

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA**

JOSIANE APARECIDA DUARTE BATISTA

**INVESTIGAÇÃO DAS INTERAÇÕES DA MOLÉCULA DE DNA COM
ELEMENTOS TERRAS-RARAS**

JUIZ DE FORA

2023

JOSIANE APARECIDA DUARTE BATISTA

**INVESTIGAÇÃO DAS INTERAÇÕES DA MOLÉCULA DE DNA COM
ELEMENTOS TERRAS-RARAS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada, para obtenção do título de Doutora em Física.

Orientadora: Maria José Valenzuela Bell

JUIZ DE FORA

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Batista, Josiane Aparecida Duarte .
Investigação das interações da molécula de DNA com elementos terras-raras / Josiane Aparecida Duarte Batista. -- 2023.
103 f.

Orientador: Maria José Valenzuela Bell
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Física, 2023.

1. DNA. 2. Terras raras: Európio, Érbio, Itérbio e Neodímio. 3. Pinça Óptica. 4. Eletroforese. 5. Ligação Cooperativa. I. Bell, Maria José Valenzuela, orient. II. Título.

Josiane Aparecida Duarte Batista

"Investigação das interações da molécula de DNA com elementos terras-raras"

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Física. Área de concentração: Física.

Aprovada em 05 de Setembro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria José Valenzuela Bell - Orientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Márcio Santos Rocha

Universidade Federal de Viçosa

Prof. Dr. Carlos Henrique Moreira Lima

Universidade Federal do Acre

Prof.^a Dr.^a Mariana da Costa Novo Pimenta Brandão

Universidade Federal de Viçosa

Eduardo Ferreira da Silva

Universidade Federal de Juiz de Fora

Virgílio de Carvalho dos Anjos

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 23/08/2023.



Documento assinado eletronicamente por **Márcio Santos Rocha, Usuário Externo**, em 05/09/2023, às 17:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana da Costa Novo Pimenta Brandão, Usuário Externo**, em 05/09/2023, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Maria Jose Valenzuela Bell, Professor(a)**, em 05/09/2023, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Ferreira da Silva, Professor(a)**, em 05/09/2023, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Virgilio de Carvalho dos Anjos, Professor(a)**, em 05/09/2023, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique Moreira Lima, Usuário Externo**, em 05/09/2023, às 17:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1424422** e o código CRC **92A7746E**.

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria das Graças e Manoel, a minha irmã Eliane, ao meu cunhado Leandro e as minhas sobrinhas, a Larissa e a Beatriz.

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”

Theodore Roosevelt

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo.”

Albert Einstein

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

“É justo que muito custe o que muito vale.”

Santa Teresa D'Ávila

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu força, coragem, determinação e conduziu minhas ações para que eu agisse de forma correta para vencer todos os obstáculos para concluir minha pós-graduação. Aos meus pais, Maria das Graças Duarte Batista e Manoel Batista Sobrinho, pelo amor e apoio incondicional no decorrer de mais uma etapa acadêmica e por nunca duvidar que esse dia chegaria e que eu seria a primeira doutora das famílias DUARTE e BATISTA.

À minha amada irmã, Eliane, por ser a pessoa que mais acreditou que esse dia chegaria, por sonhar meu sonho comigo e por me fazer não desistir em meio às dificuldades que surgiram durante esses anos, e também ao meu cunhado, Leandro. E agora a minha pequena sobrinha e afilhada Larissa que me traz luz e amor em dias não tão radiantes, que impressionantemente tem mais de mim do que poderia imaginar e assim como eu é de uma insistência inacreditável para conseguir o que quer e a minha nova sobrinha, Beatriz, que chegou para mostrar que dias melhores virão, que um sorriso pode mudar o dia de alguém e trazer paz.

A minha madrinha Denise, seu esposo Júlio e meus irmãos de coração Pyetro e Isabela, que sempre me incentivaram a nunca desistir dos meus objetivos, por mais que me parecessem tão distantes e difíceis de serem alcançados.

Ao companheirismo, momentos de descontração e carinho das minhas amigas de república de Juiz de Fora, República Girassol: Camila, Livia e Flaviana. E as minhas amigas de República de Viçosa, República Tipo Fiona: Vanessa, Thaís, Tais, Luane e Bruna. Que nessas idas e vindas entre as duas cidades em meio a essa correria não deixaram de me fazer rir e me incentivarem a continuar e dar sempre o meu melhor. As minhas amigas de república do mestrado, República Meninas: Maiara Cazotti, Juliana Paiva, Thaís Pessoa e Joyce Salmaso que mesmo cada uma tendo tomado seu destino e fisicamente estarmos distantes, permaneceram presentes, grandes incentivadoras e sempre acreditaram na conclusão do meu grande sonho de me tornar Doutora em Física.

A minha orientadora, Maria José Valenzuela Bell, que foi extremamente receptiva e disponível a apresentar seu laboratório e me receber para nos conhecermos pessoalmente, em resposta a um pedido de um primeiro contato por e-mail, por não hesitar em me aceitar como orientanda, acreditar em meu projeto e também na parceria entre os laboratórios: Laboratório do Grupo de Engenharia e Espectroscopia de Materiais (GE²M) do Departamento de Física da

Universidade Federal de Juiz de Fora e o Laboratório de Física Biológica da Universidade Federal de Viçosa (LFB), os quais tenho enorme gratidão e que sem essa parceria não teria chegado a esse momento.

Aos meus coorientadores, Márcio Santos Rocha e Virgílio de Carvalho dos Anjos, pela atenção contínua, ensinamentos, conselhos e principalmente pela confiança depositada durante todo este período de convivência. Gostaria de ressaltar o nome do Márcio Santos Rocha que pela segunda vez me coorientou e mais uma vez foi de uma generosidade, de um companheirismo, de um incentivo e de tamanha benção em minha vida acadêmica. Márcio, não tenho palavras para agradecer tamanha atenção, sabedoria e empatia durante os dias de pânico na busca de resultados, em meio às adversidades no decorrer dos dias, obrigada por mais uma vez acreditar em mim e estar junto comigo em busca do meu sonho.

Aos professores do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora, pelas disciplinas ofertadas e por transmitirem conhecimento de uma forma tão singular e eficaz, em especial aos professores Zélia Maria da Costa Ludwig, Gil de Oliveira Neto, Pablo Zimmermann Coura e Virgílio de Carvalho dos Anjos por me darem as últimas disciplinas da minha vida acadêmica. Gostaria de ressaltar o nome da professora Zélia Maria da Costa Ludwig, uma pessoa ímpar, pesquisadora humana, mulher e representante da classe feminina, iluminada e inspiradora, sua energia e sua luta são essenciais para dias melhores! Que prazer te conhecer.

Aos colegas de Laboratório do Grupo de Engenharia e Espectroscopia de Materiais (GE²M) do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora pelos dias de laboratório e pelas disciplinas cursadas juntos.

A Escola Estadual Pedro Lessa e toda sua equipe por construirmos juntos um histórico de trocas de conhecimento desde o meu Ensino Médio, onde me formei em 2006. Em especial as minhas amigas Meiry, Luciene, Lúcia, Mayara, Did, Rúbia e Núbia que nesses últimos anos de convivência se mantiveram sempre presentes, atenciosas e solícitas e também por estarem em orações e acreditar em mim como pessoa, profissional e pesquisadora. Ao meu amigo, professor e diretor Wilton Lopes que sempre esteve disponível para me ajudar na correria do dia a dia, sempre muito compreensível e solícito. Ao meu primeiro professor de Física, Sérgio Lopes, que tanto ama a Física e me apresentou essa nobre ciência, obrigada Sérgio, queria te dizer que aquela menina curiosa de anos atrás segue cultivando pela Física, o mesmo amor que você.

Aos meus amigos da Física Biológica, em especial aos meus queridos: Taty, Carlos, Rany e Rayane, mesmo estando distantes do dia a dia do laboratório estiveram sempre presentes comigo em mais uma etapa da pós-graduação. Aos meus também amigos da Física Biológica: Tiago e Leandro pelas orientações, convivências diárias, incentivos, parcerias de projeto e que sempre me estenderam a mão quando eu mais precisei durante essa temporada no qual estive de volta ao meu amado laboratório.

Aos meus amigos da pós-graduação em Física da UFJF, em especial aos mais divertidos, os quais passamos dias inesquecíveis, protagonizamos churrascos hilários e assistimos a copa do mundo: Leisa, Janaína, Tiago, Delvany, Célio Lucas, Camila e Patrick e o agregado Douglas, vocês fizeram os meus anos de doutorado mais divertidos e leves.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq) pela aquisição de equipamentos e manutenção dos laboratórios utilizados no decorrer dos anos de doutorado: Laboratório do Grupo de Engenharia e Espectroscopia de Materiais (GE²M) do Departamento de Física da Universidade Federal de Juiz de Fora e o Laboratório de Física Biológica da Universidade Federal de Viçosa (LFB), assim como, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	DNA E TERRAS RARAS.....	17
2.1	DNA	17
2.2	TERRAS RARAS	20
3	TÉCNICAS EXPERIMENTAIS: PINÇA ÓPTICA E ELETROFORESE.....	22
3.1	PINÇA ÓPTICA.....	22
3.1.1	PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DE UMA PINÇA ÓPTICA	23
3.1.2	ESTRUTURAÇÃO DO PORTA - AMOSTRA.....	27
3.1.3	TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE INTERNA DELIMITADA PELO O-RING	28
3.1.4	PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS.....	29
3.1.5	EXPERIMENTO.....	31
3.2	ELETROFORESE	35
3.2.1	PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAROSE	36
3.2.2	PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS	37
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1	ÓXIDO DE EURÓPIO	39
4.1.1	ESPECTROSCOPIA DE FORÇA.....	39
4.1.2	ELETROFORESE EM GEL.....	43
4.2	ÓXIDO DE ÉRBIO.....	45
4.2.1	ESPECTROSCOPIA DE FORÇA.....	46

4.2.2	ELETROFORESE EM GEL.....	49
4.3	ÓXIDO DE ITÉRBIO.....	53
4.3.2	ELETROFORESE EM GEL.....	57
4.4	ÓXIDO DE NEODÍMIO	58
4.4.1	ESPECTROSCOPIA DE FORÇA.....	58
4.4.2	ELETROFORESE EM GEL.....	61
5	CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	64
APÊNDICE A: MODELO DE KRATKY-POROD: ENERGIA DE CONFIGURAÇÃO DA CADEIA		67
APÊNDICE B: HASTE CONTINUAMENTE FLEXÍVEL - MODELO WLC –(WORM- LIKE-CHAIN- MODELO DE CADEIA VERMIFORME)		72
APÊNDICE C: EQUILÍBRIO QUÍMICO NAS INTERAÇÕES DNA-LIGANTES		79
APÊNDICE D: POSSÍVEIS MODOS DE LIGAÇÃO ENTRE LIGANTES E A MOLÉCULA DE DNA		84
APÊNDICE E: ARTIGOS PUBLICADOS.....		87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espessura da molécula de DNA e sua relação com o pareamento de bases. Imagem retirada de [22]	17
Figura 2 - Estrutura dos quatro nucleotídeos do DNA. Imagem retirada de [22].	18
Figura 3 - Modelo para estrutura da molécula de DNA. Imagem retirada de [22].	19
Figura 4 - Formação da dupla hélice do DNA. Imagem retirada de [22].	20
Figura 5 - Tabela periódica evidenciando a série dos lantanídeos. Imagem retirada de [31].	21
Figura 6 - Aparato gerador da Pinça Óptica. Imagem realizada pela autora da tese.	23
Figura 7 - Reflexão de dois feixes na superfície da microesfera. Os feixes incidem na objetiva (elipse cinza) e refletem na superfície da microesfera. A força resultante devido à radiação possui direção vertical e sentido de baixo para cima. Quanto mais forte a cor do perfil gaussiano maior o valor da intensidade do laser. A objetiva está representada pela elipse cinza na imagem. Imagem retirada de [45]	24
Figura 8 - Microesfera posicionada à esquerda do perfil gaussiano de intensidade do laser e abaixo do foco da objetiva. Os raios incidentes são refratados pela microesfera. Imagem retirada de [45].	25
Figura 9 - Microesfera posicionada acima do foco do laser. Força resultante de dois feixes sendo refratados após o foco do laser. Imagem retirada de [45].	26
Figura 10 - Porta amostra real sobre o suporte. Imagem realizada pela autora da tese.	28
Figura 11 - Porta amostra sob luz intensa no estágio do microscópio da pinça óptica, o qual temos o piezoelétrico acoplado. Imagem realizada pela autora da tese.	29
Figura 12 - Possíveis situações de ligações da amostra depositada sobre a lamínula. Imagem retirada de [44].	31
Figura 13 - Estiramento da molécula de DNA. A microesfera sofre forças de módulos iguais pela pinça e pelo DNA. Imagem retirada de [46].	32

Figura 14 - Curva de força de um DNA que se encontra dentro do regime entrópico com um valor máximo de força é de 2 pN. Imagem retirada de [43] .	33
Figura 15 - Cuba eletrolítica com soluções depositadas no gel. Experimento em andamento. Imagem realizada pela autora da tese.	35
Figura 16 – Montagem do recipiente utilizado para formação do gel e poços de deposição. Gel de agarose. Imagem realizada pela autora da tese.	37
Figura 17 - Comprimento de persistência dos complexos DNA-Eu ₂ O ₃ em função da concentração de Eu ₂ O ₃ na amostra, C _T , para os dois tampões utilizados: PBS 1,4 mM (círculos pretos) e PBS 154 mM (quadrados vermelhos).	41
Figura 18 - Comprimento do contorno L (normalizado como o valor de DNA puro L ₀) dos complexos DNA-Eu ₂ O ₃ em função da concentração de Eu ₂ O ₃ na amostra, C _T , para os dois tampões utilizados: PBS 1,4 mM (círculos pretos) e PBS 154 mM (quadrados vermelhos).	43
Figura 19 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA linear de 3 kpb. Observe que a intensidade da fluorescência não apresenta comportamento sistemático e não há atraso ou avanço nas execuções à medida que a concentração de Eu ₂ O ₃ aumenta.	44
Figura 20 - Resultado equivalente da Figura 19 obtido para moléculas de DNA do plasmídeo PBR322.	44
Figura 21 - Comprimento do contorno L dos complexos DNA-Er ₂ O ₃ em função da concentração de Er ₂ O ₃ na amostra, C _{Er} .	46
Figura 22 - Gráfico da força por extensão em regime de altas forças da interação entre o Er ₂ O ₃ e a molécula de DNA.	48
Figura 23 - Comprimento de persistência dos complexos DNA-Er ₂ O ₃ em função da concentração de Er ₂ O ₃ na amostra C _{Er} . O comprimento de persistência cresce até atingir um valor máximo (~ 56nm) para uma concentração crítica C _{Er} = 0,04 μM. A partir dessa concentração, A cai abruptamente para cerca de 18 nm e permanece praticamente constante a partir daí nesta faixa de concentração.	48

Figura 24 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA linear de 3 kpb para o óxido de Érbio (Er_2O_3).	50
Figura 25 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA circular de PBR322 para o óxido de Érbio (Er_2O_3).	51
Figura 26 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA linear de 3 kpb para o óxido de Érbio (Er_2O_3).	52
Figura 27 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA linear de 3 kpb para o óxido de Érbio (Er_2O_3).	52
Figura 28 - Comprimento de persistência dos complexos DNA- Yb_2O_3 em função da concentração de Yb_2O_3 na amostra C_T .	54
Figura 29 - Comprimento de contorno L dos complexos DNA- Yb_2O_3 em função da concentração de Yb_2O_3 na amostra, C_T .	55
Figura 30 - Gráfico da força por extensão em regime de altas forças da interação entre o Yb_2O_3 e a molécula de DNA.	56
Figura 31 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA linear de 3 kpb para o óxido de Itérbio (Yb_2O_3).	57
Figura 32 - Comprimento de persistência dos complexos DNA- Nd_2O_3 em função da concentração de Nd_2O_3 na amostra C_{Nd} .	59
Figura 33 - Comprimento do contorno L dos complexos DNA- Nd_2O_3 em função da concentração de Nd_2O_3 na amostra, C_{Nd} .	60
Figura 34 - Gráfico da força por extensão em regime de altas forças da interação entre o Nd_2O_3 e a molécula de DNA.	61
Figura 35 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA linear de 3 kpb para o óxido de Neodímio (Nd_2O_3).	62
Figura 36 - Regime de altas forças (65 pN). a) Curva de força x extensão para uma molécula de DNA puro. Imagem retirada de [23]. b) Curva de força x extensão para uma molécula de DNA na presença de Érbio (0,1 μM). c) Curva de força x extensão	

para uma molécula de DNA na presença de Itérbio ($0,8 \mu\text{M}$). d) Curva de força x extensão para uma molécula de DNA na presença de Neodímio ($0,150 \mu\text{M}$).....63

- Figura 37 - Vareta rígida de comprimento L que após a ação de uma força encontra-se em formato de um semicírculo. Imagem retirada de [43]..... 67
- Figura 38 - Esquema da variação do vetor posição $\mathbf{r}(s)$ o qual localiza um ponto arbitrário da curva e do vetor unitário tangente $\mathbf{t}(s)$ em cada ponto ao longo da curva arbitrária, onde os vetores encontram-se parametrizados ao longo da curva pelo comprimento de arco s . Imagem retirada de [43] 68
- Figura 39 - Curva genérica de um polímero e seus vetores posição. Imagem retirada de [43].....73
- Figura 40 - Fixando a constante de ligação química $k_i = 10^4 \text{ M}^{-1}$ e $r_{\text{máx}} = 1$ temos este comportamento gráfico que descreve a equação C.11 para alguns valores do expoente de Hill (n). Imagem retirada de [43] 82
- Figura 41 - Representação esquemática dos principais modos de interação possíveis entre a molécula de DNA e pequenos ligantes Imagem retirada de [91].....84
- Figura 42 - (a) Intercalação, (b) Ligação covalente, Ligações com os sulcos ou fendas, (c) fenda menor e a (d) fenda maior, respectivamente. Imagem retirada de [92].. 85

RESUMO

Os óxidos de Európio (Eu_2O_3), Érbio (Er_2O_3), Itérbio (Yb_2O_3) e Neodímio (Nd_2O_3) foram usados para avaliar a afinidade destes elementos de terras raras na interação com moléculas de DNA de fita dupla. Para realizar o estudo, utilizamos espectroscopia de força de molécula única com pinças ópticas e ensaios de eletroforese em gel. Os ensaios de espectroscopia de força mostram que todas as quatro terras raras estudadas apresentaram uma forte interação com o DNA de fita dupla. A interação entre o Eu_2O_3 e a molécula de DNA é independente da força iônica usada no ambiente circundante. O Eu_2O_3 tende a se ligar de forma cooperativa, formando aglomerados de moléculas (~ 3) e apresenta uma alta constante de ligação de associação de equilíbrio da ordem de 10^5 M^{-1} . Além disso, a eletroforese em gel confirma o caráter eletrostático fraco da interação e mostra explicitamente que o Eu_2O_3 não interfere na intercalação na dupla hélice. O Er_2O_3 apresenta uma forte interação com o DNA de fita dupla, condensando-o fortemente para concentrações acima de $0,04 \mu\text{M}$, levando a uma redução de mais de 50% do seu comprimento de contorno. Observamos também que essa condensação é reversível, pois para experimentos de altas forças em uma concentração de $0,1 \mu\text{M}$ do óxido podemos atingir novamente o comprimento do contorno original do DNA. A capacidade de compactação da estrutura da molécula de DNA apresentada pelo Er_2O_3 torna-o promissor para a aplicabilidade na terapia gênica, por exemplo. Vimos que o Er_2O_3 , o Yb_2O_3 e o Nd_2O_3 impedem a desnaturação induzida por força na cadeia da dupla hélice. Além de possuírem alta afinidade com a molécula, pois possuem uma constante de ligação de associação de equilíbrio da ordem de 10^6 M^{-1} a 10^7 M^{-1} . Para o Yb_2O_3 e o Nd_2O_3 , observamos que além de alta afinidade, eles são também cooperativos, indicando que quando se ligam à molécula de DNA, colaboram com a próxima ligação que acontecerá, formando aglomerados de moléculas semelhantes ao Eu_2O_3 . A cooperatividade é medida pelo expoente de Hill, que é obtido através do comprimento de persistência em função da concentração dos metais estudados separadamente. Tais resultados demonstram o potencial das terras raras para interagir com ácidos nucleicos e sugerem fortemente que esses elementos de terras raras possam ser considerados para o projeto de novos fármacos anticancerígenos à base de metais.

Palavras-chave: Európio. Érbio. Itérbio. Neodímio. DNA. Espectroscopia de força de molécula única. Pinças ópticas. Eletroforese. Ligação cooperativa.

ABSTRACT

The oxides of Europium (Eu_2O_3), Erbium (Er_2O_3), Ytterbium (Yb_2O_3) and Neodymium (Nd_2O_3) were used to evaluate the affinity of these rare earth elements in the interaction with double stranded DNA molecules. To perform the study, we used single-molecule force spectroscopy with optical tweezers and gel electrophoresis assays. Force spectroscopy assays show that all four rare earths studied showed a strong interaction with double-stranded DNA. The interaction between Eu_2O_3 and the DNA molecule is independent of the ionic strength used in the surrounding environment Eu_2O_3 tends to bind cooperatively, forming clusters of molecules (~ 3) and exhibits a high equilibrium association binding constant of the order of 10^5 M^{-1} . Furthermore, gel electrophoresis confirms the weak electrostatic character of the interaction and explicitly shows that Eu_2O_3 does not interfere with drug intercalation in the double helix. Er_2O_3 has a strong interaction with double-stranded DNA, strongly condensing it for concentrations above $0.04 \mu\text{M}$, leading to a 50% reduction in its contour length in a concentration of $0.1 \mu\text{M}$ of the oxide. Er_2O_3 's ability to compact the structure of the DNA molecule makes it promising for applicability in gene therapy, for example. We have seen that Er_2O_3 , Yb_2O_3 and Nd_2O_3 prevent the force induced melting of the double helix chain, in addition to having high affinity with the molecule, as they have an equilibrium association binding constant of the order of 10^6 M^{-1} to 10^7 M^{-1} . For Yb_2O_3 and Nd_2O_3 , we observed that in addition to high affinity, they are also cooperative, indicating that when they bind to the DNA molecule, they collaborate with the next binding that will happen, forming clusters of molecules similar to Eu_2O_3 . The cooperativity is measured by the Hill coefficient, which is obtained through the persistence length as a function of the concentration of the metals studied separately. Such results demonstrate the potential of rare earths to interact with nucleic acids and strongly suggest that these rare earth elements can be considered for the design of new metal-based anticancer drugs.

Keywords: Europium. Erbium. Ytterbium. Neodymium. DNA. Single molecule force spectroscopy. Optical tweezers. Electrophoresis. Cooperative binding.

1 INTRODUÇÃO

O desenho racional de novos medicamentos para quimioterapias e outros tipos de tratamentos para doenças humanas é um tópico importante na farmacologia e áreas afins. Em particular, os compostos à base de metal constituem uma classe de drogas amplamente empregadas nas quimioterapias atuais [1, 2], especialmente o composto cisplatina com base em platina e seus derivados [3-6]. Por outro lado, avanços no desenvolvimento de medicamentos baseados em metais e semimetais como Rutênio, Ósmio, Irídio, Ferro, Ouro, Vanádio, Arsênio e outros foram recentemente relatados [1]. No entanto, estudos usando elementos de terras raras são escassos.

O Európio (Eu) é o metal de terras raras mais reativo, e um estudo anterior realizado com um composto à base de Eu em particular alcançou resultados promissores com relação ao desenvolvimento de drogas anti-câncer à base de Eu [7]. Esse composto, projetado para ligar vários anéis aromáticos ao átomo do Eu, interage com o DNA via ligação hidrofóbica às fendas da dupla hélice com uma constante de ligação de associação de equilíbrio da ordem de 10^5 M^{-1} , exibindo também atividade antimicrobiana [7]. No entanto, como os anéis aromáticos por si só podem interagir com o DNA por meio de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de empilhamento de π - π [8, 9], é difícil discriminar o efeito real do elemento Eu nesse composto. Além disso, a afinidade do európio com o DNA de fita simples também foi demonstrada recentemente [10].

O Érbio (Er), o Itérbio (Yb) e o Neodímio (Nd) são metais de terras raras que, diferentemente do Európio, não oxidam facilmente, sendo estáveis no ar, macios, maleáveis e dúcteis. Ímas permanentes de Neodímio vem sendo usados para manipular a molécula de DNA, sendo possível a obtenção de informações mecânicas importantes da molécula, como comprimento de contorno (que mede a distância ponta a ponta) e o comprimento de persistência (que nos fornece a “elasticidade”). Para além do uso desses ímas, no presente trabalho buscamos investigar a interação direta entre o óxido de Neodímio e a molécula de DNA, assim como, os outros dois óxidos (Érbio e Itérbio).

Para realizar o estudo, utilizamos espectroscopia de força com pinças ópticas e ensaios de eletroforese em gel. Hoje, a espectroscopia de força de molécula única é reconhecida como uma técnica avançada para estudos sobre as interações entre ácidos nucleicos e ligantes, como drogas e proteínas, podendo fornecer informações sobre os modos de ligação e sobre a físico-química da interação [11-13]. A eletroforese em gel, por outro lado, é uma técnica clássica que

permite observar o comportamento de um grande conjunto de moléculas de ácidos nucleicos, complementando assim, a análise de moléculas únicas obtidas por espectroscopia de força.

No presente estudo, investigamos os efeitos do Európio, do Érbio, do Itérbio e do Neodímio na molécula de DNA de cadeia dupla usando os compostos estáveis mais simples que contém esses elementos, os óxidos: óxido de európio (Eu_2O_3), óxido de érbio (Er_2O_3), óxido de itérbio (Yb_2O_3) e óxido de neodímio (Nd_2O_3). O európio puro não pode ser usado aqui porque o elemento é muito reativo e se oxidaria rapidamente na câmara de amostra.

Nossos resultados mostram que o Eu_2O_3 , Yb_2O_3 e o Nd_2O_3 se ligam cooperativamente a dupla hélice com uma constante de ligação de associação de equilíbrio da ordem de 10^5 M^{-1} , 10^6 M^{-1} e 10^7 M^{-1} , respectivamente, por exemplo, próximo ao encontrado para muitos medicamentos anticancerígenos comerciais. Assim, o objetivo do presente estudo é mostrar o potencial das terras raras Európio, Érbio, Itérbio e Neodímio para interagir com ácidos nucleicos e motivar o desenvolvimento de novos medicamentos anticancerígenos baseados no Eu_2O_3 para quimioterapias e para terapia gênica baseada no Er_2O_3 . Assim como, investigar outras possíveis ligações e interações do Yb_2O_3 e Nd_2O_3 à molécula de DNA e suas potencialidades.

Esta tese apresenta 5 capítulos. No capítulo 1 temos uma breve introdução. No capítulo 2 discutimos brevemente sobre a molécula de DNA e os elementos terras raras. O capítulo 3 destina-se às técnicas experimentais utilizadas: pinças ópticas e a eletroforese, assim como, os protocolos de preparação de amostras usadas em cada técnica. No capítulo 4 apresentamos os resultados experimentais obtidos utilizando as técnicas de pinça óptica e eletroforese sobre a interação dos óxidos de terras raras e a molécula de DNA e por fim no último capítulo, fechamos a tese com as conclusões acerca dos resultados obtidos e as perspectivas futuras almejadas. Após as conclusões e as perspectivas futuras temos ainda os apêndices, sendo eles: Apêndice A: O Modelo de Kratky-Porod: Energia de configuração da cadeia, o Apêndice B: O Modelo WLC, o Apêndice C: O Equilíbrio químico nas interações DNA - ligantes, o Apêndice D: Possíveis Modos de Ligação entre Ligantes e a Molécula de DNA e por último o Apêndice E, contendo os Artigos publicados.

2 DNA E TERRAS RARAS

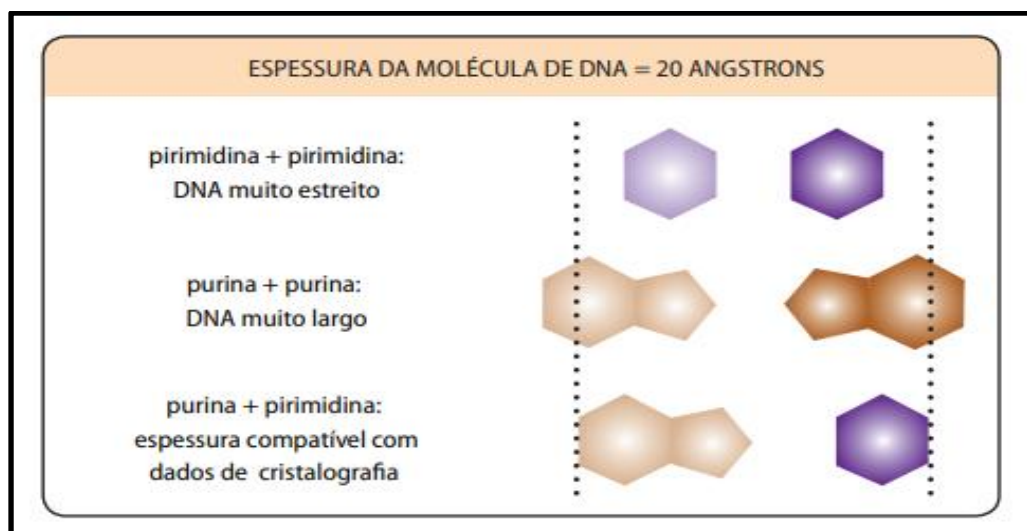
Neste capítulo é apresentada a estrutura da molécula de DNA e as características das Terras raras utilizadas no presente trabalho. A abordagem inclui um breve histórico da tradução teórica da estrutura molecular do DNA que concedeu a James Watson e Francis Crick o Prêmio Nobel de Medicina no ano de 1962.

2.1 DNA

Inspirados na metodologia empregada por Linus Pauling para a elaboração de modelos de proteínas, James Watson e Francis Crick em 1953 traduziram teoricamente a estrutura da molécula de DNA em que os nucleotídeos, monômeros da molécula, ligam-se em longas cadeias por meio do grupo fosfato e da hidroxila da pentose (desoxirribose). Esta elucidação da molécula de DNA concedeu-lhes o Prêmio Nobel de Medicina de 1962. [14-22]

O modelo estrutural da molécula de DNA confirmou o que sua elevada densidade apontava a presença de mais de uma cadeia (fitas duplas). As fitas duplas são antiparalelas (cadeias com orientações opostas) e ligadas por pontes de hidrogênio com distância uniforme de 20 angstroms (espessura da molécula de DNA, como mostrado na Figura 1) e possuem uma distância de 34 angstroms quando completam uma volta [21,22].

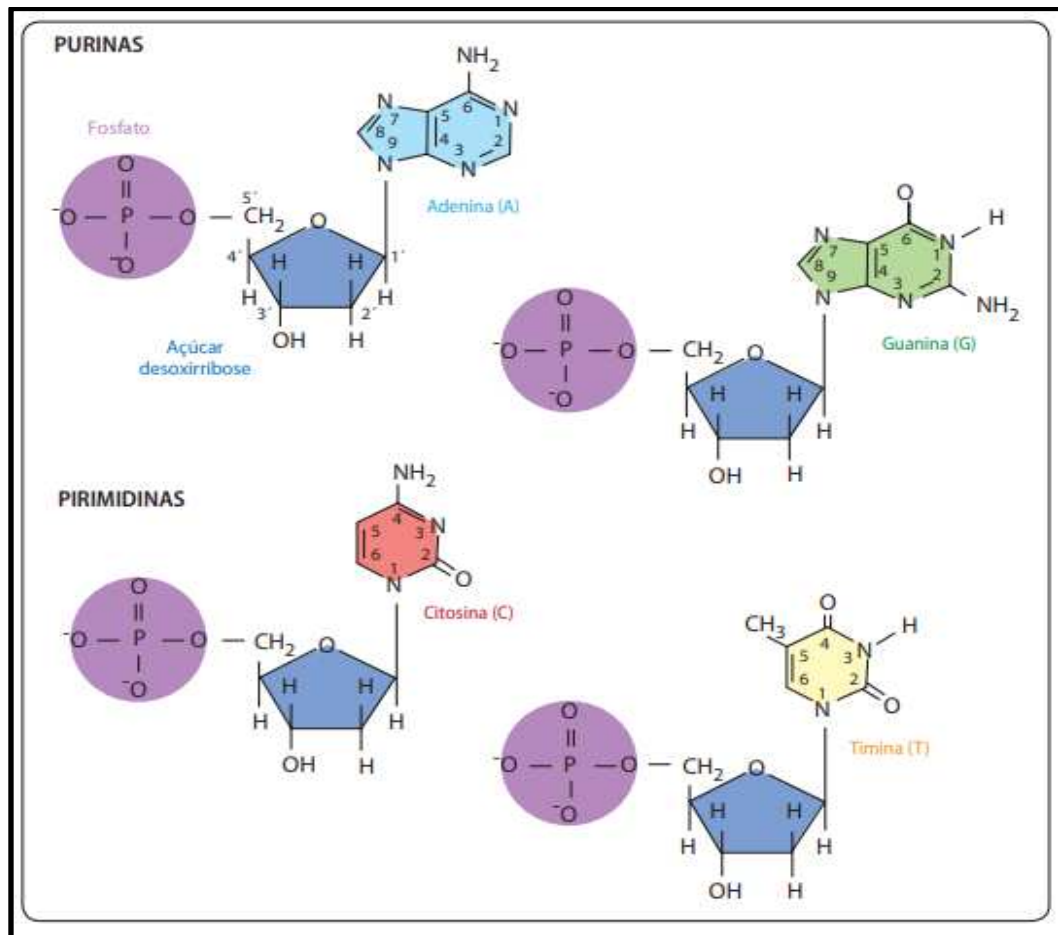
Figura 1 - Espessura da molécula de DNA e sua relação com o pareamento de bases. Imagem retirada de [22].



A molécula de DNA é então formada por quatro nucleotídeos, estes por sua vez, formam-se pela ligação entre um grupo fosfato (PO_4^-), uma desoxirribose (um açúcar do tipo

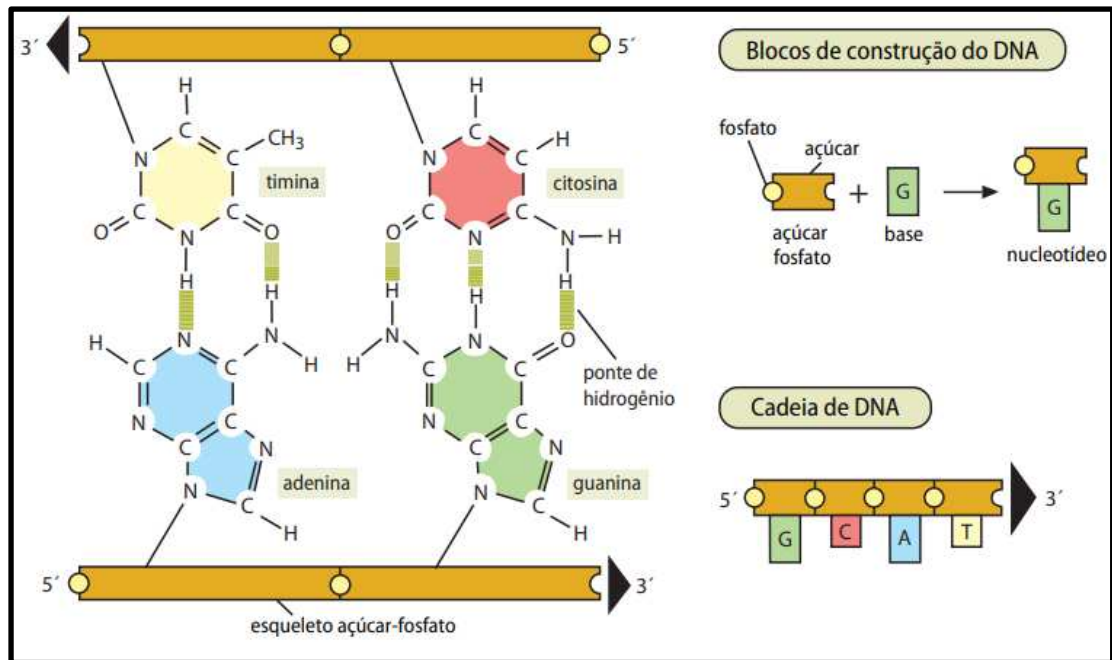
pentose) e uma base nitrogenada. Quanto às bases nitrogenadas da molécula de DNA, temos: a adenina, a timina, a guanina e a citosina, responsáveis pela diferenciação dos nucleotídeos. As bases nitrogenadas apresentam classificação mediante a presença de similaridades estruturais químicas: a timina e a citosina são chamadas de pirimidinas e a adenina e a guanina chamadas de purinas como mostram a Figura 2 [19-22].

Figura 2 - Estrutura dos quatro nucleotídeos do DNA. Imagem retirada de [22].



A ligação fosfodiéster dos nucleotídeos na cadeia (ligação entre a hidroxila ligada ao carbono 3' da pentose de um nucleotídeo e o fosfato do nucleotídeo seguinte) como mostrado na Figura 3, fornece uma grande resistência química à molécula de DNA, molécula quimicamente estável, o que viabiliza a continuidade da seqüência de seus nucleotídeos, cada seqüência de nucleotídeos carrega informações únicas da molécula. A individualização da molécula de DNA depende da seqüência de bases que a compõem e do tamanho da molécula, e sua quantificação é dada pelo número de pares de base (bp) [14-19].

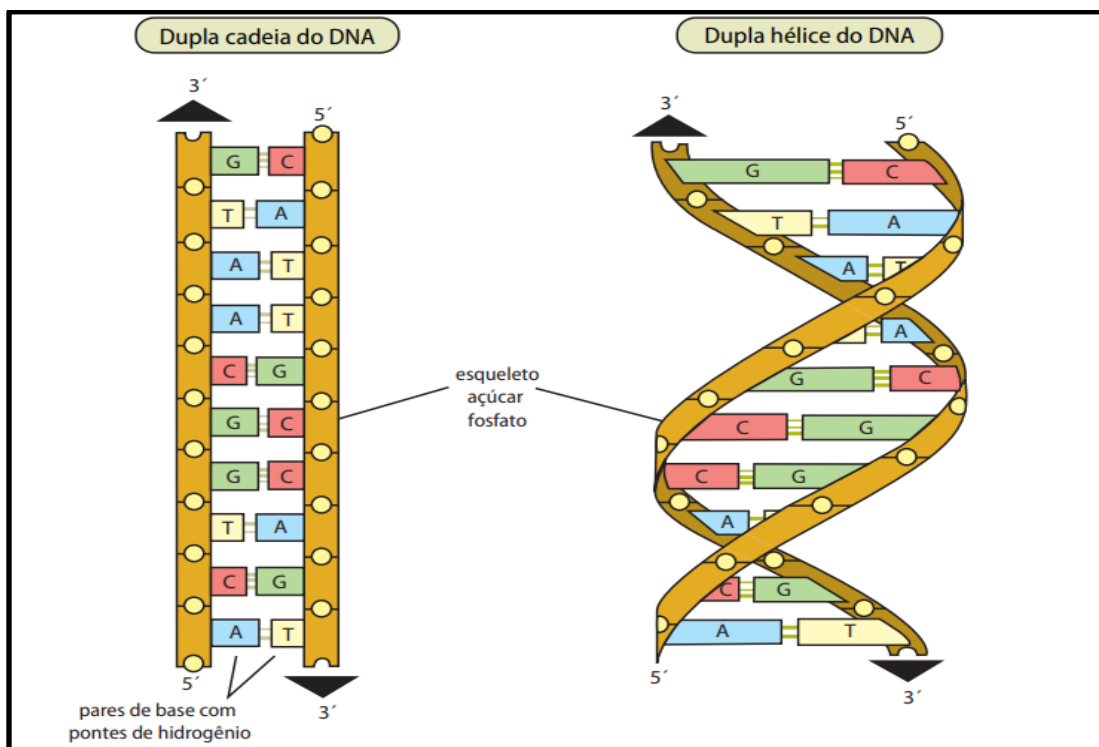
Figura 3- Modelo para estrutura da molécula de DNA. Imagem retirada de [22].



Outro fator relevante descoberto quanto à estrutura da molécula de DNA refere-se à quantidade das bases nitrogenadas. A soma total entre a timina e a citosina é sempre igual à soma entre a adenina e a guanina, ou seja, a quantidade de pirimidinas (T+C) e purinas (A+G) é idêntica ($T+C = A+G$). As ligações ocorrem entre a adenina e timina e entre a citosina e a guanina, obedecendo sempre uma purina e uma pirimidina, para que isso aconteça a quantidade de adenina e timina é sempre a mesma, assim como, a quantidade de citosina e guanina. Isso não garante que a soma entre uma adenina e uma timina seja igual à soma entre a citosina e a guanina [19-22].

Propriedades mecânicas da molécula de DNA (comprimento de contorno, comprimento de persistência, distância ponta a ponta quadrática média, raio de giro e etc.) sofrem mudanças significativas quando submetidas à presença de fármacos, enzimas, proteínas, polímeros, elementos químicos, dentre outros. Várias técnicas vêm sendo empregadas e inúmeros estudos desenvolvidos em diversas áreas, a fim de aplicações mais diversificadas possíveis. No presente trabalho utilizamos a técnica de pinçamento óptico para avaliar duas dentre essas propriedades mecânicas da molécula de DNA na presença de terras raras: o comprimento de contorno e o comprimento de persistência.

Figura 4 - Formação da dupla hélice do DNA. Imagem retirada de [22].



O comprimento de contorno (L) da molécula de DNA é dado pela medida da distância ponta-a-ponta ao longo da cadeia, ou seja, sua distância linear, desde que não esteja esticado além do seu comprimento natural. Já o comprimento de persistência (A) mede a rigidez de flexão, ou seja, quanto maior a dificuldade encontrada em dobrar uma molécula, maior seu comprimento de persistência e vice-versa. [23-30]

2.2 TERRAS RARAS

A série dos lantanídeos está compreendida entre os elementos de números atômicos 57 e 71 da tabela periódica, como indicado na Figura 5. Inicialmente, esses elementos eram chamados de terras raras, por serem de difícil separação e raramente descobertos no ambiente. Atualmente, esses elementos admitem ambas as denominações, mas não são tão escassos e difíceis de encontrar, como antes [32, 33].

No presente trabalho, estudamos interações da molécula de DNA com quatro dessas quinze terras raras. A interação do európio foi a primeira a ser investigada. O európio é o mais reativo entre os lantanídeos, apresenta uma ductilidade elevada e possui diversas aplicabilidades: em tubos de imagem para TV, na fabricação de pigmentos em lâmpadas fluorescentes entre outras aplicações. Seguido do érbio, um elemento maleável, macio e

relativamente estável no ar, não oxidando tão rapidamente quanto outras terras raras, usado em laser para tratamento de lesões e cirurgias de pele, laser de alta potência para corte de tecido ósseo, entre outros. Já o itérbio é macio e dúctil, aplicado em dispositivos de memória, em tubos de raios-X e lasers, na melhoria da resistência mecânica do aço e como catalisador industrial. E por último, o neodímio, um elemento pouco reativo, macio e maleável o qual vem sendo empregado na fabricação de super ímãs permanentes, alto-falantes, fones de ouvido e filtros de luz em lentes oculares. [32,33].

Figura 5- Tabela periódica evidenciando a série dos lantanídeos. Imagem retirada de [31].

1A												8A							
1 H Hidrogênio	2 He Hélio											3 Li Lítio	4 Be Berílio	5 B Boro	6 C Carbono	7 N Nitrogênio	8 O Oxigênio	9 F Fluor	10 Ne Neônio
11 Na Sódio	12 Mg Magnésio	3B	4B	5B	6B	7B	8B	8B	8B	1B	2B	13 Al Alumínio	14 Si Silício	15 P Fósforo	16 S Enxofre	17 Cl Cloro	18 Ar Argônio		
19 K Potássio	20 Ca Cálcio	21 Sc Escândio	22 Ti Titânio	23 V Vanádio	24 Cr Cromo	25 Mn Manganês	26 Fe Ferro	27 Co Cobalto	28 Ni Níquel	29 Cu Cobre	30 Zn Zinco	31 Ga Gálio	32 Ge Germânio	33 As Arsênio	34 Se Selênio	35 Br Bromo	36 Kr Criptônio		
37 Rb Rubídio	38 Sr Estrôncio	39 Y Ítrio	40 Zr Zircônio	41 Nb Níbio	42 Mo Molibdênio	43 Tc Técnetio	44 Ru Rútenio	45 Rh Ródio	46 Pd Paládio	47 Ag Prata	48 Cd Cádmio	49 In Índio	50 Sn Estanho	51 Sb Antimônio	52 Te Telúrio	53 I Iodo	54 Xe Xenônio		
55 Cs Césio	56 Ba Bário	57-71 * Lantanídeos	72 Hf Háfnio	73 Ta Tântalo	74 W Tungstênio	75 Re Rênio	76 Os Ósmio	77 Ir Írídio	78 Pt Platina	79 Au Ouro	80 Hg Mercúrio	81 Tl Telúrio	82 Pb Chumbo	83 Bi Bismuto	84 Po Polônio	85 At Astato	86 Rn Radônio		
87 Fr Francium	88 Ra Rádium	89-103 ** Atinídeos	104 Rf Rifório	105 Db Dúbnio	106 Sg Seabúrgio	107 Bh Bóhrio	108 Hs Hássio	109 Mt Moscúvio	110 Ds Darmstádio	111 Rg Reolpídio	112 Cn Copernício	113 Uut Ununtrium	114 Uuq Ununquádo	115 Uup Ununpêntio	116 Uuh Ununhexio	117 Uus Ununseptio	118 Uuo Ununoctio		

Série dos Lantanídeos														
57 La Lantânio	58 Ce Célio	59 Pr Praseodímio	60 Nd Neodímio	61 Pm Promécio	62 Sm Samaritium	63 Eu Európio	64 Gd Gadolínio	65 Tb Térbio	66 Dy Díscio	67 Ho Hólio	68 Er Érbio	69 Tm Tulio	70 Yb Ítrio	71 Lu Lutécio

Série dos Actinídeos														
89 Ac Actínio	90 Th Tório	91 Pa Protactínio	92 U Urânio	93 Np Neptúlio	94 Pu Plutônio	95 Am Americônio	96 Cm Cúrio	97 Bk Berkelônio	98 Cf Califórnia	99 Es Einsteinônio	100 Fm Férmio	101 Md Mendelevônio	102 No Nobelônio	103 Lr Lawrencônio

As terras raras apresentam várias aplicabilidades, entre elas podemos destacar: a utilização dos óxidos como marcador luminescente em ensaios bioanalíticos, sondas espectroscópicas e luminóforos para iluminação. Entretanto, entre as quatro terras raras desse estudo somente o európio possui luminescência forte na região do visível (forte emissor), enquanto o neodímio, o érbio e o itérbio apresentam luminescência fraca (fracos emissores) [32,33].

Nota-se que o âmbito de aplicabilidades das terras raras vai além das mencionadas até o momento, nos últimos anos vem sendo investigadas aplicações biológicas como marcadores em imunologia, possíveis interações da molécula de DNA, traçadores para acompanhamento de distribuição de fármacos, ou seja, na função de sondas espectroscópicas de biomoléculas [32,33].

3 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS: PINÇA ÓPTICA E ELETROFORESE

Neste capítulo apresentaremos um breve histórico da técnica de pinçamento óptico, o princípio de seu funcionamento baseado na descrição geométrica, além de descrevermos todo o protocolo utilizado para realizarmos os experimentos, compreendendo desde a estruturação do porta-amostra até a realização das medições. Em seguida, apresentaremos também a técnica de eletroforese, a preparação do gel de agarose e por fim, o protocolo da preparação das amostras utilizadas na corrida eletroforética.

3.1 PINÇA ÓPTICA

Desde que foi inventada por Arthur Ashkin e seus colaboradores, em 1969, a técnica de Pinça Óptica vem sendo desenvolvida e aplicada em várias áreas científicas, por ser uma das técnicas mais versáteis e precisas em estudos que abrangem as escalas sub nanométricas (átomos e moléculas simples) a micrométricas (com aplicações principalmente em sistemas biológicos). No ano de 2018 obteve o reconhecimento de sua importância, sendo atribuído a Ashkin o Prêmio Nobel de Física [34-41]. No presente estudo, essa técnica apresenta papel crucial para o desenvolvimento e qualidade dos dados obtidos entre a interação das terras raras: Európio, Érbio, Itérbio e Neodímio e a molécula única de DNA. A Figura 6 mostra o aparato gerador da Pinça Óptica, na qual se desenvolveu o presente trabalho.

A pinça óptica utilizada consiste em um laser infravermelho de estado sólido $\lambda = 1064$ nm (CNI Laser, China) montado em um microscópio Nikon Ti-S invertido com uma objetiva com aumento de 100X e abertura numérica de 1.4, um piezoelétrico (PINano P-545, Physik Instrumente), um computador e um caminho óptico. O caminho óptico é a combinação de uma série de cubos e espelhos capazes de direcionar o laser para o microscópio. Este caminho óptico diminui a intensidade do feixe para a ordem de miliwatts (mW) obtendo forças da ordem de piconewtons (pN). O laser focalizado pela objetiva é usado para prender as esferas de poliestireno ligadas às moléculas de DNA, para que essas possam ser manipuladas e esticadas movendo o estágio do microscópio. Para realizar essa manipulação, usamos um dispositivo piezoelétrico [42-45].

Figura 6 – Aparato gerador da Pinça Óptica. Imagem realizada pela autora da tese.



3.1.1 PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO DE UMA PINÇA ÓPTICA

Basicamente o princípio de funcionamento de uma pinça óptica deve-se à competição de dois fenômenos ópticos: a reflexão e a refração do laser gaussiano, quando há a incidência do feixe de luz do laser sobre um objeto dielétrico com índice de refração maior do que o da solução onde está inserido. Para melhor descrevermos o princípio de funcionamento de uma pinça óptica farei a divisão desses dois fenômenos.

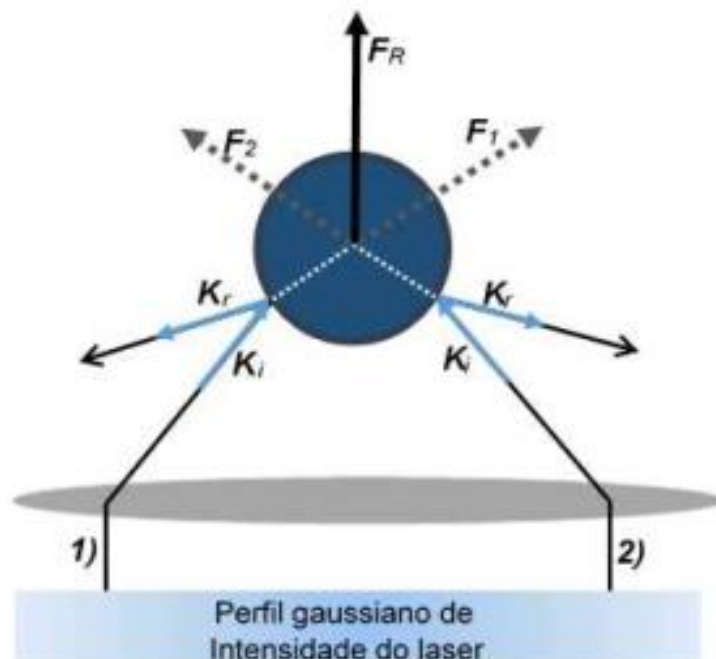
Sabe-se que de acordo com a teoria eletromagnética de Maxwell, a luz transfere momento quando incide no meio e reflete, devido à variação do momento, este meio sofre uma força (F_{rad}). A intensidade dessa força (F_{rad}) depende da pressão de radiação ($P_{rad} = \frac{2I}{c}$), onde I é a intensidade do laser e c a velocidade da luz no vácuo ($3 \times 10^8 \text{ m/s}$) e da área (A) sobre a qual o feixe incide. Ela depende também, da potência da luz incidente (mW) e da sua velocidade de propagação no meio [42-45]. Usando essas duas relações é possível estimar seu valor. Logo a variação de momento do laser gera uma força (F_{rad}) de,

$$F_{\text{rad}} = P_{\text{rad}} \cdot A = \frac{2P_{\text{ot}}}{c} = \frac{2 \times 10^{-3} \text{W}}{3 \times 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}} \cong 10 \text{ pN} \quad (1)$$

Sendo P_{ot} a potência do laser. A pressão de radiação é dada pela reflexão de parte da intensidade total incidente na microesfera.

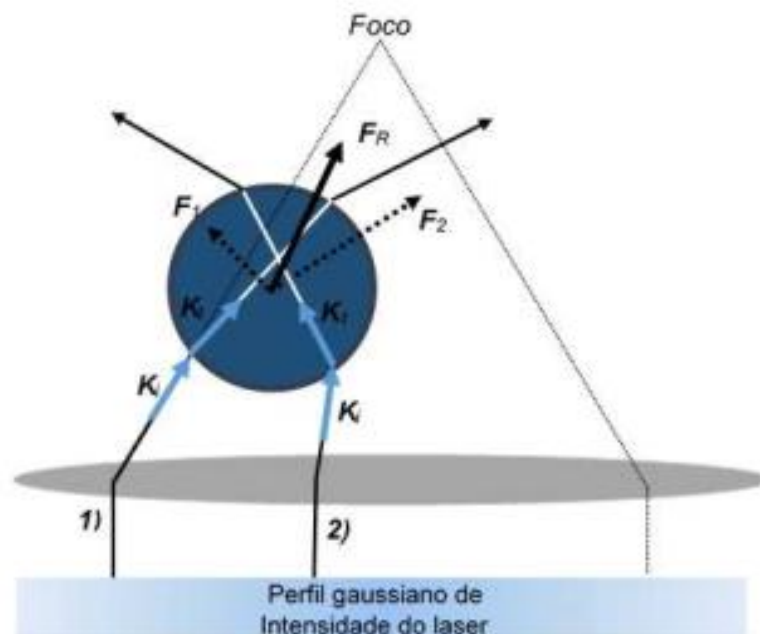
Para efetuarmos a análise qualitativa da pinça óptica e estudarmos a interação dos feixes do laser que incidem na objetiva, utilizamos uma microesfera dielétrica, com o intuito de evitar grande absorção e usufruir de sua simetria simples, como mostra a Figura 7. A reflexão desses raios na microesfera gera uma variação no momento do feixe, o qual é transferido para a microesfera. A força resultante \mathbf{F}_R que atua sobre a microesfera mediante a soma das ações das forças individuais dos dois feixes \mathbf{F}_1 e \mathbf{F}_2 empurram a microesfera para cima. A força resultante \mathbf{F}_R nada mais é do que a força de radiação (\mathbf{F}_{rad}) [42-45].

Figura 7 - Reflexão de dois feixes na superfície da microesfera. Os feixes incidem na objetiva (elipse cinza) e refletem na superfície da microesfera. A força resultante devido à radiação possui direção vertical e sentido de baixo para cima. Quanto mais intensa é a cor do perfil gaussiano maior o valor da intensidade do laser. A objetiva está representada pela elipse cinza na imagem. Imagem retirada de [45].



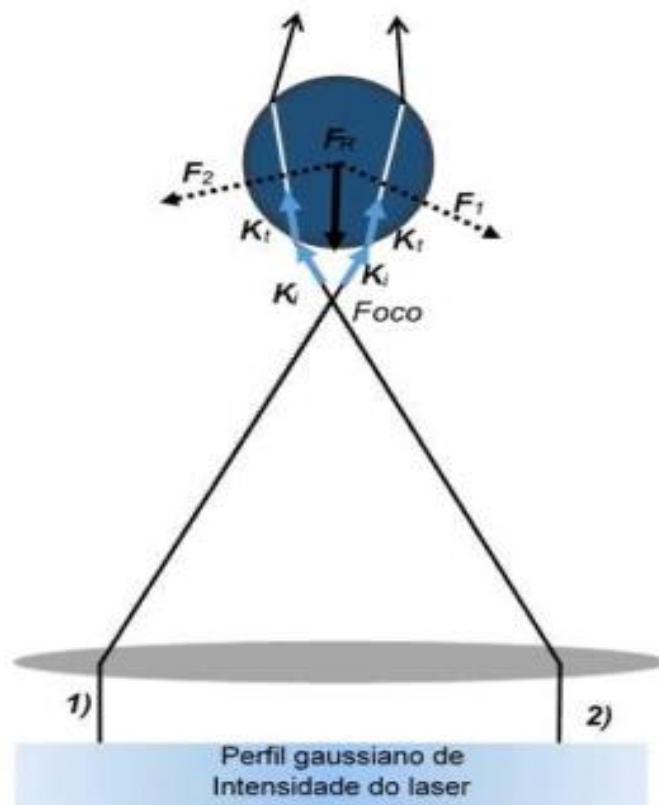
O segundo fenômeno que ocorre quando há a incidência de radiação sobre a microesfera é o fenômeno de refração dos raios incidentes mediante a mudança de meio, como mostra a Figura 8. Esse fenômeno gera outro tipo de força, chamada de força gradiente. Observe a figura abaixo, temos novamente dois feixes incidindo sobre a microesfera e por ela sendo refratados. Agora, a microesfera encontra-se à esquerda do perfil gaussiano de intensidade do laser e antes do foco da objetiva. Nota-se que quando o raio (1) incide na microesfera, mudando de meio, sua velocidade de propagação se altera (fenômeno de refração) e conseqüentemente é desviado da sua trajetória de incidência, causando uma variação do momento. Para que o momento total se conserve não violando assim os princípios físicos, o momento da microesfera também varia, mas em sentido contrário ao do raio incidente. Pela segunda lei de Newton para o raio (1) temos a força \mathbf{F}_1 como mostrado na figura, analogamente o mesmo fenômeno ocorre quando o raio (2) incide na microesfera, onde a força \mathbf{F}_2 possui maior intensidade comparada à força \mathbf{F}_1 devido ao perfil gaussiano de intensidade do laser (quanto mais intensa é a cor do perfil gaussiano maior o valor da intensidade do laser), a soma das forças \mathbf{F}_1 e \mathbf{F}_2 resulta na força \mathbf{F}_R que conduz a microesfera para o foco do laser.

Figura 8 - Microesfera posicionada à esquerda do perfil gaussiano de intensidade do laser e abaixo do foco da objetiva. Os raios incidentes são refratados pela microesfera. Imagem retirada de [45].



Outra situação possível é quando a microesfera encontra-se acima do foco, como mostra a Figura 9 novamente os feixes que incidem na microesfera sofrem refração. A força resultante agora conduz a microesfera para baixo, ou seja, mais uma vez a força resultante conduz a microesfera para o foco do feixe do laser. Logo, independentemente da microesfera estar acima ou abaixo do foco do laser, a força resultante dos feixes sempre a conduzirá para o foco do feixe do laser, ficando sempre aprisionada na região focal do laser [42-45].

Figura 9 - Microesfera posicionada acima do foco do laser. Força resultante de dois feixes sendo refratados após o foco do laser. Imagem retirada de [45].



Como mencionado anteriormente, o índice de refração da microesfera é maior do que o índice de refração do meio a qual ela se encontra, caso contrário, a força gradiente a qual ela é submetida mediante a refração dos raios incidentes nela não seriam capaz de conduzi-la em direção ao foco e sim para mais longe do mesmo. Logo, o pinçamento não ocorreria.

Vale enfatizar que para efetuarmos essa análise qualitativa simplificada e geométrica (onde o comprimento de onda λ é muito menor do que o raio da microesfera) estudamos apenas a interação entre dois feixes com a microesfera, porém, sabemos que no interior da

mesma ocorrem inúmeras reflexões e refrações. Caso tivéssemos um comprimento de onda λ muito maior que o raio da microesfera e considerássemos todas as reflexões e refrações existentes, esses resultados não mais seriam válidos, pois a óptica geométrica não seria capaz de descrevê-lo.

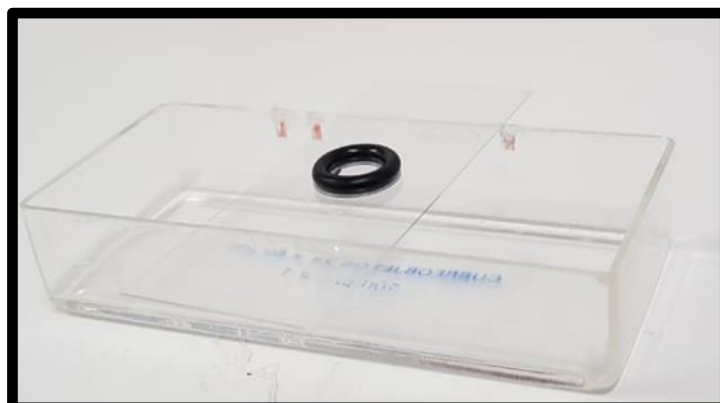
Para pequenos deslocamentos da microesfera temos um poço de potencial óptico. A curvatura desse poço é dada pela constante de força da pinça óptica K . Para potências altas do laser temos valores elevados de K que caracterizam poços mais fechados e abruptos, enquanto para potências baixas temos valores baixos de K e poços mais suaves e abertos, ou seja, quanto maior o valor de K maior será a estabilidade do pinçamento da microesfera.

3.1.2 ESTRUTURAÇÃO DO PORTA - AMOSTRA

O primeiro passo para a realização do experimento na pinça óptica é a construção e a preparação do porta-amostra utilizado. O porta-amostra é composto por um o-ring (um anel de borracha de raio 0,4 cm) e uma fina lamínula de vidro (a verificação da existência de apenas uma lamínula é algo importante a se fazer, pois é necessário garantir que duas ou mais lamínulas não estejam grudadas, visto que, elas são realmente muito finas, a espessura da lamínula é de aproximadamente 0,15 mm, e ao serem armazenadas, acabam colando uma nas outras, o que pode implicar, a perda do experimento).

A seguir, a fina lamínula de vidro é aquecida sobre uma chapa, e nesta mesma chapa, a parafina é derretida sobre outra lamínula mais grossa. Com o auxílio de uma pinça o o-ring é colocado sobre a parafina derretida, em seguida, é retirado e colocado sobre a fina lamínula de vidro, tem-se assim, o porta-amostra do experimento. Logo após, o porta-amostra é retirado da chapa e colocado sobre um suporte onde será resfriado a temperatura ambiente (como mostrado na Figura 10). Em seguida, é necessário a conferência da correta fixação e vedação do o-ring na lamínula, essa verificação é essencial para minimizar a ocorrência de possíveis vazamentos posteriores, o que acarreta a perda da solução experimental e/ou que o o-ring solte da lamínula durante a realização do experimento, perdendo assim, o experimento. Após a verificação, a superfície do porta-amostra é tratada.

Figura 10 - Porta amostra real sobre o suporte. Imagem realizada pela autora da tese.



3.1.3 TRATAMENTO DA SUPERFÍCIE INTERNA DELIMITADA PELO O-RING

Para a deposição da solução de estudo, composta pelo DNA do bacteriófago lambda biotilado e cada uma das terras raras, se faz necessário o tratamento do porta-amostra através do recobrimento da superfície, para que assim, seja possível a ligação de uma das extremidades do DNA biotilado à superfície da lamínula. O processo de recobrimento da superfície interna do o-ring inicia-se pela inserção de 20 μ l da proteína albumina de soro bovino biotilada, BSA-biot (em uma concentração de 1,9 mg/ml).

Após a deposição da BSA-biot no interior da lamínula, deve-se evitar o crescimento e a proliferação de bactérias na superfície recoberta. Para isso, o porta-amostra é direcionado ao fluxo, e permanece nele por 20 minutos com a luz ultravioleta acesa. Passados os 20 minutos, o porta-amostra é retirado do fluxo e o excesso da proteína depositada no interior da superfície delimitada pelo o-ring é subtraída. Em seguida, a superfície do interior do o-ring é lavada com 20 μ l de uma solução tampão, o tampão A, constituído de 40 mM de KCl, 25 mM de Tris HCl e 10 mM de MgCl₂, com 8,0 de pH.

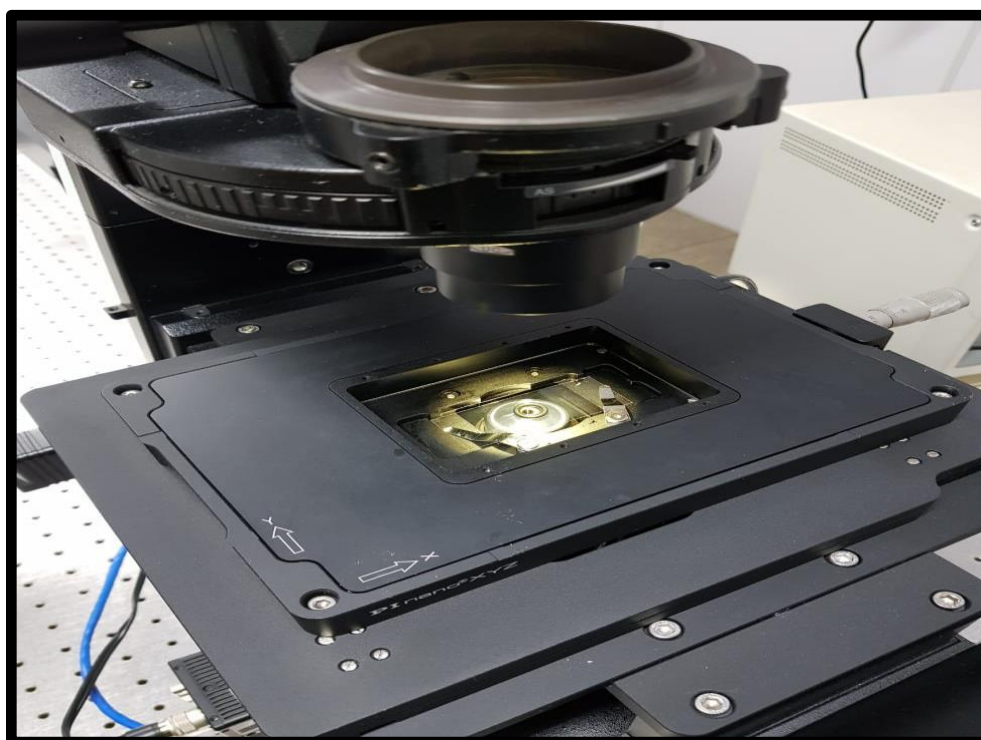
A afinidade existente entre a vitamina biotina e a proteína estreptavidina promove a ligação das mesmas às extremidades da molécula de DNA, de maneira que uma dessas extremidades biotiladas liga-se à microesfera e a outra à superfície da lamínula que está recoberta com a BSA-biot.

Após a lavagem com o tampão A, 20 μ l da proteína estreptavidina em solução tampão PBS (STP-PBS em concentração 0,25 mg/ml) é adicionada à superfície e novamente o porta-amostra é levado ao fluxo, permanecendo por mais 20 minutos. Essa parte do recobrimento da

lamínula é justificada pelo fato da necessidade de ligação da BSA biotinizada à proteína estreptavidina.

Novamente, retira-se o porta-amostra de dentro do fluxo para que o excesso do recobrimento com a estreptavidina seja subtraído com um auxílio de uma ponteira, e por fim, a última lavagem da superfície é realizada com 20 μ l da solução do tampão PBS com pH neutro (pH=7,4) a concentração de 150 mM, concluindo assim, o tratamento da superfície interna delimitada pelo o-ring. Em seguida, adiciona-se uma pequena gota de óleo na objetiva, para que assim, o porta-amostra seja colocado sob a luz do microscópio da pinça óptica por em média 15 minutos (como mostrado na Figura 11).

Figura 11 - Porta amostra sob luz intensa no estágio do microscópio da pinça óptica, o qual temos o piezoelétrico acoplado. Imagem realizada pela autora da tese.



3.1.4 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

A configuração ideal para efetuar o pinçamento óptico de uma molécula de DNA é dado por uma de suas extremidades ligada à superfície do porta-amostra que estará recoberta com a proteína estreptavidina, proteína essa, que possui uma afinidade significativa com a vitamina biotina e a outra extremidade ligada a microesfera de poliestireno, também recoberta com estreptavidina. Logo, o primeiro passo para que essa ligação aconteça é biotinilar o lambda

DNA (48.502 pares de bases, New England Biolabs) usado nos experimentos, ou seja, marcar suas extremidades com a vitamina biotina, o que chamamos de processo de biotinizaco.

A biotinizaco é realizada de antemão no laboratório (LFB) por um integrante do grupo. O DNA biotinado fica armazenado na caixa de estoque e é mantido refrigerado, garantindo assim, a qualidade e um padrão do DNA utilizado em todos os experimentos que seguem o mesmo protocolo por todos do grupo. A biotinizaco do DNA é fundamental e indispensável, devido à necessidade de ligao das extremidades da molécula de DNA   microesfera e   superfície da lamínula, tornando possível a realizao dos estiramentos necessários sem que suas extremidades se soltem, o que possibilita a permanência da mesma molécula de DNA durante todo o experimento [45].

A amostra é composta por 20 μ l de PBS (Phosphate Buffer Saline em concentrao de NaCl = 150 mM), uma soluço tampão com pH 7,4 previamente agitada no vortex, 6 μ l de λ DNA (48 kbp) biotinado, 100 vezes diluído, que inicialmente é levemente homogeneizado com a ajuda de uma pipeta e 0,6 μ l de microesferas de poliestireno (com diâmetro de 3 μ m) recobertas com estreptavidina (PS-STP). Inicialmente em estoque, a soluço de microesferas encontra-se praticamente transparente, como o volume é muito pequeno   necessário verificar a cor para garantir que realmente o volume necessário tenha sido pipetado, sendo assim, agita-se o eppendorf contendo a soluço de microesferas com o auxílio de um vortex até que o volume da soluço no eppendorf possua uma cor esbranquiçada, em seguida, retira-se o volume necessário e assim verifica-se a cor e o volume (os 0,6 μ l) na ponteira.

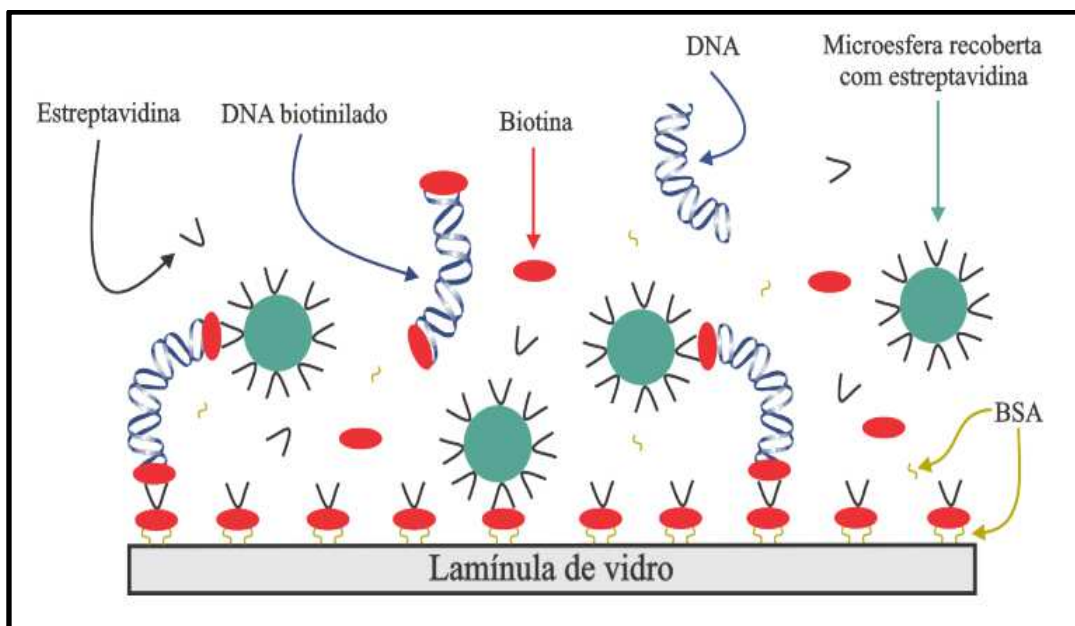
O próximo passo   homogeneizar delicadamente com o auxílio da pipeta toda a soluço da amostra: PBS + DNA + PS-STP e em seguida levar ao banho térmico que se encontra a uma temperatura de aproximadamente 37  C e deixá-la por uma hora. Logo após, o eppendorf é retirado de dentro do banho térmico e acrescenta-se 74 μ l de PBS previamente agitado no vortex, completando assim, um volume total de 100 μ l de soluço final que será levado ao porta-amostra previamente montado que já se encontra sobre o microscópio da pinça. Deposita-se a amostra no interior da superfície do o-ring do porta-amostra e aguarda-se de 30 a 60 minutos, para assim, dar início à procura das moléculas de DNA em condio ideal para realizar os estiramentos da mesma, com a pinça  ptica.

3.1.5 EXPERIMENTO

A configuração desejada para efetuar os estiramentos da molécula de DNA biotilado é dada por uma de suas extremidades adsorvidas na microesfera de poliestireno e a outra adsorvida na lamínula, ambas inicialmente recobertas com estreptavidina. A ligação da estreptavidina à lamínula dá-se mediante a ligação da biotina com a BSA à lamínula.

Existem diversas configurações possíveis (Figura 12) e deve-se garantir a configuração ideal para dar o início ao estiramento da molécula. Para isso, de imediato, procura-se por uma microesfera livre, em movimento browniano, e realiza-se a primeira puxada dessa microesfera.

Figura 12 - Possíveis situações de ligações da amostra depositada sobre a lamínula. Imagem retirada de [44].



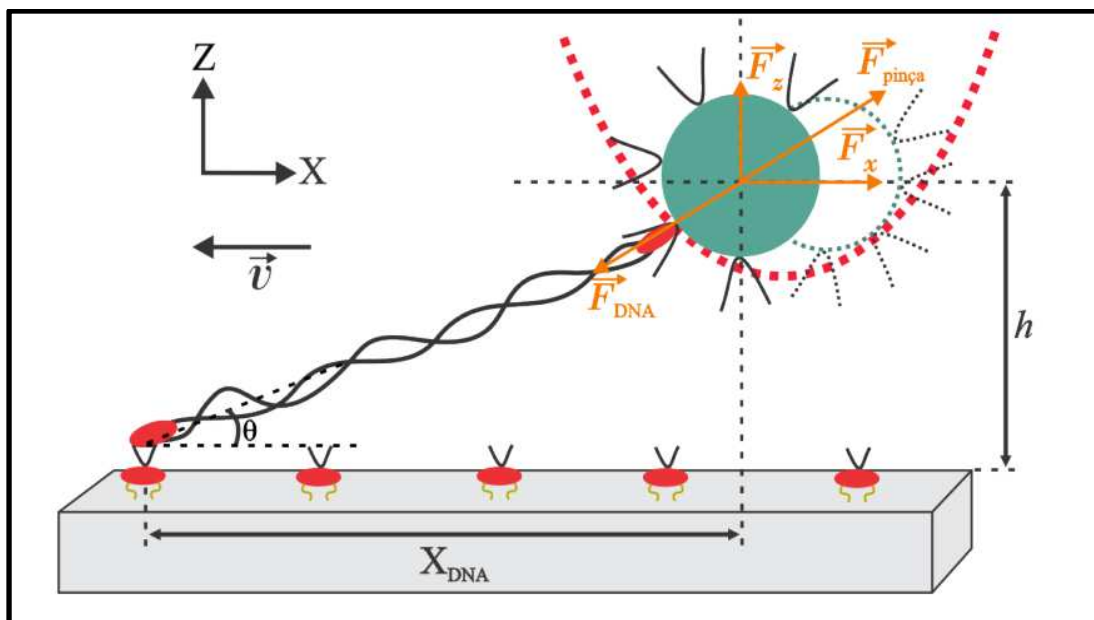
Ao realizar a puxada da microesfera com a pinça óptica observam-se dois comportamentos quanto ao seu deslocamento: a microesfera escapa do poço de potencial da pinça, indicando a presença da molécula de DNA na configuração ideal, caso contrário, a microesfera permanecerá dentro do poço de potencial e nenhuma molécula de DNA está adsorvida à microesfera.

Como não é possível enxergar de forma direta a molécula de DNA, o método que nos fornece uma indicação da existência de apenas uma molécula de DNA adsorvida na microesfera é adotado: realiza-se puxadas em sentidos opostos e compara-se o tempo que a microesfera leva para escapar do poço de potencial da pinça. Caso o tempo seja praticamente o mesmo nos dois

sentidos, temos a indicação da existência de apenas uma molécula de DNA adsorvida na microesfera.

A partir da configuração ideal em equilíbrio eletrostático, iniciam-se os primeiros estiramentos da molécula com a técnica de pinçamento óptico (Figura 13). A verificação do padrão do DNA é necessária, ou seja, as propriedades mecânicas básicas de acordo com as especificações do fabricante. O comprimento de contorno (L) e o comprimento de persistência (A) da molécula de DNA utilizada possuem medida padrão entre $14 \mu\text{m} < L < 21 \mu\text{m}$ e $40 \text{ nm} < A < 50 \text{ nm}$, respectivamente.

Figura 13 - Estiramento da molécula de DNA. A microesfera sofre forças de módulos iguais pela pinça e pelo DNA. Imagem retirada de [46].



Devido à baixa velocidade de deslocamento do estágio do microscópio ($v = 0,1 \mu\text{m/s}$), considera-se que o experimento acontece em um regime quase-estático, desprezando assim, a força de Stokes que existe sobre a microesfera. Logo, a força que a pinça óptica realiza sobre a microesfera é idêntica em módulo à força que a molécula de DNA realiza sobre a mesma.

Todo o experimento é filmado, sendo possível a determinação da posição do centro de massa da microesfera em função do tempo $x(t)$. Logo, sabendo a posição da microesfera quando esta está no fundo do poço de potencial da pinça óptica e tomando essa posição como sendo a posição inicial $x(0)$ é possível obter seu deslocamento em função do tempo decorrido do estiramento.

$$\Delta x(t) = x(t) - x(0) \quad (2)$$

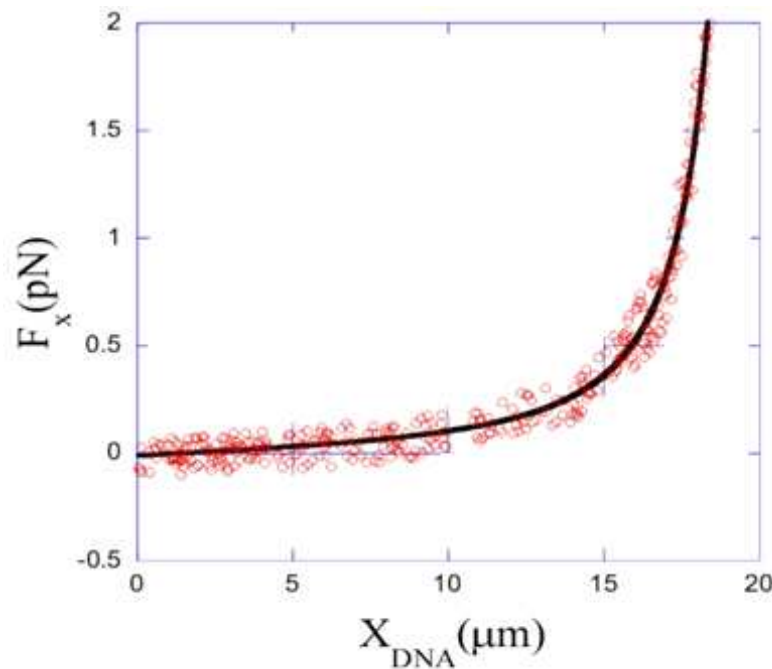
Sendo assim, a força que o DNA exerce sobre o microesfera é dada em função do tempo por,

$$F(t) = k \cdot \Delta x(t) \quad (3)$$

em que k é a constante de força da pinça óptica.

Mediante ao procedimento adotado acima, podemos obter a curva que descreve o comportamento do componente x da força que o DNA exerce sobre a microesfera em função da extensão x da molécula de DNA no regime entrópico (Figura 14).

Figura 14 - Curva de força de um DNA que se encontra dentro do regime entrópico com um valor máximo de força de 2 pN. Imagem adaptada de [44].



Nota-se que essa curva encontra-se ajustada pela equação do Modelo WLC (Apêndice B) que nos possibilita encontrar as propriedades mecânicas: comprimento de contorno e comprimento de persistência da molécula de DNA. A expressão de Marko e Siggia para a força entrópica em função da extensão é dada por

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4(1 - \frac{z}{L})^2} - \frac{1}{4} \right] \quad (4)$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, A o comprimento de persistência, L o comprimento de contorno e z é a extensão da molécula de DNA. A expressão acima se trata de uma aproximação que diverge quando o valor da extensão z da molécula de DNA é igual ao comprimento de contorno L .

Tendo a molécula de DNA em equilíbrio e com as propriedades mecânicas dentro dos parâmetros ideais, os estiramentos são realizados (esticar a molécula de DNA até que ela escape do poço de potencial). Em média, cinco estiramentos são realizados para uma mesma molécula para obtenção de parâmetros confiáveis possibilitando passar para a próxima etapa do experimento, a troca de alíquotas.

Alíquotas é o nome dado à solução de estudo que será acrescentada a amostra diretamente no interior do o-ring. Em um mesmo experimento, várias trocas de alíquotas são realizadas, a diferença entre essas alíquotas se dá basicamente pela concentração do ligante estudado em meio ao tampão utilizado. Após encontrar o DNA, as medidas dele puro (sem ligante) são realizadas, em seguida, trocam-se as alíquotas, ou seja, a cada troca, uma nova concentração do ligante estudado é acrescentada à solução anterior, para assim, avaliar o comportamento mediante a molécula de DNA escolhida.

A deposição da solução da alíquota ocorre logo após a retirada de parte da solução de DNA puro (sem a presença de qualquer ligante) no interior do o-ring. Isso se torna necessário, pois o volume que o o-ring comporta não seria suficiente para o acréscimo das soluções das alíquotas, e também, é uma maneira de lavarmos a amostra, retirando possíveis “sujeiras” e bolinhas sem DNA presentes. A troca é feita com extremo cuidado, pois é necessário garantir a menor perturbação possível ao DNA capturado.

Ao depositar a primeira alíquota na solução de DNA puro, aguarda-se o tempo de reação do ligante à molécula de DNA escolhida (~30 minutos). É importante ressaltar que o DNA permanece todo esse tempo pinçado pela pinça óptica. Devem-se ficar atento observando a imagem do DNA pinçado no monitor do computador, pois como dito, temos que garantir que o DNA não seja perturbado, e sujeiras e/ou outros DNAs presentes na amostra podem grudar na molécula escolhida, logo, caso apareçam, deve-se retirá-los de perto da molécula.

Após o tempo de reação, inicia-se os estiramentos do DNA-ligante, novamente, 5 puxadas são realizadas e a média para obtenção dos parâmetros referentes às propriedades mecânicas é calculada. O procedimento se repete em todas as demais alíquotas trocadas e ao

fim do experimento, uma relação entre as concentrações dos ligantes mediante a interação com a molécula de DNA e as propriedades mecânicas da mesma (comprimento de contorno e comprimento de persistência), é encontrada.

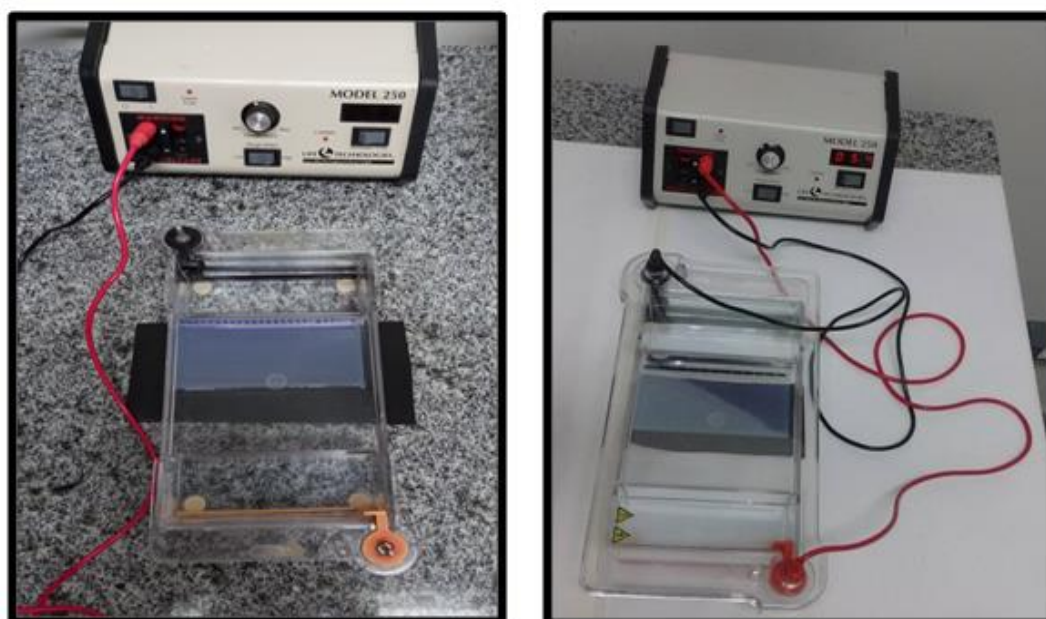
3.2 ELETROFORESE

A técnica de eletroforese é uma técnica molecular significativamente mais simples, mas não menos importante, se comparada à técnica de pinça óptica, ambas utilizadas no presente trabalho. Diferentemente da técnica de pinçamento óptico, a qual é possível o estudo de moléculas únicas, a eletroforese é uma técnica de estudo de múltiplas moléculas. A combinação dessas duas técnicas vem sendo desenvolvida em vários estudos por promover resultados de extrema importância e maior abrangência molecular, seja para estudo de proteínas, DNA, RNA e interações destes com diversos ligantes [47-59].

Basicamente o equipamento de eletroforese compreende-se de uma cuba de vidro onde colocamos uma solução eletrolítica e submetemos uma diferença de potencial entre suas extremidades mediante a ligação da mesma a uma fonte de tensão contínua por meio de dois eletrodos em forma de placas paralelas, e um gel, onde depositamos a solução de estudo em seus poços (pequenos buracos formados pelos pentes na espessura do gel), como mostrado na Figura 15.

Figura 15 - Cuba eletrolítica com soluções depositadas no gel. Experimento em andamento.

Imagem realizada pela autora da tese.



A visualização do DNA dada pela técnica molecular de eletroforese em gel de agarose baseia-se na caracterização do comprimento de suas moléculas separadas pelo campo elétrico a qual a cuba é submetida. A solução de estudo (DNA - Terra rara - tampão (TAE 10x diluído)) previamente preparada, é depositada nos pocinhos do gel que se encontra mergulhado na solução eletrolítica. A solução eletrolítica da cuba é dada por uma solução tampão que mantém constante o pH e transmite eletricidade. Em seguida, liga-se a cuba à fonte, deposita-se a solução no gel de agarose que já se encontra submerso na solução eletrolítica e assim, inicia-se a corrida eletroforética.

A migração das moléculas de DNA pelos poros do gel de agarose inicia-se imediatamente após o início da corrida, submetidas a uma corrente elétrica gerada pela diferença de potencial da fonte de tensão ligada ($d_{dp} = 64V$), esta corrente separa as moléculas de DNA pelo tamanho. Como sabemos, o DNA possui carga elétrica negativa devido à presença dos grupos fosfatos, e assim será atraído pelo pólo positivo da cuba. A migração da molécula de DNA pelo gel de agarose está atrelada ao seu tamanho, quanto maior for a molécula, menor será a sua velocidade de migração no gel, logo, moléculas menores migram mais rapidamente e percorrem uma distância maior.

Após 90 minutos de corrida retira-se o gel da cuba e coloca-o por 20 minutos em um banho de brometo de etídio, esse protocolo justifica-se pela necessidade de visualização das bandas formadas mediante a migração do DNA pelo gel. O brometo de etídio é um corante que ligado ao DNA e exposto à luz ultravioleta fluoresce no visível. Após os 20 minutos, retira-se o gel do banho e leva-o ao transiluminador para expor o gel à luz ultravioleta para visualização das bandas.

3.2.1 PREPARAÇÃO DO GEL DE AGAROSE

A primeira etapa a ser executada quanto à preparação do gel de agarose é a pesagem do pó de agarose em uma balança de alta precisão. A agarose utilizada é da SIGMA ALDRICH e a quantidade utilizada é de 1% em massa. A corrida de moléculas de DNA e a separação das mesmas ao percorrer o gel dependem da concentração do gel, assim como, da diferença de potencial a qual a cuba é submetida. Caso a porcentagem da concentração em massa exceda, possivelmente haverá exclusão de proteínas pelo gel durante a corrida, alterando os dados experimentais, diminuindo assim, a precisão da medida.

Após a pesagem da agarose, acrescenta-se o tampão TAE 10x e o TRIS, em seguida esta solução é levada ao microondas para aquecimento, até que todo o pó da agarose esteja dissolvido na solução, em torno de 45 segundos. Imediatamente após essa diluição, a solução é despejada no recipiente composto por um suporte de plástico, onde uma caixa de acrílico está encaixada e juntos comportam a solução de agarose. Por fim, o pente é encaixado para a formação dos pocinhos de deposição das soluções, assim que a solução da agarose esfriar, o gel de agarose estará formado (Figura 16).

Figura 16—Montagem do recipiente utilizado para formação do gel e poços de deposição. Gel de agarose. Imagem realizada pela autora da tese.



O próximo passo é dado pela retirada do pente do gel, deve-se remover o pente com muito cuidado, pois ele é responsável pela formação e a qualidade geométrica e volumétrica dos pocinhos de deposição. Outro processo relevante é quanto à retirada da caixa de acrílico do suporte de plástico, ao descolá-la devemos garantir a subtração de possíveis excessos de gel ao redor da caixa de acrílico, pois eles poderão perturbar a corrida alterando a direção da movimentação da solução no gel. E por fim, o gel é colocado dentro da cuba eletrolítica.

3.2.2 PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Inicialmente, tinham-se somente óxidos de terras raras em pó, logo a necessidade de dissolvê-los, a dissolução foi realizada com ácido clorídrico concentrado (37,2%) chegando a uma concentração final de 1g/L de terra rara, ou seja, para a dissolução de óxido de európio em ácido clorídrico concentrado, por exemplo, usamos 0,058g de óxido de európio e 3,12 ml de ácido clorídrico. O processo é feito por gotejamento do ácido sobre a terra rara em pó, em

seguida evaporamos o cloro em excesso e adicionamos água destilada e deionizada obtendo um volume de 50 ml de solução em HCl 2 mol/L e por fim ajustamos o pH.

As amostras são compostas de DNA e por uma terra rara, sendo elas: Európio, Érbio, Neodímio e Itérbio nas concentrações escolhidas, diluídas em tampão Tris-HCl 10 mM. A concentração de DNA foi mantida fixa em todos os poços, e em todos os experimentos de todas as quatro terras raras, enquanto as concentrações das terras raras aumentaram para cada poço, permitindo verificar os efeitos dos compostos em uma ampla faixa de concentrações. Os ensaios foram realizados usando dois tipos de moléculas de DNA de fita dupla: um DNA linear de 3 kbp e o plasmídeo PBR 322 (ThermoFischer), a fim de avaliar os efeitos de terras raras nas moléculas de DNA linear e circular.

É importante ressaltar a necessidade do acréscimo do DYE na solução da amostra composta pela molécula de DNA, a terra rara e o TRIS para a deposição nos pocinhos do gel. O DYE é um marcador de corrida capaz de aumentar a densidade da solução, fazendo com que a solução de estudo não se misture à solução da cuba eletrolítica, evitando a perda do volume de solução dentro dos pocinhos, o que acarretaria no aumento de erros nas medições e a credibilidade do experimento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados todos os resultados obtidos para a interação entre as terras raras e a molécula de DNA para as duas técnicas utilizadas, sendo elas, a Pinça Óptica e a Eletroforese. Os dados obtidos pela técnica de pinçamento óptico serão apresentados pelas curvas de força-extensão (FECs) coletadas para várias concentrações de európio, érbio, itérbio e neodímio nas amostras. As propriedades mecânicas, comprimento de persistência e comprimento de contorno, dos complexos Eu_2O_3 -DNA, Er_2O_3 -DNA, Yb_2O_3 -DNA e Nd_2O_3 -DNA foram determinadas ajustando as FECs experimentais à fórmula de Marko-Siggia (WLC) [60]. Já os dados obtidos pela corrida eletroforética serão apresentados através das imagens realizadas pelo transiluminador.

4.1 ÓXIDO DE EURÓPIO

Para avaliar os efeitos da força iônica do tampão na interação Eu_2O_3 com o DNA, realizamos as medições usando duas soluções diferentes de PBS. Os resultados para as propriedades mecânicas dos complexos Eu_2O_3 formados com DNA são resultados médios sobre medições realizadas usando moléculas de DNA diferentes (pelo menos 6 DNAs diferentes). Para cada DNA individual utilizado, foram coletados pelo menos 5 FECs para cada concentração de Eu_2O_3 . Todas as barras de erro apresentadas foram calculadas como o erro padrão da média dessas experiências. Na Tabela 1, temos a relação da composição dos dois tampões PBS utilizados no experimento.

Tabela 1: Composição dos dois tampões PBS usados.

Força iônica	NaCl	Na_2HPO_4	NaH_2PO_4
1.4 mM	0	0.4375 mM	0.125 mM
154 mM	140 mM	4.375 mM	1.25 mM

4.1.1 ESPECTROSCOPIA DE FORÇA

Um modelo estatístico para interações de DNA com pequenos ligantes foi desenvolvido por nosso grupo [11, 62]. O modelo permite extrair os parâmetros de ligação de uma interação específica a partir dos dados do comprimento de persistência em função da concentração do

ligante na amostra [62]. Resumidamente, para ligantes de DNA que induzem uma alteração monotônica no comprimento da persistência após a ligação (que é o caso do Eu_2O_3 , como mostraremos mais adiante), o valor medido efetivo (A_E) desse parâmetro pode ser escrito como [11]

$$\frac{1}{A_E} = \frac{1 - \frac{r}{r_{max}}}{A_0} + \frac{r}{r_{max} A_1} \quad (5)$$

onde A_0 é o comprimento de persistência da molécula de DNA pura, A_1 é o comprimento de persistência local induzido pelo ligante após a ligação em um local (ou equivalente, o comprimento de persistência na saturação do ligante ligado), r é a fração do local ligado (fração de DNA por pares de bases ocupados pelos ligantes ligados) e r_{max} é o valor de saturação de r [11]. O A_E pode estar relacionado aos parâmetros de ligação da interação usando uma isoterma de ligação que captura a físico-química dessa interação.

Uma isotérmica de ligação bem conhecida é o modelo de Hill (Apêndice C), que é o modelo mais simples que explica a cooperatividade nas reações de ligação [11, 63]. Pode ser escrita como

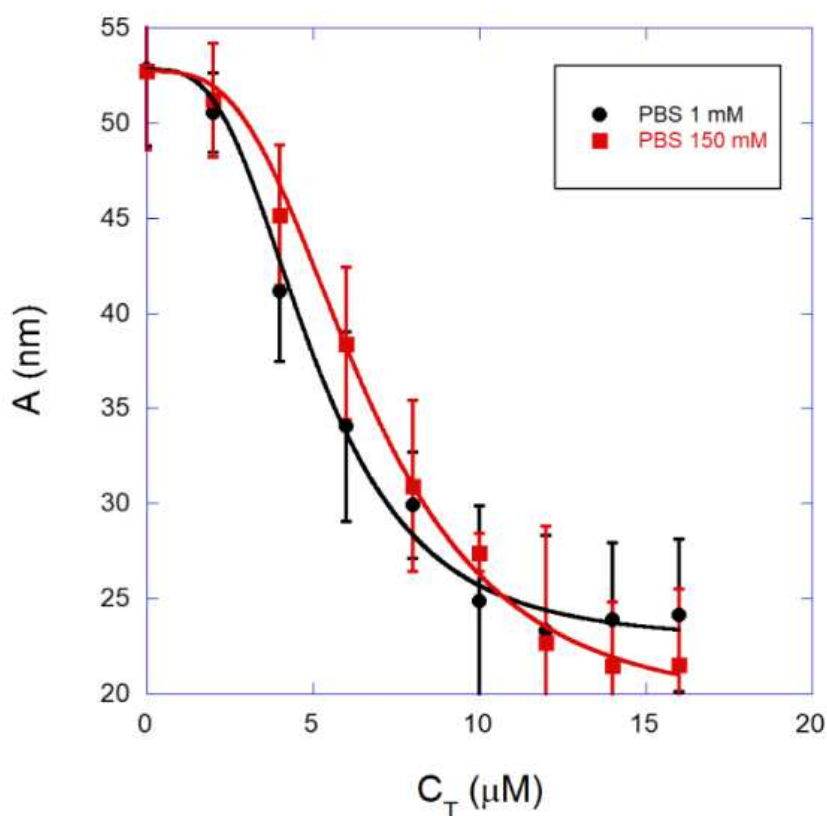
$$\frac{r}{r_{max}} = \frac{(KC_f)^n}{1 + (KC_f)^n} \quad (6)$$

onde C_f é a concentração do ligante livre (não ligado ao DNA), K é a constante de ligação da associação de equilíbrio e n é o expoente de Hill, um parâmetro que mede o grau de cooperatividade das reações de ligação. Se $n > 1$, a interação é positivamente cooperativa, por exemplo, uma molécula de ligante ligado aumenta a afinidade efetiva do DNA para a ligação subsequente ao ligante. Se $n < 1$, caso contrário, a interação é negativamente cooperativa e uma molécula de ligante ligado diminui a afinidade efetiva do DNA para a ligação subsequente ao ligante. Se $n = 1$, a interação não é cooperativa e a afinidade efetiva é independente do número de moléculas de ligantes ligadas.

Qualquer isoterma de ligação pode ser conectada à Eq. 5 para ajustar os dados experimentais do comprimento da persistência em função da concentração do ligante. Os parâmetros de ligação e os comprimentos de persistência local são deixados como parâmetros ajustáveis a serem determinados. Os detalhes dessa metodologia podem ser encontrados em um artigo de revisão [11].

Na Figura 17, mostramos o comprimento de persistência dos complexos DNA-Eu₂O₃ em função da concentração total de Eu₂O₃ na amostra, C_T , para os dois tampões utilizados: PBS 1,4 mM (círculos pretos) e PBS 154 mM (quadrados vermelhos). O nosso modelo estatístico e a isoterma de Hill, também são mostrados na figura como linhas sólidas.

Figura 17 - Comprimento de persistência dos complexos DNA-Eu₂O₃ em função da concentração de Eu₂O₃ na amostra, C_T , para os dois tampões utilizados: PBS 1,4 mM (círculos pretos) e PBS 154 mM (quadrados vermelhos).



Observe que os dois conjuntos de dados são indistinguíveis dentro das barras de erro, mostrando que a interação é independente da força iônica do tampão circundante. Esta conclusão é confirmada observando os resultados obtidos para os parâmetros de ligação retornados, que são os mesmos dentro das barras de erro para os dois tampões usados. Esses resultados estão resumidos na Tabela 2. O fato de a interação ser independente da força iônica sugere fortemente uma contribuição eletrostática insignificante para a presente interação. Esse resultado era algo esperado, uma vez que as moléculas Eu₂O₃ devem ser muito estáveis e neutras em solução, sem que ocorra dissociação.

Tabela 2: Parâmetros de ligação e comprimentos de persistência local obtido a partir do ajuste do modelo para os dois tampões utilizados.

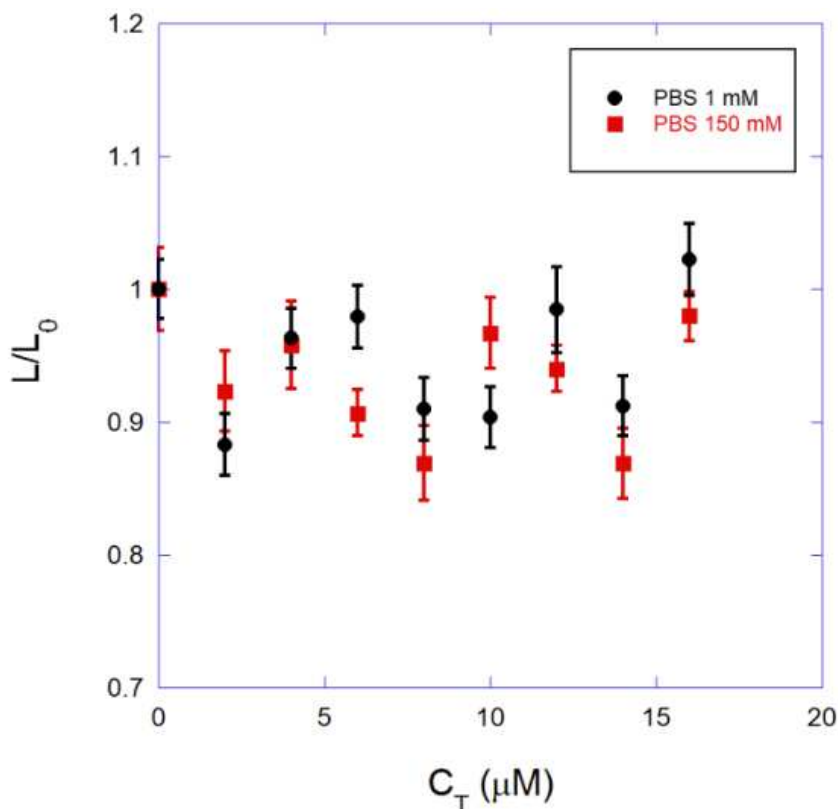
Tampão	K (M ⁻¹)	N	A ₁ (nm)
PBS [Na] = 1 mM	$(1.6 \pm 0.3) \times 10^5$	3.3 ± 0.5	22 ± 2
PBS [Na] = 150 mM	$(1.2 \pm 0.3) \times 10^5$	3.3 ± 0.4	20 ± 3

O valor retornado para a constante de ligação de equilíbrio ($K \sim 10^5 \text{M}^{-1}$) é alto, na mesma ordem de magnitude de muitos intercalantes e alguns ligantes de fenda [65-68], mostrando que o európio possui uma afinidade considerável para a molécula de DNA. Tais resultados sugerem que esse elemento de terras raras pode ser possivelmente usado no design racional de novos medicamentos anticancerígenos promissores. O európio é de fato o mais reativo dos lantanídeos, que são muito pouco estudados em suas possíveis interações com ácidos nucleicos. O resultado obtido para o expoente de Hill ($n \sim 3,3$), por outro lado, mostra que o Eu_2O_3 se liga cooperativamente ao longo da dupla hélice, formando aglomerados de cerca de ~ 3 moléculas [62, 69]. Qualitativamente, esse comportamento cooperativo está relacionado à forma sigmoideal das curvas de comprimento de persistência da Figura 17, que indica uma reação de ligação positivamente cooperativa [11].

Finalmente, o resultado obtido para o comprimento de persistência saturado $A_1 \pm 20$ nm reflete o fato de que Eu_2O_3 diminui a rigidez à flexão eficaz do DNA em cerca de $\pm 60\%$ na saturação, indicando que as dobras são formadas nos locais de ligação ao longo da dupla hélice.

Na Figura 18, mostramos o comprimento de contorno correspondente L (normalizado como o valor de DNA puro L_0) dos mesmos complexos DNA- Eu_2O_3 em função da concentração de Eu_2O_3 na amostra para os dois tampões de PBS. Observe que esse parâmetro mecânico permanece basicamente constante à medida que mais Eu_2O_3 se liga ao DNA. Tal resultado indica que o Eu_2O_3 não altera a distância média entre pares de bases adjacentes ao longo da estrutura de dupla hélice após a ligação. As moléculas Eu_2O_3 são muito pequenas e tendem a formar pequenos aglomerados de apenas 3 moléculas, como demonstrado a partir dos dados do comprimento da persistência. Além disso, a molécula não possui nenhum anel aromático capaz de promover a intercalação, nem possui carga líquida capaz de promover algum tipo de compactação de DNA. Assim, é realmente esperado que o comprimento do contorno permaneça constante em tal situação, conforme medido aqui.

Figura 18 - Comprimento do contorno L (normalizado como o valor de DNA puro L_0) dos complexos DNA- Eu_2O_3 em função da concentração de Eu_2O_3 na amostra, C_T , para os dois tampões utilizados: PBS 1,4 mM (círculos pretos) e PBS 154 mM (quadrados vermelhos).



Portanto, com base nos dados de persistência e comprimento do contorno, propomos que o Eu_2O_3 se ligue cooperativamente fora da dupla hélice, provavelmente nas fendas do DNA, formando aglomerados de cerca de ~ 3 moléculas. Da mesma forma que muitos ligantes de fenda, esses aglomerados promovem dobras que diminuem o comprimento efetivo de persistência do complexo formado, mas não alteram o comprimento do contorno. Tais resultados sugerem que o Európio sozinho apresenta uma afinidade considerável com o DNA de fita dupla e, portanto, pode ser considerado para o design racional de novos medicamentos à base de metal para quimioterapias.

4.1.2 ELETROFORESE EM GEL

As Figuras 19 e 20 mostram ensaios típicos de eletroforese com duas moléculas de DNA diferentes, respectivamente, o DNA linear de 3 kbp e o plasmídeo PBR322. Os poços do gel são numerados de 1 a 13 nas figuras e os números na parte inferior de cada figura são as razões da concentração de Eu_2O_3 pela concentração de pares de bases de DNA usadas. A taxa máxima de concentração de Eu_2O_3 por DNA de pares de bases usada em nossos experimentos de

espectroscopia de força foi de ± 10 isto é, os ensaios de eletroforese contêm a faixa de concentração usada nas experiências de espectroscopia de força.

Figura 19 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA linear de 3 kpb. Observe que a intensidade da fluorescência não apresenta comportamento sistemático e não há atraso ou avanço nas execuções à medida que a concentração de Eu_2O_3 aumenta.

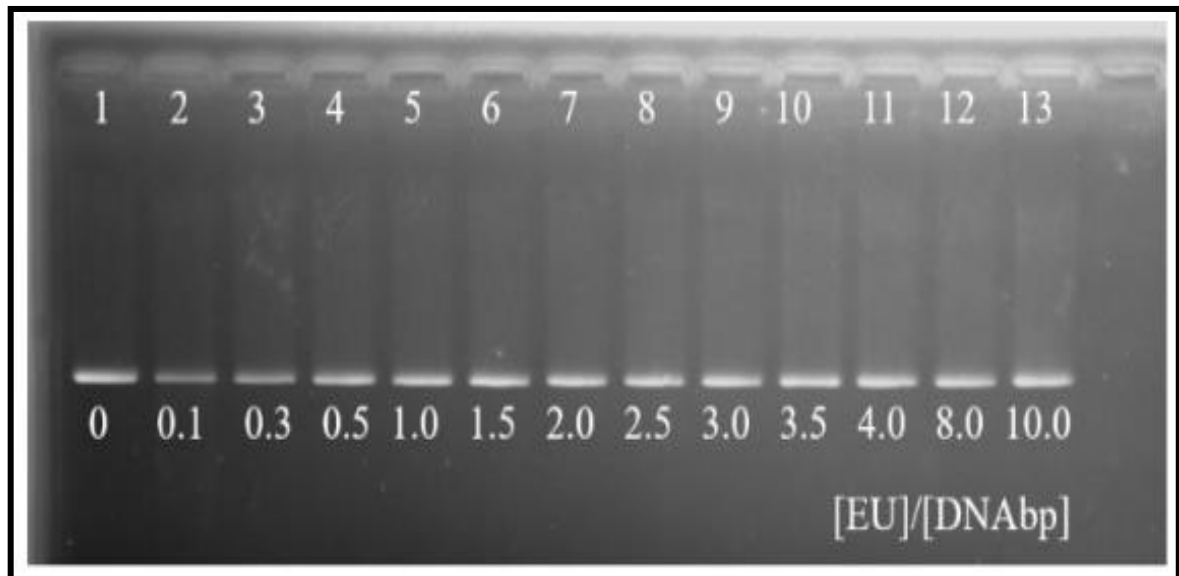
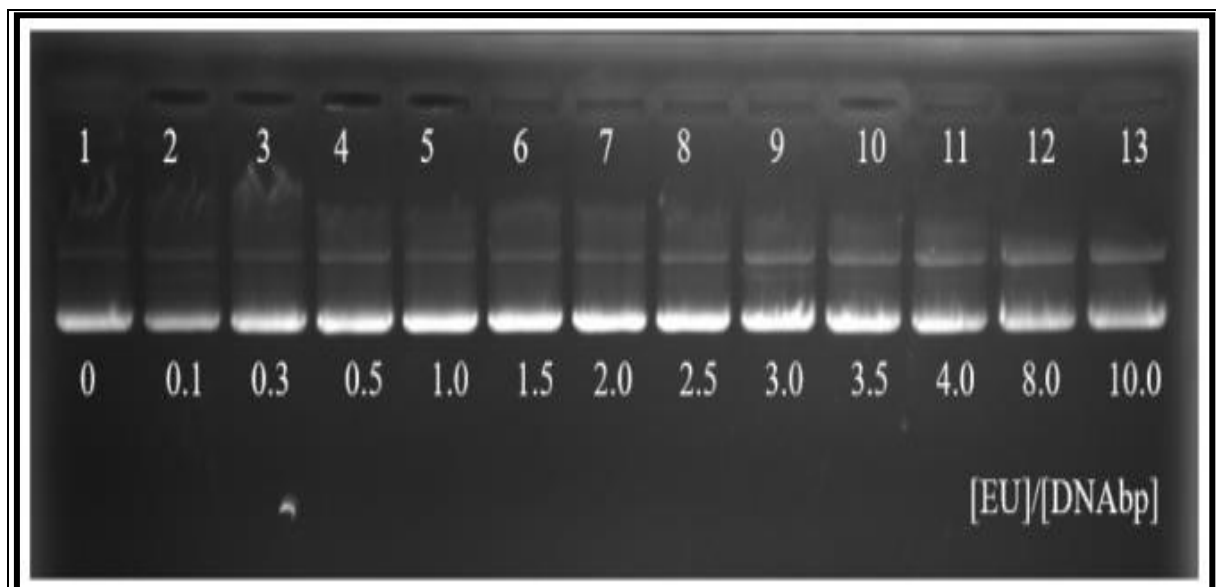


Figura 20- Resultado equivalente da Figura 19 obtido para moléculas de DNA do plasmídeo PBR322.



Observe que, para ambos os tipos de DNA, a intensidade da fluorescência não apresenta comportamento sistemático e não há atraso ou avanço nas bandas à medida que a concentração de Eu_2O_3 aumenta. Tais resultados confirmam as conclusões obtidas nos experimentos de espectroscopia de força. Não há contribuição eletrostática significativa para a ligação do Eu_2O_3 ao DNA; caso contrário, a carga líquida reduzida dos complexos formados atrasaria as bandas à medida que a concentração de Eu_2O_3 aumentasse. Por outro lado, a ligação de Eu_2O_3 não interfere na intercalação de EtBr na dupla hélice; caso contrário, seria de esperar uma mudança sistemática na intensidade da fluorescência à medida que mais Eu_2O_3 é ligado. Tal resultado sugere que o Európio pode ser usado em experimentos simultaneamente com intercalantes, não interferindo na ação de tais moléculas.

4.2 ÓXIDO DE ÉRBIO

O elemento terra rara Érbio apresentou comportamento bem intrigante, tanto nos dados experimentais da técnica de pinçamento óptico quanto da técnica de eletroforese. Devido a esse fato, buscamos varrer um intervalo maior de suas concentrações na presença da molécula de DNA pelas duas técnicas, assim como, realizar experimentos de forças altas na pinça óptica, saindo assim, do regime entrópico e indo para o regime entálpico [11, 45].

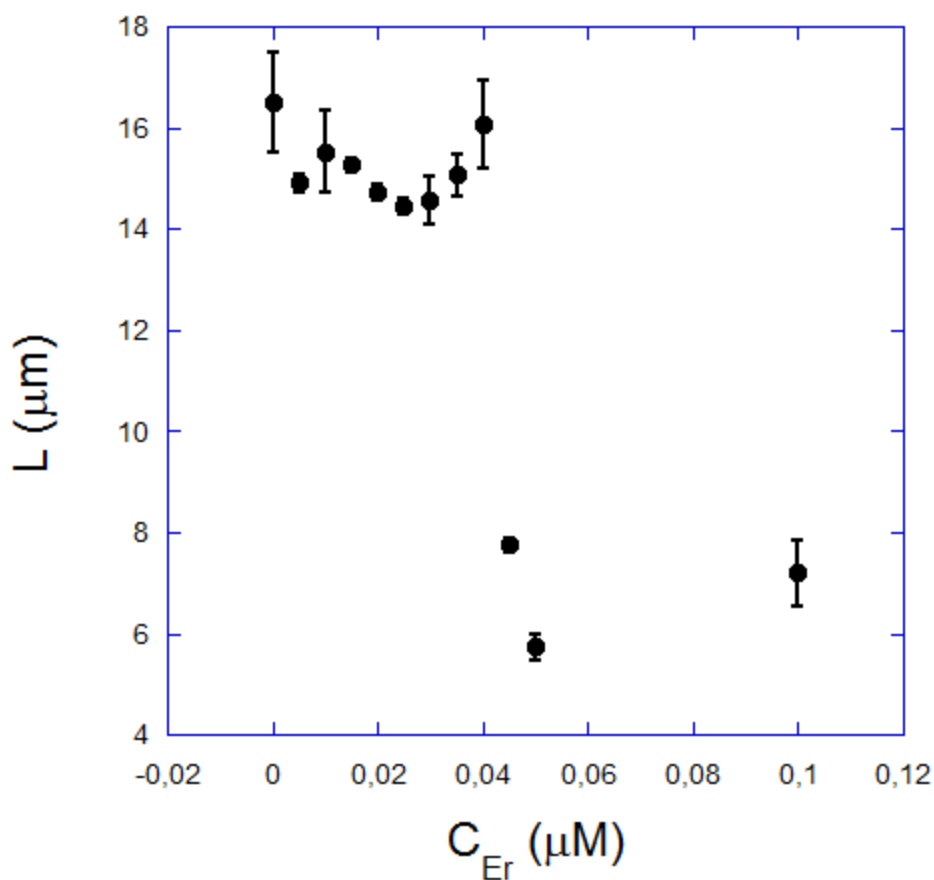
A principal diferença entre esses regimes é dada por: no regime entrópico busca-se a análise de modos de ligação, enquanto no regime entálpico busca-se a análise da descompactação e desnaturação de complexos. Outro fator relevante é a intensidade da força a qual a molécula de DNA é submetida e o que essa diferença de intensidade da força pode causar à estrutura química da molécula. O regime entálpico está na faixa de forças altas (em torno de 65 pN), nessa intensidade de forças temos alteração de características intrínsecas do material, por exemplo, durante um estiramento da molécula pode ocorrer a ruptura das ligações de hidrogênio. Logo, após ser estirado ele não necessariamente retornará a sua conformação de equilíbrio, pois pode ter ocorrido a danificação de sua estrutura química; o processo pode ser irreversível [11, 45].

Já o regime entrópico está na faixa de baixas forças (em torno de 2 – 10 pN), nessa faixa a molécula de DNA retorna a sua conformação de equilíbrio após o estiramento, devido à força restauradora entrópica, nessa faixa de força a estrutura química da molécula não é alterada, ou seja, preserva-se as ligações da molécula [11, 45].

4.2.1 ESPECTROSCOPIA DE FORÇA

A Figura 21 mostra o comportamento do comprimento de contorno, L , dos complexos DNA- Er_2O_3 em função da concentração total C_T , de Er_2O_3 , na amostra. Como podemos observar o comprimento de contorno sofre em média um ligeiro decréscimo no seu valor à medida que a concentração de Er_2O_3 aumenta de forma branda ($0,0$ (DNA puro) - $0,0025 \mu\text{M}$). Já para concentrações um pouco maiores de Er_2O_3 ($0,025 \mu\text{M}$ - $0,040 \mu\text{M}$) temos um leve crescimento. Esse comportamento suave na mudança do comprimento de contorno tanto para o decréscimo quanto para o crescimento, remete que a combinação dessas faixas de baixas concentrações de Er_2O_3 e o regime entrópico (baixas forças) não são suficientes para condensar a molécula de DNA.

Figura 21 - Comprimento do contorno L dos complexos DNA- Er_2O_3 em função da concentração de Er_2O_3 na amostra, C_{Er} .

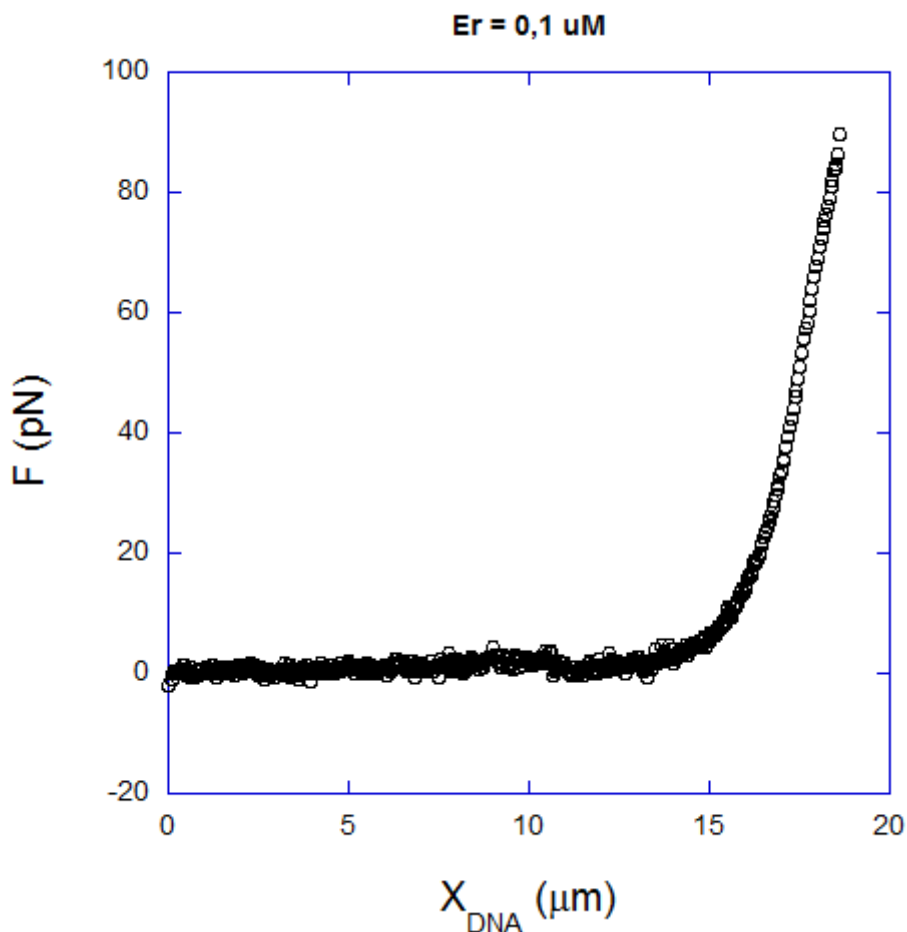


O processo de condensação da molécula de DNA é observado quando ocorre a compactação de sua estrutura, com uma redução drástica do seu volume, sendo capaz de transformar sua cadeia originalmente semiflexível em uma estrutura altamente ordenada e densa (Apêndice D). A morfologia final da molécula de DNA depende das causas que causaram a condensação, podendo assumir a forma de um toróide ou uma haste. A presença de moléculas catiônicas com carga igual ou superior a +3 pode induzir a condensação da molécula de DNA, *in vitro*, por exemplo [69-76].

Para uma concentração um pouco maior de Er_2O_3 ainda a baixas forças (regime entrópico), observa-se ainda na Figura 21, uma queda abrupta no comprimento de contorno do complexo DNA- Er_2O_3 na mudança de concentração de Er_2O_3 de $0,04 \mu\text{M}$ para a concentração de $0,05 \mu\text{M}$. Essa queda abrupta no comprimento de contorno nos leva a acreditar fortemente que para esse aumento de concentração específico temos uma forte condensação da molécula de DNA. Outra observação interessante do comportamento da molécula de DNA na presença do Er_2O_3 na faixa de maiores concentrações, mas ainda no regime de baixas forças, deve-se que a partir da concentração de $0,04 \mu\text{M}$ a molécula de DNA permanece condensada e seu comprimento de contorno fica com valor médio de $6,08 \mu\text{m}$.

Buscando maiores informações sobre essa condensação, experimentos no regime de altas forças (regime entálpico) para a concentração do Er_2O_3 igual a $0,1 \mu\text{M}$ foram realizados. E pode-se observar que a condensação que o Er_2O_3 provoca na dupla hélice da molécula de DNA é reversível, pois para experimentos de altas forças em uma concentração de $0,1 \mu\text{M}$ do metal pode-se atingir novamente o comprimento do contorno do DNA, como mostrado na Figura 22.

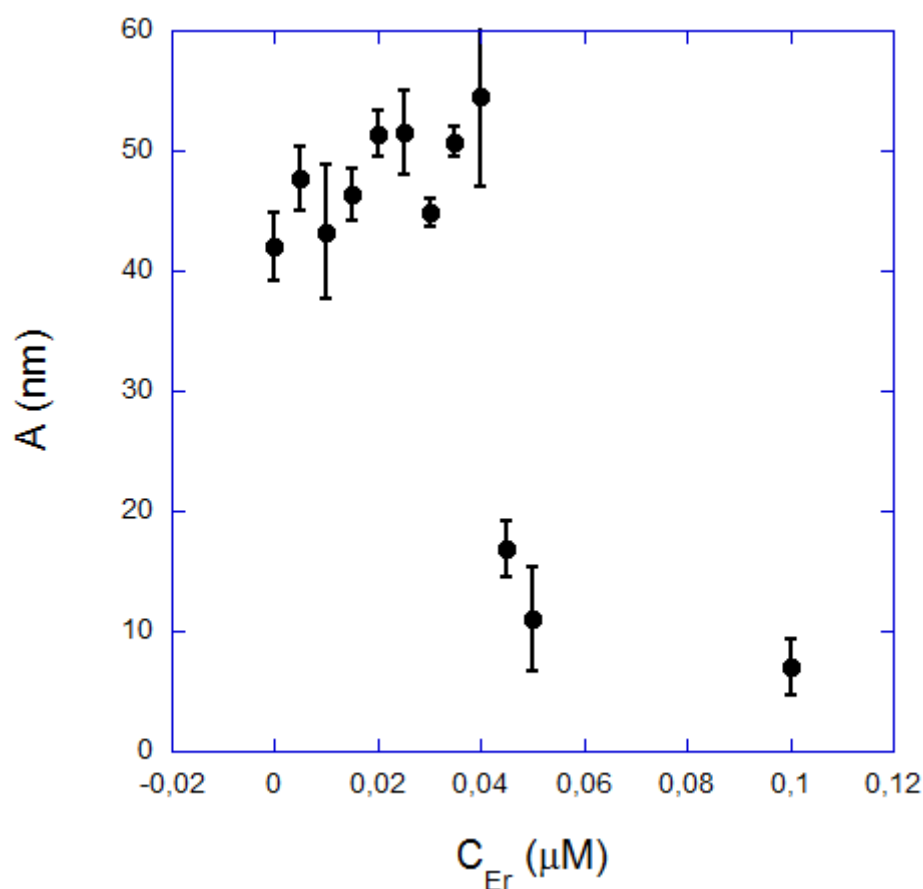
Figura 22 - Gráfico da força por extensão em regime de altas forças da interação entre o Er_2O_3 e a molécula de DNA.



A Figura 23 mostra o comportamento do comprimento de persistência, A , do DNA puro em função do aumento da concentração total C_T de Er_2O_3 na amostra. Como pode ser observado, o aumento da concentração de Er_2O_3 na amostra aumenta o comprimento de persistência que cresce até atingir um valor máximo ($\sim 56 \text{ nm}$) para uma concentração crítica $C_{\text{Er}} = 0,04 \mu\text{M}$. A partir dessa concentração, A cai abruptamente para 18 nm e permanece praticamente constante a partir daí nesta faixa de concentração. Essa queda abrupta no comprimento de persistência, nas concentrações de $0,04 \mu\text{M}$ para $0,05 \mu\text{M}$ traduz a queda da rigidez da molécula de DNA em 67%, passando de 55 nm para 18 nm , aproximadamente.

Figura 23 - Comprimento de persistência dos complexos DNA- Er_2O_3 em função da concentração de Er_2O_3 na amostra C_{Er} . O comprimento de persistência cresce até atingir um valor máximo ($\sim 56 \text{ nm}$) para uma concentração crítica $C_{\text{Er}} = 0,04 \mu\text{M}$. A partir dessa

concentração, A cai abruptamente para cerca de 18 nm e permanece praticamente constante a partir daí nesta faixa de concentração.

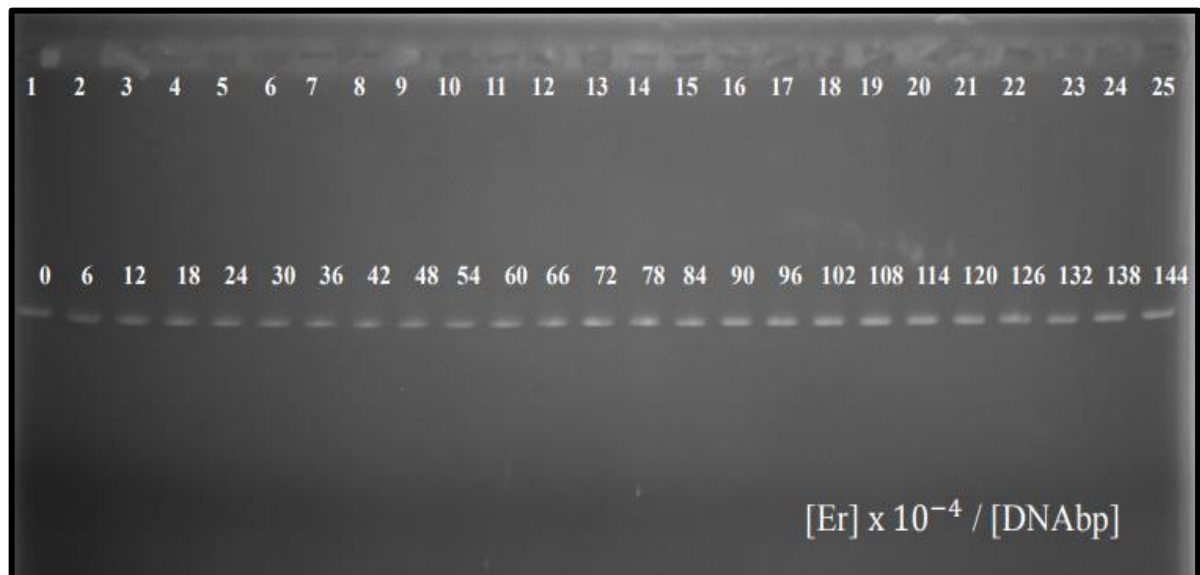


4.2.2 ELETROFORESE EM GEL

Diferentemente da Pinça Óptica que realiza o estudo de molécula única, a eletroforese em gel de agarose é uma técnica de múltiplas moléculas que traduz os resultados como uma média sobre um conjunto de moléculas. Sendo assim, ao estudar o complexo formado pela interação entre o Er_2O_3 e a molécula de DNA e investigar o resultado da compactação encontrado pela técnica de pinçamento óptico a uma concentração crítica do Er_2O_3 e ainda, averiguar a hipótese de dependência de sua concentração podendo levar a múltiplas interações, uma vasta gama de concentrações do Er_2O_3 nas corridas eletroforéticas do presente trabalho, foi estudada.

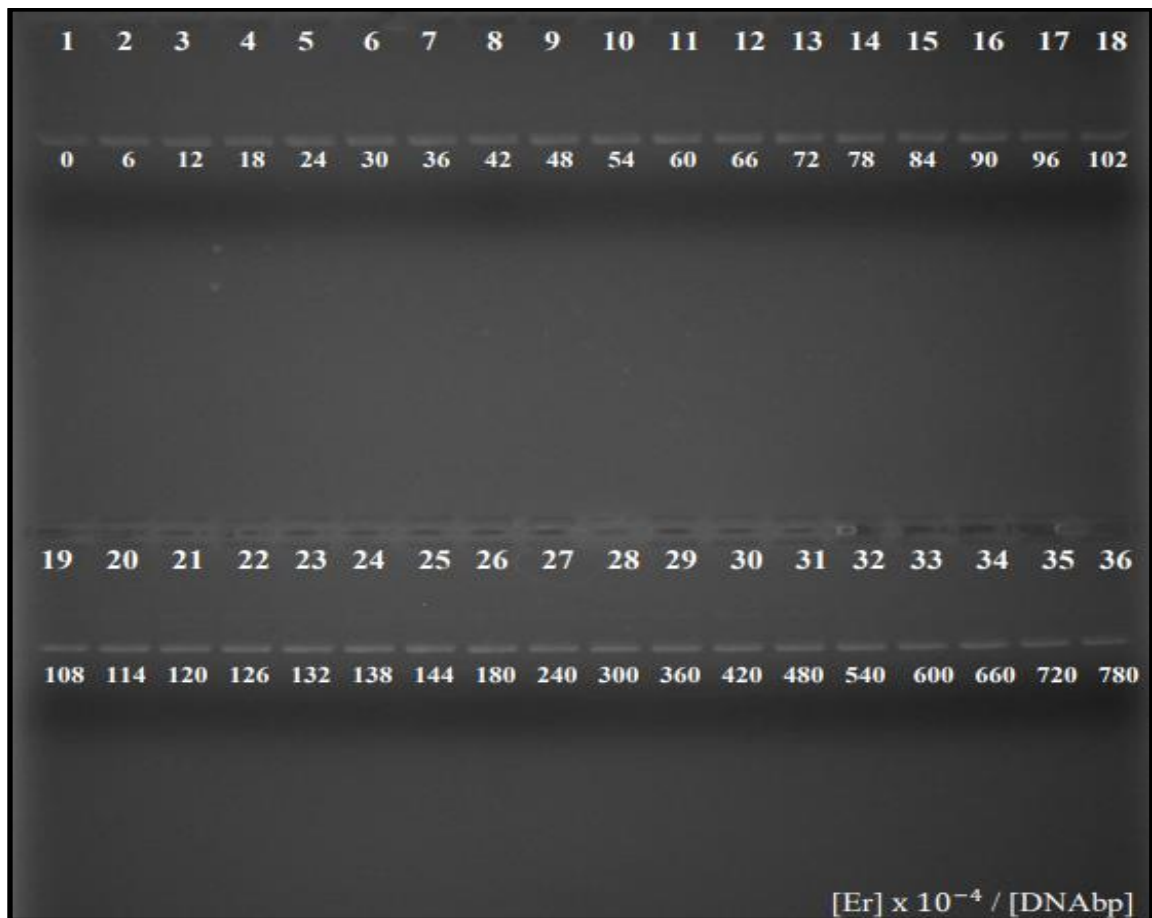
Na Figura 24 temos o DNA linear de 3kbp e na Figura 25 temos o DNA circular, o plasmídeo PBR322. Os poços do gel são numerados de 1 a 25 na Figura 24 e de 1 a 36 na Figura 25 e o número na parte inferior de cada figura são as razões da concentração de Er_2O_3 pela concentração de pares de bases de DNA usadas, respectivamente.

Figura 24 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA linear de 3 kpb para o óxido de Érbio (Er_2O_3).



Observe que para baixas concentrações do Er_2O_3 obtemos uma interação não condensadora da molécula de DNA. À medida que aumentamos a concentração do Er_2O_3 às bandas, observa-se que não houve um avanço ou um atraso durante a corrida eletroforética do complexo formado pela interação entre a molécula de DNA, linear ou circular, e o Er_2O_3 . Devido ao fato que a carga líquida reduzida dos complexos formados pela interação entre a molécula de DNA e o Er_2O_3 não são suficientes para promover um avanço nas bandas de fluorescência, ou seja, não ocorre contribuição eletrostática significativa entre eles. Em contrapartida, a intensidade de fluorescência obtém uma grande variação, como se observa na Figura 24 à medida que aumentamos a concentração do Er_2O_3 .

Figura 25 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA circular de PBR322 para o óxido de Érbio (Er_2O_3).



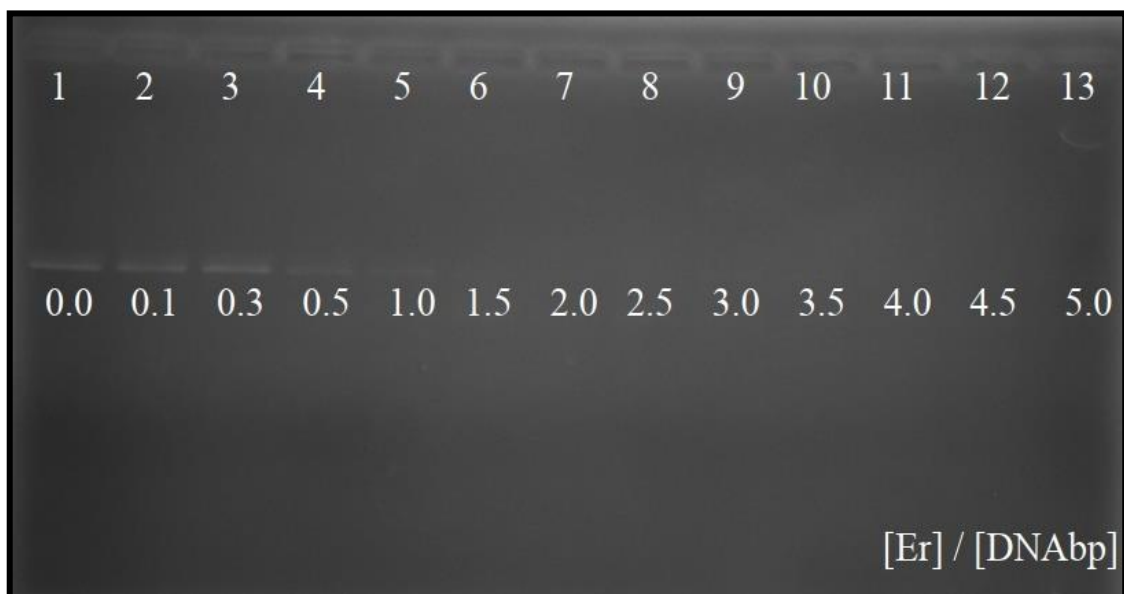
À medida que aumentamos a concentração de Er_2O_3 por pares de base podemos notar o aparecimento de uma segunda banda de fluorescência, como mostrado na Figura 26. A presença dessa segunda banda de fluorescência indica um avanço na corrida eletroforética por parte das moléculas, isso ocorre devido à compactação das mesmas. Moléculas menores possuem um maior avanço na corrida.

Figura 26 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA linear de 3 kpb para o óxido de Érbio (Er_2O_3).



Quando aumentamos significativamente a concentração de Er_2O_3 na presença da mesma concentração de DNA, observamos o desaparecimento da banda de fluorescência no gel. Neste caso, o aumento da concentração promove a condensação da molécula de DNA. Note que, o brilho dos poços foi diminuindo poço a poço à medida que aumentamos a concentração do Er_2O_3 na solução até que desapareceu por completo, como mostrado na Figura 27 [89].

Figura 27 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA linear de 3 kpb para o óxido de Érbio (Er_2O_3).



Por condensar a molécula de DNA em altas concentrações o óxido de Érbio (Er_2O_3) pode ser empregado na terapia gênica [77,78], pois facilita significativamente o transporte de moléculas de DNA de fora para dentro das células vivas, de maneira a substituir genes defeituosos e assim efetuar a correção do funcionamento das células [79,80]. Além de sua aplicação na construção de nanocarreadores, no processo de entrega de fármacos com aplicações antitumorais [71,72,82]. Por fim, podemos observar que a interação entre o óxido de érbio (Er_2O_3) e a molécula de DNA apresenta características semelhantes a fármacos que possuem múltiplas interações com a molécula de DNA, devido à variação da concentração destes à molécula [1,90].

4.3 ÓXIDO DE ITÉRBIO

Buscando entender a atividade, os modos de ligações possíveis e as aplicações dos complexos formados por Itérbio e a molécula de DNA, recentemente, estudos vêm sendo realizados a fim de encontrar nesses complexos, propriedades que pudessem ser direcionadas para aplicações biomédicas [86]. Os resultados mostram ações significativas e promissoras relacionadas a funções antibacterianas, antifúngicas e anticancerígenas tornando-os realmente relevantes. Quanto às propriedades anticancerígenas, os complexos são capazes de prevenir a proliferação celular devido ao aumento da concentração de Itérbio na amostra, o que promove a redução do número de células cancerígenas. Com relação às propriedades antibacterianas, a presença desses complexos são capazes de reduzir significativamente a dimensão das colônias após 2 dias de inoculação. E no que diz respeito ao modo de interação com a molécula de DNA, estes complexos interagem de forma hidrofóbica e por ligação de fendas [86]. No presente trabalho busca-se complementar esses estudos com experimentos de técnicas não antes utilizadas, como a técnica de pinçamento óptico e reafirmá-los com a técnica de eletroforese em gel de agarose.

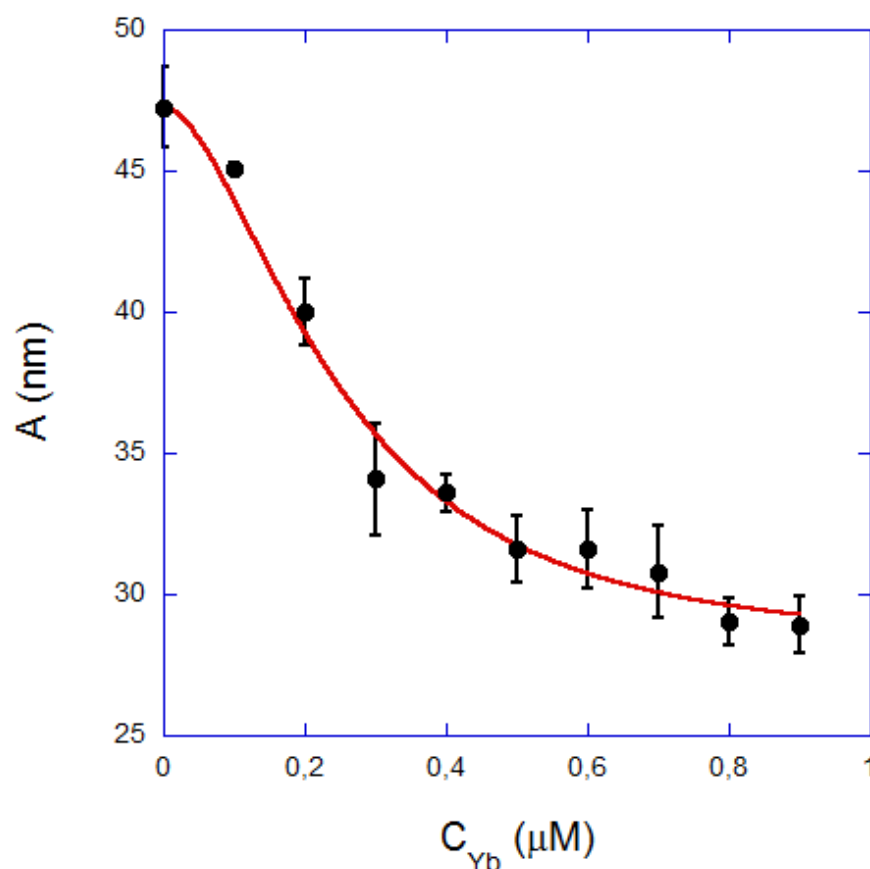
4.3.1 ESPECTROSCOPIA DE FORÇA

O comportamento da interação entre o Yb_2O_3 e a molécula de DNA foi estudado em duas faixas de forças, a forças baixas, retornando os dados apresentados pelas Figuras 28 e 29 e a forças altas, Figura 30. Esse tipo de estudo de forças é usado para determinar os parâmetros de ligação envolvendo a interação de pequenos ligantes com a molécula de DNA, onde se observa a variação de parâmetros mecânicos da molécula e compreende se a interação é reversível, ou não. O complexo formado pelo Yb_2O_3 e a molécula de DNA, Yb_2O_3 -DNA,

apresenta uma interação cooperativa semelhante à interação estudada neste trabalho entre o Eu_2O_3 e a molécula de DNA.

A Figura 28 mostra o comportamento do comprimento de persistência à medida que se aumenta a concentração de Yb_2O_3 . Observa-se que inicialmente a uma concentração de $0,1 \mu\text{M}$ de Yb_2O_3 tem-se uma queda em seu comprimento de persistência (cerca de 5%), considerada suave, por estar dentro da barra de erro. Seguida a essa queda suave, tem-se uma queda abrupta (cerca de 35%) em seu comprimento de persistência, tornando a molécula mais flexível, ou seja, diminuindo significativamente a rigidez à flexão eficaz do DNA. A faixa que compreende as concentrações de $0,2 \mu\text{M}$ a $0,9 \mu\text{M}$ tem basicamente uma constância no valor do comprimento de persistência, mostrando que essa faixa de concentração, a rigidez da molécula praticamente não se altera, tendo uma variação média oscilatória para mais ou para menos de aproximadamente 4%.

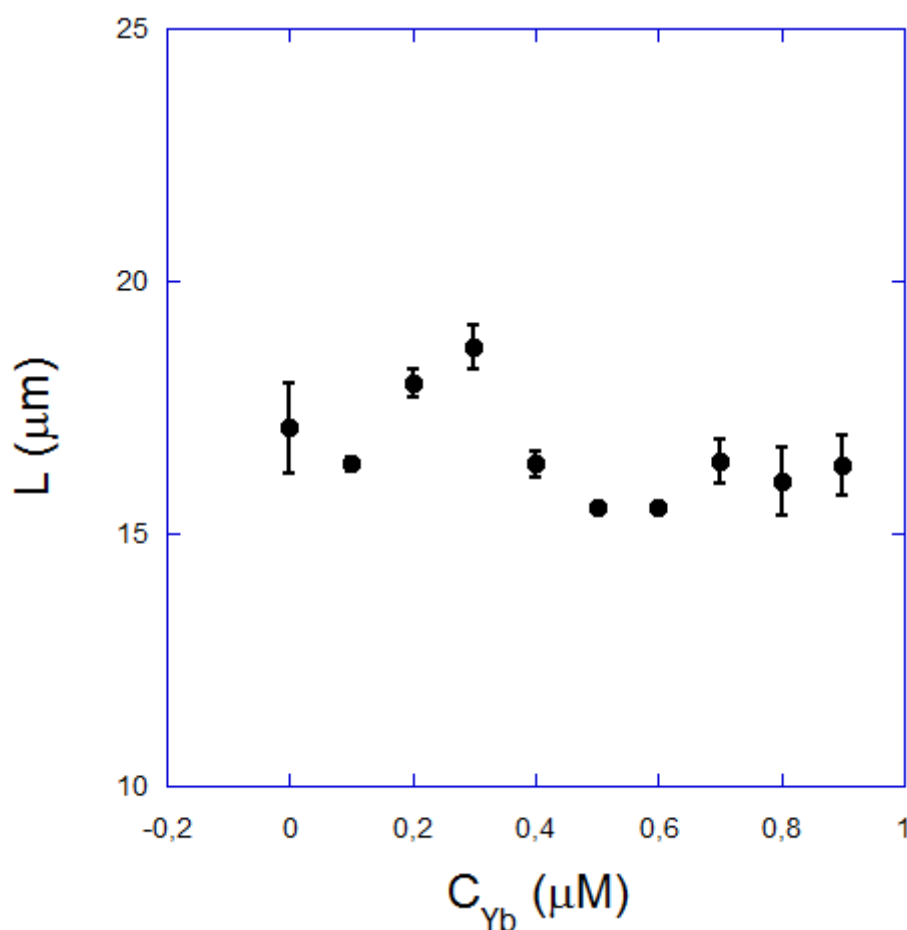
Figura 28 - Comprimento de persistência dos complexos DNA- Yb_2O_3 em função da concentração de Yb_2O_3 na amostra C_T .



A constante de ligação de equilíbrio do Yb_2O_3 à molécula de DNA é ainda mais alta do que a constante encontrada neste trabalho para a ligação do Eu_2O_3 à molécula de DNA, cerca

de ($K \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$) indicando uma afinidade significativa. O resultado obtido para o expoente de Hill ($n \sim 1,9$) indica que o Yb_2O_3 se liga cooperativamente a molécula de DNA, formando aglomerados de cerca de ~ 2 moléculas [62, 69]. Como discutido anteriormente, avaliando de forma qualitativa, esse comportamento cooperativo está relacionado à forma sigmoideal das curvas de comprimento de persistência da Figura 28, que indica uma reação de ligação positivamente cooperativa [11]. Nota-se também que o Yb_2O_3 diminui a rigidez à flexão eficaz do DNA em cerca de $\pm 40\%$.

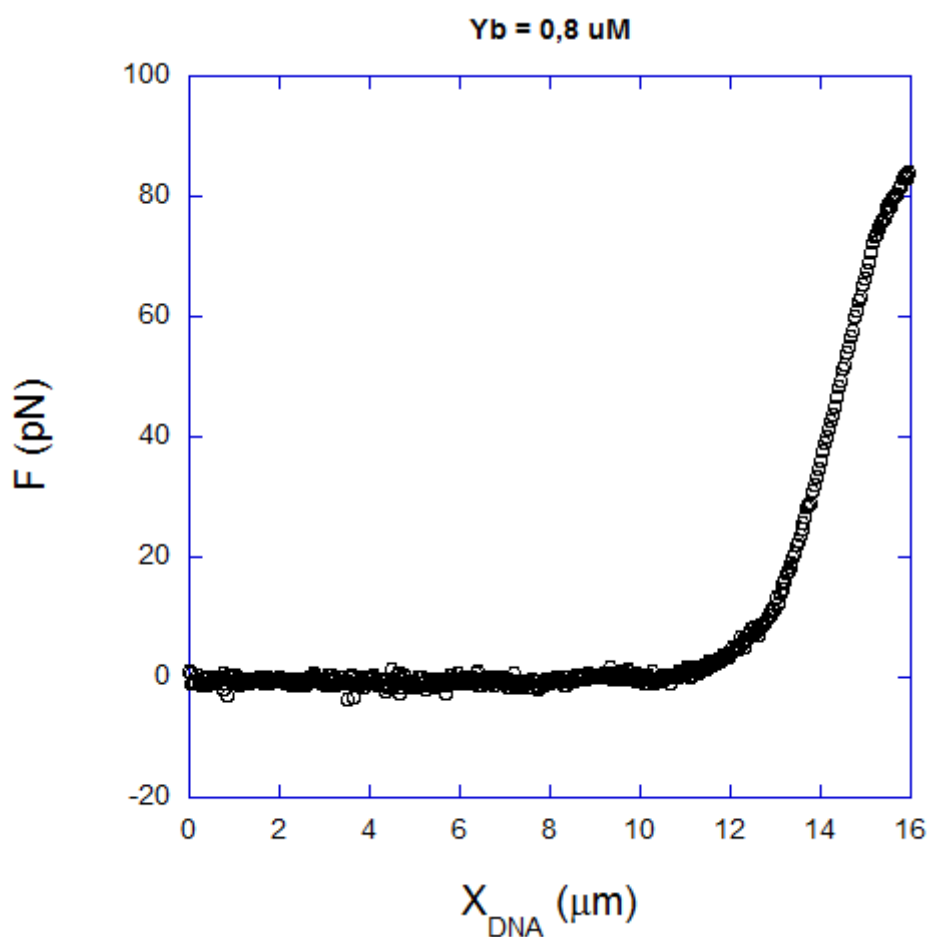
Figura 29 - Comprimento de contorno L dos complexos DNA- Yb_2O_3 em função da concentração de Yb_2O_3 na amostra, C_T .



O comportamento do comprimento de contorno da molécula de DNA na presença da variação de concentração total de Yb_2O_3 na amostra, mostrado na Figura 29 descreve um leve decréscimo, seguido de um aumento também não muito significativo e novamente outra queda, permanecendo após essa queda, praticamente constante o valor do comprimento. Essa constância do comprimento de contorno da molécula de DNA na presença do Yb_2O_3 indica que independentemente do aumento da concentração de Yb_2O_3 ela não é capaz de condensar a

molécula e nem estirá-la. A explicação para tal constância deste parâmetro mecânico dar-se devido ao fato que o Yb_2O_3 , ao ligar-se à molécula, não é capaz de modificar a distância média entre os pares de bases adjacentes ao longo da estrutura de dupla hélice. Os aglomerados formados pelas pequenas moléculas do óxido também são pequenos, e, além disso, a molécula não apresenta em sua estrutura anéis aromáticos responsáveis pela promoção da intercalação entre os pares de bases da molécula de DNA, o que causa um aumento no comprimento de contorno da molécula.

Figura 30 - Gráfico da força por extensão em regime de altas forças da interação entre o Yb_2O_3 e a molécula de DNA.



As interações com os sulcos entre os complexos e a molécula de DNA são interações não covalentes reversíveis, o gráfico da Figura 30, mostra que para uma concentração de Itérbio de $0,8 \mu\text{M}$, o comprimento de contorno da molécula é atingido novamente no regime entálpico.

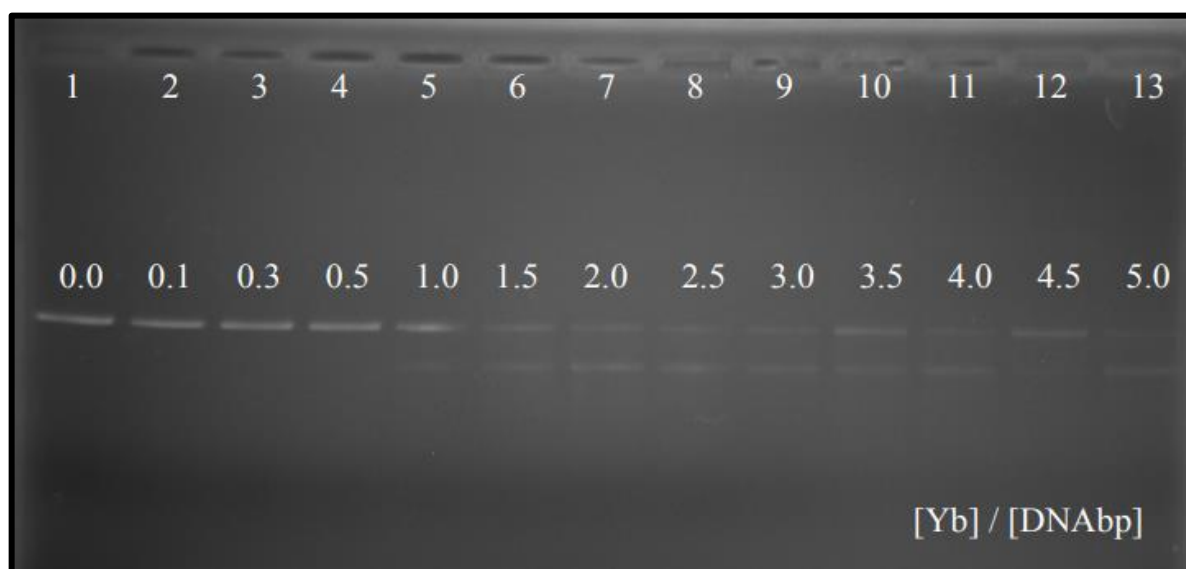
O comportamento dos parâmetros mecânicos, comprimento de contorno e comprimento de persistência, para a interação do Yb_2O_3 com a molécula de DNA é semelhante ao comportamento destes parâmetros pra a interação do Eu_2O_3 com a molécula, mostrado neste

estudo anteriormente. O modo de ligação cooperativamente positiva também se assemelha e a formação quantitativa de aglomerados é bem próxima. Outra semelhança significativa é quanto à forte interação entre essas terras raras e a molécula, retornando dos experimentos uma alta constante de ligação de equilíbrio.

4.3.2 ELETROFORESE EM GEL

A Figura 31 apresenta o comportamento de um conjunto de moléculas de DNA na presença do Yb_2O_3 , observa-se que até a razão de concentração 0,5, ou seja, quarta banda do gel tem-se somente uma banda fluorescendo, com um decréscimo de fluorescência não muito significativo e ausência de atrasos ou adiantamentos da banda de fluorescência do complexo. A partir da razão de concentração 1 nota-se uma segunda banda fluorescendo no gel.

Figura 31 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA linear de 3 kpb para o óxido de Itérbio (Yb_2O_3).



Sabe-se que quanto menor a molécula maior será o seu deslocamento no gel em uma corrida eletroforética, logo essa segunda banda que fluoresce a partir da razão 1 poderia indicar a presença de moléculas menores em solução, ou seja, uma parte das moléculas condensadas, mas essa compactação da molécula de DNA não foi observada pela técnica de pinça óptica, pois seu comprimento de contorno permaneceu praticamente o mesmo, dentro da barra de erros. Logo, não podemos afirmar que essa segunda banda seja uma condensação da molécula pelo óxido.

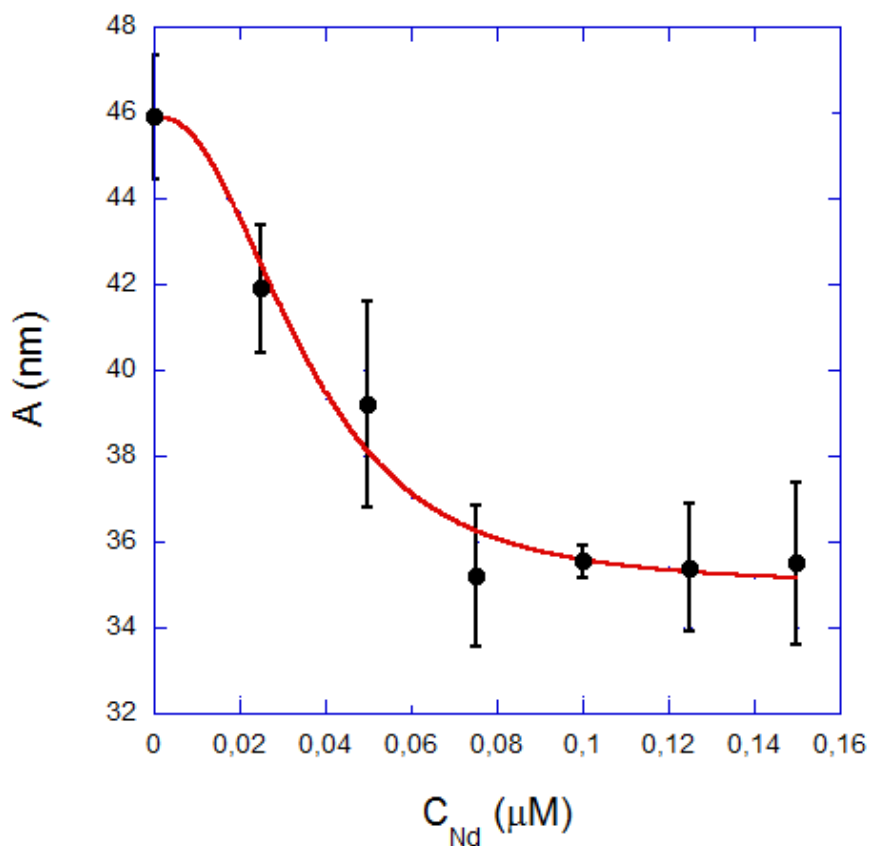
4.4 ÓXIDO DE NEODÍMIO

Nesta sessão serão apresentados os resultados da interação entre a molécula de DNA e o Nd_2O_3 , formando o complexo DNA- Nd_2O_3 . Entre todas as terras raras estudadas neste trabalho, o Neodímio interage com a molécula de DNA com a maior afinidade ($K_B = 2,9 \pm 0,6 \times 10^7 \text{M}^{-1}$) de forma positivamente cooperativa, indicando que quando o Neodímio se liga a molécula de DNA, esta ligação colabora para que a próxima aconteça, formando aglomerados ($n = 2,6 \pm 0,5$), o que qualitativamente está de acordo com o formato da curva de comprimento de persistência da Figura 32.

4.4.1 ESPECTROSCOPIA DE FORÇA

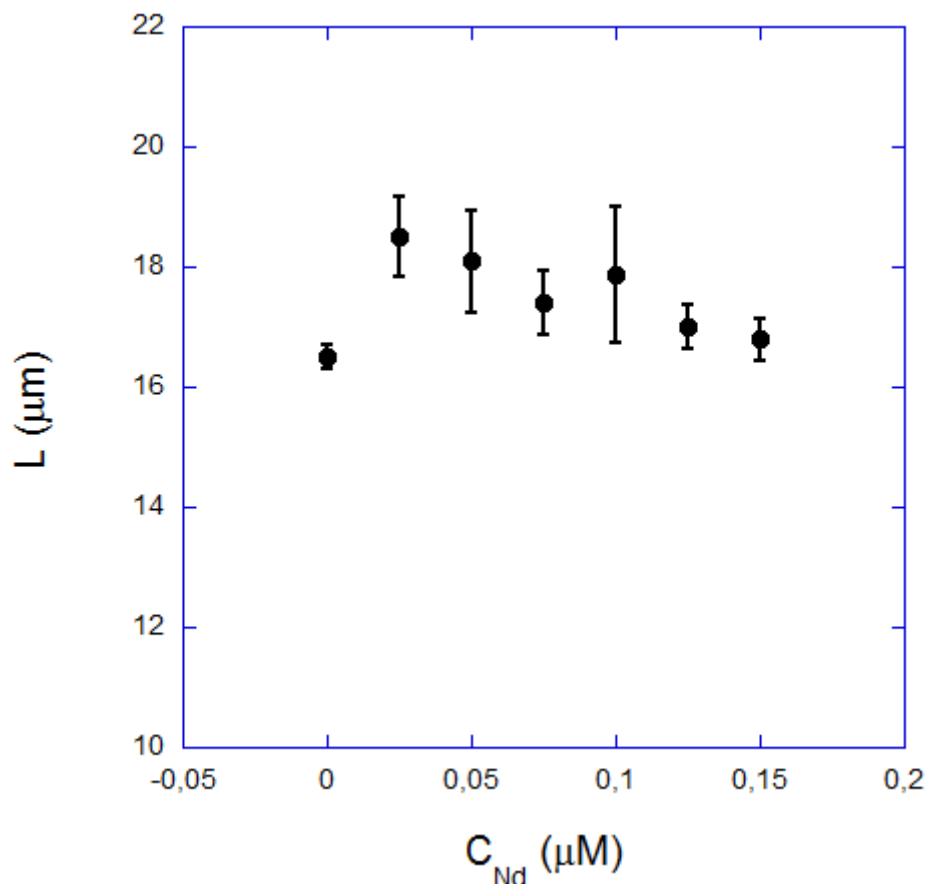
A presença do Nd_2O_3 possui interferência imediata sobre o comportamento do comprimento de persistência da molécula de DNA. Isso pode ser observado logo nas primeiras alíquotas do experimento (Figura 32). O complexo DNA - Nd_2O_3 apresenta tendência à forte flexibilização. A queda no comprimento de persistência da molécula de DNA puro é de 22% em relação ao complexo DNA - Nd_2O_3 a uma concentração de $0,1 \mu\text{M}$ permanecendo praticamente estável após essa concentração.

Figura 32 - Comprimento de persistência dos complexos DNA-Nd₂O₃ em função da concentração de Nd₂O₃ na amostra C_{Nd}.



Em relação ao comportamento do comprimento de contorno da molécula de DNA na presença do Nd₂O₃ (Figura 33), observa-se um aumento de 20% em relação à concentração da molécula de DNA pura e a partir dessa concentração (0,025 μM) o tamanho do complexo permanece praticamente constante (dentro das barras de erro). Esta aparente constância do comprimento de contorno da molécula do complexo à medida que aumentamos a concentração do Nd₂O₃ nas alíquotas sugere que a ligação do Nd₂O₃ à molécula de DNA não altera a distância média entre seus pares de bases. Isso é possível, pois as moléculas do Nd₂O₃ são muito pequenas e os aglomerados formados por elas, também o são. As moléculas do Nd₂O₃ não intercalam aos pares de base da molécula, por não apresentarem anéis aromáticos planares em sua estrutura, estes anéis são os responsáveis pela promoção da intercalação. O fato do comprimento de contorno permanecer praticamente constante exclui a possibilidade de condensação da molécula de DNA pela interação do Nd₂O₃.

Figura 33 - Comprimento do contorno L dos complexos DNA-Nd₂O₃ em função da concentração de Nd₂O₃ na amostra, C_{Nd} .

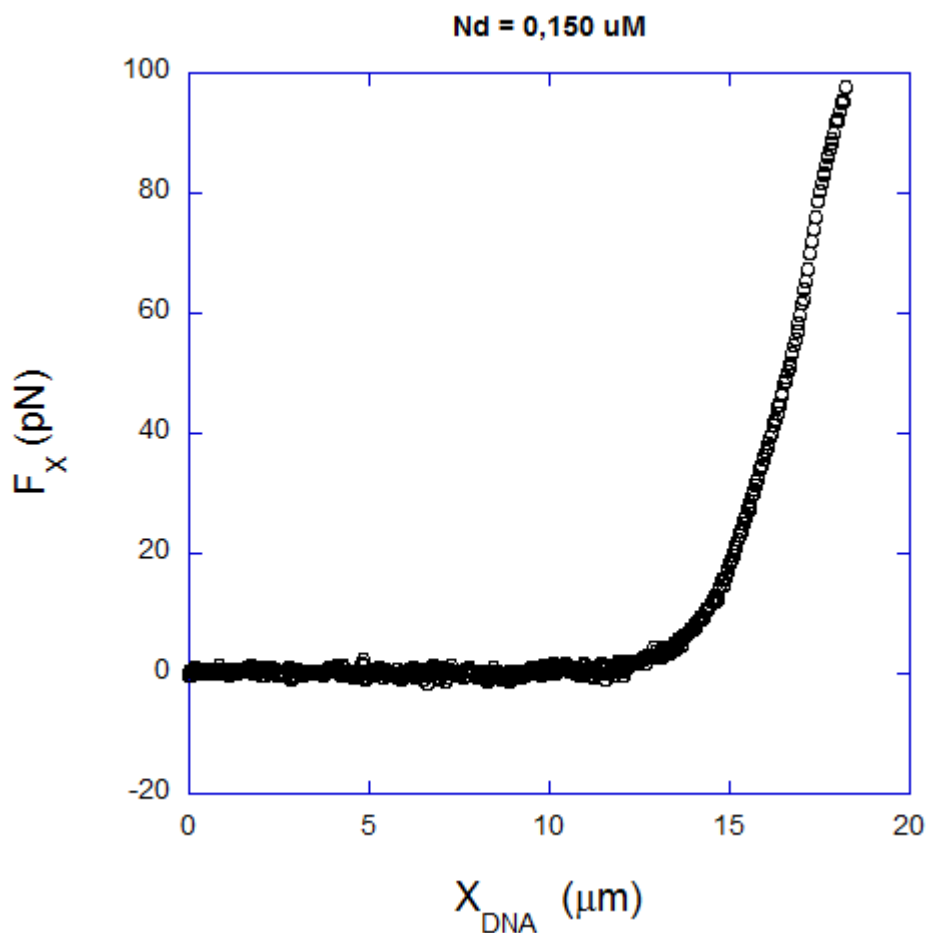


Logo, analisando os resultados obtidos para o comprimento de persistência e o comprimento de contorno para a interação entre o Nd₂O₃ e a molécula de DNA propomos que a principal interação deste complexo é dada pela ligação de sulco menor (Apêndice D), de forma positivamente cooperativa e formando pequenos aglomerados de ~ 3 moléculas. Esses aglomerados promovem dobras que diminuem o comprimento de persistência do complexo formado, mas não alteram o comprimento do contorno. Tais resultados destacam uma alta afinidade do Neodímio com a molécula de DNA e, em vista disso, é um complexo promissor para aplicações antibióticas e antitumorais devido a suas potenciais propriedades [111, 112, 122].

Os dados apresentados acima (Figura 32 e 33) foram retornados do pinçamento no regime de baixas forças de interação entre o Nd₂O₃ e a molécula de DNA. Na Figura 34, temos o Gráfico da força por extensão em regime de altas forças de interação, nele podemos observar que para uma concentração de Nd = 0,150 μM o comprimento de contorno da molécula é

restabelecido, o que condiz com uma interação reversível que se enquadra a interação de sulcos menores da molécula de DNA pelo Nd_2O_3 .

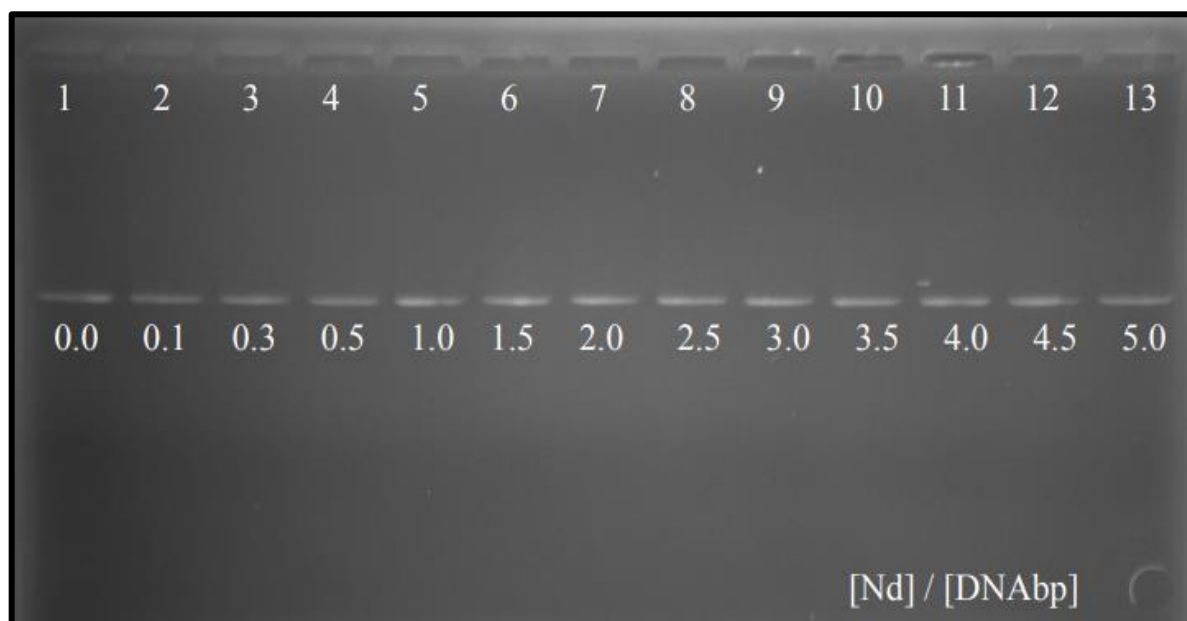
Figura 34 - Gráfico da força por extensão em regime de altas forças de interação entre o Nd_2O_3 e a molécula de DNA.



4.4.2 ELETROFORESE EM GEL

Na Figura 35 tem-se a imagem de eletroforese da interação do Nd_2O_3 com a molécula de DNA. Observa-se que praticamente não houve mudanças na intensidade de fluorescência à medida que se aumenta a concentração do Nd_2O_3 em relação aos pares de base da molécula de DNA. Outro fator a ser observado é que não há alteração na velocidade da corrida eletroforética mediante a presença do óxido, ou seja, as bandas não se atrasaram, nem se adiantaram em relação à banda do DNA puro (1º pocinho).

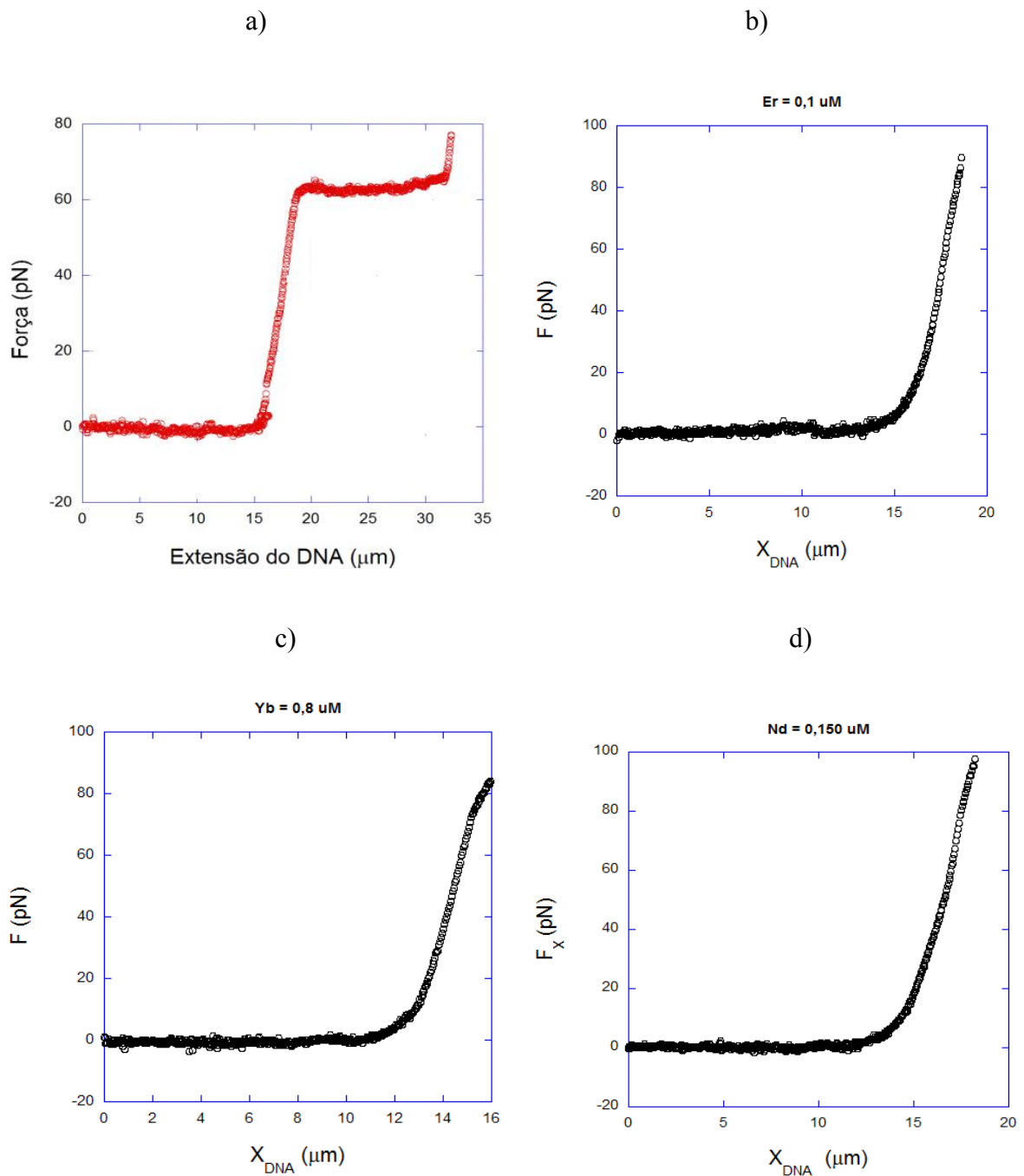
Figura 35 - Ensaio típico de eletroforese em gel realizado com moléculas de DNA linear de 3 kpb para o óxido de Neodímio (Nd_2O_3).



Logo, observa-se que não há contribuição eletrostática relevante para a ligação Nd_2O_3 à molécula de DNA, o que corrobora com os dados obtidos na técnica de pinçamento óptico. Caso existisse, à medida que a concentração de Nd_2O_3 aumentasse um comportamento ordenado na intensidade de fluorescência e um atraso da corrida, seria observado. Sob outra perspectiva, a interação de Nd_2O_3 não interfere na intercalação do EtBr, senão haveria uma mudança ordenada na intensidade de fluorescência à medida que mais Nd_2O_3 fosse ligado. Sendo assim, o Neodímio não interfere na ação das moléculas do intercalante EtBr, podendo ser usado simultaneamente em experimentos.

Por fim, podemos comparar os resultados obtidos dos estiramentos no regime de altas forças para a molécula de DNA na presença das terras raras, Érbio, Itérbio e Neodímio, com a molécula de DNA pura, como seguem na Figura 36 a seguir. Observe que, para a molécula de DNA puro o platô ocorre na faixa de força de 60 pN, onde a força permanece praticamente constante enquanto a molécula permanece sendo estirada, ou seja, para essa faixa, a molécula pode ser estirada com uma pequena força adicional. Nesta faixa, ocorre a transição estrutural da molécula [23]. Pode-se observar que na presença das terras raras a curva de força x extensão não obtém o platô na faixa de 60 pN com ocorre com o DNA puro.

Figura 36 – Regime de altas forças (65pN). a) Curva de força x extensão para uma molécula de DNA puro. Imagem retirada de [23]. b) Curva de força x extensão para uma molécula de DNA na presença de Érbio (0,1 μ M). c) Curva de força x extensão para uma molécula de DNA na presença de Itérbio (0,8 μ M). d) Curva de força x extensão para uma molécula de DNA na presença de Neodímio (0,150 μ M).



5 CONCLUSÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Neste trabalho, aplicando as técnicas de Pinça Óptica e Eletroforese em gel de agarose. Estudos foram realizados em busca da compreensão das possíveis interações entre os óxidos de terras raras e a molécula de DNA de fita dupla, objetivando encontrar propriedades promissoras com possíveis aplicações no âmbito de áreas da biomedicina, da biofísica, entre outras. Com a aplicação da técnica de Pinça Óptica, técnica esta, que faz o estudo da molécula única, experimentos no regime entrópico e entálpico foram realizados, com intuito de buscar alterações nas propriedades mecânicas da molécula de DNA mediante a presença dos óxidos, assim como, classificar o modo de ligação. Com a técnica de Eletroforese em gel de agarose, a qual realiza o estudo de múltiplas moléculas, foi possível estudar a interação dos óxidos com a molécula de DNA tanto linear, quanto circular, e promover a melhor compreensão dos dados sobre as interações dos complexos formados.

A ação do Eu_2O_3 em moléculas de DNA de cadeia dupla em ensaios de espectroscopia de força de molécula única mostrou que este composto apresenta uma forte interação com o biopolímero, que é basicamente independente da força iônica usada no ambiente circundante, isto é, o caráter eletrostático da interação é muito fraco. Entre as principais características, o Eu_2O_3 tende a se ligar de forma cooperativa, formando aglomerados de ~ 3 moléculas e apresenta uma alta constante de ligação de associação de equilíbrio da ordem de 10^5 M^{-1} . Além disso, os ensaios de eletroforese em gel sugerem que a ligação ao Eu_2O_3 não interfere na intercalação do fármaco na dupla hélice e confirma o fraco caráter eletrostático da interação. Tais resultados mostram que o Európio pode ser considerado para o design de novos medicamentos anticancerígenos à base de metal em um futuro próximo, pois sua interação com a molécula de DNA apresentou características semelhantes a alguns fármacos utilizados atualmente.

A interação entre o Er_2O_3 e a molécula de DNA de fita dupla promove uma forte condensação da molécula, isso acontece no regime entrópico para baixas concentrações do óxido ($0,04 \mu\text{M} < L < 0,05 \mu\text{M}$), levando a molécula a uma redução de 50% do seu comprimento de contorno. Esta forte condensação da molécula mediante a interação do óxido é reversível, pois no regime entálpico, para uma concentração de $0,1 \mu\text{M}$ é possível atingir novamente o comprimento de contorno do biopolímero. Sendo assim, o Er_2O_3 não promove a desnaturação da molécula de DNA. A capacidade de compactação da estrutura da molécula de DNA apresentada pelo Er_2O_3 torna-o promissor para a aplicabilidade na terapia gênica, por exemplo,

pois compostos que condensam a molécula de DNA facilitam significativamente o transporte de moléculas de DNA de fora para dentro das células vivas, substituindo os genes defeituosos, e assim, corrigindo o funcionamento das células. Esse processo é empregado na terapia gênica e também tem significativa importância na parte de nanocarreadores. [82]

A interação do Yb_2O_3 com a molécula de DNA apresentou semelhanças significativas aos dados encontrados da interação do Eu_2O_3 com a molécula. Parâmetros mecânicos como o comprimento de persistência e o comprimento de contorno, os modos de ligação, ligando também de forma positivamente cooperativa formando pequenos aglomerados e a forte interação de ligação, da ordem de $K \sim 10^6 \text{ M}^{-1}$ chamaram a atenção. O comprimento de contorno da molécula praticamente permaneceu constante, ou seja, não houve intercalação entre os pares de bases adjacentes da molécula. Como se sabe, a molécula de Itérbio não apresenta nenhum anel aromático que é o principal responsável por tal ligação. Os resultados obtidos para este complexo são comparativos com resultados de outros complexos a base de Itérbio cuja interação retornou propriedades promissoras relacionadas a funções antifúngicas, antibacterianas e anticancerígenas em estudos desenvolvidos com outras técnicas experimentais [86].

A semelhança citada no parágrafo acima foi observada também na interação entre o Nd_2O_3 e a molécula de DNA, e para o Neodímio a constante de ligação de associação de equilíbrio é ainda maior, da ordem de 10^7 M^{-1} , ou seja, a ligação do óxido à molécula de DNA de fita dupla acontece ainda mais fortemente. Observou-se nos dados obtidos pelo experimento de Eletroforese em gel de agarose que a contribuição eletrostática não se fez relevante, o que consolida os dados obtidos pela técnica de pinçamento óptico. Esta alta afinidade e o modo de ligação entre o Nd_2O_3 e a molécula de DNA são comparados a outros complexos que possuem aplicações antibióticas e antitumorais [111, 112, 122].

Portanto, pode-se concluir que os complexos formados entre cada um dos óxidos de terras raras e a molécula de DNA de fita dupla possuem propriedades importantes para aplicabilidades antibióticas, antifúngicas, antitumorais, na área de terapia gênica, como nanocarreadores, entre outras [111, 112, 122].

Finalmente, como perspectivas futuras deste trabalho estão presentes o interesse pela continuidade dos estudos dessa linha de pesquisa (complexos formados de óxidos de terras raras e a molécula de DNA de fita dupla). Os dados encontrados mostram que trata-se de uma linha

de pesquisa pouco estudada e significativamente promissora quando direcionada a aplicabilidades farmacológicas. As propostas para novos trabalhos incluem a realização de experimentos em outras faixas de concentrações destes óxidos, assim como, de outras terras raras não estudadas no presente trabalho.

Vale ressaltar que experimentos de Microscopia de Força Atômica (AFM) foram realizados, mas não foram apresentados no texto, pois para tal, precisaríamos de dados mais claros e precisos. Portanto, pretende-se retomá-los e concluí-los para que possamos apresentá-los em breve. Pretende-se também realizar o estudo da interação dessas terras raras com a molécula de DNA através de técnicas de fluorescência.

Portanto, deixamos grandes perspectivas para trabalhos futuros, pois ainda temos muito a compreender sobre a interação entre esses elementos de terras raras e a molécula de DNA de fita dupla e o potencial de sua aplicabilidade como novos fármacos.

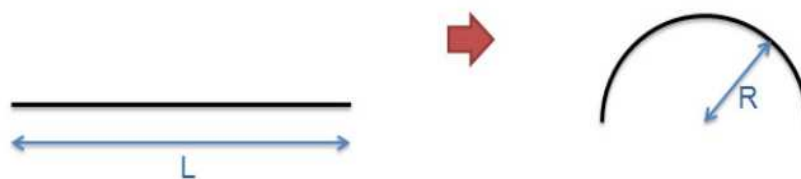
Os apêndices A, B, C e D foram escritos baseados nas referências [23, 42-46, 87, 88,91-110]. No Apêndice A discutimos sobre o Modelo de Kratky-Porod, que descreve a energia de configuração da cadeia. No Apêndice B, discorremos sobre o Modelo WLC, onde se avalia estiramentos de polímeros próximos e distantes da conformação de equilíbrio. No Apêndice C apresentamos o Equilíbrio Químico das interações DNA-ligantes, com foco na Cooperatividade do Modelo de Hill. Por fim, no Apêndice D realizamos uma breve apresentação dos Possíveis Modos de Ligação entre Ligantes e a molécula de DNA.

APÊNDICE A: MODELO DE KRATKY-POROD: ENERGIA DE CONFIGURAÇÃO DA CADEIA

Sabe-se que forças aplicadas ao longo do eixo do polímero causam compressão ou estiramento do mesmo. Já forças ao longo de uma direção transversa ao seu eixo, causam uma torção ou uma rotação. Essas deformações dependem da natureza das forças aplicadas e das propriedades mecânicas do polímero.

Para estudarmos matematicamente as deformações sofridas pelo polímero mediante a atuação dessas forças, precisamos considerar a energia envolvida durante a interação. Para isso, vamos considerar uma deformação genérica de uma vareta de comprimento L que após a atuação de uma força encontra-se na forma de um semicírculo de raio R . Como representado na Figura 37,

Figura 37 - Vareta rígida de comprimento L que após a ação de uma força encontra-se em formato de um semicírculo. Imagem retirada de [23].



O cálculo da energia de curvatura para essa deformação trata-se de um problema clássico dos livros de mecânica do contínuo [88], dada por

$$E = \frac{k_f L}{2R^2} \quad (\text{A.1})$$

Onde k_f é a rigidez flexural da vareta, dada por

$$k_f = YI \quad (\text{A.2})$$

Onde Y é o módulo de Young da vareta e I é o momento geométrico de segunda ordem da seção reta, este momento geométrico é definido de maneira análoga ao momento de inércia convencional da massa. Logo, em relação ao eixo x , quando o plano xy for perpendicular ao eixo da vareta, temos

$$I_x = \int y^2 dA \quad (\text{A.3})$$

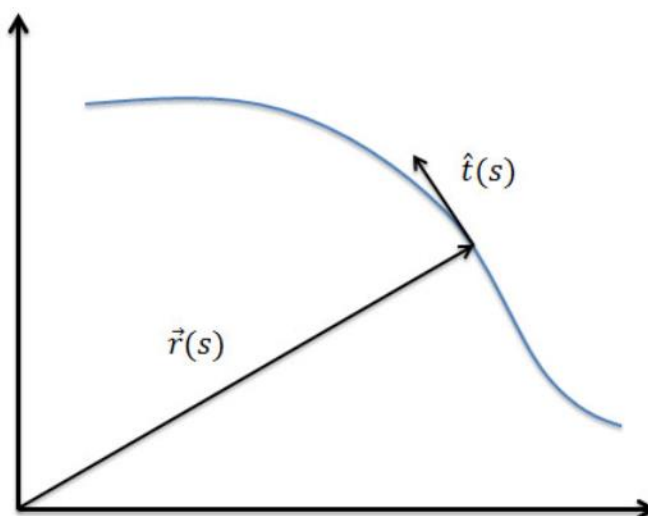
Generalizando a equação (A.1) correspondente a energia de curvatura da vareta resultando no Modelo de Kratky-Porod para a energia de curvatura de um polímero [87] Observe que a curvatura do semicírculo é dada por $1/R$, tomando C a curvatura de uma curva arbitrária qualquer dada por

$$C = \frac{1}{R} \quad (\text{A.4})$$

Teremos que C^2 será dado por

$$C^2 = \frac{1}{R^2} \quad (\text{A.5})$$

Figura 38 - Esquema da variação do vetor posição $\vec{r}(s)$ o qual localiza um ponto arbitrário da curva e do vetor unitário tangente $\hat{t}(s)$ em cada ponto ao longo da curva arbitrária, onde os vetores encontram-se parametrizados ao longo da curva pelo comprimento de arco s . Imagem retirada de [23].



Do cálculo básico, temos a relação

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s} \quad (\text{A.6})$$

E a curvatura é dada por

$$C = \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right| = \frac{\partial \hat{t}}{\partial s}. \quad (\text{A.7})$$

A relação de proporcionalidade existente entre a energia de curvatura e o comprimento L , permite estudar o caso de uma curvatura variável, para isso, integramos a energia por unidade de comprimento ao longo do comprimento de um polímero. De forma genérica, para uma curvatura arbitrária C a expressão da energia de curvatura para uma vareta rígida nos concede a expressão do modelo de Kratky-Porod,

$$E_{KP} = \frac{1}{2} k_f \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds. \quad (\text{A.8})$$

Onde k_f é a rigidez flexural do polímero.

Considerando a Figura A.2 tomando $\hat{t}(s)$ na origem do polímero, ou seja, em $s = 0$ teremos $\hat{t}(0)$, θ o ângulo entre $\hat{t}(0)$ e $\hat{t}(s)$ para uma posição arbitrária qualquer. Para um setor circular de raio R , o ângulo θ e o arco de comprimento s se relacionam e substituídos na expressão do modelo de Kratky-Porod, expressão (A.8), obtemos:

$$E = \frac{k_f s}{2R^2} = \frac{k_f \theta^2}{2s} \quad (\text{A.9})$$

Avaliando o valor de $\langle \theta^2 \rangle$ temos uma idéia da magnitude das flutuações de curvatura, para isso, tomamos a média estatística da equação (A.9) obtendo,

$$\langle E \rangle = \frac{k_f \langle \theta^2 \rangle}{2s} \quad (\text{A.10})$$

Sabendo que as flutuações de curvatura ocorrem no plano e aplicando o princípio da equi-partição da energia, tem-se $\langle E \rangle = k_B T$, deste modo

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{\beta k_f}, \quad (\text{A.11})$$

Onde $\beta = \frac{1}{k_B T}$.

βk_f é o comprimento de persistência A do polímero, o comprimento de persistência mede a rigidez da molécula, quanto maior o valor do comprimento de persistência mais rígido é o polímero, apresentando poucas dobras. Caso contrário, o polímero apresentará muitas dobras, sendo mais flexível.

Quanto à interpretação geométrica do comprimento de persistência, dada pelo valor médio entre o produto escalar $\hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s)$, como segue

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \langle \cos(\theta) \rangle \quad (\text{A.11})$$

onde o valor máximo para a equação (A.11) é o unitário.

O valor angular de θ é pequeno para pequenas flutuações, o que torna possível a aproximação $\cos(\theta) \sim 1 - \theta^2/2$. Sendo assim, para uma aproximação de primeira ordem, temos

$$\begin{aligned} \langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle &= \langle \cos(\theta) \rangle = 1 - \frac{\langle \theta^2 \rangle}{2} = 1 - \frac{s}{A} \\ \langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle &= 1 - \frac{s}{A}, \end{aligned} \quad (\text{A.12})$$

Tome nota que o termo $1 - \frac{s}{A}$ da equação (A.12) acima é a expansão em primeira ordem da função exponencial. Portanto,

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \exp\left(-\frac{s}{A}\right). \quad (\text{A.13})$$

Temos então, que o comprimento de persistência é dado pelo comprimento de correlação da cadeia polimérica, em outras palavras, o comprimento de persistência é uma medida do alcance das flutuações locais na configuração da molécula.

Ao calcularmos o valor da expressão $\langle [\hat{t}(s) - \hat{t}(0)]^2 \rangle$ em primeira ordem obtemos

$$\langle [\hat{t}(s) - \hat{t}(0)]^2 \rangle \cong 1 - 2 \cdot \langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle + 1 = \frac{2s}{A} \quad (\text{A.14})$$

Observe que para uma vareta totalmente rígida, os vetores $\hat{t}(0)$ e $\hat{t}(s)$ são paralelos, sendo assim, $\hat{t}(s) - \hat{t}(0) = 0$, o que implica que o comprimento de persistência da equação

(A.14) tende a infinito. Logo, temos a medida da distância ao longo do polímero sobre o qual a orientação da curva está não-correlacionada, ou seja, o comprimento de persistência.

APÊNDICE B: HASTE CONTINUAMENTE FLEXÍVEL - MODELO WLC –(WORM-LIKE-CHAIN- MODELO DE CADEIA VERMIFORME)

Considerando os gastos energéticos de forças externas aplicadas sobre polímeros que possuem alguma flexibilidade, o modelo WLC, realiza desde a avaliação de estiramentos próximos a conformação de equilíbrio, ou seja, estiramentos pequenos capazes de iniciar a retirada do polímero de sua configuração de equilíbrio, até os gastos energéticos de estiramentos que se encontram longe desta conformação. Visualizando o polímero como uma fina haste continuamente elástica e submetendo - o a forças dentro do regime entrópico, o modelo possui uma expressiva precisão, descrevendo perfeitamente as análises experimentais descritas nesse trabalho para forças da ordem de 5 pN. É importante ressaltar que este modelo torna-se limitado quando o comprimento de contorno do polímero atinge 90% do mesmo, pois nessa situação temos uma divergência para $z = L$.

ESTIRAMENTOS PRÓXIMOS DA CONFORMAÇÃO DE EQUILÍBRIO

Inicialmente descreveremos o modelo WLC onde as forças são capazes de realizar somente pequenos estiramentos no polímero, nessa situação, temos uma baixa intensidade das forças permitindo que a avaliação das mesmas seja realizada pela lei de Hooke. Tomando então a conformação na qual o polímero está próximo a de equilíbrio, devido a intensidade das forças, tem-se que:

$$F = -kz, \quad (\text{B.1})$$

onde k é a constante elástica e z é uma medida do estiramento do polímero (distância ponta a ponta do polímero), mas essa extensão (z) pode ser escrita como a distância quadrática média entre as extremidades da molécula de DNA,

$$z = \sqrt{\langle r_{ee}^2 \rangle} \quad (\text{B.2})$$

A distância que separa as extremidades do polímero (r_{ee}) modifica à medida que o polímero é submetido a forças de estiramento. Logo, para estimar a extensão do polímero é necessário o uso da média quadrática da distância $\langle r_{ee}^2 \rangle$ entre as extremidades do mesmo.

Considerando a curva genérica de um polímero e seus vetores posição (Figura 38), temos o vetor \vec{r}_0 na posição inicial, ($s = 0$), e o vetor \vec{r}_L na posição final, ($s = L$), onde essas posições distam à extremidade do polímero, ou seja, seu comprimento de contorno L . Temos

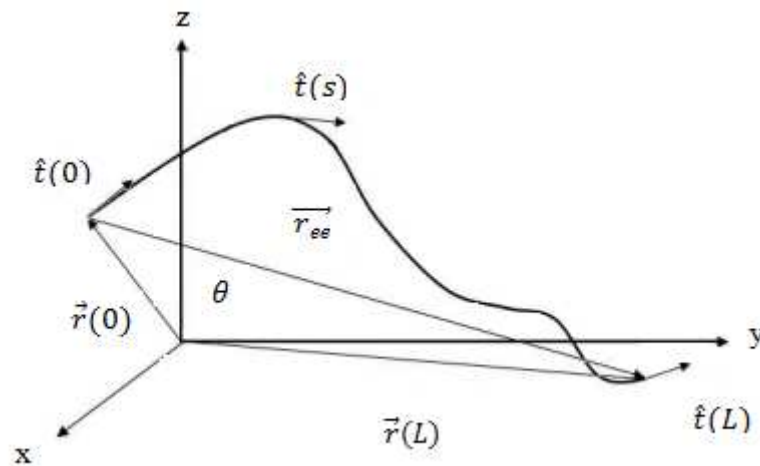
ainda o vetor \vec{r}_{ee} que une as extremidades do polímero, e seu módulo é dado pela diferença entre os vetores posição \vec{r}_L e \vec{r}_0 , ou seja, a distância entre as extremidades do polímero, logo:

$$\vec{r}_{ee} = \vec{r}_L - \vec{r}_0 \quad (\text{B.3})$$

Obtendo a média quadrática deste vetor, tem-se

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = \langle [\vec{r}_L - \vec{r}_0]^2 \rangle. \quad (\text{B.4})$$

Figura 39 – Curva genérica de um polímero e seus vetores posição. Imagem retirada de [43].



Sabendo que,

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s} \quad (\text{B.5})$$

Aplicando a integral em ambos os lados, tem-se

$$\int_0^s d\vec{r} = \int_0^s \hat{t}(s') ds' \quad (\text{B.6})$$

Tem-se como solução do primeiro membro somado ao segundo membro,

$$\vec{r}_s = \vec{r}_0 + \int_0^s \hat{t}(s') ds'. \quad (\text{B.7})$$

Mudando o limite de integração superior para $s = L$ na equação B.6, tem-se

$$\int_0^L d\vec{r} = \int_0^L \hat{t}(s') ds' \quad (\text{B.8})$$

Logo B.7 se tornará:

$$\vec{r}_L = \vec{r}_0 + \int_0^L \hat{t}(s') ds'. \quad (\text{B.9})$$

De posse de (B.4) e (B.9), substituindo (B.9) em (B.4), \vec{r}_0 será eliminado e teremos somente $\langle \left[\int_0^L \hat{t}(s') ds' \right]^2 \rangle$:

$$\begin{aligned} \langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle &= \langle \left[\vec{r}_0 + \int_0^L \hat{t}(s') ds' - \vec{r}_0 \right]^2 \rangle = \langle \left[\int_0^L \hat{t}(s') ds' \right]^2 \rangle = \\ \langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle &= \left\langle \left[\int_0^L \hat{t}(s') ds' \right] \cdot \left[\int_0^L \hat{t}(s'') ds'' \right] \right\rangle = \\ &= \int_0^L ds'' \left[\int_0^L ds' \langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle \right] \end{aligned} \quad (\text{B.10})$$

Note que na equação (B.9) tem-se um produto escalar entre dois vetores unitários e sendo assim, torna-se necessário o cálculo da média entre eles. Entre estes dois vetores unitários temos o ângulo θ , sendo as localizações desses vetores, um posicionado na origem e o outro em uma posição s qualquer do polímero,

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \langle \cos \theta \rangle. \quad (\text{B.11})$$

Considerando apenas pequenas flutuações, têm-se somente pequenos valores para o ângulo θ , tornando possível a aproximação de primeira ordem da função exponencial em que:

$$\cos \theta \sim 1 - \frac{\theta^2}{2} \quad (\text{B.12})$$

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \cong 1 - \frac{\langle \theta^2 \rangle}{2} = 1 - \frac{s}{A} \quad (\text{B.13})$$

O que se faz perceber que se considerarmos todos os termos da expansão para a função exponencial,

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \cong e^{-\frac{s}{A}}. \quad (\text{B.14})$$

A equação (B.14) considera uma interpretação geométrica do comprimento de persistência, que mede a correlação da cadeia de um polímero. Sendo assim, a medida da distância ao longo do polímero, a qual a cadeia passa a ter orientação descorrelacionada define o comprimento de persistência. De posse desse resultado é possível obtermos uma expressão geral realizando uma alteração na origem do sistema, com $s = s'$ ao invés de $s = 0$. Assim sendo obtém-se:

$$\langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle \cong e^{-\frac{|s'-s''|}{A}}. \quad (\text{B.15})$$

Substituindo a equação (B.15) na equação (B.10) e dividindo a integral em duas partes iguais obtém,

$$\langle \overline{r_{ee}^2} \rangle \cong 2 \int_0^{L_C} e^{-\frac{s''}{A}} ds'' \int_0^{s''} e^{-\frac{s'}{A}} ds' \quad (\text{B.16})$$

Tendo como solução:

$$\langle \overline{r_{ee}^2} \rangle \cong 2AL_C - 2A^2 \left[1 - e^{-\frac{L_C}{A}} \right]. \quad (\text{B.17})$$

Analisando a relação de extremos entre o comprimento de contorno e o comprimento de persistência, tem-se:

I- PARA O LIMITE FLEXÍVEL, $L_C \gg A$ (ESTIRAMENTOS MÍNIMOS):

Na situação de limite flexível têm-se pequenos estiramentos devido a forças de baixa intensidade, mediante a esse tipo de força pode-se compreender a elasticidade do polímero através da lei de Hooke, como descreve a equação (B.1). Sabe-se que a conformação do polímero tem suas extremidades separadas por uma distância (r_{ee}) e esta distância se altera a medida que o polímero é submetido a estiramentos. Como feito nesse apêndice, a média quadrática da distância $\langle \overline{r_{ee}^2} \rangle$ entre as extremidades do polímero estima a extensão do mesmo. Tomando o comprimento de persistência do polímero muito menor que o comprimento de contorno, têm-se pequenos estiramentos de onde obtém,

$$z \cong \sqrt{2AL_C} \leftrightarrow \langle \overline{r_{ee}^2} \rangle \cong 2AL_C \quad (\text{B.18})$$

Avaliando a energia envolvida no limite flexível, pode-se observar que a energia é da ordem de $k_B T$, estando o polímero próximo da conformação de equilíbrio. Pelo princípio da equipartição de energia, tem-se que:

$$\frac{3}{2} k_B T = \frac{1}{2} k z^2 \quad \rightarrow \quad k = \frac{3 k_B T}{z^2} \quad (\text{B.19})$$

Substituindo os valores de z dado pela equação (B.18) e de k dado pela equação (B.1) na equação (B.20) obtém a equação da força estimada em pequenos estiramentos:

$$F = - \frac{3 k_B T}{2A} \frac{z}{L_C} \quad (\text{B.20})$$

II- PARA O LIMITE RÍGIDO, $L_c \ll A$ (ESTIRAMENTOS MÁXIMOS):

Para estiramentos máximos, ou seja, onde o polímero se encontra longe da conformação de equilíbrio, a estimativa adequada da elasticidade passa a não ser descrita pela lei de Hooke. Para estimar a elasticidade do polímero dentro do limite rígido usa as considerações energéticas construídas no modelo de Kratky-Porod, retirando dessa equação o trabalho executado pela força necessária para manter a molécula totalmente estirada.

$$E_{WLC} = \frac{1}{2}k_f \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - Fz \quad (\text{B.21})$$

Onde os parâmetros foram descritos no apêndice A e F foi descrito neste apêndice. Para o limite rígido, onde os estiramentos são máximos tem-se:

$$z \sim L_c \leftrightarrow \langle \overline{r_{ee}^2} \rangle \cong L_c^2 \quad (\text{B.22})$$

A conformação do DNA nesta situação apresenta total estiramento e ao longo do polímero qualquer vetor unitário $\hat{t}(s)$ será praticamente paralelo à curva $\vec{r}(s)$ que descreve a conformação da molécula. Definindo a componente t_z do vetor $\hat{t}(s)$ dada ao longoda extensão z do polímero, esta componente se manterá aproximadamente constante e terá valor mais elevado que as demais componentes t_x e t_y referentes aos eixos x e y , respectivamente.

Portanto, o módulo do vetor unitário $\hat{t}(s)$, determinado por $t^2 = t_x^2 + t_y^2 + t_z^2 = 1$, sendo as componentes t_x e t_y praticamente perpendiculares a curva $\vec{r}(s)$ já que as três componentes entre si são perpendiculares e a componente t_z do vetor $\hat{t}(s)$ dada ao longoda extensão z do polímero, ou seja, é paralela ao mesmo, e observando o tamanho das componentes t_x e t_y (pequenos), tem-se que $t_x^2 + t_y^2 = t_{\perp}^2$ e sendo assim;

$$t_z = \sqrt{1 - t_{\perp}^2}. \quad (\text{B.23})$$

Como t_x e t_y são muito pequenos, quando elevados ao quadrado ficam ainda menores, logo $t_x^2 + t_y^2 = t_{\perp}^2$ e t_{\perp}^2 é muito menor que um, tornando razoável tomar a aproximação de primeira ordem na expansão da equação (B.23), obtém:

$$t_z \cong 1 - \frac{t_{\perp}^2}{2} \quad (\text{B.24})$$

Utiliza-se a expansão e a aproximação para exprimir a estimativa da extensão do estiramento do polímero, que fornece o seguinte resultado;

$$z \cong \int_0^{L_C} t_z(s) ds \quad (\text{B.25})$$

Dispondo das equações (B.24) e (B.25) dadas pelas aproximações de primeira ordem nas expansões, juntamente com a consideração de que t_z é praticamente constante ao longo da curva que determina o polímero, pode-se substituir $\frac{\partial t}{\partial s}$ por $\frac{\partial t_{\perp}}{\partial s}$ assim como, (B.24) e (B.25), na equação (B.21), que fornece:

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} k_B T A \int_0^{L_C} \left| \frac{\partial \widehat{t}_{\perp}}{\partial s} \right|^2 ds - F \int_0^{L_C} \left(1 - \frac{t_{\perp}^2}{2} \right) ds = \frac{1}{2} k_B T \int_0^{L_C} \left[A \left| \frac{\partial t_{\perp}}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_B T} |t_{\perp}|^2 \right] ds - FL_C. \quad (\text{B.26})$$

Observando a equação acima se percebe a presença de uma energia associada a cada modo normal de vibração, logo aplicando a transformada de Fourier para decompor a energia total em seus modos normais. Aplicando a definição;

$$\widetilde{t}_{\perp}(q) = \int \frac{1}{2\pi} [e^{iqs} t_{\perp}(s) ds] \quad (\text{B.27})$$

Substituindo (B.27) em (B.26) tem-se a seguinte expressão de energia:

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} k_B T \int \frac{1}{2\pi} \left[A q^2 + \frac{F}{k_B T} \right] |\widetilde{t}_{\perp}|^2 dq - FL_C. \quad (\text{B.28})$$

A partir da equação (B.28) calcula-se o valor quadrático médio de t_{\perp} , resultando:

$$\langle t_{\perp}^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T}{FA}}. \quad (\text{B.29})$$

O polímero fica praticamente linear quando submetido ao estiramento, com isso, z fica praticamente sobreposto ao comprimento de contorno L_C , sendo assim, a razão entre o estiramento e o comprimento de contorno $\left(\frac{z}{L_C}\right)$ resulta na componente escalar ao longo do eixo z do vetor unitário, isto é, $\frac{z}{L_C} \cong t_z$ levando a:

$$\frac{z}{L_C} \cong 1 - \frac{t_{\perp}^2}{2} \rightarrow \frac{z}{L_C} \cong 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{FA}}, \quad (\text{B.30})$$

Colocando a força F em função da extensão z e deixando-a em evidência $F(z)$ e considerando os estiramentos máximos do polímero:

$$F(z) = \frac{1}{4} \frac{k_B T}{A} \left[\frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L_C}\right)^2} \right]. \quad (\text{B.31})$$

EQUAÇÃO DE MARKO E SIGGIA

As equações (B.20) e (B.31) expressam mínimos e máximos estiramentos do polímero respectivamente. Caso a equação (B.31) fosse válida para pequenos estiramentos uma expansão de primeira ordem levaria para a equação (B.20), o que não é possível. Para grandes estiramentos, Marko e Siggia interpolaram os termos na equação (B.31) acrescentando dois termos de correção, somando o termo $\frac{z}{L_C} - \frac{1}{4}$, sendo insignificantes quando $z \sim L_C$, mas quando fazemos a expansão em primeira ordem nos dá a força em função da extensão para pequenos estiramentos. Marko e Siggia propuseram esta solução

$$F(z) = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L_C} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L_C}\right)^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (\text{B.32})$$

APÊNDICE C: EQUILÍBRIO QUÍMICO NAS INTERAÇÕES DNA-LIGANTES

As ligações entre a molécula de DNA e os ligantes podem ocorrer das mais variadas formas. Isso ocorre devido à estrutura, à conformação e a composição do DNA. Entre elas, temos a ligação de interação de natureza eletrostática, ligação entre os pares de base, ligação entre as fendas da molécula de DNA, entre outras. Essas ligações ocorrem de acordo à interação entre a estrutura do ligante e a molécula do DNA, podendo ocorrer isoladas ou concomitantemente. As interações que ocorrem espontaneamente no interior celular da molécula de DNA e várias substâncias são conduzidas por condições de equilíbrios termodinâmicos e químicos.

Buscando compreender o equilíbrio químico do sistema composto pelas moléculas de DNA e os ligantes, ao associá-las de forma genérica teremos,



Onde A e B são as substâncias que passarão pela reação de associação e C é produto dessa reação, k_i e k_d são as constantes químicas intrínsecas de associação e de dissociação da reação, respectivamente. Essas constantes são chamadas também de constantes macroscópicas ou termodinâmicas e são definidas em termos das concentrações molares de A e B , como,

$$k_i = \frac{[C]}{[A][B]} \quad \text{e} \quad k_d = \frac{[A][B]}{[C]} \quad (\text{C.2})$$

Ou seja,

$$k_d = k_i^{-1} \quad (\text{C.3})$$

Observe que a equação (C.1) não considera a influência de uma associação sobre a formação de uma seguinte, mesmo ela sendo capaz de fornecer a constante de afinidade entre os reagentes. No caso em estudo, onde a associação de ligantes à molécula de DNA acontece muitas vezes mediante a dependência de outras, ou seja, à medida que associamos um ligante à molécula de DNA isso pode acarretar na facilitação de uma nova associação, ou a objeção. Para estudarmos então esse modo de associação usaremos o modelo de ligação cooperativa de Hill.

COOPERATIVIDADE NO MODELO DE HILL

O modelo do britânico Archibald Vivian Hill caracteriza os estudos do modo de associações de forma a considerar ligações cooperativas e também, que os sítios de ligação podem admitir um ou mais ligantes. Sendo assim, analisando a reação química a seguir,



Onde se tem a constante de associação aparente k_A , dado por:

$$k_A = \frac{[B(A)_n]}{[B][A]^n} \quad (\text{C.5})$$

A constante de associação aparente da equação C.5 representa a reação global de associação, ou seja, uma única molécula do substrato interage com n moléculas do ligante. Ao passo que, as constantes de associação intrínsecas da equação C.2 representam a reação de um único sítio de ligação do substrato com uma única molécula de ligante. Observe que na situação em que o substrato possui um único sítio de ligação tem-se a constante de associação aparente idêntica a constante de associação intrínseca.

Sendo assim, caso as ligações ocorram mediante a associação de uma molécula seguida de outra onde as constantes dessas associações sejam iguais, tem-se a seguinte relação;

$$k_A = k_i^n \quad (\text{C.6})$$

Onde k_A é a constante aparente e k_i é a constante intrínseca de seguidas associações.

Considerando $[A] \equiv C_f$ é a concentração dos ligantes livres, $[C] \equiv C_b$ é a concentração de ligantes ligados e C_{bp} a concentração de pares de base do DNA que depende do DNA, temos que $[B] \equiv C_{bp} - C_b$ é a concentração de pares de base do DNA subtraída da concentração de ligantes ligados. Substituindo as relações na equação (C.5), tem-se:

$$k_A = \frac{C_b}{C_f^n (C_{bp} - C_b)} \quad (\text{C.7})$$

A fração de sítios ligados r em um processo de ligação de ligantes aos sítios do DNA pode ser obtida através da razão entre a concentração de ligantes ligados (C_b) e a concentração de pares de base do DNA (C_{bp}), como segue;

$$r = \frac{C_b}{C_{bp}} \quad (\text{C.8})$$

Note que ao efetuar a divisão da equação C.7 pela concentração de pares de base do DNA (C_{bp}) é possível identificar a fração de sítios ligados r , observe;

$$k_A = \frac{\frac{c_b}{c_{bp}}}{\frac{c_f^n(c_{bp} - c_b)}{c_{bp}}} = \frac{r}{c_f^n(1-r)} \quad (\text{C.9})$$

Colocando a fração de sítios ligados r em evidência e de posse da equação (C.6), tem-se;

$$r = \frac{(k_i C_f)^n}{1 + (k_i C_f)^n} \quad (\text{C.10})$$

A equação (C.10) é a equação da isoterma de ligação de Hill, onde n é o expoente de Hill. Sabe-se que a constante intrínseca de ligação k_i varia significativamente em função da temperatura, o que restringe a equação da reação de associação de Hill, pois ela vale somente à temperatura constante.

Expressando graficamente a isoterma de ligação de Hill, observamos que a isoterma é dada por uma curva que relaciona a fração ligada de ligante por substrato (r) com a concentração de ligante livre em solução C_f . A determinação desta curva seja ela de maneira teórica ou experimental, possibilita o conhecimento de propriedades físico-químicas relevantes do sistema.

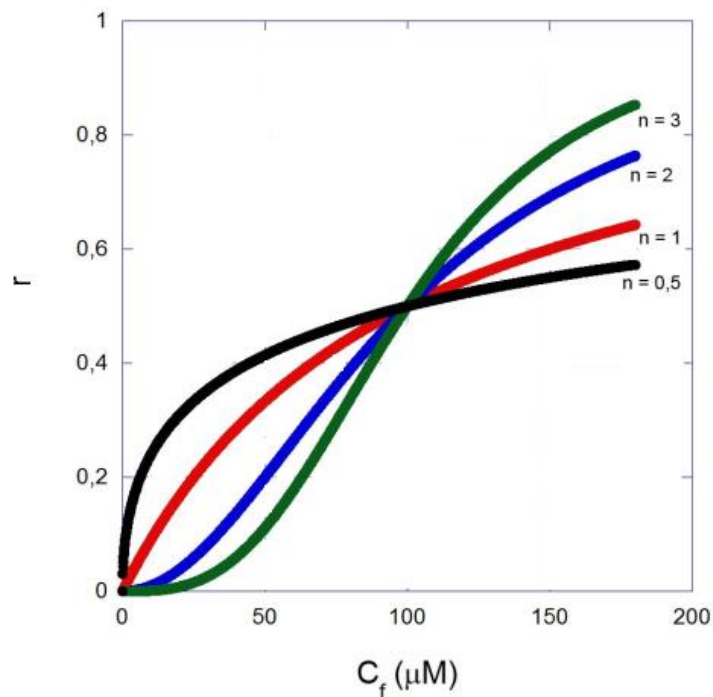
Considerando uma solução, saturada, em equilíbrio e a possibilidade de um ligante ocupar mais de um par de bases do DNA, temos uma ligação na qual o DNA possui todos os seus pares de base ocupados, onde cada par de bases encontra-se ocupado exatamente por um ligante. Nesta situação, a fração de sítios ligados atinge seu valor máximo, ou seja, 100%. Todavia, se o ligante ocupar mais de um par de bases do DNA a fração de sítios ligados será menor que 1, ou seja, menor que o valor máximo. Logo, para uma fração máxima de sítios ligados ($r_{máx}$), podemos reescrever a equação (C.10) da seguinte forma,

$$r = \frac{r_{máx}(k_i C_f)^n}{1 + (k_i C_f)^n} \quad (\text{C.11})$$

Na Figura 39 temos curvas típicas para fração de sítios ligados (r) em função da concentração de ligantes livres em solução (C_f), com valores do expoente de Hill $n = 0,5; 1; 2$ e 3 . Essas curvas possuem valores fixos para a constante de associação intrínseca (k_i) e para a fração máxima de sítios ligados $r_{máx}$, onde $k_i = 10^4 M^{-1}$ e $r_{máx} = 1$. Observe que

quanto maior o valor do expoente de Hill (n) mais rapidamente ocorre a saturação, ou seja, o valor $r_{m\acute{a}x} = 1$ é atingido quando temos menores valores da concentração de ligantes, implicando maior afinidade do ligante pelos sítios do DNA quanto maior for o valor do expoente de Hill.

Figura 40 - Fixando a constante de ligação química $k_i = 10^4 M^{-1}$ e $r_{m\acute{a}x} = 1$ temos este comportamento gráfico que descreve a equação (C.11) para alguns valores do expoente de Hill (n). Imagem retirada de [23].



A Figura 40 mostra que quanto maior o valor do expoente de Hill (n), menor será a quantidade de ligantes livres necessários para que o sistema atinja a saturação, ou seja, maior a afinidade química aparente dos ligantes pelo substrato, explicando o porquê da saturação ocorrer para um valor menor de concentração de ligantes livres em solução (C_f).

- Se $n > 1$, a constante de associação aparente (k_A) aumenta com o expoente de Hill (n), ou seja, a ligação de uma molécula de ligante favorece as ligações consecutivas. Esta alta afinidade do ligante pelo substrato se revela à medida que o ligante seguinte liga-se ao DNA mediante a uma maior afinidade que o ligante anterior ligado, esse aumento da afinidade caracteriza uma interação dada por uma cooperatividade positiva;
- Se $n < 1$, a constante de associação aparente (k_A) diminui com o expoente de Hill (n), ou seja, a ligação de uma molécula de ligante dificulta as ligações consecutivas. Esta

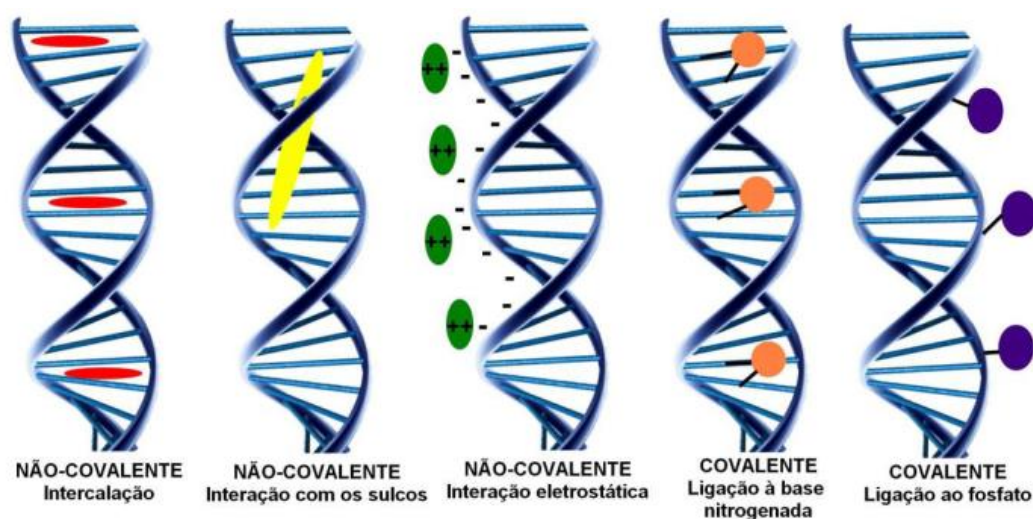
baixa afinidade do ligante pelo substrato se revela à medida que o ligante seguinte liga-se ao DNA mediante a uma menor afinidade que o ligante anterior ligado, esse diminuição da afinidade caracteriza uma interação dada por uma cooperatividade negativa;

- Se $n = 1$, a constante de associação aparente (k_A) é igual à constante de ligação intrínseca, $k_A = k_i$, a ligação de uma molécula de ligante não interfere nas ligações consecutivas, ou seja, a afinidade é independente do número prévio de ligantes ligados ao substrato. As associações são independentes e esse tipo de interação é classificado como interação não-cooperativa.

APÊNDICE D: POSSÍVEIS MODOS DE LIGAÇÃO ENTRE LIGANTES E A MOLÉCULA DE DNA

As possíveis interações e associações entre a molécula de DNA e diversos ligantes podem ocorrer de vários modos distintos, sendo elas não-covalentes ou covalentes. Para as ligações não-covalentes, temos a intercalação entre os pares de base da molécula, interações com os sulcos ou ligações de fendas (que podem ocorrer de forma que a ligação ocorra com a fenda maior ou com a fenda menor) e a interação eletrostática. Já para as ligações covalentes, temos: a ligação do complexo à base nitrogenada da molécula de DNA e a ligação do complexo ao fosfato da molécula de DNA, como podemos observar nas Figuras 41 e 42.

Figura 41 - Representação esquemática dos principais modos de interação possíveis entre a molécula de DNA e pequenos ligantes [91].

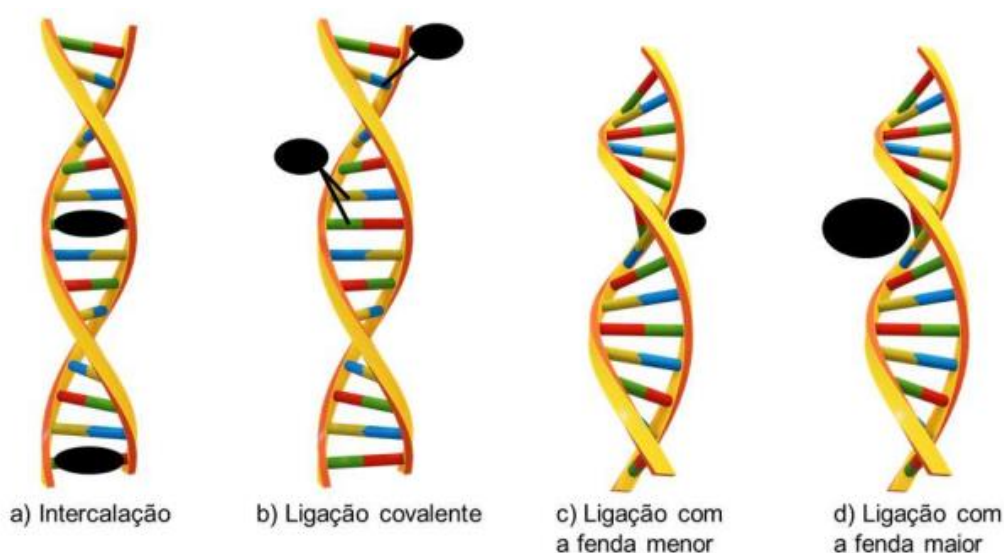


A primeira ligação apresentada nas Figuras 41 e 42 é uma ligação não-covalente conhecida como interação de intercalação. A intercalação é dada pela inserção das moléculas do ligante entre os pares de bases adjacentes da molécula de DNA, o que acarreta uma substancial mudança estrutural na molécula, como um desenrolamento, um enrijecimento e um alongamento da dupla hélice da molécula de DNA. Após a intercalação, o esqueleto da molécula perde a estrutura helicoidal regular, os ângulos de torção que envolve os grupos açúcar-fosfato sofrem uma alteração para que seja possível acomodar o composto aromático, provocando a separação dos pares de bases no sítio de intercalação, alongando a dupla hélice promovendo um decréscimo no diâmetro da hélice. Este tipo de ligação do ligante à molécula de DNA ocorre devido à molécula do ligante possuir anéis aromáticos planares. A intercalação é um tipo de ligação reversível, ou seja, as moléculas intercaladas podem ser retiradas. A

estabilização do complexo formado pela intercalação do intercalante à molécula de DNA é dada principalmente pelas interações de empilhamento π entre os grupos aromáticos heterocíclicos dos pares de bases e as estruturas aromáticas do intercalante. Contribuem também, as ligações hidrofóbicas, as ligações de hidrogênio e as forças eletrostáticas [93-101].

A segunda ligação não covalente importante da Figura 41 é a interação com os sulcos, ou interações por fendas, elas acontecem entre as moléculas dos compostos e a dupla hélice da molécula de DNA tanto com as fendas menores (Figura 42(c)), quanto às fendas maiores (Figura 42(d)). Os ligantes de fenda menor são capazes de modificar a elasticidade da molécula e liga-se a seqüências de pares de bases AT, preferencialmente. Geralmente são moléculas menores (até 1000g/mol) como apresentados na Figura 42(c) destacam-se por apresentarem propriedades antibióticas e antitumorais. Já a ligação com a fenda maior, como podemos observar na Figura 42 (d), acontece com moléculas maiores (acima de 1000g/mol), sendo também uma ligação não covalente e que envolve um forte componente eletrostático. Essas interações são classificadas como reversíveis [102-108].

Figura 42 - (a) Intercalação, (b) Ligação covalente, Ligações com os sulcos ou fendas, (c) fenda menor e a (d) fenda maior, respectivamente [92].



Sabe-se que a molécula de DNA em solução aquosa apresenta uma alta densidade linear de carga negativa, devido ao seu grupo fosfato. Por isso, diferentes partes da molécula de DNA interagem fortemente umas com as outras de maneira repulsiva, podendo interagir também com ligantes positivos, como íons, macro-íons e cátions multivalentes de forma atrativa. Portanto, entre todas as interações possíveis existentes entre a molécula de DNA e ligantes, temos como

parte essencial a interação eletrostática. Ela é capaz de modificar a conformação da molécula em solução e também alterar seu comprimento de persistência. Para soluções com pouco sal, o comprimento de persistência tende a ser maior, pois ocorre uma blindagem menor dos fosfatos da molécula de DNA pelos íons positivos da solução onde a molécula se encontra. O papel desempenhado por esses íons (que se encontram próximos dos fosfatos da dupla hélice em solução) é essencial para blindar a repulsão dos diferentes segmentos da molécula. Esta interação eletrostática com ligantes positivos em solução pode levar a condensação da molécula [109, 110].

A transição da molécula de DNA na forma dispersa em solução, à forma condensada, é promovida pela ligação dos cátions multivalentes ao longo da dupla hélice da molécula de DNA, os cátions localizam-se próximos aos fosfatos, inúmeras dobras da molécula podem ser observadas, o que promove um aumento significativo da densidade local de segmentos da molécula. Esta condensação absoluta da molécula de DNA de fita dupla é obtida somente por interação com ligantes catiônicos que possuem carga igual ou superior a +3.

As propriedades mecânicas da molécula de DNA como o comprimento de persistência e o comprimento de contorno, são extremamente relevantes quanto ao processo de condensação da molécula. Fragmentos muito pequenos de DNA, onde temos o comprimento de contorno da mesma ordem do comprimento de persistência, não são facilmente condensados.

A ligação covalente entre os átomos do ligante e as bases nitrogenadas do DNA, quarta interação da Figura 41, ocorre devido ao compartilhamento dos seus elétrons para se manterem estáveis. O produto desta ligação possui a estrutura conhecida como aduto. Elas podem ocorrer mediante a uma única ligação química, conhecida como monoaduto, ou duas ligações químicas, diadutos, como mostrado na Figura 42(b). A ligação covalente é geralmente classificada como irreversível e inibe totalmente os processos celulares da molécula de DNA [92].

Por fim, sabem-se que existem ligantes que interagem com a molécula de DNA com múltiplos modos de ligação, cuja dependência pode estar ligada as propriedades da solução tampão, as condições externas, as seqüências de pares de bases, as condições distintas que esse complexo é submetido, entre outros.

APÊNDICE E: ARTIGOS PUBLICADOS

Neste apêndice apresentamos o artigo publicado durante o período de doutorado da autora dessa tese e o artigo de sua parceria com o laboratório de Física Biológica da Universidade Federal de Viçosa-MG.

- **Revista Biochemical and Biophysical Research Communications**

J.A.D. Batista, L. Oliveira, T.A. Moura, V.C. dos Anjos, M.J.V. Bell, M.S. Rocha, “On the use of Europium (Eu) for designing new metal-based anticancer drugs”. 531, 372-376 (2020).

- **Journal of Physical Chemistry B**

Ethe A. Costa, Amanda P. Gonçalves, Josiane A. D. Batista, Raniella F. Bazoni, Anésia A. Santos, Márcio S. Rocha. “New insights on the mechanism of action of the drug chloroquine: direct interaction with DNA and cytotoxicity”. 126, 19, 3512-3521 (2022).



Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical and Biophysical Research Communications

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybbrc



On the use of Europium (Eu) for designing new metal-based anticancer drugs

J.A.D. Batista ^a, L. Oliveira ^b, T.A. Moura ^b, V.C. dos Anjos ^a, M.J.V. Bell ^a, M.S. Rocha ^{b,*}

^a Departamento de Física, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^b Departamento de Física, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2020

Accepted 17 July 2020

Available online 14 August 2020

Keywords:

Europium

DNA

Single molecule force spectroscopy

Optical tweezers

Cooperative binding

ABSTRACT

Europium oxide (Eu_2O_3) was used to evaluate the affinity of this rare earth element for interacting with double-stranded (ds) DNA molecules. To perform the study, we used single molecule force spectroscopy with optical tweezers and gel electrophoresis assays. Force spectroscopy experiments show that Eu_2O_3 presents a strong interaction with dsDNA, and the binding is independent on the ionic strength used in the surrounding environment. Among the main characteristics of the interaction, Eu_2O_3 tends to bind in a cooperative way, forming bound clusters of ~ 3 molecules, and presents a high equilibrium association binding constant on the order of 10^5 M^{-1} . In addition, gel electrophoresis confirm the weak electrostatic character of the interaction and explicit show that Eu_2O_3 does not interfere on drug intercalation into the double-helix. Such results demonstrate the potential of europium for interacting with nucleic acids and strongly suggest that this rare earth element may be considered for the design of new metal-based anticancer drugs in the future.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The rational design of new drugs for chemotherapies and other kinds of treatments for human diseases is an important topic in pharmacology and related fields. In particular, metal-based compounds constitute a class of drugs largely employed in current chemotherapies [1,2], specially the platinum-based compound cisplatin and its derivatives [3–6]. On the other hand, advances on drug development based on metals and semimetals such as Ruthenium, Osmium, Iridium, Iron, Cooper, Gold, Vanadium, Arsenic and others were recently reported [1]. Nevertheless, studies using rare earth elements are sparse, which opens up a huge range of possibilities for the design of new promising drugs using these elements.

Europium (Eu) is the most reactive rare earth metal, and a previous study performed with a particular Eu-based compound have achieved promising results concerning the development of Eu-based anticancer drugs [7]. Such compound, designed linking various aromatic rings to the Eu atom, interacts with DNA via hydrophobic groove binding with an equilibrium association binding

constant on the order of 10^5 M^{-1} , also exhibiting antimicrobial activity [7]. Nevertheless, since the aromatic rings alone can interact with DNA via hydrogen bonds, hydrophobic and π - π stacking interactions [8,9], it is difficult to discriminate the real effect of the Eu element in such compound. In addition, europium affinity of single-stranded DNA was also recently demonstrated [10].

In the present study, we investigate the effects of europium on double-stranded DNA using the simplest stable compound containing such element: the europium oxide Eu_2O_3 . Pure europium cannot be used here because the element is very reactive and would rapidly oxidize in the sample chamber. To perform the study, we used force spectroscopy with optical tweezers and gel electrophoresis assays. Single molecule force spectroscopy is today recognized as the state-of-the-art technique for studies concerning the interactions between nucleic acids and ligands such as drugs and proteins, being able to provide information on the binding modes and on the physical chemistry of the interaction [11–13]. Gel electrophoresis, on the other hand, is a classic technique which allows one to observe the behavior of a large ensemble of nucleic acids molecules, thus complementing the single molecule analysis obtained from force spectroscopy. Our results show that Eu_2O_3 binds cooperatively to the double-helix with a high equilibrium association constant (on the order of 10^5 M^{-1}), i. e., close to that

* Corresponding author.

E-mail address: marcios.rocha@ufv.br (M.S. Rocha).

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.07.080>

0006-291X/© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

New Insights into the Mechanism of Action of the Drug Chloroquine: Direct Interaction with DNA and Cytotoxicity

Ethe A. Costa, Amanda P. Gonçalves, Josiane A. D. Batista, Raniella F. Bazoni, Anésia A. Santos, and Márcio S. Rocha*

Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.2c01119>

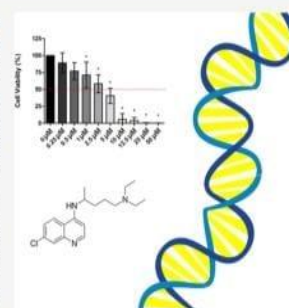
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

ABSTRACT: Chloroquine (CLQ) and hydroxychloroquine (HCLQ) are compounds largely employed in the treatment of various human diseases for decades. Nevertheless, a number of intrinsic details concerning their mechanisms of action, especially at the molecular level, are still unknown or have presented controversial results in the literature. Using optical tweezers, here, we investigate at the single-molecule level the molecular mechanism of action of the drug CLQ in its intrinsic interaction with the double-stranded (ds)DNA molecule, one of its targets inside cells, determining the binding modes and the physicochemical (binding) parameters of the interaction. In particular, we show that the ionic strength of the surrounding medium strongly influences such interaction, changing even the main binding mode. In addition, the cytotoxicity of CLQ against three different cell lines was also investigated here, allowing one to evaluate and compare the effect of the drug on the cell viability. In particular, we show that CLQ is highly cytotoxic at a very low (a few micromolar) concentration range for all cell lines tested. These results were rigorously compared to the equivalent ones obtained for the closely related compound hydroxychloroquine (HCLQ), allowing a critical comparison between the action of these drugs at the molecular and cellular levels.



INTRODUCTION

Although scientists and the pharmaceutical industry have discovered and synthesized a number of efficient drugs to treat human and animal diseases over the past decades, important peculiarities concerning the molecular mechanisms of action of many of these drugs remain unknown, especially with respect to the intrinsic interactions of such compounds with cellular components like proteins and nucleic acids.

Chloroquine (CLQ) and hydroxychloroquine (HCLQ) are compounds largely used in malarial treatment. Besides that, they are also used to treat autoimmune diseases such as lupus erythematosus and rheumatoid arthritis.^{1–3} In early 2020, some studies proposed that these antimalarials agents could be an alternative in tackling the COVID-19 pandemics.^{3,4} Nevertheless, their use for this purpose is no longer recommended by the World Health Organization (WHO) since they offer a high risk of adverse effects and, in addition, their antiviral effects have not been demonstrated in clinical trials.⁵

In fact, CLQ and its derivative HCLQ, which was synthesized with the purpose to reduce the cytotoxicity of the former,⁶ present a wide range of side effects that can be explained by their action upon neural and cardiac cells, where low concentrations of these molecules cause the inhibition of important ionic channels.^{7–10} In addition, previous studies have shown that both CLQ and HCLQ can directly interact

with DNA molecules, thus being potentially cytotoxic to many types of cells.^{11–19}

Despite the studies cited above, many peculiarities of the DNA interaction with CLQ are still unknown. In particular, a single-molecule study for investigating such peculiarities is still lacking. This type of study is today recognized as the state of the art to characterize DNA interactions with ligands such as drugs or proteins, allowing one to determine the binding modes and the physicochemical (binding) parameters of these interactions.^{20–24} Here, we fill this gap, presenting a single-molecule study, which unveils the main aspects of the DNA–CLQ interaction. The results achieved were compared to those obtained from a classic bulk technique, gel electrophoresis. Finally, the conclusions drawn were rigorously compared to an equivalent study recently performed with the similar compound HCLQ,¹⁸ providing new insights into the intrinsic differences between the molecular mechanisms of action of the two drugs. In summary, both drugs interact strongly with

Received: February 15, 2022

Revised: April 26, 2022

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A. Casini, A. Vessieres, S. M. Meier-Menches, *Metal-based Anticancer Agents*, 1st Edition, Royal Society of Chemistry (RSC), 2019.
- [2] U. Ndagi, N. Mhlongo, M. E. Soliman, Metal complexes in cancer therapy – an update from drug design perspective., *Drug Des. Devel. Ther.* 11 (3) (2017) 599–616.
- [3] S. M. Cohen, S. J. Lippard, Cisplatin: From dna damage to cancer chemotherapy, *Prog. Nucleic Acid Re.* 67 (2001) 93–130.
- [4] L. Oliveira, M. S. Rocha, Force spectroscopy unravels the role of ionic strength on dna-cisplatin interaction: Modulating the binding parameters., *Phys. Rev. E* 96 (2017) 032408.
- [5] L. Oliveira, J. Caquito Jr, M. Rocha, Carboplatin as an alternative to cisplatin in chemotherapies: New insights at single molecule level, *Biophys. Chem.* 241.
- [6] L. Oliveira, J. Caquito Jr, M. Rocha, Oxaliplatin effects on the dna molecule studied by force spectroscopy, *Biomed. Phys. Eng. Exp.* 5.
- [7] S. Jahani, M. Khorasani-Motlagh, M. Noroozifar, Dna interaction of europium(iii) complex containing 2,2-bipyridine and its antimicrobial activity., *J. Biomol. Struct. Dyn.* 34 (2016) 612–624.
- [8] I. C. Lin, O. A. von Lilienfeld, M. D. Coutinho-Neto, I. Tavernelli, U. Rothlisberger, Predicting noncovalent interactions between aromatic biomolecules with london-dispersion-corrected dft, *J. Phys. Chem. B* 111 (2007) 14346–14354.
- [9] L. D. Williams, M. Egli, Q. Gao, A. Richa, Dna intercalation: helix unwinding and neighbor-exclusion., *Structure and Function - Proc. Conversation in Biomolecular Stereodynamics.* 1 (1992) 7th.
- [10] S.-F. Xue, X.-Y. Han, Z.-H. Chen, Q. Yan, Z.-Y. Lin, M. Zhang, G. Shi, The chemistry of europium (iii) encountering dna: Sprouting unique sequence-dependent performances for multifunctional time-resolved luminescent assays, *Analyt. Chem.* 90 (17) (2018) 10614–10620.

- [11] M. S. Rocha, Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate dna interactions with drugs and proteins in single molecule experiments., *Integr. Biol.* 7 (2015) 967–986.
- [12] K. R. Chaurasiya, T. Paramanathan, M. J. McCauley, M. C. Williams, Biophysical characterization of dna binding from single molecule force measurements., *Phys. Life Rev.* 7 (2010) 299–341.
- [13] I. Heller, T. P. Hoekstra, G. A. King, E. J. G. Peterman, G. J. L. Wuite, Optical tweezers analysis of dna-protein complexes., *Chem. Rev.* 114 (2014) 3087–3119.
- [14] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff and K. Roberts, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, 5th edn, 2007.
- [15] Watson, J.D. and Crick, F. H. C., “Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid” *Nature* 171 (4356), 737-738 (1953).
- [16] Watson, J.D. and Crick, F. H. C., “Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid” *Nature* 171 (4361), 964-967 (1953).
- [17] Watson, J. and Crick, F., “Nobel Prize in Physiology or Medicine 1962 for their discoveries concerning the molecular structure of nucleic acids and its significance for information transfer in living material.” [https:// www.nobelprize.org/prizes/medicine/1962/summary/](https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1962/summary/).
- [18] Griffiths, A. J. F., Miller, J. H., Suzuki, D.T., Lewontin, R. C., and Gelbart, W. M., *Introdução à genética*. Guanabara Koogan, 7th ed. (2002).
- [19] Schrank, A., *Biologia Molecular Básica*. Mercado Aberto, 3rd ed. (2003).
- [20] ALBERTS, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th. ed. New York: Garland Pub. Inc., 2002.
- [21] WATSON, J. D. et al. *Biologia molecular do gene*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006.
- [22] Ribeiro, Maria Cecilia Menks., *Genética molecular*, 2009.
- [23] Rocha, Márcio Santos, *Interações DNA-ligantes: uma introdução*. 1°ed. São Paulo: Editora Livraria da Física, 2020.

- [24] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles and S. M. Block, *Biophys. J.*, 1997, 72, 1335–1346.
- [25] T. Strick, J.-F. Allemand, D. Bensimon, R. Lavery and V. Croquette, *Physica A*, 1999, 263, 392–404.
- [26] S. B. Smith, L. Finzi and C. Bustamante, *Science*, 1992, 258, 1122–1126.
- [27] D. Boal, *Mechanics of the cell*, Cambridge University Press, 2002.
- [28] A. Vologodskii and M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucl. Acids Res.*, 2013, 41, 6785–6792.
- [29] A. Vologodskii, Q. Du and M. Frank-Kamenetskii, *Artif DNA PNA XNA*, 2013, 4, 1–3.
- [30] S. Geggier and A. Vologodskii, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, **107**, 15421–15426.
- [31] <http://www.megatimes.com.br/2014/05/lantanideos-lantanios-ou-terras-raras.html>. Acessado dia 11 de fevereiro de 2022.
- [32] Paganini, Paula Pinheiro, “Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido misto de estanho/titânio dopadas com lantanídeos para marcação biológica”. São Paulo, 2012.
- [33] Martins, Tereza S. Isolani, Paulo Celso. “Terras raras: aplicações industriais e biológicas” *Química Nova*, Vol. 28, No. 1, 111-117, 2005.
- [34] A. Ashkin, *Phys. Rev. Lett.*, 1970, 24, 156&.
- [35] A. Ashkin and J. M. Dziedzic, *Science*, 1987, 235, 1517–1520.
- [36] A. Ashkin, *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 4853–4860.
- [37] M. S. Rocha, *Am. J. Phys.*, 2009, **77**, 704–712.
- [38] J. R. Moffitt, Y. R. Chemla, S. B. Smith and C. Bustamante, *Annu. Rev. Biochem.*, 2008, **77**, 205–228.
- [39] D. G. Grier, *Nature*, 2003, 424, 810–816.

- [40] K. Svoboda and S. M. Block, *Annu. Rev. Bioph. Biom.*, 1994, 23, 247–285.
- [41] K. C. Neuman and S. M. Block, *Rev. Sci. Instrum.*, 2004, 75, 2787–2809.
- [42] Rocha, M. S. "Tese apresentada ao departamento de física da Universidade Federal de Minas Gerais, Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicação no estudo da interação DNA - fármacos", (2008).
- [43] Silva, E.F. Dissertação apresentada ao departamento de física da Universidade Federal de Viçosa, "Estudo da Interação DNA-HOECHST (33258) por pinçamento óptico", (2013).
- [44] Crisafuli, F. A. P., "Caracterização das Interações do DNA com as moléculas Actinomicina de Gelred." Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil (2016)
- [45] Bazoni, R. F., "Efeitos de forças externas nas propriedades mecânicas de complexos DNA-ligantes.", Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil (2016).
- [46] Lima, C.H.M., "Estudo da interação do intercalante doxorubicina em condensados de DNA via espectroscopia de força." Tese de doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil (2018).
- [47] Hames, B. D. & Rickwood, D. *Gel Electrophoresis of Proteins*. 2ed. New York, 1990.
- [48] Sigma, Aldrich. (Disponível em: sigmaaldrich.com.br (Acesso em 13 de março de 2022)).
- [49] Naoum, P. C. *Eletroforese: Hemoglobinopatias, Proteínas Séricas, Lipoproteínas e DNA*. São Paulo: Editora Santos.
- [50] Andrews, A.T. (1986). *Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications* (2nd edn). Oxford University Press, Oxford.
- [51] Dunn, M. J. (1993). *Gel electrophoresis: proteins*. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- [52] Allen, R.C. and Budowle, B. (1994). *Gel electrophoresis of proteins and nucleic acids*. De Gruyter, Berlin.

- [53] Garfin, D. E. (1995). In *Introduction to biophysical methods for protein and nucleic acid research* (ed. J.A. Glasel and M.P. Deutscher), p. 53. Academic Press, SanDiego.
- [54] Westermeier, R. (1997). *Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations* (2nd edn). VCH Press, Weinheim.
- [55] Hames, B. D. (ed.) (1998). *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach* (3rd edn). Oxford University Press, Oxford.
- [56] Chramba, A. (1985). *The practice of quantitative gel electrophoresis*. VCH Press, Weinheim.
- [57] Caglio, S. and Righetti, P. G. (1993). *Electrophoresis* 14, 554.
- [58] Daune, M. (ed.) (1999). *Molecular Biophysics Structures in motion*. Oxford University Press, Oxford.
- [59] Donald, V. G. (ed) (2011) - 4nd ed. *Biochemistry*. John Wiley & sons, inc. pags. 1147, 1148, 1158.
- [60] J. F. Marko, E. D. Siggia, *Stretching dna*, *Macromolecules* 28 (26) (1995) 8759–8770.
- [61] E. F. Silva, R. F. Bazoni, E. B. Ramos, M. S. Rocha, *Dna-doxorubicin interaction: new insights and peculiarities.*, *Biopolymers* 107 (3) (2017) e22998.
- [62] L. Siman, I. S. S. Carrasco, J. K. L. da Silva, M. C. Oliveira, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, *Quantitative assessment of the interplay between dna elasticity and cooperative binding of ligands.*, *Phys. Rev. Lett.* 109 (24) (2012) 248103.
- [63] A. V. Hill, *The possible effects of the aggregation of the molecules of hemoglobin on its dissociation curves.*, *Proc. Physiol. Soc.* 40 (1910) iv–vii.
- [64] W. F. P. Bernal, E. F. Silva, M. S. Rocha, *Unraveling the physical chemistry and the mixed binding modes of complex dna ligands by single molecule stretching experiments.*, *RSC Adv.* 6 (2016) 105631–105637.
- [65] M. S. Rocha, A. D. L´ucio, S. S. Alexandre, R. W. Nunes, O. N. Mesquita, *Dna-psoralen: Single-molecule experiments and first principles calculations*, *Appl. Phys. Lett.* 95 (2009) 253703.

- [66] A. Sischka, K. Tønning, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Rios, D. Anselmetti, Molecular mechanisms and kinetics between dna and dna binding ligands, *Biophys. J.* 88 (1) (2005) 404–411. 12
- [67] R. Eckel, R. Ros, A. Ros, S. D. Wilking, N. Sewald, D. Anselmetti, Identification of binding mechanisms in single molecule-dna complexes, *Biophys. J.* 85 (3) (2003) 1968–1973.
- [68] P. S. Alves, O. N. Mesquita, M. S. Rocha, Controlling cooperativity in β -cyclodextrin-dna binding reactions., *J. Phys. Chem. Lett.* 6 (2015) 3549–3554.
- [69] V. Ramakrishnan. Histone structure and the organization of the nucleosome. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*”, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 26, 83-112 (1997).
- [70] G.Li, D. Reinberg, “Chromatin higher-order structures and regulation”, *Current Opinion in Genetics e Development* 21, 175-186 (2011).
- [71] P. G. Arscott, A. Z. Li, and V. A. Bloomfield, “Condensation of dna by trivalent cations. 1. Effects of dna length and topology on the size shape of condensed particles”, *Biopolymers* 30, 619-630, (1990).
- [72] E. Plum, P. G. Arscott, and V. A. Bloomfield, “Condensation of dna by trivalent cations. 2. Effects of dna length and topology on the size shape of condensed particles”, *Biopolymers* 30, 631-643, (1990).
- [73] L. Martin, M. C. Davies, B. J. Rackstraw, C. J. Roberts, S. Stolnik, S. J. B. Tandler, and P. M. Williams, “Observation of dna polymer condensate formation in real time at a molecular level”, *FEBS Lett* 480, 106-112, (2000).
- [74] C. Gosule and J. A. Schellman, “Compact form of dna induced by spermidine”, *Nature* 259, 333-335, (1976).
- [75] A. Bloomfield, “Dna condensation by multivalent cations? *Biopolymers* 44,269-282, (1997).
- [76] C. Gosule and J. A. Schellman, “A transition to a compact form of dna in polymer solutions”, *Proc. Natl. Acad. Sci* 68, 1886-1890, (1971).

- [77] S.-D. Li and L. Huang, *Gene Therapy*, 2006, 13, 1313–1319.
- [78] C. Sheridan, *Nature Biotech.*, 2011, 29, 121–128.
- [79] H. G. Hansma, R. Golan, W. Hsieh, C. P. Lollo, P. Mullen-Ley and D. Kwoh, *Nucl. Acids Res.*, 1998, 26, 2481–2487.
- [80] M. M. O. Sullivan, J. J. Green and T. M. Przybycien, *Gene Therapy*, 2003, 10, 1882–1890.
- [81] A.-C. Munteanu, M. Badea, R. Olar, L. Silvestro, C. Dulea, C.-D. Negut and V. Uivarosi, Synthesis and structural investigation of new bio-relevant complexes of lanthanides with 5-hydroxyflavone: DNA binding and protein interaction studies, *Molecules*, 2016, 21(12), 1737.
- [82] S. Jahani, M. Noroozifar, M. Khorasani-Motlagh, M. Torkzadeh-Mahani and M. Adeli-Sardou, In vitro cytotoxicity studies of parent and nanoencapsulated holmium-2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline complex toward fish-salmon DNA-binding properties and antibacterial activity, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, 2019, 37(17), 4437–4449.
- [83] B. H. Hussein, H. A. Azab, M. F. El-Azab and A. I. El-Falouji, A novel anti-tumor agent, Ln(III) 2-thioacetate benzothiazole induces anti-angiogenic effect and cell death in cancer cell lines, *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, 51, 99–109.
- [84] J.-H. Wei, Z.-F. Chen, J.-L. Qin, Y.-C. Liu, Z.-Q. Li, T.-M. Khan, M. Wang, Y.-H. Jiang, W.-Y. Shen and H. Liang, Watersoluble oxoglucine-Y(III), Dy(III) complexes: in vitro and in vivo anticancer activities by triggering DNA damage, leading to S phase arrest and apoptosis, *Dalton Trans.*, 2015, 44(25), 11408–11419.
- [85] K. Andiappan, A. Sanmugam, E. Deivanayagam, K. Karuppasamy, H.-S. Kim and D. Vikraman, In vitro cytotoxicity activity of novel Schiff base ligand–lanthanide complexes, *Sci. Rep.*, 2018, 8(1), 3054.
- [86] Zahra Aramesh-Boroujeni, Shohreh Jahani, Mozghan Khorasani-Motlagh, Kagan Kerman, Meissam Noroozifar *Parent and nano-encapsulated ytterbium(III) complex toward binding with biological macromolecules, in vitro cytotoxicity, cleavage and antimicrobial activity studies*. *RSC Adv.*, 2020,10, 23002-23015.
- [87] J. F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bensimon, and V. Croquette, *ph-dependent specific binding and combing of dna*, *Biophys. J.* 73(1997), no. 4, 2064–2070

- [88] A. Ben-Naim, *Cooperativity and regulation in biochemical processes*, Kluwer Academic, USA, 2001.
- [89] Lu, Xi-Liang, Fan, Jian-Jun, Liu, Yi, Hou, An-Xin, *Characterization of the interaction between cationic Erbium (III)-porphyrin complex with bovine serum albumin*, *Journal of Molecular Structure* 934(1-3):1-8, 2009.
- [90] Deng Z, Hu X, Wang Y, Yin Y, Peng B, Xu Z. Preparation, characterization, and DNA interaction studies of cationic europium luminescent copolymer. *J Biomater Sci Polym Ed.* 2015;26(1):16-31, 2014.
- [91] Barra, C. V.; Netto, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos Metalintercaladores. *Rev. Virtual Quim.*, **2015**, 7 (6), 1998-2016.
- [92] Oliveira, Rayane Maria de, A cafeína como catalisador de fármacos à base de platina: um estudo de espectroscopia de força de molécula única. Dissertação apresentada a Universidade Federal de Viçosa, 2022
- [93] Andy Sischka, Katja Toensing, Rainer Eckel, Sven David Wilking, Norbert Sewald, Robert Ros, and Dario Anselmetti. Molecular mechanisms and kinetics between dna and dna binding ligands. *Biophysical journal*, 88(1):404-411, 2005.
- [94] Jonathan B Chaires, Nanibhushan Dattagupta, and Donald M Crothers. Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: equilibrium binding studies on the interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, 21(17):3933-3940, 1982.
- [95] Nam-Kyung Lee, Jin-Sung Park, Albert Johner, Sergei Obukhov, Ju-Yong Hyon, Kyoung J Lee, and Seok-Cheol Hong. Investigation of the elasticity of a cisplatin-dna adduct via single-molecule measurements and bimodal modeling. *Physical Review E*, 79(4): 041921, 2009.
- [96] Antonino Lauria, Alessandra Montalbano, Paola Barraja, Gaetano Dattolo, and Anna Maria Almerico. Dna minor groove binders: an overview on molecular modeling and qsar approaches. *Current medicinal chemistry*, 14(20):2136-2160, 2007.

- [97] Victor A Bloomfield. Condensation of dna by multivalent cations: considerations on mechanism. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 31(13):1471-1481, 1991.
- [98] Hannon, M. J. Supramolecular DNA recognition. *Chemical Society Reviews* 2007, 36, 280.
- [99] Calladine, C. R.; Drew, H.; Luisi, B.; Travers, A.; *Understanding DNA: the molecule and how it works*, 3a ed, Elsevier: Amsterdam, 2004.
- [100] Turel, I.; Kljun J. Interactions of metal ions with DNA, its constituents and derivatives, which may be relevant for anticancer research. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2011, 11, 2661.
- [101] Keene, F. R.; Smith, J. A.; Collins, J. G. Metal complexes as structure selective binding agents for nucleic acids. *Coordination Chemistry Reviews* 2009, 253, 2021.
- [102] Boer, D. R.; Canals, A.; Coll, M. DNA binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. *Dalton Transactions* 2009, 3, 399.
- [103] Pearson, R. G. Hard and soft acids and bases, HSAB, part 1: fundamental principles. *Journal of Chemical Education* 1968, 45, 581.
- [104] Pizarro, A. M.; Sadler, P. J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie* 2009, 91, 1198.
- [105] Fontes, A. P. S.; Almeida S. G. Compostos de platina em quimioterapia do câncer. *Química Nova* 1997, 20, 398.
- [106] Chen, H.; Parkinson, J. A.; Morris, R. E.; Sadler, P. J. Highly selective binding of organometallic ruthenium ethylenediamine complexes to nucleic acids: novel recognition mechanisms. *Journal of the American Chemical Society* 2003, 125, 173.
- [107] Strekowski, L.; Wilson, B. Noncovalent interactions with DNA: an overview. *Mutation Research* 2007, 623, 3.
- [108] Wheate, N. J.; Brodie, C. R.; Collins, J. G.; Kemp, S.; Aldrich-Wright, J. R. DNA intercalators in cancer therapy: organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of analysis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2007, 7, 627.

- [109] Waring, M. J. DNA modification and cancer. *Annual Review of Biochemistry* 1981, 50, 159.
- [110] Zeglis, B. M.; Pierre, V. C.; Barton, J. K. Metallo-intercalators and metallo-insertors. *Chemical Communications* 2007, 44, 4565.
- [111] Khorasani-Motlagh M, Noroozifar M, Mirkazehi-Rigi S. Fluorescence and DNA-binding spectral studies of neodymium(III) complex containing 2,2'-bipyridine, [Nd(bpy)₂Cl(3)OH₂]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2010 Feb; 75(2):598-603.
- [112] María J. Beltrán-Leiva, Isabel Fuenzalida-Valdivia, Plinio Cantero-López, Ana Bulhões-Figueira, Jans Alzate-Morales, Dayán Páez-Hernández, and Ramiro Arratia-Pérez Classical and Quantum Mechanical Calculations of the Stacking Interaction of Nd^{III} Complexes with Regular and Mismatched DNA Sequences, *The Journal of Physical Chemistry B* 2019 123 (15), 3219-3231.
- [113] Nwe K, Andolina CM, Huang CH, Morrow JR. PARACEST properties of a dinuclear neodymium(III) complex bound to DNA or carbonate. *Bioconjug Chem.* 2009 Jul; 20(7):1375-82.