, foi um grande marco para ciência, pois até então a ideia de que uma estrutura considerada relativamente simples, um longo polímero composto por apenas quatro tipos de subunidades nucleotídicas similares, carregava toda a nossa informação genética não era bem aceita (ALBERTS et al., 2017, p. 172).

Com mostra a figura 1, a molécula do DNA consiste em duas longas cadeia polinucleotídicas. Cada cadeia ou fita é composta de quatro tipos de subunidades nucleotídicas, e as duas fitas são unidas por ligações de hidrogênio entre as bases dos nucleotídeos (ALBERTS et al., 2017, p. 173)

Figura 1 – Dupla fita do DNA. Demonstrando as dimensões da dupla-hélice (a); mostrando o esqueleto e as bases empilhadas (b) e modelo volume atômico (c).

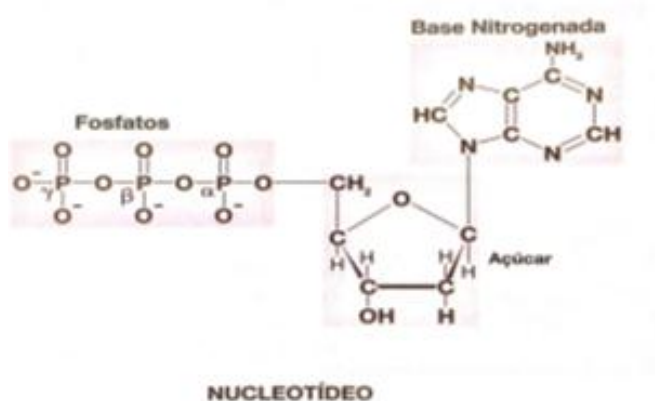


Fonte: NELSON; COX, 2011.

Segundo Atkins e Jones (2012, p. 178) [...] ligação de hidrogênio, uma atração intermolecular na qual um átomo de hidrogênio ligado a um átomo pequeno e fortemente eletronegativo, mais especificamente nitrogênio (N), oxigênio (O) ou flúor (F), é atraído pelo par isolado de elétrons de outro átomo de N, O ou F.[...]

Os nucleotídeos (Fig. 2) são formados por um açúcar (que no caso do DNA é a pentose desoxirribose) que se liga a uma base nitrogenada por seu carbono de número 1', e a um grupamento fosfato pelo carbono de número 5' (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

Figura 2 – Composição de um nucleotídeo

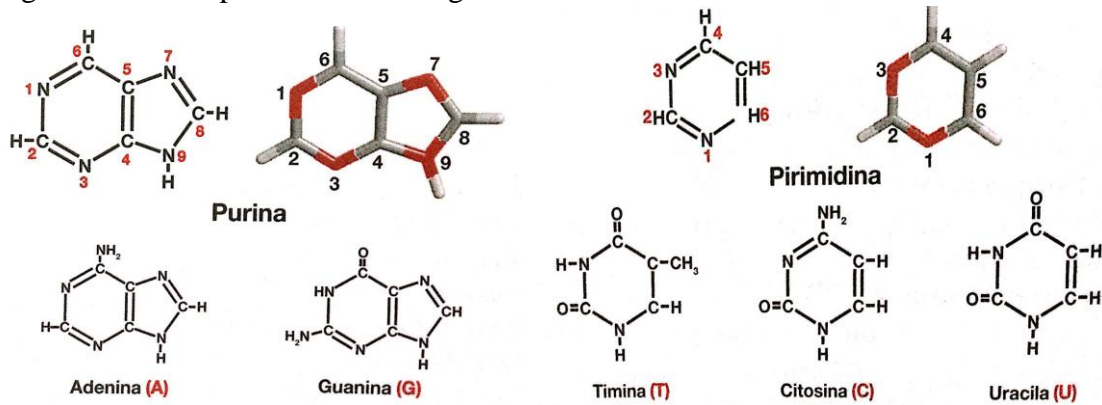


Fonte: ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014.

As bases nitrogenadas (Fig. 3) podem ser púricas (com dois anéis) ou pirimídicas (com um anel). As púricas são a adenina (A) e guanina (G), e as pirimídicas são a citosina (C), a

timina (T) e a uracila (U). A ligação que se estabelece entre a base e o açúcar é denominada ligação glicosídica (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

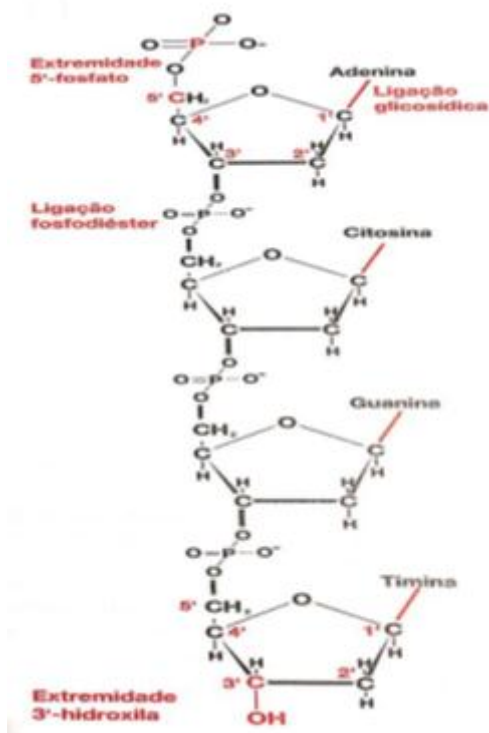
Figura 3 – Os 5 tipos de bases nitrogenadas



Fonte: ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014.

Para se ligarem uns aos outros e formarem a molécula de DNA, os nucleotídeos estabelecem as ligações fosfodiéster. Estas são compostas por um grupo fosfato (5'-PO₄) e um grupo hidroxílico (3'-OH) do carbono 3' do próximo nucleotídeo (Fig. 4). Isso faz com que as cadeias polinucleotídicas possuam direcionalidade, ou seja, a cadeia irá iniciar com um nucleotídeo de extremidade 5' com grupamento fosfato, e o terminará com um extremidade 3' com grupamento hidroxílico (ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014).

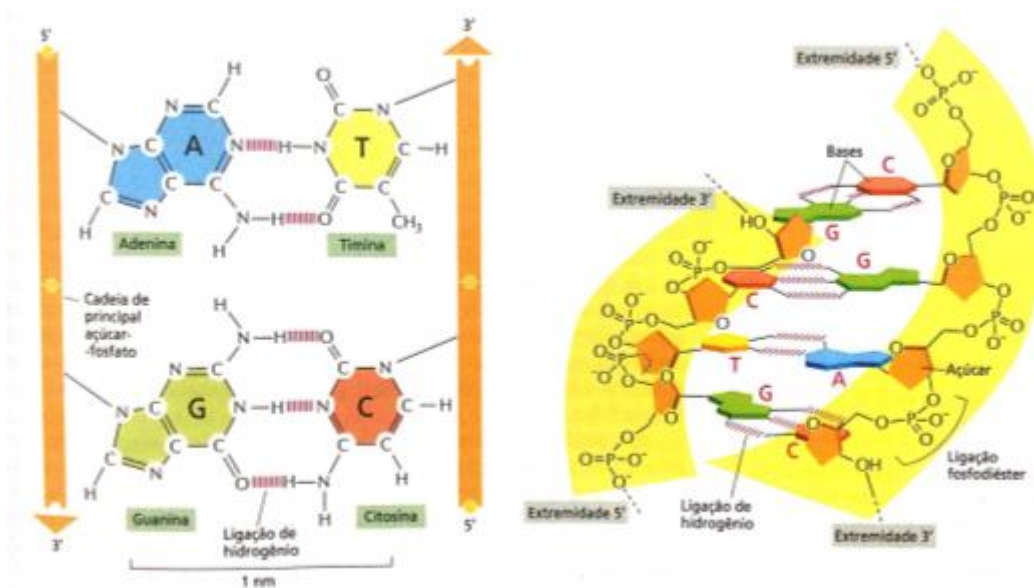
Figura 4 – Ligação fosfodiéster



Fonte: ZAHA; FERREIRA; PASSAGLIA, 2014.

Assim como é demonstrado na figura 5, o pareamento das bases acontece da seguinte forma: A sempre pareia com T, e C sempre pareia com G. A base púrica (formada por dois anéis) pareia com a base pirimídica (formada por um único anel) (ALBERTS et al., 2017).

Figura 5 – Pareamento das bases nitrogenadas do DNA



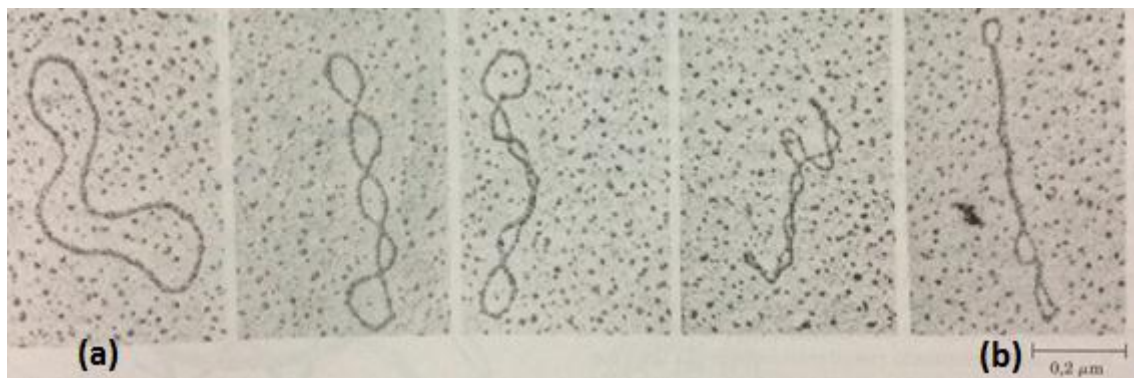
Fonte: ALBERTS et al., 2017.

4.3 PLASMÍDEOS

Bactérias, fungos e leveduras além de possuir o DNA cromossomal em seu nucleóide, possuem em seu citoplasma pequenas moléculas de DNA circular, denominadas de plasmídeos. Em geral, os mesmos possuem apenas milhares de pares de bases, mas carregam informação genética e sofrem replicação produzindo mais plasmídeos (NELSON; COX, 2011).

O DNA plasmidial apresenta uma propriedade chamada de supertorção, onde “o DNA é espiralado na forma de uma hélice dupla em que cada uma das cadeias de DNA se enrola ao redor de um eixo” (NELSON; COX, 2011, p. 954). Isso acontece quando ocorre uma tensão estrutural, quando não está supertorcido, diz-se que o DNA apresenta-se relaxado (NELSON; COX, 2011). A figura 6 apresenta as estruturas do DNA plasmidial supertorcida e relaxada.

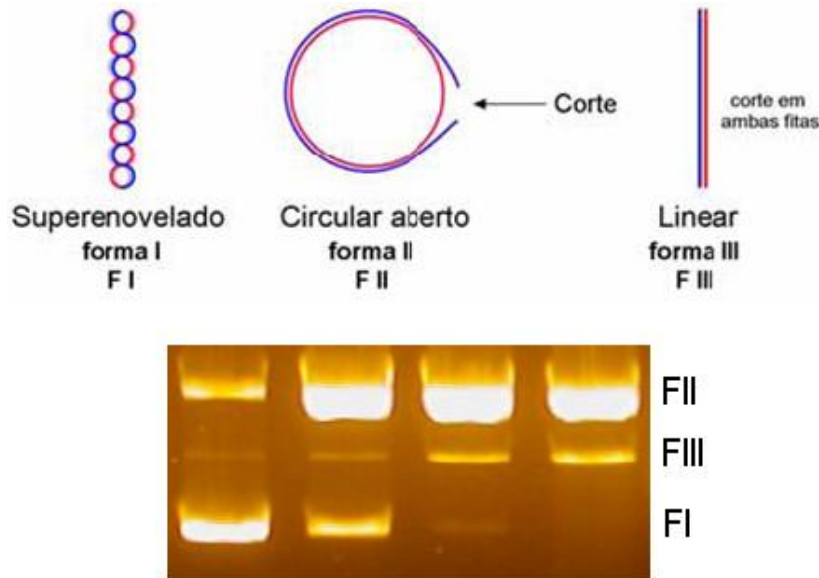
Figura 6 – DNA plasmidial supertorcido (b) e relaxado (a)



Fonte: Adaptado de NELSON; COX, 2011.

Os plasmídeos são excelentes moléculas para o estudo da clivagem do DNA, pois quando submetidos ao corte em uma de suas fitas, perdem seu tensionamento da forma supertorcida (F III) e passam para a forma circular aberta (F II), quando ocorre o corte da segunda fita, o DNA plasmidial passa para a forma linear (F I). Quando submetidas a eletroforese com gel de agarose, é possível a separação total destas três formas de DNA plasmidial, podendo assim ser identificada a clivagem (FISHER, 2010). As três formas do plasmídeo e como elas se apresentam na eletroforese estão presentes na figura 7.

Figura 7 – As três formas de DNA plasmidial e suas eletroforeses



Fonte: FISHER, 2010.

4.4 CÂNCER

Segundo o Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva, o INCA, “Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado (maligno) de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo” (INCA, 2018).

Ultimamente, o nome neoplasia também vêm sendo usado para designar o câncer, mais especificamente os tumores malignos, que são caracterizados pelo crescimento descontrolado de células mutantes (ALMEIDA, 2004).

Como a divisão destas células se dá muito rapidamente, estas células são muito agressivas e incontroláveis, e acabam se acumulando e formando tumores. Existem diferentes tipos de câncer devido as diferentes células em nosso corpo. Se o câncer inicia-se em tecidos epiteliais denomina-se carcinoma, em tecidos conjuntivos, sarcoma (INCA).

O câncer não possui uma única causa, vários fatores podem estar associados a esta doença, como: tabagismo, hábitos alimentares, alcoolismo, hábitos sexuais, medicamentos, fatores ocupacionais, radiação solar, hereditariedade. Apesar de muitas vezes a hereditariedade ser tomada como fator determinante para o desenvolvimento da doença, são raros os casos em que a doença é dada exclusivamente por ela. Na maioria das vezes são os fatores de natureza ambiental os reais causadores da doença (INCA).

Toda a nossa informação genética está contida em nosso DNA. Em nossas células o DNA está compactado nos genes, são através deles que são repassadas as informações para o

funcionamento de nossas células. Quando acontece uma mutação genética, ou alterações no DNA, essas células mutantes passam a receber instruções erradas para suas atividades. Essas alterações podem ativar genes que são inativos em células normais, que então passam a ser células cancerosas (INCA).

As células cancerosas multiplicam-se de forma mais rápida que as normais à sua volta, tomando assim o lugar das demais. Podem desprender-se do tumor e migrar, atingindo tecidos próximos ou vasos sanguíneos, por onde podem atingir órgãos distantes, formando assim metástases. Como são menos especializadas que as células normais, conforme vão substituindo as células normais, os órgãos vão perdendo suas funções (INCA).

O DNA é o principal alvo intracelular de drogas anticâncer devido à sua interação com pequenas moléculas que podem causar danos nas células cancerígenas, resultando na morte celular (KASHANIANA et al., 2012).

4.5 ENZIMAS

Enzimas participam de quase todas as reações que ocorrem em nosso corpo. Elas são proteínas com atividade catalisadora, ou seja, aumentam a velocidade das reações, sem que sejam consumidas na reação global (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

Dentre as muitas reações biológicas que são termodinamicamente favoráveis, as enzimas seletivamente canalizam restantes (chamados substratos) para rotas úteis. As enzimas direcionam, assim, todos os eventos metabólicos (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006, p. 53).

As enzimas possuem algumas propriedades importantes Champe; Harvey; Ferrier, 2006):

- Sítios ativos: consistem em uma região específica da enzima que possui cadeias de aminoácidos que foram uma superfície complementar ao substrato. Quando a enzima liga-se ao substrato, forma um complexo enzima-substrato, que é convertido em enzima-produto, que posteriormente transforma-se em enzima e produto;
- Eficiência catalítica: reações catalisadas por enzimas ocorrem cerca de 10^3 a 10^8 vezes mais rapidamente do que se não estivessem presentes na reação;
- Especificidade: enzimas possuem alta especificidade, onde catalisam apenas um tipo de reação;
- Co-fatores: algumas enzimas necessitam de um co-fator não-protéico para realizar sua atividade. Estes podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas;

- Regulação: a atividade da enzima pode ser ativada ou inibida, de acordo com a necessidade da célula;
- Localização dentro da célula: o local onde a enzima está dentro da célula (geralmente dentro de organelas) serve para não haver o contato entre o substrato ou o produto da reação com demais reações competitivas.

As enzimas podem agir de duas maneiras: fornecendo uma rota alternativa para a reação, diferente da reação não-catalisada ou facilitando a catálise da reação através do sítio-ativo (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

Dentre os fatores que influenciam a velocidade da reação enzimática pode-se citar a concentração do substrato, temperatura e pH (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006). Em relação a concentração do substrato, a velocidade da reação onde uma enzima age, aumenta de acordo com a concentração do substrato, até uma velocidade máxima (V_{max}). A velocidade da reação é medida pelo número de moléculas de substrato convertidas em produto por unidade de tempo (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

Outro fator é a temperatura, onde a velocidade da reação aumenta de acordo com o aumento da temperatura, até ser atingida uma V_{max} . Isso se dá devido ao aumento de energia das moléculas, em que mais moléculas possuem energia suficiente para formar produtos (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

A ação enzimática geralmente necessita de espécies ionizadas ou não ionizadas para que assim possam interagir. A concentração de íons H^+ no meio pode vir a afetar a velocidade da reação. Valores muito altos ou muito baixos de pH também podem levar a desnaturação enzimática. O pH ótimo para a atividade da enzima é aquele em que a mesma atinge sua atividade máxima (CHAMPE; HARVEY; FERRIER, 2006).

4.5.1 Metaloenzimas

Segundo Lippard e Berg (1994) apud Silva (2013), nos sistemas biológicos os metais encontram-se na forma de íons coordenados por cadeias proteicas formando as metaloproteínas. Se essa metaloproteína catalisa alguma reação é chamada de metaloenzima.

As metaloenzimas são classificadas conforme as funções biológicas que desempenham. A tabela 2 apresenta esta classificação.

Tabela 2 – Classificação das metaloenzimas

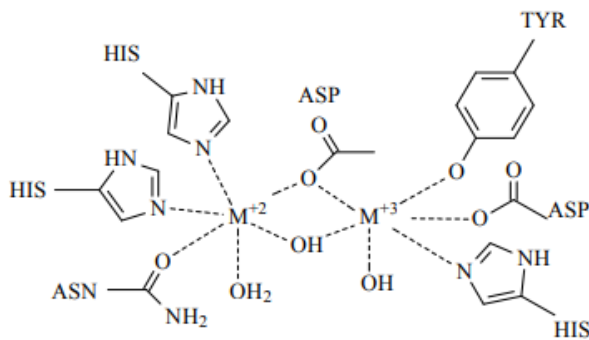
Classe	Nome	Função	Exemplos
1	Oxiredutases	Catalisam reações de oxidação e redução	Tirosinase, catecol oxidase, citocromo oxidase, catalase, ascorbato oxidase, ferredoxinas.
2	Transferases	Catalisam a transferência de um grupo de átomos, como CH ₃ , CH ₃ CO ou NH ₃ de uma molécula a outra	Quinase, aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase
3	Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise com a clivagem da ligação C-O, C-N, O-P, ou C-S.	Fosfatase ácida púrpura, peptidases, uréase
4	Liases	Catalisam a adição de um grupo a uma dupla ligação, ou a remoção de um grupo para criar uma dupla ligação	Aconitase, fumarase, glutamato descarboxilase, anidrase carbônica
5	Isomerases	Catalisam a interconversão entre isômeros	Fosfohexoseisomerase, fosfoglicomutase
6	Ligases ou sintetases	Catalisam a ligação entre duas moléculas	DNA ligase, tirosina tRNAsitase

Fonte: Adaptado de TOMA, 2015; SILVA, 2013.

4.5.1.1 Fosfatase Ácida Púrpura (PAP)

Fosfatases Ácidas Púrpuras (PAPs) são hidrolases ácidas dinucleares com íons de metais em seu sítio ativo que catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato. Estão presentes em mamíferos, plantas, fungos e em algumas bactérias (SEVERINO, 2007; CAMARGO, 2009). A Figura 8 demonstra um sítio ativo de PAPs.

Figura 8 – Sítio ativo de PAPs



Fonte: SEVERINO, 2007.

As PAPs podem gerar a hidrólise de fosfoproteínas, nucleotídeos, arilfosfatos. Quando o seu sítio ativo possui o centro metálico é composto por $\text{Fe}^{\text{III}} \text{M}^{\text{II}}$ (onde M pode ser Fe ou Zn), esta enzima catalisa a hidrólise de éster de ácido fosfórico ativado e anidridos, como por exemplo a adenosina trifosfato (ATP) (SEVERINO, 2007).

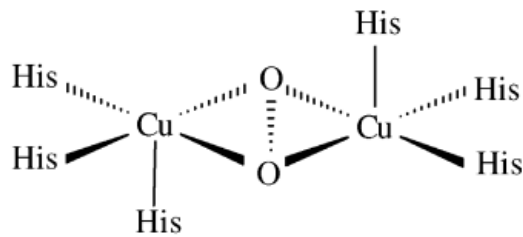
4.5.1.2 Tirosinase

Esta enzima está presente em bactérias, fungos, animais e humanos e cuja principal característica é conter no seu sítio ativo, dois íons cobre(II). São capazes de catalisar a oxidação de fenóis e catecóis e destes com as correspondentes quinonas. Desempenha também um papel fundamental na melanogênese, ou seja, na síntese de melanina, que tem como função a pigmentação da pele, dos olhos e cabelos, e proteção contra a radiação solar (Melanina. Disponível em <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Melanina>>. Acesso em 23 de abr. de 2018).

Estudos relatam que a melanina pode apresentar outro papel importante, agindo como um agente oxidante. A tirosinase demonstrou a capacidade de coordenar-se a íons metálicos, podendo assim ligar-se ao DNA, promovendo a quebra da dupla-fita, tudo isso através de uma reação onde o radical hidroxila é a espécie oxidante (Fenton) (NUNES, 2015; NOGUEIRA, 2007).

A enzima tirosinase (Fig. 9) é dependente da valência do cobre e da sua ligação ao oxigênio. Seu sítio ativo pode apresentar-se em três estados intermediários: $\text{Cu}^{\text{I+}}\text{-Cu}^{\text{I+}}$, $\text{Cu}^{\text{2+}}\text{-O}_2\text{-Cu}^{\text{2+}}$ e $\text{Cu}^{\text{2+}}\text{-Cu}^{\text{2+}}$ (CARDOSO, 2014).

Figura 9 – Sítio ativo da Tirosinase



Fonte: DUARTE, 2009.

4.5.2 Equação de Michaelis-Menten

Segundo Champe, Harvey e Ferrier (2006), a equação de Michaelis-Menten é muito usada para determinar a velocidade das reações enzimáticas, ela relaciona a velocidade de reação com a concentração do substrato, e é dada pela seguinte fórmula:

$$V_0 = V_{\max} \{ [S] / ([S] + KM) \}$$

Onde: V_0 = velocidade inicial da reação; V_{\max} = velocidade máxima; KM = constante de Michaelis; $[S]$ = concentração de substrato (CHAMPE, HARVEY; FERRIER, 2006).

4.6 COMPLEXOS METÁLICOS

Os átomos dos elementos químicos localizados na série de transição da tabela periódica exibem uma característica muito interessante, a de formar compostos de coordenação (complexos) com bases de Lewis (grupo que pode doar um par de elétrons). Estas bases de Lewis, em compostos de coordenação são denominadas ligantes, que podem ser uma molécula neutra, ou íons (LEE, 1999).

Já os íons metálicos tem características de ácido de Lewis (receber par de elétrons). A tendência dos elementos de transição de formar complexos deve-se a capacidade de formar íons pequenos com carga elevada que possuem orbitais vazios com baixa energia que podem receber pares de elétrons doados pelos ligantes (LEE, 1999).

Alguns íons metálicos formam os complexos mais estáveis com ligantes tendo átomos de N, O ou F doadores. Nesse grupo estão os elementos dos grupos 1 e 2, a primeira metade dos metais da primeira série de transição, os lantanídeos e os actinídeos, e os elementos do bloco p, exceto os mais pesados. Esses metais são denominados “receptores de classe a”, e correspondem aos ácidos “duros”. Já os metais ródio (Rh), irídio (Ir), paládio (Pd), platina (Pt), prata (Ag), ouro (Au), e mercúrio (Hg) formam complexos mais estáveis com os elementos mais pesado dos Grupos 15, 16 e 17. Esses metais são denominados “receptores de classe b”, e correspondem aos ácidos “moles”.

Os demais metais de transição, e os elementos mais pesados do bloco p, formam complexos com os dois tipos de doadores e são assim de natureza “intermediária” (LEE, 1999, p. 331).

Os metais Fe e Cu são ditos de natureza “intermediária”, enquanto o zinco é um ácido duro (LEE, 1999).

Os complexos metálicos geram grande interesse na pesquisa quimioterápica devido as diversas vantagens que oferecem, como poder adotar várias geometrias de acordo com o seu número de coordenação, aumentando assim sua diversidade estrutural, podem também coordenar-se a diversos ligantes, possuem número de oxidação variável, baixo massa molecular e propriedades catalíticas (LIANG et al., 2017; LU et al., 2012; MEGGERS, 2009).

4.7 NUCLEASES

Enzimas que clivam, ou cortam o DNA em sua ligação fosfodiéster, na maioria das vezes com alta especificidade são chamadas de nucleases (FISHER, 2010).

As nucleases possuem importância em diversas atividades biológicas, como a síntese de ácidos nucleicos, recombinação, regulação, processamento e degradação (YU; COWAN, 2018).

As nucleases podem ser de origem natural ou sintética. As de origem natural podem promover a clivagem do DNA apenas pelo método hidrolítico, já as sintéticas podem clivar tanto de maneira hidrolítica como oxidativa (KREFT, 2014).

4.7.1 Nucleases naturais

O estudo das nucleases deu-se a partir da descoberta de enzimas bacterianas que cortavam a fita de DNA em certas sequências, produzindo assim fragmentos de DNA específicos, estas enzimas foram denominadas nucleases de restrição. Espécies diferentes de bactérias, produzem diferentes nucleases de restrição, cada uma produzindo fragmentos de DNA específicos (ALBERTS et al., 2017).

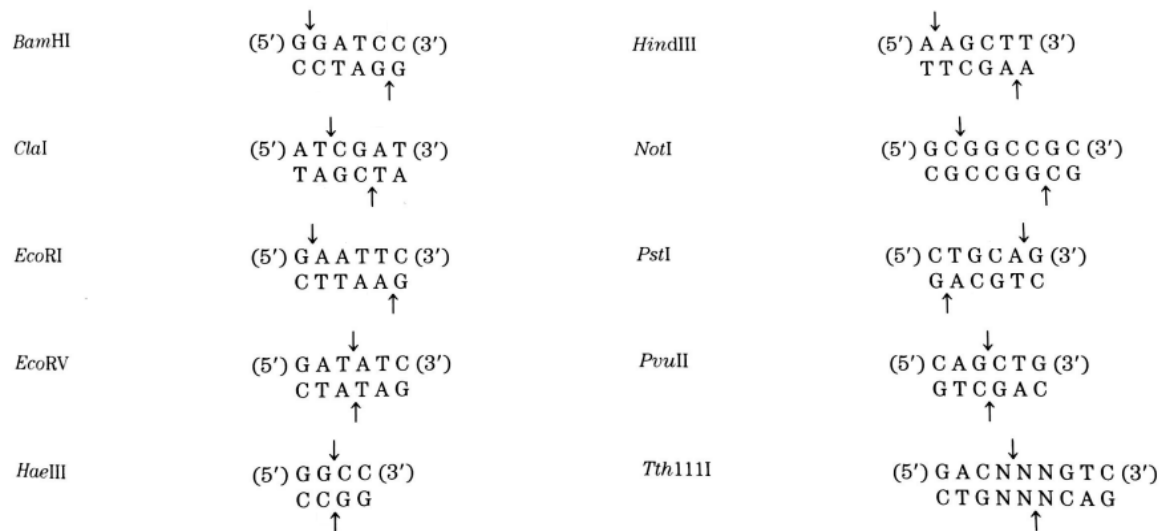
Segundo (NELSON; COX, 2011), existem duas classes de nucleases: as exonucleases e as endonucleases, os autores afirmam que:

As exonucleases degradam os ácidos nucleicos a partir de uma extremidade da molécula. Muitas operam apenas no sentido $5' \rightarrow 3'$ ou no sentido $3' \rightarrow 5'$, removendo nucleotídeos apenas das extremidades $5'$ ou $3'$, respectivamente, de uma fita de um ácido nucleico fita dupla ou de um DNA de fita simples. As endonucleases degradam

atuando em sítios internos e específicos de uma fita ou molécula de ácido nucleico, reduzindo-se a fragmentos cada vez menores (NELSON; COX, 2011, p. 979).

A figura 10 apresenta onde cada uma das endonucleases de restrição cliva o DNA especificamente.

Figura 10 – Sequências de reconhecimento de algumas endonucleases de restrição tipo II



Fonte: NELSON; COX, 2011.

4.7.2 Nucleases sintéticas

Em contraste com as nucleases baseadas em proteínas, que geralmente exibem alguma medida de seletividade de substrato, nucleases artificiais com base em complexos metálicos geralmente desconsideram as sequências de ácidos e a capacidade de diferenciar entre anéis de ribose e desoxirribose. Conseqüentemente, tais catalisadores são capazes de degradar um espectro mais amplo de substratos.

As nucleases sintéticas (metalonucleases) foram definidas pela primeira vez em 1990 por Sigman como sendo: “Complexos de coordenação com atividade redox capazes de clivar ácidos nucléicos em condições fisiológicas, através de um ataque oxidativo no anel de ribose, ou desoxirribose” (SIGMAN, 1990). Contudo, com o avanço das pesquisas e desenvolvimento de novas técnicas, pode-se avançar nos estudos em relação ao uso das nucleases sintéticas. Vários complexos já foram descritos na literatura em relação a clivagem do DNA, onde além do método hidrolítico, já evidenciado, apresentaram uma clivagem oxidativa. Assim, se faz necessário ampliar a definição proposta por Sigman como sendo: Compostos capazes de clivar os ácidos nucléicos em condições próximas às fisiológicas, de maneira hidrolítica ou oxidativa.

O primeiro complexo metálico a apresentar atividade de clivar o DNA foi o $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})_2]^+$. Isso aconteceu durante o estudo do mecanismo de inibição da DNA polimerase I, onde descobriu-se que o complexo $[\text{Cu}(1,10\text{-fenantrolina})_2]^+$ inibia a polimerização dirigida por poli (dA-dT) catalisada por *Escherichia coli* DNA polimerase I e outras polimerases sob condições aeróbicas, a coordenação do complexo provocava a despolimerização de poli (dA-dT) e relaxação de DNA supertorcido para círculo aberto (SIGMAN, 1979).

Nos últimos anos, a multinuclearidade tem sido uma das estratégias de sucesso para aumentar a eficiência e seletividade das metalonucleases devido aos potenciais efeitos cooperativos entre os centros de metal (ARBUSE, 2009).

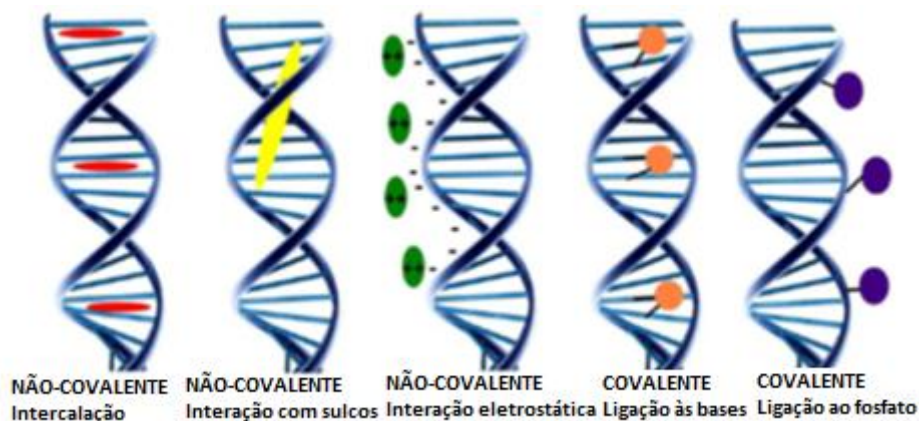
4.8 ASPECTOS IMPORTANTES PARA O ESTUDO DA CLIVAGEM DO DNA

4.8.1 Tipos de interações entre complexos metálicos e o DNA

Barra e Neto (2015) destacam que no estudo das interações entre complexos metálicos pode-se dizer que o centro metálico carregado positivamente, em geral, pode se ligar a biomoléculas negativamente carregadas, fazendo assim com que proteínas e ácidos nucleicos sejam o centro para essas substâncias estranhas.

Devido a estrutura do DNA muitas interações podem ocorrer, dentre elas, há as não-covalentes que acontecem através de interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas no sulco menor do DNA, ou através da intercalação, e ainda de maneira covalente, através da ligação direta do complexo ao DNA por suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato. A figura 11 representa esses modos de interações do DNA com os complexos metálicos (BARRA; NETO, 2015).

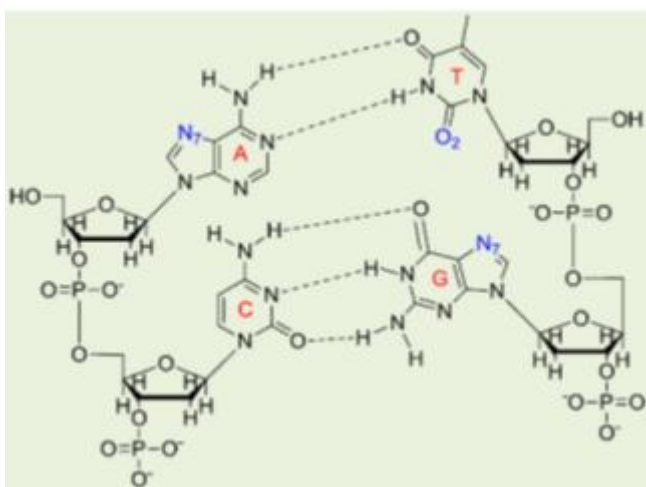
Figura 11 – Tipos de interações entre do DNA e complexos metálicos



Fonte: BARRA; NETO, 2015.

Segundo os autores a formação das interações entre complexos metálicos e DNA é conduzida por vários princípios. Um deles destaca que a coordenação é favorecida nos átomos com maior densidade eletrônica e menor impedimento estérico das bases nitrogenadas, como N_7 de adenina e guanina e O_2 da timina (Fig. 12).

Figura 12 – Coordenação favorecida nos átomos das bases nitrogenadas, como o N_7 da adenina e guanina e O_2 da timina.



Fonte: BARRA; NETTO, 2015.

Complexos que contêm íons metálicos menores e pouco polarizáveis tendem a se ligar ao átomo de oxigênio, enquanto os que contêm íons metálicos maiores e muito polarizáveis se ligam preferencialmente ao nitrogênio, como previsto pela teoria de ácidos e bases duros e moles. A labilidade dos ligantes presentes no complexo afeta não somente sua capacidade de atingir o alvo farmacológico, como também a tendência na formação da ligação covalente com o DNA. As características estruturais e eletrônicas dos ligantes presentes no arcabouço molecular do complexo metálico, por exemplo, ligantes planares rígidos ricos em elétrons π , são determinantes no tipo de interação observada (BARRA, NETTO, 2015, p. 2002).

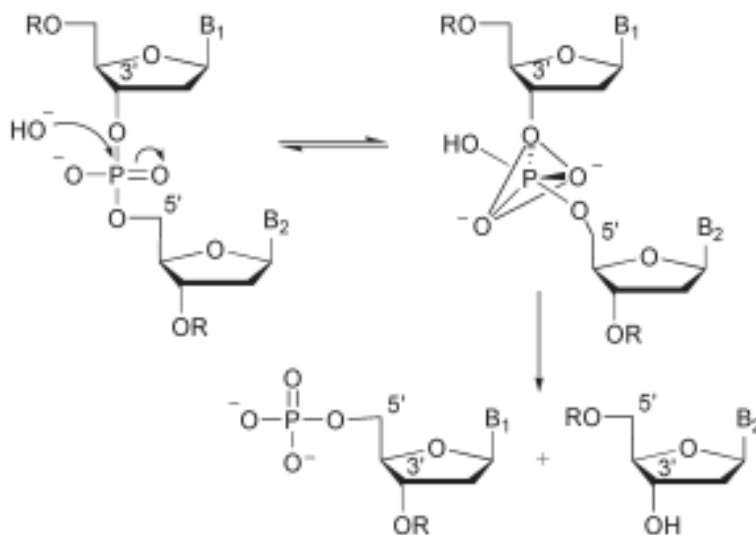
4.8.2 Métodos de clivagem

Os complexos metálicos podem interagir com o DNA tanto de forma covalente, como de forma não covalente (KASHANIANA et al., 2012), conforme descrito anteriormente. Neste

trabalho nos deteremos no estudo apenas da forma covalente através dos mecanismos hidrolítico e oxidativo.

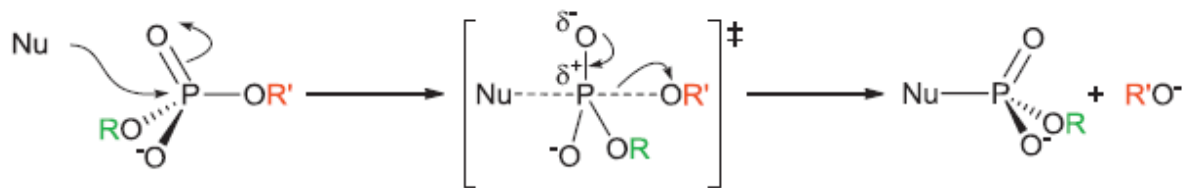
Segundo os trabalhos descritos por Gabriel (2016), Martins (2014), Desbouis et al., (2012), Kreft (2014), Fisher (2010), o mecanismo hidrolítico ocorre quando o complexo metálico promove a quebra da ligação do DNA pelo ataque nucleofílico de uma molécula de água (ou hidróxido) ao fósforo da ligação fosfodiéster, formando um intermediário penta-coordenado, de geometria bipiramidal trigonal. O intermediário é estabilizado pelas ligações de hidrogênio. Após, ocorre a quebra da ligação fosfodiéster geralmente em P-O5' ou P-O3' dependendo da nuclease, e gerando duas novas extremidades: ROH e R-O-PO₃H₂. Geralmente os complexos metálicos que coordenam as moléculas de água em posição *cis*, apresentam o mecanismo hidrolítico, pois esta coordenação facilita o ataque nucleofílico à ligação fosfodiéster do DNA (GABRIEL, 2016; MARTINS, 2014; DESBOUIS et al., 2012; KRFET, 2014; FISHER, 2010). As figuras 13 e 14 apresentam o mecanismo de clivagem hidrolítico do DNA.

Figura 13 – Mecanismo de clivagem hidrolítica do DNA liberando os terminais R-OH e R-O-PO₃



Fonte: Adaptado de MANCIN et al., 2005.

Figura 14 – Mecanismo da clivagem hidrolítica da ligação fosfodiéster do DNA



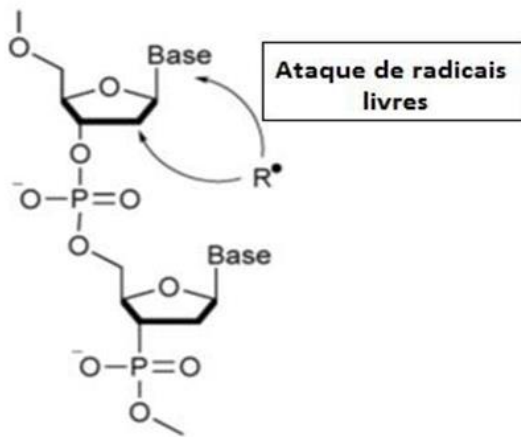
Fonte: DESBOUIS et al., 2012.

Em relação à natureza do centro metálico dos complexos, Hegg e Burstyn (1998) descreveram as principais características de um íon metálico idealmente apropriado a promover hidrólise de ligações fosfodiéster. Estas características são a dureza (para se ligar átomos de oxigênio do grupo fosfato), a acidez de Lewis (para polarizar tanto os grupos fosfato como o nucleófilo) e a rápida troca de ligante (para garantir o ciclo catalítico) (HEGG; BURSTYN, 1998).

Segundo Yu e Cowan (2018), os complexos que promovem a hidrólise do DNA apresentam íons metálicos como ácidos de Lewis fortes que incluem o Cu(II), Cr(III), Zn(II), Fe(III), Co(III) e Ce(IV) (YU e COWAN, 2018).

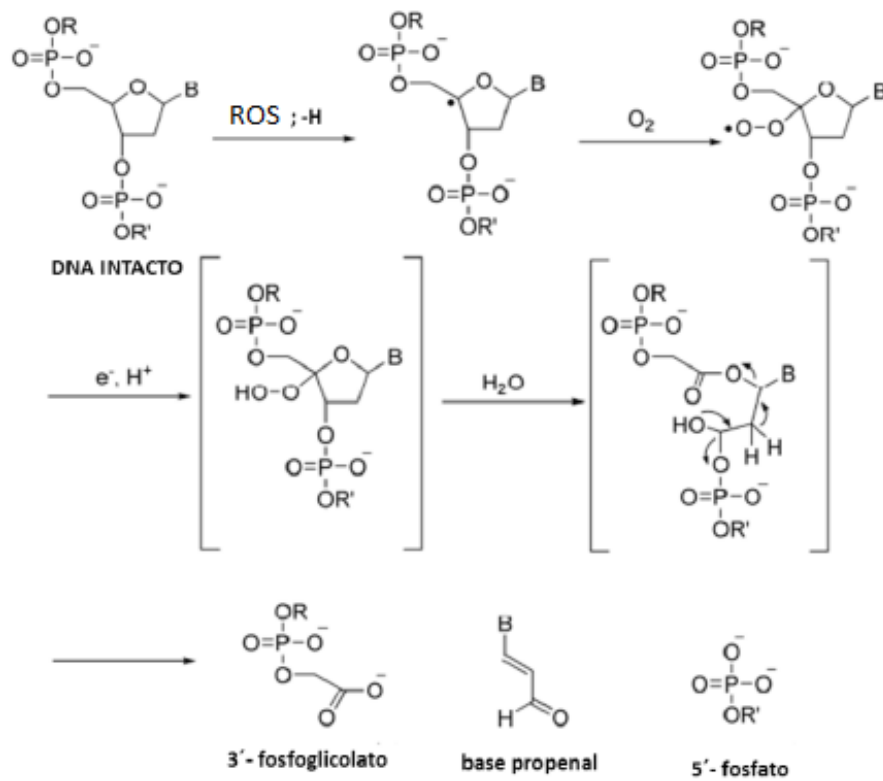
Conforme destacam os autores Yu e Cowan (2018), Kreft (2014), Martins (2014) Desbouis et al. (2012), o mecanismo oxidativo ocorre geralmente devido à presença de íons de metais com atividades redox e oxigênio no meio. Com a reação entre o íon de metal e o oxigênio do meio, formam-se produtos radiculares, espécies reativas de oxigênio (ROS), por exemplo: O_2^- (ânion superóxido), H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), OH^\cdot (radical hidroxila). Estas espécies reativas atacam então as bases nitrogenadas do DNA, geralmente retirando o hidrogênio da desoxirribose, ou também reagem com a ligação fosfodiéster, podendo gerar vários produtos, causando assim a quebra da fita de DNA (YU e COWAN, 2018; KREFT, 2014; MARTINS, 2014; DESBOUIS et al., 2012). As figuras 15 e 16 apresentam o mecanismo de clivagem oxidativa do DNA.

Figura 15 – Clivagem oxidativa do DNA formando produtos radiculares



Fonte: GABRIEL, 2016.

Figura 16 – Mecanismo de clivagem oxidativa do DNA



Fonte: KREFT, 2014.

4.9 COMPLEXOS METÁLICOS QUE CLIVAM O DNA

4.9.1 Cisplatina

A partir das descobertas de atividades antitumorais demonstradas por complexos metálicos, diversos tipos de complexos, com diferentes metais começaram a ser extensivamente estudados (MAITY et al., 2018).

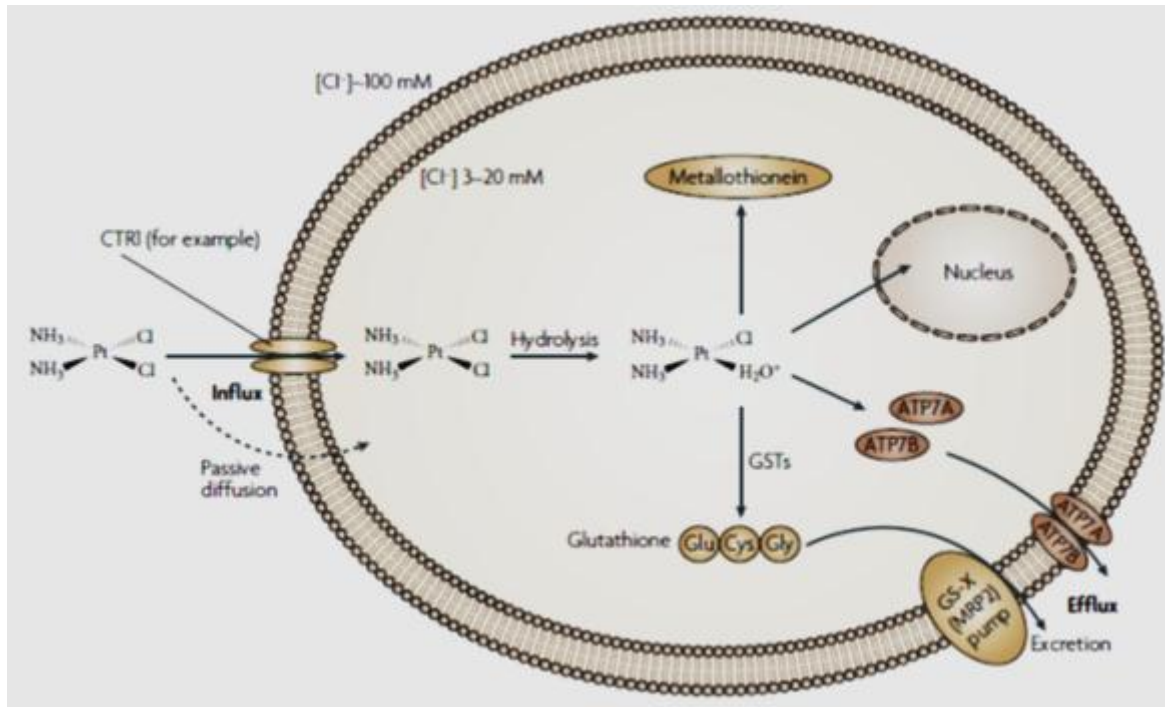
O principal alvo dos quimioterápicos é o DNA, pois a replicação desta biomolécula proporciona diferentes processos no corpo humano e é muito importante na manipulação de genes. Os complexos metálicos atuam como nucleases sintéticas sobre o DNA, clivando-o com alta seletividade (GLISIC, 2017).

O complexo *cisdiaminodicloroplatina(II)* ou cisplatina, é a droga anticâncer mais conhecida e utilizada. Graças ao seu alto poder antitumoral, seu uso foi muito bem-sucedido clinicamente, sendo ela considerada o “padrão-ouro” de metais na medicina quimioterápica (SCHIMITT et al., 2018; LIANG et al., 2017; SRISHAILAM et al., 2014; SHAHABADI et al., 2012).

As propriedades da cisplatina foram descobertas a mais de 50 anos, quando o físico Barnett Rosenberg estudava as propriedades eletromagnéticas de eletrodos de platina (que eram considerados inertes) em uma amostra com a bactéria *Escherichia coli*. Quando o campo eletromagnético foi ligado, apresentou modificações na estrutura da bactéria. A partir daí, vários estudos com a cisplatina começaram a ser feitos, descobrindo-se sua atividade de interação com o DNA, até que em 1971 ela começou a ser usada em testes clínicos, e em 1978 seu uso foi aprovado pela Food and US Drug Administration (FDA) (KELLAND, 2007).

A representação de como a cisplatina age dentro da célula está presente na figura 17. Ela chega até a célula intacta pois o plasma sanguíneo possui alta concentração de cloretos, após sua entrada na célula, sofre substituição destes ligantes cloreto por água. posteriormente, liga-se covalentemente ao DNA, formando adutos. Isto provoca modificações na molécula de DNA, fazendo com que ocorra parada do ciclo celular, provocando a morte celular (apoptose) (KELLAND, 2007).

Figura 17 – Representação da entrada da cisplatina na célula e sua ligação com o DNA



Fonte: KELLAND, 2007.

Na ligação com o DNA, após a hidrólise da ligação fosfodiéster, os principais alvos da cisplatina são um dos átomos de nitrogênio de guanina ou de adenina (FONTES; CESAR; BERALDO, 2005). Esta ligação da cisplatina com as bases provoca uma destabilização do DNA, que interfere no reconhecimento da molécula pelas proteínas reparadoras, e também faz com que não haja mais a replicação e transcrição da célula, causando a morte celular ou apoptose (ESTEVES, 2012; DIAS, 1989).

O produto cisplatina-DNA é reconhecido por uma proteína específica que se liga fortemente a ele, inserindo um grupo fenil na cavidade do DNA, comprometendo o suporte das bases nucleicas (TOMA, 2015).

Apesar de apresentar características muito importantes à medicina e ser amplamente usada, a cisplatina apresenta alguns inconvenientes em sua utilização, como a sua baixa solubilidade em água, o que faz com que ela seja administrada via endovenosa, o surgimento de tumores resistentes a sua toxicidade e apresenta vários efeitos colaterais aos pacientes, como nefrotoxicidade, neurotoxicidade, vômitos e náuseas (ESTEVES, 2012; FONTES; CESAR; BERALDO, 2005).

Por possuir estas características negativas ao seu uso, como efeitos colaterais e resistência, vários pesquisadores dedicam-se a encontrar novos compostos que apresentem clivagem química controlada, gerando danos somente às células malignas, causando assim

menos efeitos negativos aos pacientes (JIANG et al., 2010; SHRIVER et al., 2008; MAHESWARI et al., 2007).

4.9.2 Complexos contendo dois centros metálicos

Nos últimos anos, a multinuclearidade tem sido uma das estratégias de sucesso para aumentar a eficiência e seletividade das metalonucleases devido aos potenciais efeitos cooperativos entre os centros de metal (LI et al., 2006; HUMPREY; KARLIN; ROKITA, 2002).

Essa considerável ação cooperativa parece existir entre os dois íons metálicos na dupla ativação de ácidos de Lewis e na clivagem das ligações fosfodiéster.

Segundo Karlin et al. (2001) apud Arbuse (2009), já demonstraram que os complexos multinucleares com ligantes piridil tem maior capacidade de clivagens mais eficientes do que seus analogos mononucleares.

Vários centros metálicos podem atuar cooperativamente para acelerar o mecanismo da reação. Por isso, os complexos multinucleares são frequentemente mais ativos do que os seus homólogos mononucleares (MANCIN et al., 2005).

4.10 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO E INSTRUMENTAÇÃO

4.10.1 Análise Elementar

A análise elementar serve para determinar a quantidade de carbono, hidrogênio e nitrogênio em uma amostra. Ela é feita através de um analisador CHN onde a amostra é totalmente queimada e os produtos são medidos. Uma massa conhecida da amostra fica retida em uma cápsula de alumínio ou estanho. A combustão e a análise dos produtos são totalmente automatizadas pelo analisador. No analisador, a amostra é submetida a aproximadamente 900 graus Celsius (°C) em uma atmosfera de O₂ puro, onde ocorre a oxidação do carbono, hidrogênio e nitrogênio a CO₂, H₂O e óxidos de nitrogênio, após, os gases são transportados e separados utilizando cromatografia gasosa e então um detector de condutividade térmica analisa as porcentagens de C,N e H com exatidão de < 0,3 por cento (%) (HOUSECROFT; SHARPE, 2013).

4.10.2 Espectroscopia eletrônica de absorção (UV-VIS)

A espectroscopia eletrônica é obtida através das transições eletrônicas entre os níveis de energia. As transições de elétrons de níveis inferiores de energia para níveis superiores dão origem aos espectros de absorção (HOUSECROFT; SHARPE, 2013).

Os orbitais moleculares (OM) podem ser de caráter ligante (σ ou π), não ligante (n) ou antiligante (σ^* ou π^*). Se uma molécula absorve uma quantidade apropriada de energia, um elétron em um orbital ocupado é excitado para um orbital desocupado ou parcialmente ocupado. A separação HOMO-LUMO (HOMO = OM mais alto ocupado, LUMO = OM mais baixo desocupado) é tal que os espectros de absorção geralmente são observados na região do ultravioleta (UV) ou do visível do espectro eletromagnético. As energias dos OM são quantizadas, e, dessa maneira, uma transição eletrônica está associada a uma quantidade específica de energia, ΔE (HOUSECROFT; SHARPE, 2013, p. 95).

Os espectros de absorção podem apresentar transições eletrônicas dos seguintes tipos: $\sigma^* \leftarrow \sigma$; $\sigma^* \leftarrow n$; $\pi^* \leftarrow \pi$; $\pi^* \leftarrow n$; transferência de carga; 'd-d' (HOUSECROFT; SHARPE, 2013). Geralmente, os espectros de UV-VIS são obtidos na faixa de 200-800 nm, um detector demonstra a radiação que é transmitida através da amostra (transmitância, T), que é convertida a valor de absorbância (A), tudo automatizado pelo espectrofotômetro. Através da Equação de Lamber-Beer ($A = \epsilon \times c \times l$; onde c = concentração em mol.dm^{-3} , l = caminho óptico da célula em cm), pode-se converter a absorbância em absorção molar (ϵ), um coeficiente que é independente da concentração da amostra diluída (HOUSECROFT; SHARPE, 2013).

4.10.3 Espectroscopia de Infravermelho (IV)

A técnica de radiação infravermelha se limita as regiões entre o visível e das micro-ondas, onde são analisadas as transições entre níveis de energia vibracional. Ela é dita espectroscopia vibracional, onde um modo vibracional origina uma variação no momento dipolo, que é captada pelo espectroscópio. A região do IV vai do remoto (20 cm^{-1}) ao próximo (14000 cm^{-1}), mas geralmente é utilizada a faixa média do IV (400 cm^{-1} a 4000 cm^{-1}). Amostras gasosas, líquidas ou sólidas podem ser quantificadas pela técnica, para a análise de sólidos, geralmente é preparado um disco onde a amostra é moída e prensada juntamente com algum haleto de metal alcalino, por exemplo brometo de potássio (KBr) (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2015; HOUSECROFT; SHARPE, 2013).

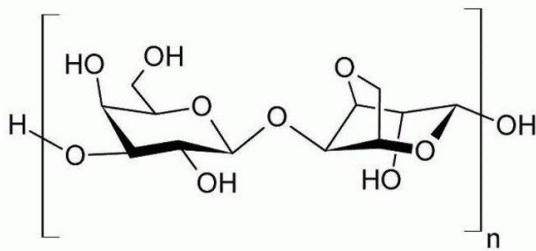
Na espectrometria de infravermelho com transformações de Fourier, a radiação com os comprimentos de onda desejados é separada por dois feixes, um fixo e outro móvel. Com a variação entre os dois feixes, o detector obtêm as variações na intensidade da radiação, que é

chamado de interferograma, posteriormente convertido no domínio das frequências. A amostra é submetida a radiação de uma larga faixa de energias, analisando esta faixa que passa pela amostra que obtêm-se o espectro completo de infravermelho (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2015).

4.10.4 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese em gel de agarose é uma das técnicas mais utilizadas para a detecção de fragmentos de DNA 100 pb a 25 kb. A agarose consiste em subunidades de agarobiose (L- e D-galactose) repetidas (Fig. 18), e é obtida de algas marinhas do tipo *Gelidium* e *Gracilaria* (LEE et al., 2012; PINHATI, 2014).

Figura 18 – Estrutura da agarose



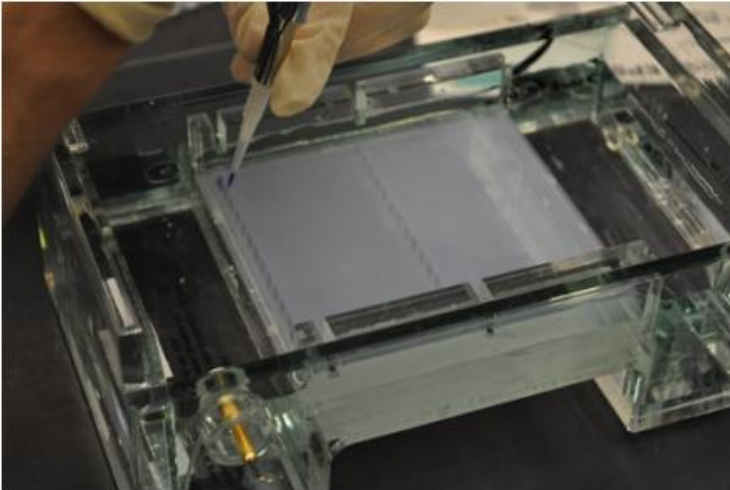
Fonte: UltraPure Agarose. Disponível em <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16500500>>. Acesso em 25 de abril de 2018.

Legenda: n = grau de polimerização (n>10.000)

A técnica leva em consideração principalmente a carga e o tamanho do DNA analisado. A estrutura do DNA em pH neutro apresenta carga negativa, devido aos grupos fosfato presente na molécula (LEE et al., 2012; PINHATI, 2014).

Para a realização da eletroforese é necessário que se aplique a amostra de DNA a ser analisado no meio de gel de agarose, conforme visualizado na figura 19. A técnica consiste na aplicação de um campo elétrico sobre o de gel de agarose com a amostra de DNA presente. Estes fragmentos de DNA (como são carregados negativamente) irão migrar para o pólo positivo, induzindo a separação de acordo com o seu tamanho (LEE et al., 2012; PINHATI, 2014).

Figura 19 – Aplicação da amostra de DNA em gel de agarose

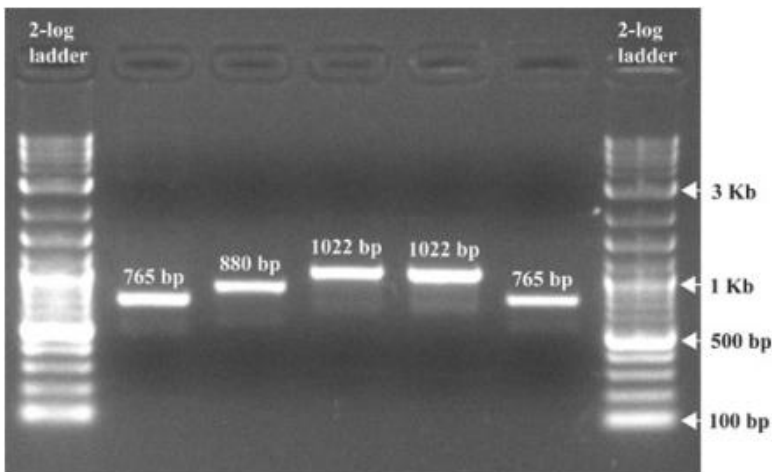


Fonte: LEE et al., 2012.

Segundo Lee et al. (2012), essa taxa de migração do DNA pelo gel leva em conta as seguintes propriedades: tamanho da molécula de DNA; concentração de agarose; conformação do DNA; tensão aplicada; presença de brometo de etídio, tipo de agarose e tampão de eletroforese (LEE et al., 2012, p. 01).

Após aplicada a corrente elétrica e ocorrer a separação dos fragmentos de DNA, é feita a coloração do gel com corante apropriado e então é aplicada à amostra uma luz ultravioleta (UV), podendo assim serem visualizados os resultados (Fig. 20) (PINHATI, 2014).

Figura 20 – Imagem de eletroforese em gel após a exposição do gel à luz UV



Fonte: LEE et al., 2012.

4.10.5 DNase Footprinting

A técnica dá-se pelo uso de uma proteína específica que proteger o DNA da ação de clivagem de algum agente externo. Quando algum agente externo promove a clivagem da fita, são gerados vários fragmentos, todos possuindo a mesma extremidade comum e com comprimento dependente da sequência apresentada pelo agente. Então graças a esta proteína protetora, algumas partes do DNA estarão protegidas e fragmentos não serão produzidos. Quando estes fragmentos forem submetidos a eletroforese, serão observadas algumas falhas, que correspondem ao DNA incubado com proteína, estas falhas são os chamados footprints da proteína. A proteína utilizada para o footprinting pode ser a DNase I, uma enzima que se liga ao DNA e corta a ligação fosfodiéster nas duas fitas. Ela consegue então impedir o ataque próximo as suas ligação ao DNA (LIN; BARBOSA, 2002).

5 METODOLOGIA

A pesquisa se caracterizou como qualitativa do tipo análise documental (LUDKE e ANDRÉ, 2014) por ter um assunto definido, a saber, complexos metálicos (nucleases) que clivam o DNA.

A estratégia de pesquisa envolveu uma busca a partir da base de dados *online* utilizando como principal ferramenta, a revista científica *American Chemical Society (ACS)*, que é uma editora de revistas de pesquisa em química, relacionadas às ciências e afins, atendendo comunidades científicas em todo o mundo. Também foi realizada a pesquisa pelo site, *Science Direct*, uma plataforma digital que fornece acesso a diversas revistas científicas e e-books de todo o mundo.

Para isso foram utilizadas as seguintes palavras-chave e suas combinações na língua portuguesa e inglesa: complexos, metálicos, clivagem, DNA, enzimas, sintéticas, nucleases, metálicas, metaloenzimas, metalonucleases, oxidativa, hidrolítica.

Foram pesquisados artigos publicados de 2015 a 2018. Em seguida, foram selecionados apenas artigos que apontavam o estudo de complexos (nucleases) com dois centros metálicos (dinucleares). Com alguns artigos selecionados, escolheu-se aqueles que tratavam dos diferentes modos de clivagem do DNA, sendo um por hidrólise e outro por oxidação.

O estudo desses artigos foi realizado com o intuito de analisar, compreender e reunir o conhecimento produzido sobre o assunto na revisão.

6 ESTUDO DOS COMPLEXOS SELECIONADOS NA LITERATURA

Neste trabalho estudou-se dois complexos dinucleares com diferentes centros metálicos. Todos já sintetizados e caracterizados por grupos de pesquisadores brasileiros e seus colaboradores.

Um dos complexos estudados (CAMARGO et al., 2018) apresenta em sua constituição os íons metálicos Fe(II) e Zn(II); Foram preparados e caracterizados de maneira conjunta, por pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), estes do Brasil, Miami University dos Estados Unidos e também a The University of Queensland, Brisbane, na Austrália. Já o segundo complexo (NUNES, et al., 2015), envolveu íons cobre Cu(II), sintetizado e caracterizado pelos grupos de pesquisadores da Universidade de São Paulo (USP), Universidade Federal do Paraná (UFPR), Centrale Marseille.

A tabela 3 apresenta os íons metálicos e ligantes presentes nos complexos analisados, e suas respectivas fórmulas empíricas.

Tabela 3 – Íons metálicos e ligantes presentes nos complexos analisados e suas fórmulas

Identificação dos complexos	Complexo FeZn	Complexo Cu ₂
Constituição: íons metálicos e ligantes	Fe(III) e Zn(II) 2-[[bis(piridina-2-ilmetil)amino]metil]-6-[[[[2-hidroxi-5-metil-3-[[[4-[(piren-1-ilmetil)amino]butil]amino]-metil]fenil]metil] (piridin-2-ilmetil) amino] metil]-4- metilfenol	Cu(II) apyhist: 2-(acetil)piridina e histamina dpam: 2,2'-bis(aminometil)difenila
Fórmulas dos complexos	[Fe ^{III} Zn ^{II} (LP2)(μ-OH)(H ₂ O)](ClO ₄) ₂	[Cu ₂ (apyhist) ₂ (dpam)](ClO ₄) ₄

6.1.1 COMPLEXO FeZn

Na tentativa de gerar nucleases com maior eficiência e seletividade na clivagem de DNA, os autores (CAMARGO et al., 2008) propuseram a síntese e caracterização de três complexos dinucleares de Fe(II) e Zn(III), distintos entre si, por apresentarem ligantes diferentes em sua constituição, baseando-se no sítio ativo de PAPs, enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres de fosfato.

Neste trabalho, o foco principal, foi somente em um dos complexos sintetizados, o $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{LP}2)(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})](\text{ClO}_4)_2$, o mesmo foi escolhido para discussão pois apresentou melhores resultados de clivagem de DNA, denominado aqui de complexo FeZn.

Este complexo que apresenta a fórmula molecular, $\text{FeZnC}_{75}\text{H}_{79}\text{N}_7\text{Cl}_5\text{O}_{16}$ foi caracterizado por diversos métodos, conforme discussão abaixo.

Uma das caracterizações foi por análise elementar (%), cujos valores teóricos e calculados estão exibidos na tabela 4. Pode-se perceber que os valores estão muito próximos entre si, confirmando a fórmula proposta.

Tabela 4 – Valores calculados pela análise elementar do complexo $\text{FeZnC}_{75}\text{H}_{79}\text{N}_7\text{Cl}_5\text{O}_{16}$

	Teórico %	Calculado%
C	55,15	55,03
H	4,88	4,91
N	6,00	5,95

Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de CAMARGO et al., 2018.

O complexo FeZn também foi caracterizado por IV. As frequências obtidas pelos autores são apresentadas nas tabelas 5.

As bandas destacadas para definir tanto ligantes como complexos metálicos são fundamentais, pois através destas é possível certificar-se se houve a desprotonação do ligante e a complexação com o íon metálico, além da caracterização dos demais constituintes. Pela interpretação dos dados, pode-se confirmar através das regiões de absorção, bandas de estiramento C=C e C=N, conforme valores de frequências $1474\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$ e C-H_{Ar} em 3043 cm^{-1} dos anéis aromáticos, e C-H_{alif} em 2857 cm^{-1} e a banda de estiramento O-H das moléculas de água foi determinada na região de 3443 cm^{-1} , comprovando-se a coordenação com os centros metálicos, Fe(III) e Zn(II).

Pode-se também verificar a presença da banda do contra-íon, o ânion perclorato (ClO_4)²⁻, na região de frequência entre 1112-1090 cm^{-1} .

Tabela 5 – Valores de frequências de IV (cm^{-1}) para o complexo FeZn, utilizando pastilhas de $\text{KBr}_{(s)}$

Estiramentos (ν)	Frequências (cm^{-1})
(O–H)	3443
(C–H _{Ar})	3043
(C–H _{alif})	2857
(C=C)	1610
(C=C)	1474
(C–O)	1112, 1090
Deslocamentos (δ)	
(C–H _{Ar})	847
(C–H _{Ar})	762
(C=C _{Ar})	620

Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de CAMARGO et al., 2018.

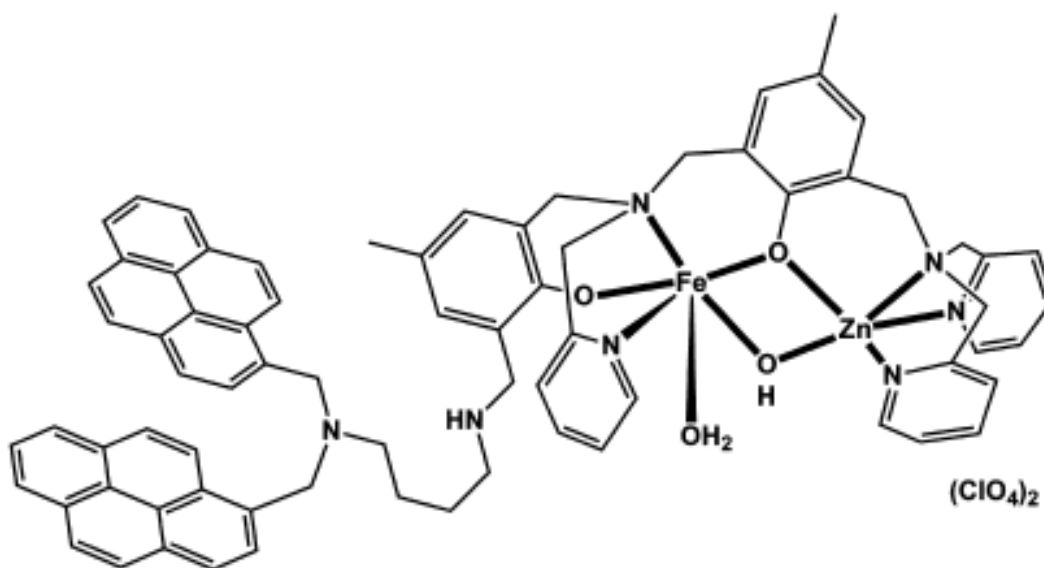
A análise por UV-VIS foi realizada utilizando acetonitrila ($\text{CH}_3\text{CN}_{(l)}$) e água ($\text{H}_2\text{O}_{(l)}$) como solventes na proporção $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (2:1, v/v), na faixa de 200-900 nm.

No espectro de UV-vís, os resultados descritos pelos autores, indicam uma banda forte de absorção no espectro em λ_{max} de 510 nm, com valor de absortividade molar (ϵ) igual a 2300 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, quando o solvente usado foi a $\text{CH}_3\text{CN}_{(l)}$, e 491 nm quando o solvente foi $\text{H}_2\text{O}/\text{CH}_3\text{CN}$ (2:1, v/v). Estas bandas de absorção foram atribuídas a uma transferência de carga ligante-metal (LMCT) proveniente dos orbitais π do fenolato para os orbitais $d\pi^*$ do íon ferro(III). Transferências similares foram observadas para as PAPs. Um segundo processo de LMCT ocorre na região de 330 nm, envolvendo os orbitais π do fenolato e $d\pi^*$ do Fe(III).

De acordo com as caracterizações pode-se propor uma estrutura para o complexo FeZn, onde o ligante LP2 (Figura 21) seria um sistema conjugado que contém dois grupos pirenos ligados através de um espaçador diamina [$-\text{NH}(\text{CH}_2)_4\text{NH}-$], e os íons metálicos Fe(III) e Zn(II) interligados por uma ponte hidroxio e fenoxo, e ainda com uma molécula de água ligada ao ferro.

A figura 21 representa a estrutura proposta para o complexo FeZn: $[\text{Fe}^{\text{III}}\text{Zn}^{\text{II}}(\text{LP2})(\mu\text{-OH})(\text{H}_2\text{O})]$, onde LP2: 2- { [[[3- [[4- [bis(piren-1-ilmetil)amino]butil]amino]metil]-2-hidroxi-5-metilfenil]metil] (piridin-2-ilmetil)amino]metil }-6- { [bis(piridin-2-ilmetil)amino]metil }-4-metilfenol

Figura 21 – Estrutura proposta do complexo FeZn



Fonte: Adaptado de CAMARGO et al., 2018.

Experimentos cinéticos da atividade de PAPs para o complexo FeZn, foram avaliados quanto a sua atividade catalítica usando *bis*(2,4-dinitrofenil) fosfato ativado (BDNPP), como o substrato a ser hidrolisado. As condições reacionais usavam um tampão 0,05 mol.L⁻¹. As taxas iniciais foram medidas em tempo real em diferentes valores de pH que compreende uma faixa entre 4,5 e 10, e as concentrações do substrato BDNPP de entre 0,5 a 6,5 mmol.L⁻¹ e 50,0 μmol.L⁻¹ para o complexo a 25 °C, sendo o produto de reação, o 2,4-dinitrofenolato, e as reações foram monitoradas a menos de 5% de esgotamento do substrato.

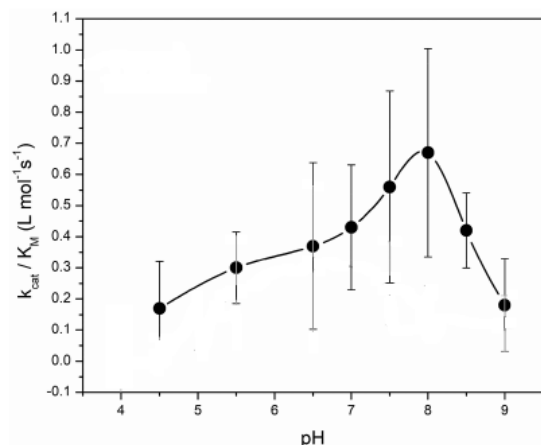
Os parâmetros cinéticos de constante catalítica (k_{cat}) e constante de afinidade (K_M) foram determinados pelos autores usando os métodos de taxa inicial utilizando uma equação semelhante à proposta por Michaelis e Menten mas em que a constante de equilíbrio K_s é substituída por K_M :

$$V_0 = \frac{V_{\text{max}} [S]}{K_m + [S]}$$

Segundo Fontes (1996) a constante cinética (k_{cat}) está associada ao processo de formação da ligação do complexo ao substrato e é calculada pelo tempo necessário para a reação acontecer. O valor do KM é uma medida da afinidade do substrato em relação à enzima (quanto maior for o seu valor menor será a afinidade), ele é definido como o valor da concentração de substrato quando a velocidade de reação é metade de V_{max} (limite para que tende V_0 quando a concentração do substrato tende para infinito). O método de taxa inicial baseia-se na estimativa da velocidade para o tempo igual a 0 (onde V_0 é o valor da atividade catalítica para as condições de ensaio nesse tempo zero), nestas condições as características do meio de ensaio, ou seja, a concentração dos substratos, são aquelas que foram escolhidas para o realizar (FONTES, 1996).

O gráfico da figura 22 apresenta a eficiência catalítica (k_{cat} / KM) do complexo FeZn versus pH que foi obtido utilizando a Equação de Michaelis-Menten, onde observou-se que o complexo FeZn atinge uma maior eficiência catalítica de conversão do substrato quando em pH 8,0.

Figura 22 – Dependência do pH na hidrólise do substrato BDNPP



Fonte: Adaptado de CAMARGO et al., 2018.

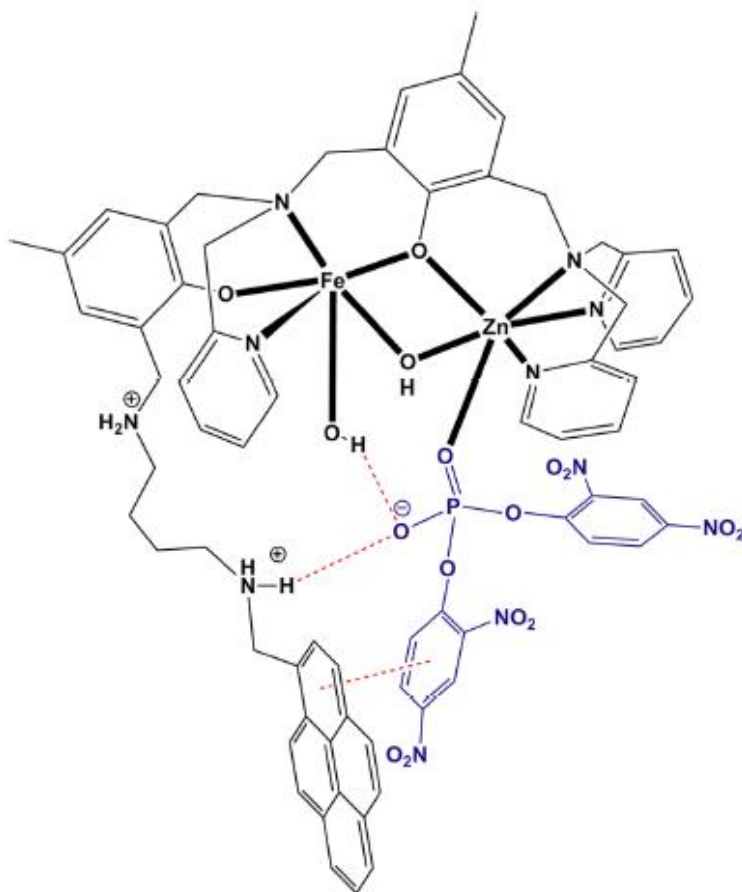
Os parâmetros cinéticos da clivagem, disponíveis na tabela 6, foram obtidos ajustando os dados encontrados a equação de Michaelis-Menten. Estes parâmetros foram medidos para os valores de pH 6,5 e 8,0 (determinado anteriormente como o mais adequado).

Relacionando as duas constantes encontradas (catalítica e de afinidade) pode-se determinar a eficiência catalítica do complexo FeZn para a conversão do substrato BDNPP, valor este que é dado em $L.mol^{-1}.s^{-1}$.

Como pode ser visto a partir dos dados da tabela 6, o complexo apresenta maiores constantes quando em pH igual a 8,0, sugerindo de acordo com os autores, que a eficiência

catalítica máxima do complexo é atingida quando o resíduo de amina de cadeia lateral se torna desprotonado e promove interações ótimas com o substrato (Fig. 23).

Figura 23 – Demonstração das interações do complexo FeZn com o substrato BDNPP



Fonte: CAMARGO et al., 2018.

Obs.: As interações demonstradas nesta figura são do complexo similar ao FeZn. A diferença está na presença de apenas um grupo pireno nesta representação. Porém, serve de modelo para o complexo estudado que apresenta dois grupos pirenos.

Tabela 6 – Parâmetros cinéticos da clivagem obtidos pela equação de Michaelis-Menten

pH	$k_{cat} \times 10^4 \text{ (s}^{-1}\text{)}$	$K_M \times 10^4 \text{ (mol.L}^{-1}\text{)}$	K_{cat}/K_M ($\text{L.mol}^{-1}.\text{s}^{-1}$)
6,5	$2,90 \pm 0,29$	$5,10 \pm 0,18$	$0,56 \pm 0,62$
8,0	$3,80 \pm 0,10$	$5,5 \pm 0,11$	$0,67 \pm 0,61$

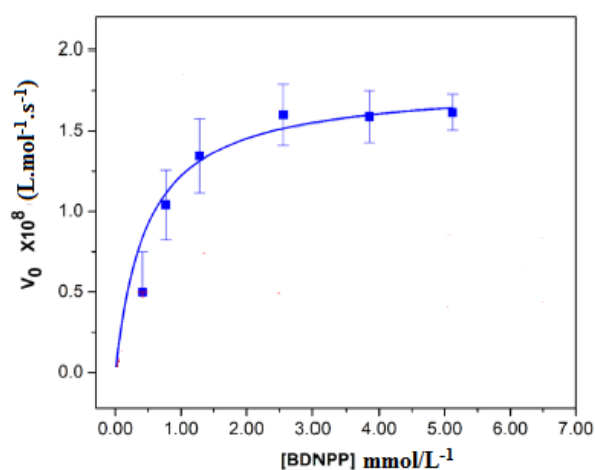
Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de CAMARGO et al., 2018.

K_{cat} : constante catalítica, K_M : constante de afinidade, k_{cat}/K_M : eficiência catalítica.

Os efeitos da concentração do substrato na clivagem também foram analisados. O experimento foi feito variando a concentração do substrato BDNPP e a medida que ocorria o aumento de substrato utilizava-se a Equação de Michaelis-Menten para obter os dados de V_0 (taxa inicial). Seus resultados estão expressos na figura 24.

Esta análise é feita pois existem condições que devem ser consideradas. Se a concentração de substrato $[S] \gg K_{cat}$, a enzima estará saturada, praticamente toda ela complexada com o substrato, e se a concentração de substrato $[S] \ll K_{cat}$ toda a enzima estará na forma não complexada ao substrato (FONTES, 96).

Figura 24 – Efeito da concentração do substrato em pH 6,5



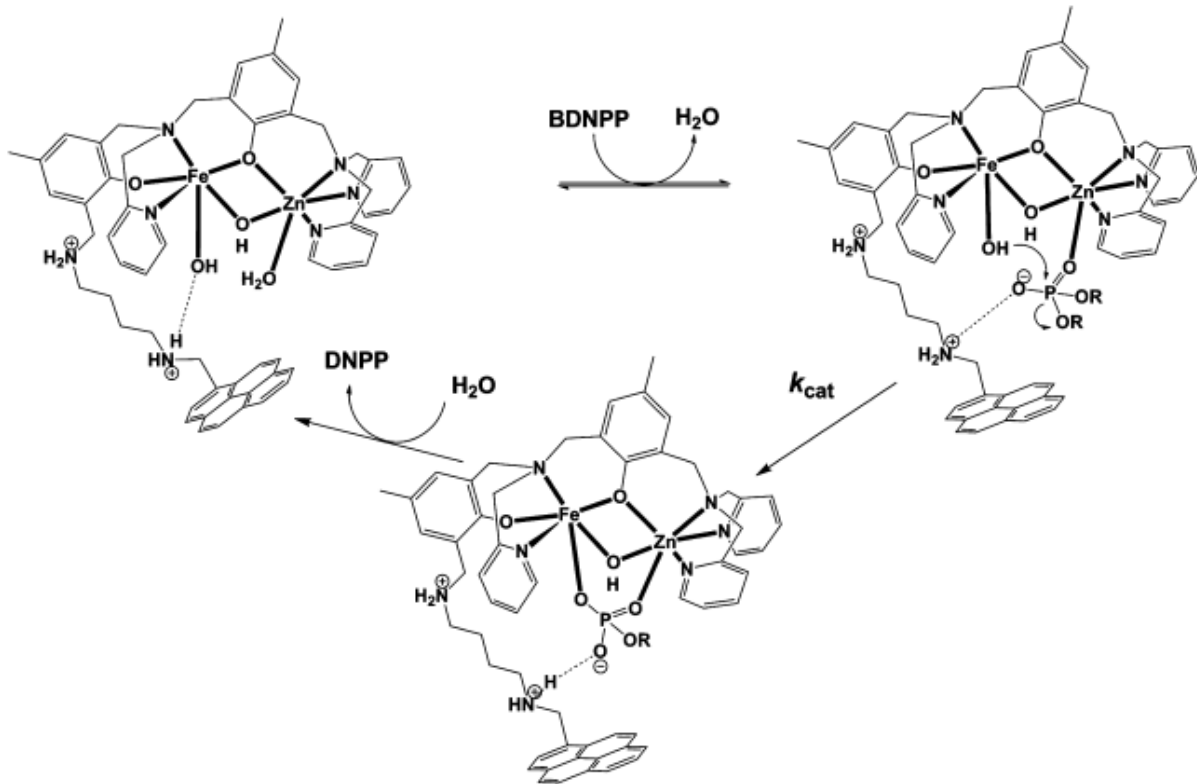
Fonte: Adaptado de CAMARGO et al., 2018.

Conforme resultados obtidos e descritos na figura 24, em pH de 6,5 nota-se que a concentração entre 4 mmol.L⁻¹ e 5 mmol.L⁻¹ é a ideal.

Baseando-se nos dados estruturais e cinéticos obtidos com as análises realizadas anteriormente, Camargo et al., (2018) propuseram o mecanismo da reação de clivagem do BDNPP para o complexo FeZn. (Fig. 25).

De acordo com os autores, primeiramente, o substrato liga-se monodentadamente ao íon Zn(II) da unidade [(OH)Fe^{III}(μ-OH)Zn^{II}(OH₂)], deslocando o seu ligante H₂O. Na etapa seguinte ocorre o ataque nucleofílico do grupo OH⁻ ligado ao Fe(III) e a liberação do grupo abandonador 2,4-dinitrofenolato. Finalmente, o produto monoéster coordenado μ-1,3 DNPP, é deslocado por duas moléculas de H₂O do ambiente, e o sítio ativo é regenerado.

Figura 25 – Mecanismo de clivagem hidrolítica da ligação fosfodiéster do BDNPP pelo complexo FeZn



Fonte: Adaptado de CAMARGO et al., 2018.

A atividade semelhante a fosfodiesterase na clivagem do DNA plasmidial foi determinada utilizando-se uma mistura do complexo FeZn com o substrato BDNPP ativado em uma mistura de acetonitrila $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (2:1, v / v), devido à sua baixa solubilidade, e monitorando-se a hidrólise do substrato BDNPP por UV-VIS a 400 nm, que é a máxima absorção do produto 2,4-dinitrofenolato.

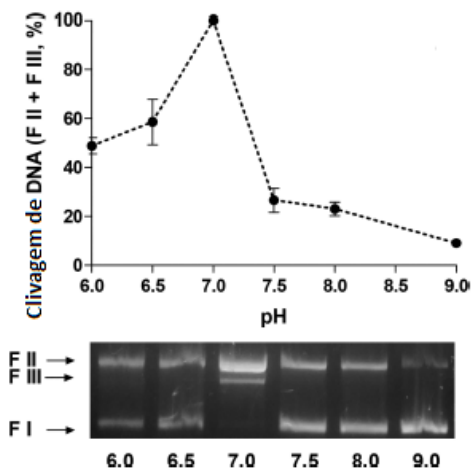
Para a análise da atividade de clivagem do DNA plasmidial pelo complexo FeZn, os autores avaliaram as conversões da forma supertorcida (F I) para as formas circular aberta (F II) e linear (F III), que representam as formas do plasmídeo com quebra da fita de DNA que estão exemplificadas na página 26 deste trabalho.

As reações de clivagem foram feitas em um volume de total de 20 μL , usando 330 ng de DNA plasmidial em uma solução tampão de 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$. A reação iniciou-se pela adição do complexo A e incubação de até 16 horas a 37°C. Após, foi realizada a eletroforese em gel de agarose da amostra a 90 volts (V) por um tempo de 90 min.

Para determinar a eficiência da clivagem do DNA pelo complexo, foram realizadas análises variando dois fatores: o pH do meio (Fig. 26) e as concentrações do complexo (Fig. 27). A fragmentação espontânea do DNA foi considerado para a análise, sendo de 20% a pH 6,0 a 6,5 e insignificante em outros valores de pH.

Na análise de dependência do pH na clivagem, a reação foi conduzida nas condições descritas anteriormente, utilizando $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do complexo FeZn e variando-se os valores de pH entre 6,0 a 9,0, os resultados desta análise estão representados na figura 26. Segundo os autores percebe-se que o complexo apresentou a capacidade de conversão de aproximadamente 100% do substrato para as formas II e III quando em pH em torno de 7,0. Também em pH em torno de 7,0, foi onde o substrato apresentou a conversão para a forma linear (FIII) indicando total clivagem do substrato. Portanto, o pH ideal para a clivagem deste complexo é $\sim 7,0$.

Figura 26 – Dependência do pH na clivagem do DNA plasmidial na concentração de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do complexo A por 16 horas em 37°C

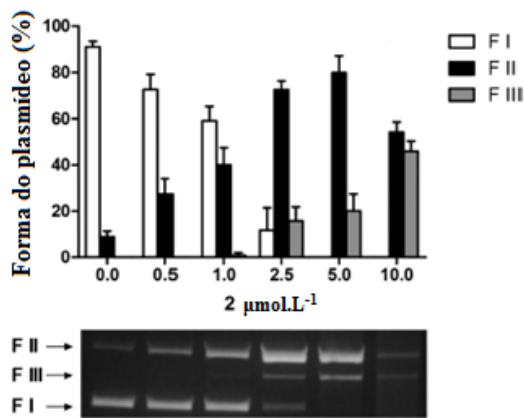


Fonte: Adaptado de CAMARGO et al., 2018.

A eficiência de clivagem de DNA do complexo FeZn também foi avaliada em termos de sua concentração (Figura 27). Onde a reação seguiu as condições estabelecidas anteriormente, variando as concentrações do complexo de $0,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, mantendo um valor de pH igual a 7,0 e após, realizada a eletroforese em gel.

Analisando-se a figura 27, nota-se que o complexo apresenta a conversão do substrato para a forma III a partir da concentração de $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, e a medida que a concentração do complexo é aumentada para $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, a conversão também é aumentada. Portanto, pode-se dizer que o complexo FeZn realiza clivagem do substrato de BDNPP a partir da concentração de $2,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 27 – Dependência da concentração do complexo na clivagem de DNA plasmidial utilizando $2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ em pH 7,0 por 16 horas em 37°C

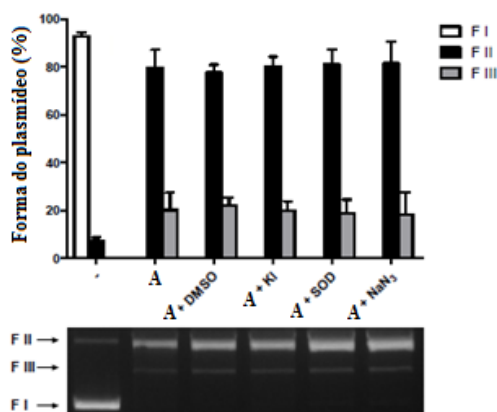


Fonte: Adaptado de CAMARGO et al., 2018.

Para investigar se o complexo também poderia promover a clivagem de DNA pelo método oxidativo, uma análise foi feita para apurar os efeitos de espécies reativas de oxigênio (ROS) através da adição de alguns catalisadores: Dimetilsulfóxido (DMSO), Iodeto de potássio (KI), Superóxido dismutase (SOD) e Azida de sódio (NaN_3) em conjunto ao complexo FeZn (Fig. 28). Após foi realizada a eletroforese em gel.

Analisando-se a figura 28 pode-se perceber que a adição de ROS no meio não promoveram nenhuma alteração nas conversões das formas do DNA plasmidial, pois as porcentagens das formas do plasmídeo permaneceram as mesmas, tanto na amostra contendo somente o complexo FeZn, como nas demais amostras contendo a mesma quantidade de complexo com as demais espécies. Pode-se assim afirmar que o complexo FeZn não promove a clivagem de DNA pelo método oxidativo, e sim hidrolítico.

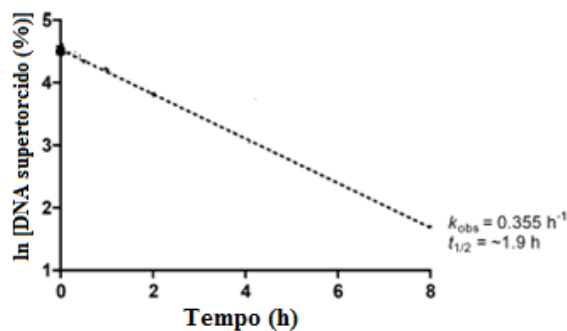
Figura 28 – Efeito de ROS na clivagem do substrato BDNPP em $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do complexo por 16 horas em 37°C



Fonte: Adaptado de CAMARGO et al., 2018.

A clivagem do DNA também foi investigada pelos autores através do monitoramento dos parâmetros da reação, onde a taxa de clivagem (k_{obs}) foi obtida a partir do cálculo de \ln da parcela de DNA supertorcido versus tempo (Figura 29). Obteve-se um valor médio de k_{obs} de $0,355 \text{ h}^{-1}$ e um tempo de meia vida de aproximadamente 1,9 horas.

Figura 29 – Parâmetros cinéticos da reação de clivagem do DNA plasmidial em $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ do complexo monitorados por 8 horas a 37°C em pH 7,0



Fonte: Adaptado de CAMARGO et al., 2018.

A análise de DNase Footprinting (Fig. 31) foi realizada para avaliar as preferências de ligação do complexo nas sequências de nucleotídeos. Embora poucos estudos de DNase I Footprinting foram relatados até o momento para compostos metálicos, os ensaios realizados pela adição da DNase I, se mostraram bem sucedidos.

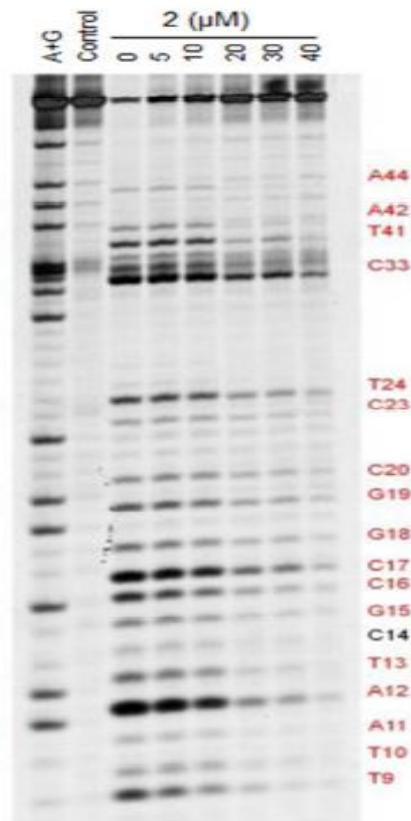
Através desta análise determinou-se que o complexo liga-se preferencialmente em uma região rica em AT, abrangendo quatro nucleotídeos de T9 a A12 (A, TTAA). Outros três locais de ligação são observados: T24 (C), T41 – A42 e A44 (D) e G15-C20 (E, GCCGGC) (a descrição dos nucleotídeos estão exemplificadas nas figuras 2, 3, 4 e 5 deste trabalho, presentes nas páginas 23, 24 e 25). Estes sítios de ligação estão demonstrados na figura 30.

Figura 30 – Proposta de ligação do complexo FeZn com as bases do DNA



Fonte: Adaptado de CAMARGO et al., 2018.

Figura 31 – Dnase I Footprinting para o complexo FeZn



Fonte: Adaptado de CAMARGO et al., 2018.

6.1.2 COMPLEXOS Cu1 e Cu2

Os autores (NUNES et al., 2015) sintetizaram e caracterizaram quatro compostos de Cu(II), dois deles mononucleares e os outros dinucleares. Os complexos mononucleares foram preparados com a finalidade de estudos comparativos com os dinucleares. Selecionou-se apenas um complexo dinuclear, $[\text{Cu}_2(\text{apyhist})_2(\text{dpam})](\text{ClO}_4)_4$, denominado aqui de Cu2, para discutir e seu respectivo mononuclear $[\text{Cu}((\text{apyhist})\text{H}_2\text{O})(\text{ClO}_4)_2]$, denominado Cu1, para comparação. A seleção do complexo dinuclear levou em consideração os melhores resultados frente as análises realizadas e, por apresentar a reatividade de nuclease, pelo método oxidativo frente ao DNA.

Segundo os autores, o estudo do complexo Cu2 teve como objetivo verificar possíveis correlações entre sua citotoxicidade e estrutura. A atividade de clivagem foi estudada usando células de melanomas murino (ratos) B16F10 e TM1MNG3 (SOUZA, BORGES e BONORINO, 2009).

Cristais castanho-violeta do complexo Cu₂ foram caracterizados através da Análise Elemental (%), conforme tabela 7. Pode-se perceber que os valores estão muito próximos entre si, confirmando a fórmula proposta.

Tabela 7 – Valores calculados pela análise elemental do complexo C₃₈H₄₄N₁₀Cu₂Cl₄O₁₆

	Teórico (%)	Calculado (%)
C	39,15	39,45
H	3,80	3,83
N	12,02	11,48
Cu	10,09	11,09

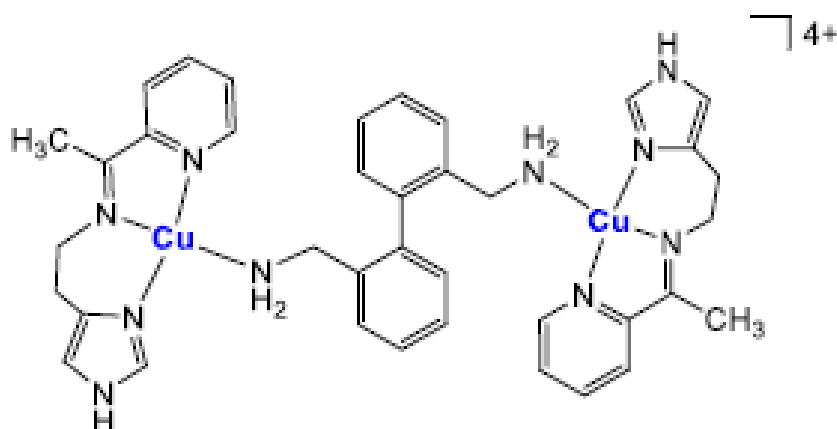
Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de NUNES et al., 2015.

Os autores analisaram o complexo por UV-VIS, e de acordo com o espectro de UV-VÍS pode-se identificar uma banda de absorção em λ_{\max} de 664 nm, características de transições d-d, cujo valor da absorvidade molar foi de $\epsilon = 0,175 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A estrutura proposta para o complexo Cu₂ está representada na figura 32.

A geometria do complexo Cu₂ foi determinada como sendo quadrática-plana, arranjo característico de íons de metais que possuem configuração d⁸ com ligantes de campo forte, d⁴ com ligantes de campo fraco, ou d⁹ com ligantes de campo forte ou fraco. Onde os ângulos de ligação entre os ligantes e o metal são de 90° e podem ter dois isômeros (*cis* e *trans*) (SHRIVER, 2008; LEE, 1999). O íon Cu(II) possui configuração d⁹.

Figura 32: Estrutura proposta do complexo Cu₂ [Cu₂(apyhist)₂(dpam)](ClO₄)₄

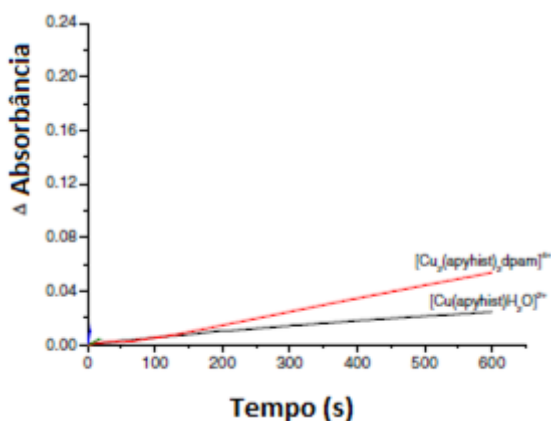


Fonte: Adaptado de NUNES et al., 2015

Os experimentos cinéticos da atividade tirosinase foram realizados utilizando o complexo Cu₂, numa concentração de 160 μmol.L⁻¹ e seu respectivo mononuclear, com concentração de 320 μmol.L⁻¹, em relação a suas atividades catalíticas usando *L*-dopa (di-hidroxfenilalanina) como substrato a ser oxidado numa concentração de 8,0 mmol.L⁻¹. A reação se deu em tampão fosfato em 50 mmol e pH = 7,0, a 25 °C, e a forma da dopaquinona correspondente controlada em 475 nm (Fig. 33).

Conforme discutido pelos autores as curvas comparativas de absorbância *versus* tempo apresentam valores crescentes e foram atribuídas à formação do produto dopaquinona. Pode-se considerar que as curvas são típicas de saturação (Michaelis-Menten) e atestavam que, como esperado, o complexo dinuclear foi mais ativo como mimético da tirosinase do que seus análogos mononucleares, embora todos eles são muito menos ativos do que a proteína tirosinase (Fig. 33).

Figura 33 – Curvas de comparação da atividade catalítica dos complexos de cobre(II) frente a oxidação da *L*-dopa



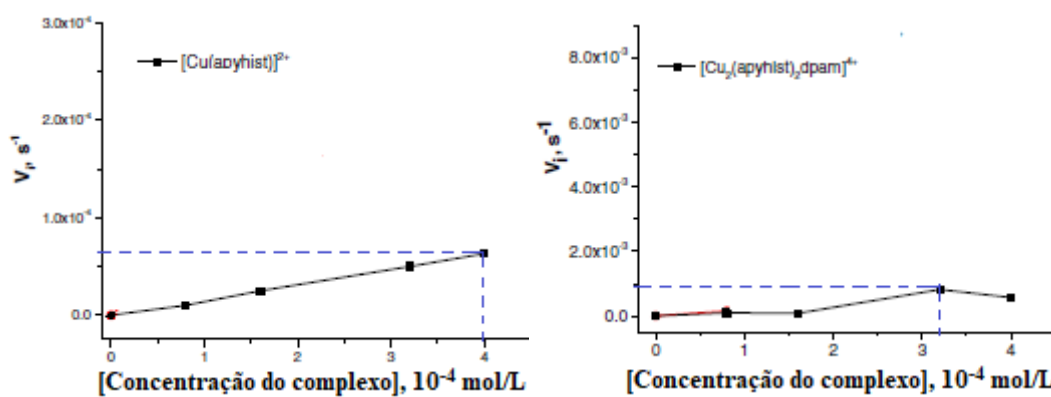
Fonte: Adaptado de NUNES et al., 2015.

A figura 34 mostra os gráficos da velocidade *versus* a concentração para os complexos, onde pode-se perceber a partir das velocidades iniciais (V_i , s⁻¹) de cada complexo, que o complexo Cu₂ é mais reativo que seu mononuclear, frente a oxidação da *L*-Dopa indicado uma pseudo-primeira, que é a ordem de uma reação que é realizada sem a presença de um catalisador, apenas em concentrações muito baixas dos complexos mononucleares. A reação deu-se em uma concentração de 8,0 mmol da *L*-dopa, em tampão fosfato (50 mmol, pH 7,0), a 25 °C.

Determinou-se também as constantes cinéticas (K_{obs} , mol.L⁻¹ s⁻¹) para os complexos Cu₂ dinuclear e mononuclear de pseudo-primeira ordem e segunda ordem a partir dos gráficos da formação da dopaquinona correspondente *versus* concentração do catalisador, ou do substrato. Deve-se considerar uma dependência da concentração do substrato na reação, com isso, para o complexo Cu₂, determinou-se os parâmetros de $K_{obs} = 1,91 \times 10^2$ mol.L⁻¹ s⁻¹ para a primeira etapa e $K_{obs} = 0,235 \times 10^2$ mol.L⁻¹ s⁻¹ para a segunda etapa. Já a constante cinética de pseudo-primeira ordem, apresenta um $K_{obs} = 2,38 \times 10^2$ mol.L⁻¹ s⁻¹ para a primeira etapa e $K_{obs} = 0,294 \times 10^2$ mol.L⁻¹ s⁻¹ para a segunda etapa. Isso mostra que a segunda etapa é muito mais lenta que a primeira. Determinou-se que os valores dos parâmetros para o complexo Cu₁ para a pseudo-primeira ordem e segunda ordem foram $K_{obs} = 0,156 \times 10^2$ mol.L⁻¹ s⁻¹ e $0,195 \times 10^2$ mol.L⁻¹ s⁻¹, respectivamente.

Conforme discussão dos autores, as duas etapas consideradas para o complexo Cu₂, na dependência da concentração do substrato (Fig. 34), deu-se provavelmente ao equilíbrio da espécie dinuclear com o análogo mononuclear, uma vez que a constante estimada para uma segunda etapa catalisada pelo complexo Cu₂ está muito perto do valor correspondente para o análogo mononuclear.

Figura 34 – Dependência da concentração da oxidação da *L*-Dopa com a concentração dos complexos de cobre



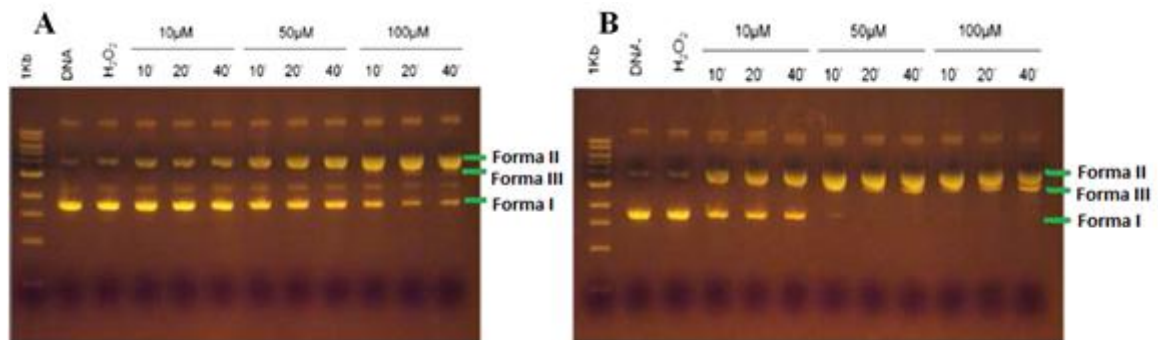
Fonte: Adaptado de NUNES et al., 2015.

Os autores também avaliaram a possível atividade do complexo Cu₂, como nuclease sintética, compostos que exibem potenciais propriedades antitumorais. O experimento de clivagem do DNA foi acompanhado por eletroforese de gel em agarose (Figura 35).

Inicialmente constatou-se que na ausência de um agente oxidante ou agente redutor, nenhuma mudança significativa no DNA foi verificada pela eletroforese, ou seja, o DNA foi

preservado. Após, foram realizados ensaios na presença de peróxido de hidrogênio, conforme mostra a figura 35A. Analisando-se as imagens de eletroforese para o complexo mononuclear, observou-se uma atividade nuclease significativa. Já o complexo Cu₂ (Figura 35B) mostrou-se com uma capacidade notável de clivar o DNA, conduzindo à forma II (relaxada) e forma I (linear), após 20 minutos de incubação, mostrando-se um completo desaparecimento de forma I (superenovelada), após 20 min de incubação, em uma concentração de 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$.

Figura 35 – Gel de agarose do plasmídeo de DNA pBluescript II KS (+/-)

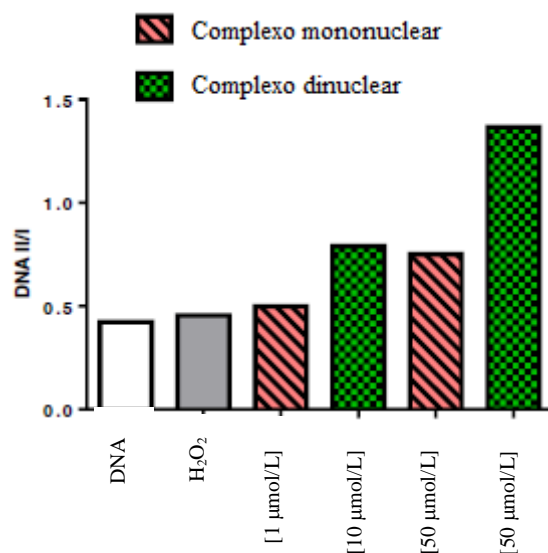


Fonte: NUNES et al., 2015.

Legenda: A) Complexo mononuclear de cobre(II); B) Complexo dinuclear de cobre(II) incubados com peróxido de hidrogênio em 10, 20 e 40 minutos, a 37 °C

Comparou-se as atividades dos complexos em diferentes concentrações, na proporção obtida da (forma II)/(forma I) do DNA, em cada caso (Figura 36), apontando-se para uma maior atividade do complexo Cu₂ em relação ao mononuclear, conforme o aumento da concentração dos mesmos.

Figura 36: Razão da [forma II]/[forma I] do DNA dos complexos mononucleares e dinucleares em DNA plasmidial ($36 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$); DNA + H₂O₂ ($125 \mu\text{mol.L}^{-1}$)



Fonte: Adaptado de NUNES et al., 2015.

Também foram realizados ensaios de citotoxicidade, onde a capacidade do complexo Cu₂ em promover alterações no metabolismo nas células, podendo gerar ou não a morte celular foi medida (Teste de citotoxicidade. Disponível em <<http://bcrcj.org.br/servicos/testes-de-citotoxicidade/>>. Acesso em: 20 de maio de 2018).

Conforme Nardone (1977) apud Nobrega (2013), a citotoxicidade pode ser definida como sendo:

[...]o conjunto de alterações da homeostase celular que leva a uma série de modificações que interferem na capacidade adaptativa das células, bem como na sobrevivência, multiplicação e realização de suas funções metabólicas. A intensidade da lesão celular depende de vários fatores, tais como a concentração do material testado, o tempo de exposição, o tipo de célula, a capacidade da substância em penetrar na célula, entre outras (NARDONE, 2013, p. 106).

Realizou-se ensaios de citotoxicidade dos complexos frente as células melanomas B16F10 e TM1MNG-3. A citotoxicidade basal afeta as estruturas e funções que estão presentes em todas as células, como membrana celular, mitocôndria, ribossomos, cromossomos e lisossomos. Essas alterações nas funções comuns geralmente desencadeiam em alterações nas funções específicas da células. Esta citotoxicidade é dada em valor de IC₅₀ (que significa a concentração que inibe 50% das células quando comparado às células controle não expostas ao mesmo agente), vários métodos podem ser usados para esta determinação, onde variadas concentrações de um agente são aplicadas em células e um determinado intervalo de tempo (PALMA; CORAT; SOARES, 2008; RAELE, 2013). O método de determinação de citotoxicidade basal utilizado pelos autores foi o teste de redução do tetrazolium (MTT), que apresentou valores de IC₅₀, para Cu₂, de 15,4 µm para células B16F10 e 93,3 µm para células TM1MNG3. Isso mostra que o complexo dinuclear Cu₂ apresenta maior efeito citotóxico que o mononuclear Cu₁.

Segundo NOBREGA (2013) o MTT apresenta-se na coloração amarela, sendo absorvido pelas mitocôndrias, de modo que estas reduzem o sal tetrazolium por ação da redutase mitocondrial formando-se o cristal formazan, um produto de coloração púrpura. Assim, quanto maior é a viabilidade da célula, maior a formação destes cristais e analisa-se por espectrofotômetro. Obtém-se os dados por análise de regressão linear, logarítmica ou

polinomial, conforme o comportamento apresentado nos ensaios, através da comparação da absorbância dos poços tratados com controles celulares.

Com isso, quando o coeficiente de determinação (R^2) fica próximo de 1 pode-se encontrar a concentração necessária dos materiais testes para inibir em 50% a viabilidade das células (NOBREGA, 2013).

O coeficiente de determinação ou de explicação, definido por:

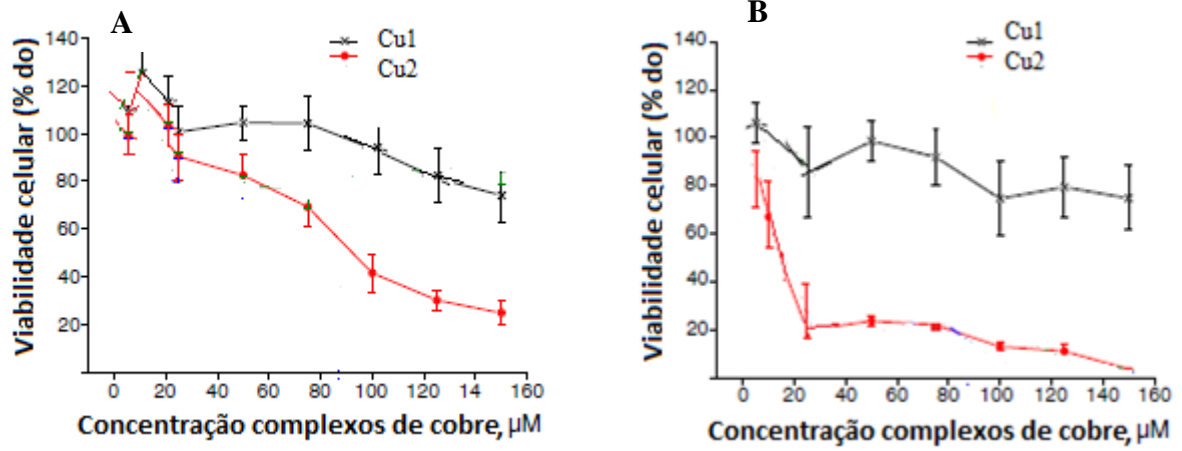
$$R^2 = VE/VT = \frac{bS_{XY}}{S_{YY}}$$

Ele indica quantos por cento a variação explicada pela regressão representa sobre a variação total. Deve-se ter valores $0 \leq R^2 \leq 1$. Se R^2 for igual a 1, isto significa que todos os pontos observados se situam “exatamente” sobre a reta de regressão. Tendo-se, neste caso, um ajuste perfeito. As variações da variável Y são 100% explicadas pelas variações da variável X, não ocorrendo desvios em torno da função estimada. Por outro lado, se $R^2 = 0$, isto quer dizer que as variações de Y são exclusivamente aleatórias e explicadas pelas variações de outros fatores que não X (VIALI. Disponível em: <http://www.pucrs.br/ciencias/viali/graduacao/engenharias/material/apostilas/Apostila_5.pdf> . Acesso em: 15 de junho de 2018).

Determinou-se a citotoxicidade dos complexos Cu1 e Cu2 após 24 horas, em diferentes concentrações, e concluiu-se que os complexos mostraram-se dependentes das doses utilizadas (Figura 37). O complexo Cu2 dinuclear apresentou os mais altos valores de toxidez para ambas as linhagens de células melanoma.

Os autores evidenciaram que a espécie dinuclear foi muito mais reativa frente as células B16F10 (Fig. 37B) do que para as células TM1MNG3 (Fig. 37A), principalmente em baixas concentrações, menores de $50 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Pode-se explicar isso, pelo fato dos dois tipos de células serem diferentes em relação ao seu conteúdo de melanina. As células B16F10 são altamente melanogênicas, enquanto as células TM1MNG3 não possuem melanina detectável. Assim, pode-se concluir que as células B16F10 foram mais suscetíveis à toxicidade do complexo dinuclear.

Figura 37 – Viabilidades celulares da TM1MNG3 (A) da B116F10 (B) em diferentes concentrações para os complexos Cu1 e Cu2



Fonte: Adaptado de NUNES et al., 2015.

CONSIDERAÇÕES

Através das análises dos complexos metálicos (nucleases metálicas) realizadas neste trabalho, percebe-se que complexos com dois centros metálicos são mais reativos e clivam o DNA com melhores resultados. Isso pode ser comprovado através do acompanhamento pelos métodos de instrumentação, como por exemplo, análises de citotoxicidade, eletroforese, clivagem do DNA, e atividade de nuclease.

Para a investigação do que são e como funcionam as nucleases sintéticas, um estudo minucioso foi feito, por meio de várias fontes, buscando esclarecimentos de todos os assuntos que são necessários para a compreensão do tema, como o DNA, plasmídeos, câncer, enzimas, métodos de clivagem e técnicas de caracterização destes complexos.

O complexo FeZn realiza a clivagem do DNA pelo método hidrolítico, fato este comprovado por vários estudos, chegando à conclusão que os dois íons metálicos participavam do mecanismo da reação, promovendo interações que auxiliaram na maior eficiência de clivagem pelo complexo. Já em relação aos estudos dos complexos de cobre, dois complexos, um mononuclear e outro dinuclear foram utilizados para uma melhor comparação da atividade de dois centros metálicos. Os mesmos realizavam a clivagem de DNA pelo método oxidativo, realizado através da adição de peróxido de hidrogênio na amostra. Após a realização da investigação, comprovou-se que o complexo Cu₂, que era dinuclear, apresentou melhores resultados de clivagem e toxicidade que o complexo mononuclear.

Pode-se dizer então que através de todos os resultados apresentados nos estudos, os complexos que apresentam um centro dinuclear em sua estrutura possuem melhor atividade de nuclease, realizando uma clivagem de DNA mais efetiva.

REFERÊNCIAS

- American Chemical Society.** Disponível em <<https://pubs.acs.org/action/showPublications?display=journals>>.
- ALBERTS, B. et al. **Fundamentos da biologia celular.** 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALMEIDA, V. et al. Câncer e agente anti-neoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova.** n. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ARBUSE, A. et al. DNA-Cleavage Induced by New Macrocyclic Schiff base Dinuclear Cu(I) Complexes Containing Pyridyl Pendant Arms. **Inorganic Chemistry.** n. 48, p. 11098–11107, 2009.
- ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de química: questionando a vida moderna e o meio ambiente.** 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012
- BARAN, E. Suplementação de elementos-traços. **Química Nova na Escola.** n. 6, p. 07-12, jul. 2005.
- BARRA, C.; NETTO, A. Interações entre complexos antitumorais e o DNA e suas ferramentas de análise: um enfoque nos metalointercaladores. **Revista Virtual Química,** 2015, 7 (6), 1998-2016.
- BENITE, A.; MACHADO, S.; BARREIRO, E. Considerações sobre a química bioinorgânica medicinal. **Revista eletrônica de farmácia.** v. 4, n. 2, p. 131-142, 2007.
- BORTOLOTTO, T. **Interação e Clivagem de DNA por Novos Complexos Mononucleares de Cu(II) e Binucleares de Fe(III)Zn(II).** 2015. 204 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.
- BROWN, T.; LeMAY, J.; BURSTEN, B. **Química: a ciência central.** 9 ed. São Paulo: Prentice Hall, 2005.
- CAMARGO, T. **Desenvolvimento de complexos de Al^{III}Zn^{II} e Al^{III}Cu^{II}: biomiméticos para as fosfatases ácidas púrpuras substituídas.** 2009. 88 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- CAMARGO, T. et al., Second-sphere effects in dinuclear Fe^{III}Zn^{II} hydrolase biomimetics: tuning binding and reactivity properties. **Inorganic Chemistry.** n. 57, p. 187-203, 2018.
- CARDOSO, E. **Inibição da atividade da tirosinase por análogos do ácido kójico.** 2014. 65 p. (Mestrado em Biologia Celular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2014.
- CHAMPE, P.; HARVEY, R.; FERRIER, D. **Bioquímica ilustrada.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.

COWAN, J. Chemical nucleases. **Current Opinion in Chemical Biology**. n. 5, p. 634-642, 2001.

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

DIAS, G. Cisplatina e análogos: drogas inorgânicas anticancerígenas. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 57-59, dez. 1988.

DUARTE, L. **Produção e caracterização da atividade de tirosinase no extrato bruto de *Pycnopus sanguineus* CCT-4518**. 2009. 67 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

ESTEVES, L. **Investigação teórica do mecanismo de ação de compostos binucleares de platina (II)**. 2012. 107 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

FISHER, F. **Atividade de Complexos Metálicos sobre biomoléculas: interação e clivagem**. 2010. 99 p. Dissertação (Mestrado em Química) Departamento de Química - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

FONTES, A.; CÉSAR, E.; BERALDO, H. A química inorgânica na terapia do câncer. **Revista Química Nova na Escola**. n. 6, p. 13-18, jul. 2005.

FONTES, R. **Enzimas e cinética enzimática**. 1996. Disponível em: <https://users.med.up.pt/~ruifonte/PDFs/PDFs_arquivados_anos_anteriores/2005-2006/Enzimas_e_Cinetica_Enzimica2005-06.pdf>. Acesso em: 10 de junho de 2018.

GLISIC, B. et al., Synthesis, cytotoxic activity and DNA-binding properties of copper(II) complexes with terpyridine. **Polyhedron**. n. 139, p. 313-322, 2018.

GABRIEL, P. **Efeito da alteração na segunda esfera de coordenação de complexos binucleares de Fe^{III}Zn^{II} como modulador da atividade de clivagem e interação com DNA**. 2016, 156 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) Centro de Ciências Biológicas – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

HEGG, E.; BURSTYN, J. 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**. n. 173, p. 133–165, 1998.

HOUSECROFT, C.; SHARPE, A. **Química inorgânica**. 4 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2013.

HUMPHREYS, K.; KARLIN, K.; ROKITA, A. Efficient and specific strand scission of DNA by a dinuclear copper complex: comparative activity of complexes with linked tris(2-pyridylmethyl)amine moieties. **American Chemical Society**. n. 124, p. 6009-6019, 2002.

SOUZA, A.; BORGES, T.; BONORINO, C. Expressão elevada de HspBP1 em células de melanoma murinho impede crescimento tumoral em vivo. **IV Mostra de Pesquisa da Pós-Graduação – PUCRS**. 2009.

JIANG, J. et al. Synthesis and characterization of the ligand based on benzoxazole and its transition metal complexes: DNA-binding and antitumor activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**. n. 104, p. 583-591, 2010.

KELLAND, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Publishing Group**. v. 7, p. 573-584, 2007.

KREFT, G. **Interação e Clivagem de DNA por Complexos de Co^{2+} com Ligantes Tripodais N-Doadores**. 2014. 67 p. Dissertação (Mestrado em Química) Departamento de Química – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

LEE, J. **Química inorgânica não tão concisa**. 5 ed. São Paulo: Blucher, 1999.

LEE, P. et al. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. **Journal of Visualized Experiments**. v. 62, n. 3923, p. 1-5, abril 2012.

LI, L. et al. **Inorganic Chemistry**. n. 45, p. 7144-7159, 2006.

LIANG, J. et al. Recent development of transition metal complexes with in vivo antitumor activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**. n. 177, p. 276-286, 2017.

LU, J. et al. Synthesis and characterization of unsymmetrical oxidovanadium complexes: DNA-binding, cleavage studies and antitumor activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**. n. 112, p. 39-48, 2012.

LÜDKE, M.; ANDRÉ, M. **Pesquisa em educação, Abordagens Qualitativas**. 2 ed. Rio de Janeiro: E.P.U., 2014.

MAHESWARI, P. *et al.* Structure, cytotoxicity, and DNA-cleavage properties of the complex $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{pbt})\text{Br}_2]$ structure, cytotoxicity, and DNA-cleavage properties of the complex $[\text{Cu}^{\text{II}}(\text{pbt})\text{Br}_2]$. **Inorganic Chemistry**. v. 47, n. 9, p. 3719-3727, 2008.

MAITY, B. Ferrocene-promoted photoactivated DNA cleavage and anticancer activity of terpyridyl copper(II) phenanthroline complexes. **Organometallics**. n. 29, p. 3632-3641, 2010.

MARTINS, P. **Avaliação de interação e clivagem de DNA por complexos de rutênio**. 2014. 89 p. Dissertação (Mestrado em Ciências: Química Inorgânica) Departamento de Química Orgânica e Inorgânica – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.

MANCIN, et al. Artificial metallonucleases. **Chemical Communications**. p. 2540–2548, 2005

MEGGERS, E. Targeting proteins with metal complexes. **Chemical Communications**. p. 1001-1010, 2009.

Melanina. Disponível em : <<https://pt.wikipedia.org/wiki/Melanina>>. Acesso em 23 de abril de 2018.

NELSON, D.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NEVES, A.; VARGAS, M. Complexos de platina(II) na terapia do câncer. **Revista Virtual de Química**. Niterói, v. 3, n. 3, p. 196-209, set. 2011.

NÓBREGA, A. **Padronização de extratos de Eugenia florida DC. e seu estudo toxicológico para o desenvolvimento de um fitoterápico ou fitofármaco**. 2012. 220 p. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2012.

NOGUEIRA, R. et al. Fundamentos e aplicações ambientais do processos Fenton e foto-Fenton. **Química Nova**. v. 30, n. 2, p. 400-408, 2007.

NUNES, C. *et al.* Reactivity of dinuclear copper(II) complexes towards melanoma cells: Correlation with its stability, tyrosinase mimicking and nuclease activity. **Journal of Inorganic Biochemistry**. n. 149, p. 49-58, 2015.

PALMA, M.; CORAT, E.; SOARES, C. **Avaliação da citotoxicidade in vitro de superfícies recobertas por nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT)**. 2008. 54 p. relatório final de projeto de iniciação científica (PIBIC/CNPq/INPE). 2008.

PINHATI, F. Eletroforese de DNA: dos laboratórios de biologia molecular para as salas de aula. **Química Nova na Escola**. v. 37, n. 4, p. 316-319, nov. 2015.

RAELE, R. **Avaliação da citotoxicidade de Quantum dots, in vitro, em células de RAW 264.7**. 2013. 77 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Aplicada à Saúde). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

REEDIJK, J. *Bioinorganic Chemistry*. p. 1-3, 2013.

SATHYARAJ, G. et al. Oxidative cleavage of DNA by ruthenium(II) complexes containing a ferrocene/non-ferrocene conjugated imidazole phenol ligand. **Organometallics**. n. 31, p. 6980–6987, 2012.

SCHMITT, F. et al. New (arene)ruthenium(II) complexes of 4-aryl-4H-naphthopyrans with anticancer and anti-vascular activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**. n. 184, p. 69-78, 2018.

Science Direct. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/>>.

SEVERINO, P. **Atividades de modelos biomiméticos de fosfatases ácidas púrpuras sobre ácidos nucléicos**. 2007. 106 p. Tese (Doutorado em Química) Departamento de Química – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

SHRIVER, D. et al. **Química Inorgânica**. 4 ed. Porto Alegre, Bookman, 2008.

SIGMAN, D. Chemical nucleases. *Biochemistry*. v. 29, n. 39, 1990

SIGMAN, D. et al. Oxygen-dependent Cleavage of DNA by the 1,10-Phenanthroline Cuprous Complex. **The journal of biological chemistry**. v. 254, n. 24, p. 12269-12272, 1979.

SILVESTEIN, R.; WEBSTER, F.; KIEMLE, D. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2015.

SILVÉRIO, M.; CASTRO, C.; MIRANDA, A. Avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). **Revista brasileira de plantas medicinais**. Botucatu, v.15, n.1, p.59-65, 2013.

SRISHAILAM, A. et al. Cellular uptake, cytotoxicity, apoptosis, DN. A-binding, photocleavage and molecular docking studies of ruthenium(II) polypyridyl complexes. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. n. 132, p. 111-123, 2014.

Teste de citotoxicidade. Disponível em <<http://bcrj.org.br/servicos/testes-de-citotoxicidade/>>. Acesso em 20 de maio de 2018.

TOMA, H. **Química bioinorgânica e ambiental**. São Paulo: Blucher, 2015.

UltraPure Agarose. Disponível em <<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/16500500>>. Acesso em: 25 mai. 2018.

VIALI, L. **Estatística básica**. Disponível em: <http://www.pucrs.br/ciencias/viali/graduacao/engenharias/material/apostilas/Apostila_5.pdf>. Acesso em: 15 de junho de 2018.

YU, Z.; COWAN, J. Metal complexes promoting catalytic cleavage of nucleic acids - biochemical tools and therapeutics. **Chemical Biology**. n. 43, p. 37-42, 2018.

ZAHA, A.; FERREIRA, H.; PASSAGLIA, L. **Biologia molecular básica**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

ANEXOS

Em anexo estão disponibilizados os dois artigos utilizados no trabalho.