

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

Interação DNA-Ligantes: Corante Azure A

Arthur Gomes Soares de Rezende
Magister Scientiae

VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024

ARTHUR GOMES SOARES DE REZENDE

Interação DNA-Ligantes: Corante Azure A

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Marcio Santos Rocha

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2024**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

R467i
2024 Rezende, Arthur Gomes Soares de, 1999-
Interação DNA-ligantes: corante azure A / Arthur Gomes
Soares de Rezende. – Viçosa, MG, 2024.
1 dissertação eletrônica (68 f.): il. (algumas color.).

Orientador: Márcio Santos Rocha.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Física, 2024.
Referências bibliográficas: f. 61-68.
DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.072>
Modo de acesso: World Wide Web.

1. Reações químicas. 2. Fenotiazinas - Análise. 3. DNA -
Análise. I. Rocha, Márcio Santos, 1978-. II. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Física. Programa de
Pós-Graduação em Física Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 541.39

ARTHUR GOMES SOARES DE REZENDE

Interação DNA-Ligantes: Corante Azure A

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Física, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de dezembro de 2024.

Assentimento:

Arthur Gomes Soares de Rezende
Autor

Marcio Santos Rocha
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pelo autor em 19/02/2025 às 13:14:45 e pelo orientador em 26/02/2025 às 13:23:11. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **2UBF.UQDH.YQ7R** e clique no botão 'Validar documento'.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, à minha família: minha mãe, irmã, avô, avó, tia, primos, e a todos que me acompanharam ao longo dessa jornada. Sem a força de vontade, o incentivo constante e o apoio de cada um de vocês, jamais teria chegado até aqui. Obrigado por estarem ao meu lado durante toda a minha vida, sempre me oferecendo as melhores condições para que eu chegasse até este momento. Aos meus amigos, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, independentemente de eu estar feliz, triste ou estressado, minha eterna gratidão. Obrigado pela paciência, atenção e pelo respeito que sempre me ofereceram.

Agradeço ao meu orientador, Márcio, por todo o auxílio, apoio e confiança. A sua dedicação, disponibilidade para me ouvir, tirar dúvidas, por mais que parecessem aleatória foram essenciais para que eu chegasse lá. Sua empatia, principalmente nos momentos mais difíceis, e a capacidade de perceber que algo não está bem, mesmo quando tentamos nos esconder de algum problema, foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

A Ethe e o Lucas, gostaria de registrar a minha gratidão a ambos. Ethe, como você sempre diz, "quem diria que alguém que eu comecei a odiar se tornaria uma amizade verdadeira?". Muito obrigado por me ouvir, por buscar me compreender acima de tudo, seja em relação a problemas pessoais ou acadêmicos. Lucas, você também foi uma pessoa essencial ao longo dessa jornada, e sou muito grato pela sua amizade e apoio.

Agradeço também a pessoas que encontrei ao longo do mestrado e que levarei para a vida toda. Lucia, minha psicóloga, obrigado por me ouvir, por sempre me atender com tanto cuidado, e por me ensinar a lidar com as dificuldades da vida, além das técnicas de respiração que foram essenciais. Lillian, sou muito grato por me ensinar sobre autocontrole, autoconhecimento e como encontrar momentos de relaxamento. Camila, minha professora de inglês e amiga, sou grato por todos os momentos que compartilhamos ao longo dessa fase.

Aos meus colegas de departamento, funcionários, professores e membros do Laboratório de Física Biológica, muito obrigado pelo acolhimento, pelas risadas e pelos momentos de troca e aprendizado. A todos que conheci em Viçosa durante esse período, sou muito grato por todo o apoio, incentivo, ideias e conversas, tanto dentro quanto fora do ambiente universitário.

Por fim, quero agradecer aos gatos que passaram pela minha vida até hoje.

Agradeço ao CNPq, à FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Deixo Sísifo na base da montanha! As pessoas sempre reencontram seu fardo. Mas Sísifo ensina a fidelidade superior que nega os deuses e ergue as rochas. Também ele acha que está tudo bem. Esse universo, doravante sem dono, não lhe parece estéril nem fútil. Cada grão dessa pedra, cada fragmento mineral dessa montanha cheia de noite forma por si só um mundo. A própria luta para chegar ao cume basta para encher o coração de um homem. É preciso imaginar Sísifo feliz.

Albert Camus

RESUMO

REZENDE, Arthur Gomes Soares de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2024. **Interação DNA-Ligantes: Corante Azure A**. Orientador: Marcio Santos Rocha.

Alguns tipos de tratamento de câncer e outras doenças requerem que os compostos interajam com o DNA ou células tumorais para que possam agir de maneira direcionada no combate ou na reparação de células danificadas. Dessa forma, torna-se essencial estudar corantes que funcionem como marcadores e possam atuar na reparação de danos. Nesse contexto, o corante Azure A tem ganhado destaque. Amplamente utilizado como marcador de células tumorais e com potencial em terapias fotodinâmicas, o Azure A ainda é pouco explorado no que diz respeito às suas propriedades físico-químicas. Esse conhecimento é essencial, pois permite entender como o corante interage com o DNA e como suas características podem ser otimizadas para atuar em ambientes biológicos diversos. Este trabalho, de maneira pioneira, descreve a interação do Azure A com moléculas de DNA isoladas em diferentes forças iônicas, oferecendo novos insights sobre o mecanismo de interação em cada contexto. Os resultados apresentados aqui demonstram que a interação é mediada pela força iônica, com dois modos distintos, em alta e média temos uma interação de fendas, em contrapartida temos intercalação em condições de baixa força iônica. Esse resultado é de suma importância para o entendimento do comportamento em sistemas biológicos, abrindo caminho para aplicações futuras mais precisas em diagnóstico e tratamento de câncer e outras patologias que envolvam interações com o DNA.

Palavras-chave: Interações DNA-Ligantes.; Corante fenotiazínico.; Azure A.; DNA.; Força iônica.

ABSTRACT

REZENDE, Arthur Gomes Soares de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2024. **DNA-Ligand Interaction: Azure A dye.** Adviser: Marcio Santos Rocha.

Some types cancer treatment and other diseases require compounds to interact with DNA or tumor cells acting in a targeted manner to fight or repair damaged cells. It is therefore essential to study dyes that work as markers and can act to repair damage. In this context, the Azure A dye has gained prominence. Widely used as a marker for tumor cells and with potential in photodynamic therapies, Azure A is still little explored in terms of its physicochemical properties. This knowledge is essential because it allows us to understand how the dye interacts with DNA and how its characteristics can be optimized to act in different biological environments. This pioneering work describes the interaction of Azure A with isolated DNA molecules at different ionic strengths, offering new insights into the mechanism of interaction in each context. The results presented here show that the interaction is mediated by ionic strength, with two distinct modes: at high and medium ionic strengths we have a cleft interaction, while at low ionic strengths we have intercalation. This result is extremely important for understanding behavior in biological systems, paving the way for more precise future applications in the diagnosis and treatment of cancer and other pathologies that involve interactions with DNA.

Keywords: DNA-ligand interactions.; Phenothiazine dye. ; Azure A.; DNA.; Ionic strength.

Lista de Figuras

2.1	Difração da dupla hélice do DNA obtida por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins em 1951	15
2.2	Estrutura química da molécula de DNA com os pares de base	16
2.3	Bases nitrogenadas da molécula de DNA.	16
2.4	Estrutura dimensionada da molécula de DNA e emparelhamento dos pares de base	18
2.5	Formas estruturais do DNA	19
3.1	Rigidez de um polímero sob perspectiva geométrica	21
3.2	Representação gráfica de um polímero arbitrário	22
3.3	Gráfico da força em função da extensão para uma molécula de DNA no regime entrópico.	27
4.1	Intercalação com DNA: Molécula entre pares de bases	30
4.2	Ilustração representando a interação entre fendas e o DNA.	31
4.3	Representação dos diversos tipos de interações possíveis entre compostos e DNA	33
5.1	Estrutura química do Azure A e Azul de Metileno	35
6.1	Desenhos de Theodore Maiman ilustrando os princípios físicos do LASER.	39
6.2	Ilustração representando os diferentes regimes da pinça óptica	41
6.3	Figura demonstrando as forças ópticas no regime da Óptica Geométrica.	42
6.4	Representação das forças ópticas do LASER sob uma microesfera no regime de Rayleigh	43
7.1	Figura ilustrativa do aparato experimental e montagem óptica.	45
7.2	Representação esquemática de preparo do porta amostras da lamínula de DNA.	46
7.3	Estiramento da molécula de DNA via pinça óptica	47
7.4	Porta amostras utilizados na armazenagem do corante Azure A	48
8.1	DNA: como molas entrópicas no modelo <i>Quenched-disorder</i>	50

9.1	Gráficos mostrando comportamento do comprimento de contorno do DNA na presença de Azure A diluído em força iônica 150mM e 10mM.	53
9.2	Gráficos mostrando comportamento do comprimento de persistência do DNA na presença de Azure A diluído em força iônica 150mM e 10mM. . .	54
9.3	Gráfico do comportamento Contorno x Concentração em baixa força iônica 1mM	55
9.4	Gráfico do comportamento Persistência x Concentração em baixa força iônica 1mM	56
9.5	Gráficos ajustados para interação de fendas com base no modelo Queenched Disorder para interação DNA-Azure A em alta e média força iônica.	57
9.6	Concentração em função do comprimento de contorno relativo em PBS 1mM	58

Sumário

1	Introdução	12
I	Revisão interdisciplinar	13
2	Bioquímica da molécula de DNA	14
2.1	Aspectos históricos do DNA	14
2.2	Estrutura do DNA	15
2.3	Tipos de DNA	18
3	Física de polímeros: Molécula de DNA	20
3.1	Mecânica de polímeros	20
3.2	Modelo de Kratky - Porod	21
3.3	Comprimento de correlação e regime entrópico	22
3.4	Modelo Worm Like Chain (WLC)	24
3.4.1	Estiramento próximo do equilíbrio	24
3.4.2	Estiramentos longe do equilíbrio	26
3.4.3	Estiramento arbitrário	26
4	Interações DNA - Ligantes	28
4.1	Equilíbrio químico das interações DNA-Ligantes	28
4.2	Tipos de interações - Intercalação	29
4.3	Tipos de interações - Ligação de fendas	30
4.4	Múltiplos modos de ligação e interação covalente	32
4.5	Modelo de McGhee-von Hippel	33
5	Corante fenotiazínico Azure A	35
II	Técnica e metodologia	37
6	Pinça óptica	38
6.1	Aspecto histórico	38
6.2	Teoria da pinça óptica	39

6.3	Regimes ópticos - Pinça óptica	40
6.3.1	Óptica geométrica	41
6.3.2	Regime de Rayleigh - modelo do dipolo elétrico	42
7	Rotina experimental e abordagem metodológica	44
7.1	Aparato experimental	44
7.2	Preparo de amostra	45
7.3	Experimento na pinça óptica	46
7.4	Preparo de alíquotas de corante Azure A	48
8	Modelo Quenched Disorder	49
III	Resultados e discussões	51
9	Resultados obtidos	52
9.1	Interação em força iônica 150mM e 10mM	52
9.1.1	Análise do comprimento do contorno	52
9.1.2	Análise do comprimento de persistência	53
9.2	Interação em baixa força iônica - PBS 1mM	54
9.2.1	Comprimento de contorno em baixa força iônica	54
9.2.2	Comprimento de persistência em baixa força iônica	55
9.3	Parâmetros físicos em força iônicas 150mM, 10mM e 1mM	56
10	Conclusão	60

Capítulo 1

Introdução

O estudo da interação entre o DNA e diversos compostos transcende as fronteiras das disciplinas biológicas e químicas, abrangendo também o domínio da física. Nesse cenário, a física biológica emerge como um campo multidisciplinar e abrangente.

Na área experimental, várias técnicas podem ser empregadas, incluindo espectrofotometria, eletroforese e microscopia de força atômica. No entanto, dado o nosso interesse na interação de moléculas individuais, o foco nesse trabalho será na técnica da pinça óptica. Desenvolvida nos laboratórios da Bell no final dos anos 1960 por Arthur Ashkin e colaboradores, a pinça óptica revolucionou a manipulação de objetos microscópicos. No ano de 2018, Ashkin foi laureado com prêmio Nobel pelas aplicações da técnica em sistemas biológicos.

Nesse contexto, investigamos as mudanças nas propriedades mecânicas e químicas da molécula de DNA na presença de diferentes concentrações de Azure A. O Azure A é um corante catiônico fenotiazínico, derivado da oxidação do Azul de Metileno, com uma ampla gama de aplicações, desde coloração em células até tecnologias eletrocromicas. Os estudos sobre a interação entre o Azure A e o DNA são recentes, portanto, ainda não há relatos dessa interação ao nível de molécula única.

A dissertação foi dividida em três partes: revisão interdisciplinar, técnica e metodologia, e por fim os resultados e conclusões. Na Síntese Interdisciplinar, são realizadas análises da molécula DNA sob diferentes perspectivas disciplinares, desde sua estrutura bioquímica e interações até as teorias fundamentais de origem Física, permitindo assim essa abordagem interdisciplinar no estudo do DNA. Na sequência temos uma parte, intitulada Detalhamento do Processo Experimental, onde é apresentada detalhadamente as etapas experimentais. Nesse contexto, são descritos os métodos e procedimentos utilizados na pesquisa, juntamente com a estrutura teórica e experimental necessária para o bom funcionamento da técnica de Pinça Óptica.

Na terceira e última parte, interação do DNA com Azure A, são apresentados e discutidos os resultados obtidos via pinça óptica da interação entre o DNA e o composto químico Azure A juntamente com a conclusão.

Parte I

Revisão interdisciplinar

Capítulo 2

Bioquímica da molécula de DNA

Nesta seção, será explorado o ácido desoxirribonucleico (ADN), mais conhecido por Deoxyribonucleic Acid (DNA), sob uma perspectiva histórica e bioquímica, abordando desde sua descoberta até suas propriedades bioquímicas fundamentais.

2.1 Aspectos históricos do DNA

No século XIX, em 1865, o cientista tcheco George Mendel conduziu experimentos com ervilhas, que foram pioneiros na compreensão inicial da hereditariedade das características. Paralelamente, em 1869, o suíço Friedrich Miescher realizou estudos utilizando sêmen de salmão e pus humano, onde foi identificada uma estrutura nuclear com alta concentração de fósforo, inicialmente denominada nucleína e posteriormente reconhecida como DNA [1, 2].

Já no século XX, por volta dos anos 1940, o biofísico alemão Max Delbrück, no Instituto de Tecnologia da Califórnia, contribuiu significativamente na compreensão dos mecanismos de hereditariedade, mutação e evolução ao fundar o Grupo Fago, dedicado à investigação das relações entre genética e física. De maneira simultânea, o bioquímico austríaco Erwin Chargaff tentava estabelecer regras e padrões sobre as bases nitrogenadas na molécula de DNA, a fim de contribuir para o entendimento da estrutura molecular do material genético [3].

Pouco mais de uma década depois, no ano de 1951, Erwin Chargaff e seus colaboradores estudando a composição química do ácido desoxirribonucleico em ouriços-do-mar, observou padrões nas concentrações relativas de bases nitrogenadas. Anos depois, essas observações foram confirmadas em diversos outros organismos, estabelecendo as chamadas Regras de Chargaff [4]. Essas regras são fundamentais para compreender a estrutura e função do DNA, nas quais podem ser resumidas da seguinte forma:

- I. A concentração molar de Adenina [A], é igual à Timina [T], enquanto de Citosina [C], é igual à Guanina [G]. $[A] = [T]$ e $[C] = [G]$.

II. A molaridade de purinas em um DNA é a mesma de pirimidinas. $[A] + [G] = [C] + [T]$.

Ao longo do tempo, avanços científicos continuaram a moldar nosso entendimento do DNA. Em meados do século XX, os estudos de difração de raio-X, realizados por Rosalind Franklin, forneceram imagens que revelaram a estrutura física do DNA. As fotografias de difração de Franklin, especialmente a famosa Fotografia 51, demonstraram uma forma de hélice, sugerindo fortemente a natureza helicoidal da molécula de DNA [5].

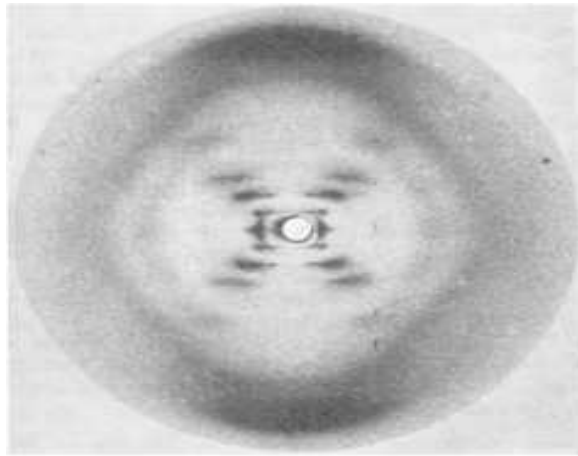


Figura 2.1: Difração de raios-x do DNA demonstrando a estrutura em dupla hélice, obtida por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins em 1951 [5].

Inspirados por esses trabalhos e observando padrão obtido por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins via difração de raios-x, assim como ilustrado na figura anterior 2.1, James Watson e Francis Crick propuseram um modelo de hélice dupla para estrutura tridimensional do DNA. Publicado no ano de 1953, o propunha duas cadeias polinucleotídicas em espiral, unidas por pares de bases complementares (adenina com timina e citosina com guanina), formando dupla hélice. Seu trabalho não apenas esclareceu a estrutura do DNA, mas também lançou as bases para a moderna biologia molecular e genética, revolucionando nossa compreensão sobre hereditariedade e evolução. Anos depois, Watson, Crick e Wilkins foram laureados com o Prêmio Nobel de Medicina em 1962 pelos seus trabalhos relacionados as estruturas e propriedades do DNA [6, 7].

Nas seções seguintes, serão apresentadas um pouco mais da estrutura química responsável por moldar o DNA, além dos principais sub-tipos encontrados na natureza.

2.2 Estrutura do DNA

A molécula de DNA é formada por quatro nucleotídeos básicos, cada um diferenciado pela sua base nitrogenada. Cada nucleotídeo é composto por um grupo fosfato (PO_4^-), um açúcar do tipo pentose (no caso do DNA, a desoxirribose) e uma base nitrogenada.

Na ilustração 2.2 podemos visualizar com maior clareza a maneira na qual esses grupos funcionais estabelecem ligações químicas entre si.

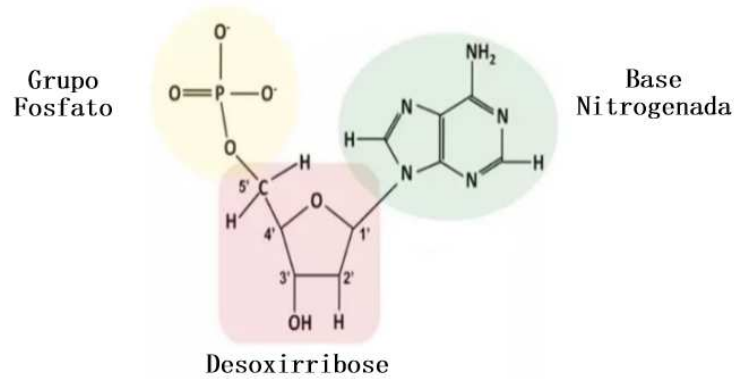


Figura 2.2: Estrutura química da molécula de DNA com pares de base. Adaptado de [8]

As bases nitrogenadas são essenciais para manutenção da estabilidade entre as cadeias, sendo responsáveis pela distinção entre os nucleotídeos. Em termos de classificação, essas estruturas são divididas em dois grupos: as purinas, que incluem adenina (A) e guanina (G), e as pirimidinas, compostas por citosina (C) e timina (T) [9].

As pirimidinas, citosina e timina possuem uma estrutura molecular simples, com apenas um anel, permitindo interações específicas, como emparelhamento de bases complementares no DNA. Por outro lado, as purinas, adenina e guanina, apresentam dois anéis, possuindo assim uma estrutura mais complexa, podendo participar de uma variedade maior de interações moleculares, incluindo processos metabólicos e sinalização celular [10].

Na Figura 2.3 temos uma representação visual dessa distinção estrutural, destacando a organização dos anéis que compõem cada grupo de bases nitrogenadas.

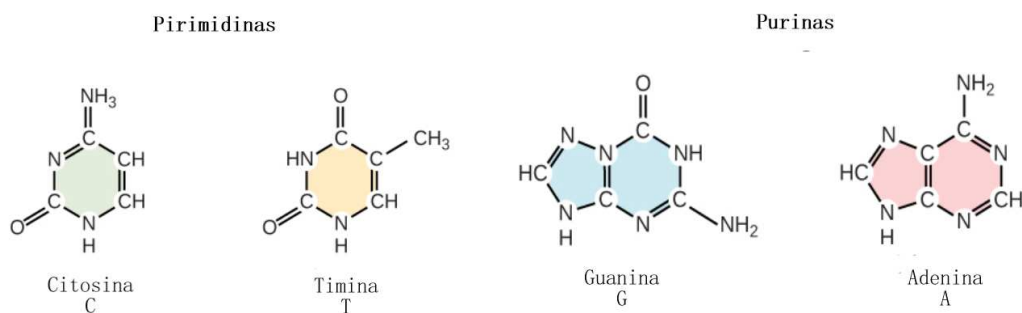


Figura 2.3: Bases nitrogenadas da molécula de DNA [11].

A formação em fita da estrutura do DNA é um processo essencial e complexo, cuja

estabilidade depende da ligação fosfodiéster, covalente, que exerce uma interação fundamental entre os nucleotídeos adjacentes na cadeia de DNA. Em outras palavras, um funcional hidroxila de um grupo fosfato do nucleotídeo reage com duas hidroxilas de outra molécula. Essa conexão entre os nucleotídeos adjacentes é de suma importância para a integridade da molécula, uma vez que garante a estabilidade da estrutura e transmite a informação genética essenciais para hereditariedade [12].

A ligação fosfodiéster desempenha um papel fundamental na estrutura do DNA ao conectar os nucleotídeos na mesma fita. Por outro lado, as ligações de hidrogênio entre os pares de bases são essenciais para a estabilidade das duas fitas de DNA, mantendo-as unidas e permitindo a formação da estrutura de dupla hélice. Sem essas ligações de hidrogênio, as fitas de DNA poderiam se separar facilmente, comprometendo a capacidade da molécula de desempenhar suas funções biológicas essenciais [13].

A simetria na estrutura do DNA organiza a molécula de maneira precisa. A pentose, que forma seu "esqueleto", possui carbonos numerados — uma convenção que facilita a compreensão e comunicação sobre a estrutura do DNA. A ligação entre o carbono 5' de uma pentose e o grupo fosfato é estável, enquanto o carbono 1' da pentose está sempre associado à base nitrogenada. Essa organização permite que o grupo fosfato de um nucleotídeo se una ao carbono 3' de outro nucleotídeo, formando a cadeia de DNA. A coerência na direção da ligação fosfodiéster é essencial, uma vez que estabelece a orientação específica da fita de DNA e mantém a integridade estrutural da molécula, no sentido 5'→3' [14], como ilustrado no diagrama 2.4.

A estrutura da segunda fita é gerada pela ação da enzima polimerase, que sintetiza uma nova fita de DNA com orientação 3' para 5'. Isso resulta em duas fitas de comprimento aproximadamente igual, unidas por interações de hidrogênio e dispostas antiparalelamente. As pontes de hidrogênio são estabelecidas entre uma purina e uma pirimidina, onde a guanina se emparelha com a citosina e a adenina com a timina, formando assim os pares de base [15].

Uma vez que ambas as fitas são desenvolvidas, é possível dimensionar as estruturas do DNA. A distância entre os pares de base adjacentes é aproximadamente 0,34 nm, enquanto o diâmetro da hélice é cerca de 2,0 nm.

Os processos químicos relacionados a estrutura química do DNA, por exemplo o tipo de ligação entre os pares de base, bases nitrogenadas, desoxirribose, são os mesmos para qualquer tipo de DNA. No entanto, é possível encontrar diferentes tipos de DNA, nas quais as principais diferenças aparecem quando comparamos os parâmetros mecânicos.

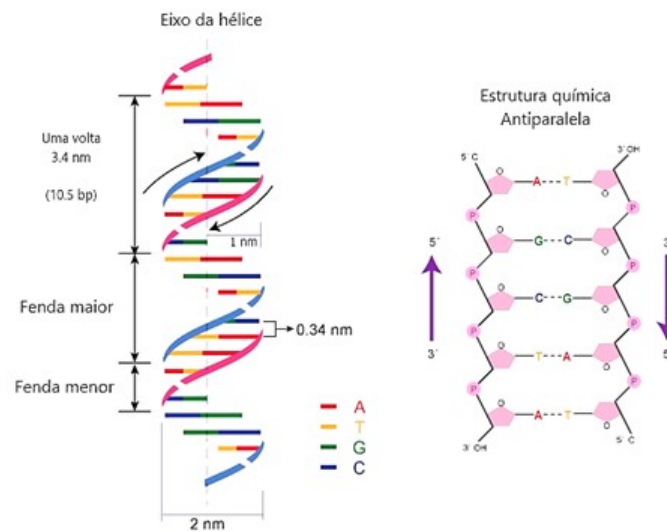


Figura 2.4: Estrutura dimensionada da molécula de DNA e emparelhamento dos pares de base [16].

2.3 Tipos de DNA

A estrutura química da molécula de DNA é conservada em todos os seres vivos, permitindo a generalização do estudo com qualquer tipo de organismo desde que as condições do meio no qual ele se encontra seja conservada. Todos os indivíduos compartilham o mesmo emparelhamento entre os pares de bases, uma pentose do tipo desoxirribose e um grupo fosfato [17].

Apesar da semelhança na estrutura básica, as diferenças entre os indivíduos residem na relação entre as concentrações molares dos pares de bases e nas variações no formato da molécula. Na natureza, podem ser encontradas mais de dez formas diferentes de DNA, cada uma delas variando segundo as condições impostas pelo ambiente, levando a alterações nos parâmetros físico-químicos da molécula, como o diâmetro da dupla hélice e a localização das ligações na desoxirribose [18].

Entre as diversas conformações do DNA presentes na natureza, destacam-se as formas A, B e Z apresentadas na figura 2.5. Essas diferentes conformações podem surgir devido a variações nas condições ambientais ou a interações com proteínas específicas, e cada uma delas possui propriedades únicas que podem influenciar sua função biológica e sua interação com outros componentes celulares [19].

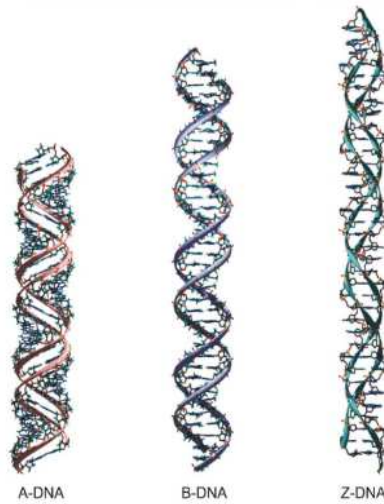


Figura 2.5: Formas A, B e Z do DNA. Adaptado de [20]

O DNA de forma *A* é 75% menos hidratado quando comparado a forma *B*, provocando assim uma estrutura mais curta e afastamento relativo menor entre os pares de base da molécula, sendo necessário assim mais pares de base para realizar uma volta completa na dupla hélice [21]. Quando comparado ao DNA do tipo *Z* com os demais citados, formas *A* e *B*, temos a estrutura mais diferente de todas, mas ainda assim importante uma vez que pode ser encontrado em bactérias, seres eucariontes e vírus. Entre os formatos mencionados, é o que apresenta a dupla hélice mais estreita e o mais comprido em termos de extensão [19, 22].

Parâmetro	DNA - A	DNA - B	DNA - Z
Orientação da hélice	Direita	Direita	Esquerda
Pares de base por volta	11	10	12
Afastamento pares de base adjacentes (<i>nm</i>)	0,26	0,34	0,46
Ângulo de torção da hélice	33°	36°	-30°
Diâmetro da base (<i>nm</i>)	2,3	2,0	1,8

Tabela 2.1: Comparação dos parâmetros mecânicos dos diferentes tipos de DNA. Adaptado de [18].

No experimento de pinça óptica, é empregado o λ -DNA, cuja origem está em um vírus responsável por contaminar a bactéria *Escherichia coli*. Esse λ -DNA possui características de um DNA tipo B, contendo aproximadamente 48.500 pares de bases, resultando em um comprimento estimado de 16,5 μm , fazendo com que suas dimensões se tornam adequadas para o experimento de pinça óptica [23].

Capítulo 3

Física de polímeros: Molécula de DNA

Neste capítulo, pretende-se mostrar a molécula de DNA sob a perspectiva da física de polímeros, discutindo a origem e o significado dos principais parâmetros mecânicos da molécula.

3.1 Mecânica de polímeros

Unidades que se repetem ao longo de uma macromolécula são chamadas de meros. Quando essas unidades se adicionam formando uma cadeia extensa via ligações covalentes, temos como resultado um polímero. Ao analisar a estrutura da dupla hélice do DNA em uma escala macroscópica, observamos que nucleotídeos repetem ao longo da dupla hélice. Dessa forma, ao examinar o comportamento global percebemos a formação de uma estrutura polimérica, nos permitindo que seja possível realizar uma análise do DNA sem nos preocuparmos com a estrutura química dos nucleotídeos e aplicar metodologias similares às estudadas na área de Física dos Polímeros [24, 25, 26].

Na Física de Polímeros, dois parâmetros mecânicos fundamentais são amplamente utilizados para caracterizar esses materiais: o comprimento de contorno (L) e a persistência (A). O comprimento de contorno é definido como a extensão total da cadeia polimérica em sua conformação linear. No caso do “DNA natural”¹, esse parâmetro é determinado pelo número e tamanho dos pares de base. Já o comprimento de persistência é uma medida da correlação espacial de perturbações locais na conformação da molécula. Em um modelo discreto, pode ser interpretada como a distância média entre dobras consecutivas da cadeia polimérica, enquanto no caso contínuo, é descrita por meio da função de autocorrelação dos vetores tangentes à estrutura. Dessa forma, quanto maior a rigidez do material, maior será seu comprimento de persistência [27].

A comparação das escalas de comprimento, persistência e contorno, é essencial para classificar os polímeros, permitindo determinar se estamos lidando com um polímero em

¹Neste contexto, considera-se "DNA natural"aquele na ausência de ligantes.

um regime de cadeia rígida, onde a persistência é significativamente maior que o comprimento de contorno, ou em um regime de cadeia flexível, onde o comprimento de contorno é muito maior que a persistência, como representado na figura 3.1. Também podemos encontrar um regime intermediário, onde o comprimento de contorno é maior que a persistência [28].

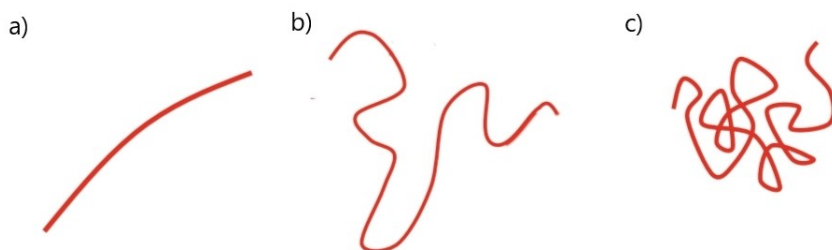


Figura 3.1: Rigidez de um polímero sob o ponto de vista geométrico. a) Rígido: $A \gg L$; b) Semiflexível: $A < L$; c) Flexível: $A \ll L$ [29].

O λ -DNA, em sua forma natural, exibe características mecânicas que estão em um ponto intermediário entre o regime rígido e o flexível. Suas dimensões, com um valor de $A \sim 50 \times 10^{-9}$ m para o parâmetro de persistência e $L \sim 16,5 \times 10^{-7}$ m para o comprimento de contorno, colocam-no na categoria de polímeros semi-flexíveis [30].

Em solução aquosa, a molécula de DNA está sujeita a colisões com outras partículas, o que pode resultar em modificações até atingir um novo ponto de equilíbrio. Essas conformações dependem principalmente da temperatura e composição do meio [31]. Portanto, a aplicação de uma força externa em uma das pontas também pode causar deformações na extensão e no giro da estrutura, sendo necessário gastar energia para modificar a molécula em relação à sua conformação inicial [32].

Ao aumentar a temperatura do meio, aumentamos a taxa de colisões com a molécula de DNA, levando a um aumento no número de dobras e, conseqüentemente, a uma maior variedade de conformações disponíveis, resultando em um aumento na entropia do sistema. De forma análoga, em baixas temperaturas, a molécula de DNA tende a ficar mais rígida, assemelhando-se a uma vareta rígida, diminuindo a entropia [33].

3.2 Modelo de Kratky - Porod

O modelo desenvolvido por Otto Kratky e Günther Porod em 1949 representou um marco na compreensão da relação entre a curvatura de um polímero e sua energia. Por meio de experimentos com a técnica de espalhamento de raio-X, conduzidos com o composto policloreto de vinila, eles estabeleceram uma conexão direta entre a geometria molecular do polímero e sua energia [34].

Na sequência será demonstrado como obter a energia de uma cadeia polimérica em função da curvatura e de seus parâmetros mecânicos.

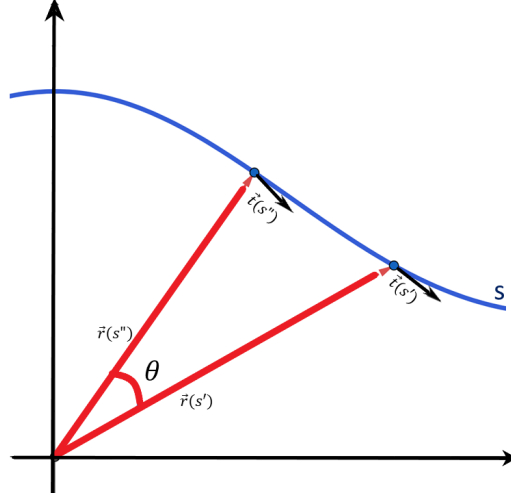


Figura 3.2: Representação gráfica de um polímero arbitrário, cujo $\vec{r}(s')$ e $\vec{r}(s'')$ representam vetores que localizam pontos arbitrários do polímero e os $\vec{t}(s')$ e $\vec{t}(s'')$ vetores tangentes a esses pontos.

Podemos definir a curvatura de uma curva como a taxa de variação do vetor tangente em relação ao comprimento do arco da curva. Na Figura 3.2, a curva está parametrizada pelo parâmetro s , e o vetor $\vec{r}(s)$ representa dois pontos arbitrários sobre ela. Utilizando técnicas do cálculo diferencial, o vetor tangente $\vec{t}(s)$ pode ser definido como a derivada do vetor posição $\vec{r}(s)$ em relação ao parâmetro s , ou seja,

$$\vec{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}(s)}{\partial s}. \quad (3.1)$$

A partir disso, podemos expressar a curvatura em termos do vetor tangente.

$$C = \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right| = \left| \frac{\partial \vec{t}}{\partial s} \right| \quad (3.2)$$

Seguindo o modelo Kratky-Porod e utilizando resultados obtidos via mecânica de meios contínuos, podemos definir a energia do sistema em função do seu comprimento de contorno, L , e rigidez flexural ² κ_f , pela equação matemática a seguir [30].

$$E_{KP} = \frac{1}{2} \kappa_f \int_0^L \left| \frac{\partial \vec{t}}{\partial s} \right|^2 ds \quad (3.3)$$

3.3 Comprimento de correlação e regime entrópico

Considerando novamente a Figura 3.2, é possível demonstrar que o ângulo θ formado entre os vetores $\vec{r}(s'')$ e $\vec{r}(s')$ é igual ao ângulo formado entre os vetores tangentes $\vec{t}(s'')$ e $\vec{t}(s')$. Dessa maneira, para um arco de circunferência com comprimento s e um ângulo θ ,

²A rigidez flexural é a medida da resistência de um material à flexão quando uma carga é aplicada.

podemos escrever a energia como:

$$E_{arco} = \frac{\kappa_f \theta^2}{2s}. \quad (3.4)$$

Considerando pequenas curvaturas ao longo do polímero, podemos aproximar a energia associada ao arco como sendo aproximadamente igual à energia total E e $\sin(\theta) = \theta$. Essas simplificações nos permitem calcular o valor quadrático médio da curvatura utilizando métodos estatísticos e integrais gaussianas [35]:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{A}, \quad (3.5)$$

onde $A = \beta \kappa_f$ é definido como o comprimento de persistência, $\beta = k_b T$ com k_b sendo a constante de Boltzmann e T a temperatura absoluta.

Podemos observar que o comportamento do comprimento de persistência reflete características fundamentais do material em diferentes condições de temperatura. Quando a temperatura aumenta em direção ao infinito ($T \rightarrow +\infty$), as interações térmicas se tornam dominantes, levando as cadeias poliméricas a se movimentarem de forma mais livre e aleatória. Isso resulta em uma maior flexibilidade da molécula, já que as ligações moleculares são menos restritas pela energia térmica, permitindo uma maior capacidade de deformação [36, 37].

Por outro lado, quando a temperatura se aproxima do zero absoluto ($T \rightarrow 0$), a energia térmica diminui significativamente, reduzindo a agitação molecular e fazendo com que as cadeias poliméricas se comportem de maneira mais ordenada e rígida. Nesse regime, as ligações moleculares têm menos energia para se mover, resultando em uma estrutura mais estática e semelhante a uma vareta rígida [36].

Além disso, ao adotarmos uma abordagem geométrica para examinar o comportamento das cadeias poliméricas, temos a oportunidade de explorar as direções locais ao longo da curva da molécula. Esses vetores delineiam a orientação da cadeia polimérica em vários pontos ao longo de sua extensão. Assim, podemos aprofundar essa análise de forma geométrica ao considerar o valor médio dos vetores tangentes à curva da molécula [37].

Podemos conduzir essa mesma análise de maneira geométrica, utilizando os vetores unitários tangentes à curva, representados por $\hat{t}(s'')$ e $\hat{t}(s')$, conforme ilustrado na Figura 3.2. Desse modo, o valor médio desses vetores pode ser calculado utilizando a equação a seguir:

$$\langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle = \langle \cos(\theta) \rangle \quad (3.6)$$

cujo valor máximo é 1.

No cenário de pequenas curvaturas, utilizando a série de Taylor e desprezando termos

de ordem superiores chegamos na seguinte expressão:

$$\langle \cos(\theta) \rangle = 1 - \frac{\langle \theta^2 \rangle}{2} = 1 - \frac{s}{A}, \quad (3.7)$$

em que A é o comprimento de persistência e $\langle \theta^2 \rangle$ é o valor quadrático médio da curvatura. Essa aproximação para pequenos arcos s possui semelhanças com a expansão em série de Taylor da função exponencial $f(x) = \exp(-x)$. Dessa maneira, podemos reformular a equação 3.7 de modo mais sintético como:

$$\langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle = \exp\left(-\frac{s}{A}\right). \quad (3.8)$$

A partir da equação 3.8 é possível demonstrar que, para uma vareta rígida, a persistência tende a infinito, isso, na prática, significa que, mesmo sob forças ou perturbações externas, a vareta mantém tende a permanecer com sua orientação original.

3.4 Modelo Worm Like Chain (WLC)

O modelo Worm Like Chain (WLC), conhecido em português como Cadeia Tipo Vermiforme, é uma ferramenta fundamental para descrever o comportamento elástico da molécula de DNA quando submetida a baixas forças externas, até aproximadamente 5 pN. Esse cenário é denominado regime entrópico, uma vez que se concentra nas mudanças conformacionais da molécula em resposta a estímulos externos [38].

Dessa maneira, podemos tratar o sistema baseando-se em três situações distintas. A primeira situação denominamos de estiramento próximo do equilíbrio (pequenos estiramentos), na segunda condição, chamamos de estiramento longe do equilíbrio (próximos a configuração retilínea). Por fim será apresentado, aquela situação que realizamos um estiramento arbitrário [39].

3.4.1 Estiramento próximo do equilíbrio

Nessa seção iremos tratar o sistema em condições próximas ao equilíbrio. Desprezando efeitos de curvatura do polímero, e considerando que a cadeia é extensa e formada por um processo de caminhada aleatória é possível mostrar utilizando o Teorema Central do limite que a distribuição de probabilidade do vetor ponta a ponta ³ desse polímero segue uma distribuição normal. Esse teorema estabelece que a soma de um grande número de variáveis aleatórias independentes segue uma distribuição normal [29].

Definindo \mathbf{R} como o vetor distância ponta a ponta, temos que a distribuição de pro-

³Definido como o vetor que conecta as extremidades do polímero.

babilidade desse vetor é dada por

$$P(\mathbf{R}) = \left(\frac{3}{2\pi \langle \Delta \mathbf{R} \rangle} \right)^{\frac{3}{2}} \exp \left[-\frac{3\mathbf{R}^2}{2 \langle \Delta \mathbf{R} \rangle^2} \right] \quad (3.9)$$

Estamos interessados no comportamento macroscópico do sistema no equilíbrio a uma temperatura fixa T . Dessa maneira, podemos associar nossa distribuição de probabilidade ao fator de Boltzmann, $\exp(-\beta H(Q))$, com Q é o grau de liberdade da nossa Hamiltoniana [40]. Em nosso sistema, temos como grau de liberdade a distância ponta a ponta da cadeia; portanto temos que a nossa energia associada ao polímero pode ser estimada em:

$$E(\mathbf{R}) = \frac{3\mathbf{R}^2}{2\beta \langle \Delta \mathbf{R} \rangle^2} \quad (3.10)$$

Nesse contexto, estamos interessadas na força de estiramento, a qual podemos expressar em termos da energia potencial pelo vínculo $F_r = \frac{-\partial U(r)}{\partial r}$. Assim, para encontrar a força de estiramento ao longo de uma direção precisamos do valor médio quadrático do módulo do vetor ponta a ponta. Esse parâmetro depende do regime em que estamos considerando o nosso polímero, nesse caso então iremos apresentar ele em dois regimes extremos, flexível e rígido. As demonstrações para o cálculo da distância ponta a ponta quadrática média nos dois regimes podem ser encontradas na referência [23]. Também iremos considerar em nosso experimento que o estiramento ocorre ao longo da direção z .

Dessa maneira, temos a seguir então os dois casos:

- I. No regime flexível ($L \gg A$), a média quadrática da distância ponta a ponta é dada por $\langle \Delta R \rangle^2 = 2AL$. Em Substituindo esse resultado na função 3.10 e derivando parcialmente em relação a variável \mathbf{z} , obtemos:

$$F(z) = \frac{3k_b T}{2AL} z \quad (3.11)$$

Temos que a força é diretamente proporcional ao estiramento, cuja constante de proporcionalidade é dada por $\frac{3k_b T}{2AL}$. Esse resultado evidencia que estamos tratando como um sistema clássico, tendo em vista que esse resultado seria o mesmo se fosse considerado uma mola ideal que pode ser estirada em três dimensões e utilizado

- II. No caso oposto, $A \gg L$, a persistência é significativamente maior que o comprimento de contorno, caracterizando o regime rígido. Aplicando a mesma abordagem utilizada anteriormente, obtemos que o valor quadrático médio da distância ponta a ponta é igual ao quadrado do comprimento de contorno, ou seja, $\langle \Delta R \rangle^2 = L^2$.

Esse resultado é previsível, pois, nesse regime, a cadeia polimérica tem o comportamento semelhante a uma vareta rígida. Assim, quando submetemos o polímero a forças externas, não temos alteração no seu comprimento de contorno.

3.4.2 Estiramentos longe do equilíbrio

Nesse regime, consideramos que a cadeia polimérica segue uma conformação quase linear, tornando assim relevantes efeitos de curvatura. Para isso iremos usar o modelo de Kratky-Porod, com um vínculo na energia que mantém a estrutura em uma conformação quase linear [34]. Dessa forma, podemos escrever a energia como

$$E = \frac{\kappa_f}{2} \int_0^L \left| \frac{\partial^2 \theta}{\partial s^2} \right|^2 ds - Fz, \quad (3.12)$$

de modo que F atua como um multiplicador de Lagrange para manter o comprimento z constante. Nesse contexto, temos que o vetor tangente ao polímero é quase paralelo a conformação da molécula e $z \sim L$ [41].

$$F(z) = \frac{k_b T}{4A} \left[\frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \right], \quad (3.13)$$

sendo k_b a constante de Boltzmann, T temperatura absoluta, A é o comprimento de persistência, L é o contorno e z estiramento da molécula.

3.4.3 Estiramento arbitrário

Nas subseções anteriores, foram analisadas as condições associadas a curtos e longos estiramentos, respectivamente. Nesse contexto, espera-se que estiramento próximo do equilíbrio esteja contido em situações longe do equilíbrio. De modo que quando feita uma expansão em série de Taylor na função 3.13, em $z \sim 0$ retorne a expressão do curto estiramento.

No entanto, esse processo não é verdade, aparece a adição de um termo independente resultado obtido no regime elástico, como mostrado a seguir [30]:

$$F^{(1)} \cong \frac{k_b T}{A} \left(\frac{1}{4} + \frac{z}{2L} \right) \quad (3.14)$$

Para corrigir essa expressão, foi proposto no ano de 1995, pelos pesquisadores John F. Marko e Eric D. Siggia a inserção do termo $\frac{z}{L} - \frac{1}{4}$ na função 3.13 via interpolação. Ao adicionar esse termo, torna-se possível estimar os parâmetros de contorno e persistência em quaisquer condições, estiramentos curtos e longos [42].

Adicionando esses dois termos, obtemos, assim, a expressão generalizada força entrópica do DNA em função da extensão.

$$F(z) = \frac{k_b T}{A} \left[\frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} + \frac{z}{L} - \frac{1}{4} \right] \quad (3.15)$$

O modelo permanece válido até valores próximos de $0,9L$, equivalente, assim, a um sistema em que o DNA está submetido a poucos piconewtons. Em outras palavras, a equação de Marko e Siggia é válida apenas ao regime entrópico. Na Figura 3.3 temos um gráfico obtido para um DNA natural da força em função da extensão, em azul o ajuste com função de Marko Siggia e preto são pontos experimentais.

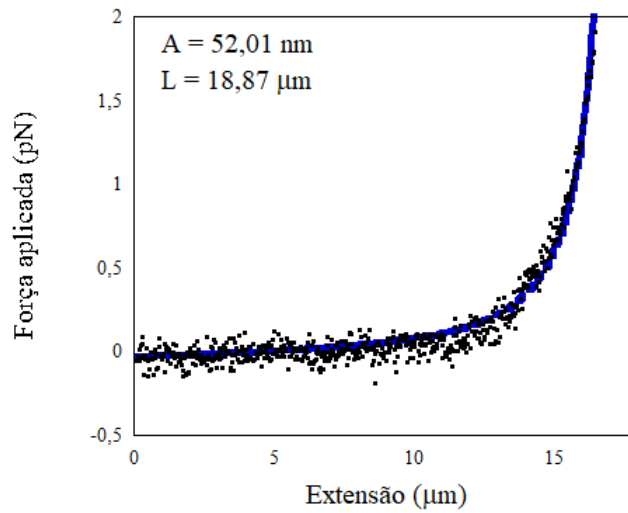


Figura 3.3: Gráfico da força em função da extensão para uma molécula de DNA no regime entrópico, os pontos experimentais foram ajustados utilizando a função de Marko Siggia para a obtenção dos parâmetros mecânicos. Fonte: Próprio autor.

Capítulo 4

Interações DNA - Ligantes

Discutiremos aqui os tipos de interações da molécula de DNA com ligantes que, em geral, modificam as propriedades mecânicas do complexo resultante em relação ao biopolímero original.

4.1 Equilíbrio químico das interações DNA-Ligantes

Em um sistema fechado com dois ou mais componentes, as reações ocorrem até alcançar um estado de equilíbrio. A estabilidade desse sistema é influenciada por fatores externos, como temperatura, umidade e pressão, assim como por fatores internos, incluindo concentração, volume e pH. As alterações e ajustes no equilíbrio resultantes de perturbações externas nas reações químicas foram inicialmente descritas por Fritz Haber e Carl Bosch no início do século XX e posteriormente formalizadas pelo francês Henri Le Chatelier [43].

O equilíbrio químico é atingido quando a transferência de matéria e energia entre o sistema e o meio são mantidas constantes. Neste estudo, tanto o DNA quanto um composto em solução serão expostos às mesmas condições ambientais, permitindo que as constantes de ligação sejam determinadas [44].

Nesse contexto, consideraremos a reação química entre dois reagentes e provocando a formação de um produto: A reage com B, resultando na formação da nova estrutura C, conforme descrito na reação abaixo:



Os coeficientes K_i e K_d recebem o nome constante de equilíbrio da associação e dissociação, respectivamente [45]. Esses parâmetros definem a afinidade da ligação química

em determinada concentração, em termos matemáticos podemos definir como:

$$K_i = \frac{[C]}{[A][B]} \qquad K_d = K_i^{-1} = \frac{[A][B]}{[C]} \qquad (4.2)$$

No experimento com molécula única de DNA e ligante, duas situações podem ser observadas: as moléculas do composto estão ligadas ao material genético ou livre em solução. Tendo em vista que estamos interessados em como um composto interage com DNA, é interessante redefinir as grandezas em termos da fração ligada. Em seu caso mais simplificado, podemos definir $[A] \equiv C_f$ como a concentração de ligantes livres, $[C] \equiv C_b$ concentração de ligantes ligada ao DNA e por fim, $[B] \equiv C_{bp} - C_b$, em que C_{bp} é a concentração de pares de base. Assim, podemos reescrever a equação (4.2) em termos dos novos parâmetros da seguinte forma,

$$r = \frac{K_i C_f}{1 + K_i C_f}, \qquad (4.3)$$

nesta equação de equilíbrio, introduzimos a variável \mathbf{r} , definida como a fração ligada, dada por $r \equiv \frac{C_b}{C_{bp}}$, que representa a razão entre a concentração de moléculas ligadas (C_b) e a concentração total de pares de bases disponíveis (C_{bp}). Em outras palavras, \mathbf{r} pode ser interpretada como a quantidade de moléculas ligadas por par de base do DNA. Essa maneira de descrever o sistema foi proposto pela primeira vez por George Scatchard em 1949, escrevendo a fração ligada em função da concentração de ligantes e a constante de associação. Esse modelo, conhecido como Isoterma de Scatchard, é aplicável a sistemas nos quais a temperatura é mantida constante [46].

A equação formulada dessa maneira possui simplificações importantes. A primeira simplificação está relacionada ao fenômeno conhecido como *cooperatividade*, no qual uma molécula, ao interagir com outra, pode influenciar as ligações subsequentes e a segunda simplificação, presume que apenas uma molécula é capaz de se ligar a um par de bases do DNA, o que será discutido com mais detalhes ao final do capítulo.

4.2 Tipos de interações - Intercalação

A interação de intercalação no DNA é um fenômeno em que certas moléculas podem inserir-se entre os pares de bases nitrogenadas adjacentes da dupla hélice de DNA, como ilustrado na figura 4.1. Essas moléculas intercaladoras são frequentemente compostos planares e aromáticos, com uma estrutura que lhes permite se encaixar entre os anéis de bases do DNA. Isso ocorre devido à formação de ligações π - π *stacking*, uma atração eletrostática entre os orbitais π das moléculas intercaladoras e as bases do DNA [47].

Um dos primeiros relatos de intercalação ocorreu em 1960, quando a técnica difração de raio-x foi empregada para investigar a interação entre compostos da classe Acridina.

Esses compostos são utilizados para controlar a ação de bactérias e parasitas, além de serem empregados como corantes biológicos [48].

Quando uma molécula intercaladora se insere entre os pares de bases do DNA, ela modifica as propriedades estruturais da molécula de DNA. O ligante ao ligar entre essas estrutura, provoca uma torção na dupla hélice no sentido de desfazer a estrutura causando um aumento no espaçamento entre os pares de base [49].

A capacidade dos compostos intercaladores de modificar a estrutura do DNA tem sido explorada terapeuticamente, especialmente no desenvolvimento de agentes anticancerígenos e antimicrobianos. Esses compostos podem inibir a ação de enzimas responsáveis pelo superenrolamento e desenrolamento do DNA, processos fundamentais para a replicação, transcrição e reparo celular. Dessa forma, a interrupção dessas funções pode levar à morte de células tumorais ou patogênicas. Além disso, a intercalação do DNA pode interferir na correção de regiões genômicas danificadas, dificultando a recuperação de mutações. Esse mecanismo é utilizado para potencializar o efeito de tratamentos quimioterápicos, aumentando sua eficácia [50, 51].

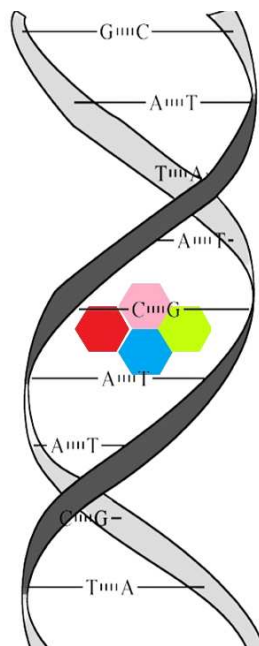


Figura 4.1: Representação da interação de intercalação no DNA: molécula inserida entre os pares de bases da dupla hélice. Fonte: Próprio autor.

4.3 Tipos de interações - Ligação de fendas

Durante a formação da dupla hélice do DNA, os grupos fosfato presentes nos nucleotídeos conferem uma carga líquida negativa à molécula, abrangendo as fitas e as fendas. Dessa forma, compostos catiônicos em solução aquosa, que perdem elétrons e adquirem

carga positiva, podem interagir com o DNA por meio de ligações eletrostáticas. Essas interações ocorrem preferencialmente nas fendas maior e menor da hélice, onde a exposição dos grupos funcionais dos pares de bases facilita a ligação, sendo a força e estabilidade dessas interações influenciadas pela força iônica do meio [13].

Em uma escala macroscópica, as interações de longo alcance são predominantemente de natureza coulombiana, resultando na atração entre os grupos fosfato negativamente carregados do DNA e os grupos funcionais orgânicos dos compostos catiônicos. Por outro lado, em uma escala microscópica, as interações de curto alcance ocorrem, onde os dipolos das moléculas interagem para formar estruturas permanentes ou induzidas. Esse tipo de interação é mediado pelas forças de Van der Waals, as quais são interações intermoleculares fracas, mas importantes na estabilização das associações entre os compostos catiônicos e o DNA [52].

A interação entre compostos catiônicos e as fendas do DNA é essencial para a quimioterapia e o desenvolvimento de antibióticos, pois permite a ligação seletiva desses compostos ao DNA de células cancerígenas, tornando a terapia mais eficaz e segura. Essa seletividade induz a apoptose das células doentes, preservando os tecidos saudáveis e reduzindo os efeitos colaterais [53, 54]. Além disso, ao atuarem de forma direcionada, esses compostos aumentam a eficiência do tratamento e minimizam as reações adversas associadas à quimioterapia convencional, proporcionando uma abordagem terapêutica mais precisa e uma melhor qualidade de vida para os pacientes [55].

Essa capacidade de minimizar os efeitos colaterais indesejados podem tornar os tratamentos mais confortáveis e menos invasivos, proporcionando uma experiência mais positiva para os pacientes. Esses avanços não apenas beneficiam diretamente os pacientes, mas também têm o potencial de impulsionar o desenvolvimento de novas terapias e abordagens terapêuticas inovadoras para uma variedade de condições médicas [56].

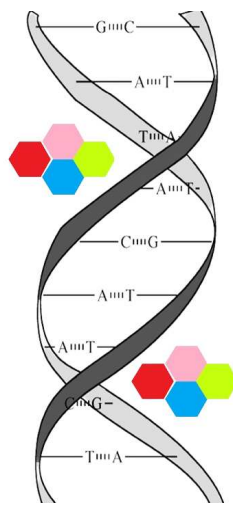


Figura 4.2: Representação da interação entre fendas maior e menor com DNA. Fonte: Próprio autor.

Alguns compostos podem manifestar mais de um tipo de interação, como o caso da Cloroquina que dependendo da força iônica do meio pode apresentar traços de intercalação ou ligação de fendas [57].

4.4 Múltiplos modos de ligação e interação covalente

Alguns fármacos desenvolvidos para o tratamento do câncer, como os complexos de platina, exemplificam agentes capazes de estabelecer múltiplos tipos de interação com o DNA ou manifestar ligações covalentes. Essas ligações covalentes implicam na formação de vínculos estáveis entre átomos, como os presentes na cisplatina, e os átomos de nitrogênio das bases nitrogenadas do DNA. Essa versatilidade de interação é influenciada não apenas pela estrutura química desses compostos, mas também por fatores ambientais, como a força iônica do meio, concentração, pH, entre outros aspectos. [58] Tais distorções interferem na replicação e transcrição do DNA, bloqueando a síntese de novas moléculas necessárias para o crescimento e sobrevivência das células cancerígenas.

Um composto famoso, Psoralen, utilizado para o tratamento de melanomas, vitiligo e outras doenças relacionadas ao tecido epitelial possui interações mais complexas. Esse ligante quando exposto a luz UVA, Ultravioleta A ($\lambda \sim 320 - 400nm$), forma ligação covalente com DNA, diferentemente quando sujeito à ação do UVB, Ultravioleta B ($\lambda \sim 280 - 320nm$), cuja interação com a molécula de DNA ocorre via intercalação [59, 60].

Os complexos de platina, representados pela cisplatina e carboplatina, constituem uma classe essencial de compostos na quimioterapia do câncer, estabelecendo uma conexão indissolúvel com o DNA. Sua capacidade de estabelecer ligações covalentes com o DNA, entre os átomos de platina e nitrogênio das bases nitrogenadas, desestruturam a dupla hélice do DNA, interferindo na replicação e transcrição do material genético resultando na inibição do crescimento celular [61, 62].

Psoralen e complexos de platina são exemplos que ilustram a complexidade e a sofisticação das abordagens terapêuticas na batalha contra o câncer. Suas interações multimodais com o DNA, como ilustrado na figura 4.3, fornecem informações valiosas sobre os mecanismos moleculares subjacentes ao câncer, estabelecendo um alicerce para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas [63].



Figura 4.3: Ilustração demonstrando diversos tipos de interações possíveis entre compostos e o DNA. Adaptado de [64]

Dado que um composto pode interagir com o DNA por diferentes mecanismos, ocupando distintos modos de ligação e exibindo variadas origens de interação, torna-se fundamental o desenvolvimento de uma isoterma capaz de quantificar e caracterizar esses processos com precisão. Na seção a seguir, será apresentada a isoterma de McGhee-von Hippel, adotada como base deste estudo, a qual permite a obtenção de parâmetros bioquímicos essenciais, como a fração de moléculas ligadas, o número de sítios ocupados e a constante de associação química, proporcionando uma compreensão detalhada da interação.

4.5 Modelo de McGhee-von Hippel

A interação de um composto com a molécula de DNA pode modificar de diversas maneiras o funcionamento do DNA, dependendo da natureza do composto e do modo de interação. Dessa forma, considerando que uma molécula pode interagir de mais de uma maneira, a depender do meio e ocupando mais de um sítio de ligação, surge o modelo de exclusão de vizinhos [65].

Desenvolvido a partir de modelos estatísticos de probabilidade condicional e princípios físico-químicos, no ano de 1974 os pesquisadores, James D. McGhee e Peter H. Von Hippel, sugerem um modelo novo para avaliar a interação entre compostos orgânicos com a molécula de DNA, destacando por considerar uma abordagem probabilística e bioquímica de um novo parâmetro N . A variável N , número de exclusão dos sítios ligados, ou seja quantos pares de base por molécula de ligante possibilitou a melhor compreensão de que um composto pode ocupar mais de um sítio [66].

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - Nr) \left[\frac{1 - Nr}{1 - (N - 1)r} \right]^{N-1} \quad (4.4)$$

Se considerarmos o caso mais simples, um ligante ocupa apenas um sítio de ligação, ou seja parâmetro N igual à 1 na equação 4.4, retornamos a isoterma anterior descrita

por Scatchard 4.3. Evidenciando assim, a versatilidade do modelo proposto, se adaptando a diferentes contextos de ligação molecular, fornecendo informações valiosas sobre as interações moleculares em estudo [67].

Capítulo 5

Corante fenotiazínico Azure A

Os corantes fenotiazínicos representam uma classe de compostos orgânicos notáveis por suas ligações químicas aromáticas contendo Nitrogênio e Enxofre em suas estruturas moleculares [68]. Dentro dessa classe, destaca-se o Azure A, devido seu papel significativo em diversas áreas científicas e industriais, tais como marcadores de células tumorais e desenvolvimento de dispositivos eletrocromáticos [69, 70].

Derivado do Azul de Metileno, descoberto em 1906 por meio do processo de desmetilação, eliminação do grupo metil da molécula (CH_3) destacado na Figura 5.1, o Azure A compartilha propriedades químicas semelhantes, como fotossensibilidade e solubilidade, o tornando aplicável em diversos contextos científicos, desde marcadores biológicos até sensores no meio comercial. Embora ambos, Azul de Metileno e Azure A, sejam corantes fenotiazínicos de coloração azul, suas propriedades físico-químicas apresentam algumas diferenças. O corante Azure A comparado ao Azul de Metileno é mais estável quimicamente (maior vida útil), seguro e eficaz em processos bioquímicos [71, 72].

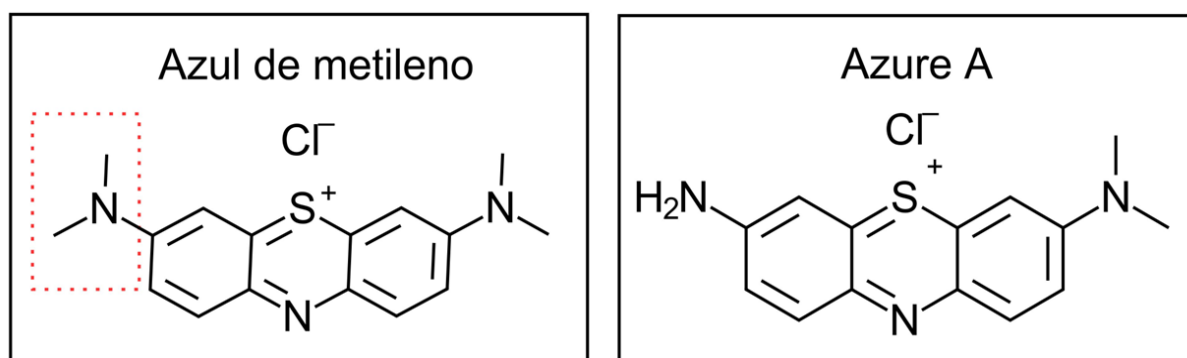


Figura 5.1: Diferença na estrutura química do Azure A e Azul de Metileno. Circulada em preto a presença dos radicais CH_2 no Azul de Metileno. Fonte: Próprio autor.

Podemos também ver depoimentos na literatura demonstrando que o Azure A comparado a gerações anteriores de corantes, como Azure B e Azul de Metileno, demonstra maior eficácia no tratamento de doenças neurodegenerativas. Isso ocorre, uma vez que

ele inibe enzimas responsáveis pela apoptose e agregados de proteínas que formam os emaranhados neurofibrilares, fazendo com que ele se torne mais indicado para aplicações biológicas e terapêuticas [73].

Outra característica notável do Azure A é a fotossensibilidade, tornando o composto particularmente útil em diversos tipos de terapias. Sua capacidade de absorver energia da luz e transferi-la para moléculas próximas o torna eficaz na geração de espécies reativas de oxigênio, resultando em danos seletivos às células-alvo. Essa propriedade é amplamente explorada em aplicações terapêuticas inovadoras, especialmente na terapia fotodinâmica, onde o Azure A é utilizado para induzir efeitos terapêuticos específicos em células-alvo. Essa abordagem é aplicada com sucesso no tratamento de diversas condições médicas, incluindo câncer e doenças infecciosas [74, 75].

Essa característica também desempenha um papel fundamental no desenvolvimento de novos materiais e tecnologias, uma vez que é capaz de interagir com substratos e materiais ao nível molecular. Sua estabilidade e confiabilidade em uma variedade de condições ambientais o tornam um candidato ideal para o desenvolvimento de dispositivos eletrocromáticos, sensores e outros equipamentos avançados [72].

Dessa maneira, há uma preferência crescente pelo uso do Azure A devido à sua menor toxicidade e melhor relação custo-benefício. Essa escolha reflete não apenas as propriedades químicas dos compostos, mas também considerações práticas e de segurança em diversas aplicações, como processos terapêuticos e novos materiais [76].

Quando buscamos na literatura resultados da interação entre o corante Azure A e a molécula de DNA, nota-se que temos poucos estudos. No estado da arte, temos resultados utilizando apenas técnicas de múltiplas moléculas, de modo que temos efeitos coletivos entre a interação do corante com as moléculas de DNA, tais como Espectroscopia UV-Vis e dicroísmo circular [77, 78]. Também foi encontrado um estudo teórico estabelecendo um vínculo entre potenciais termodinâmicos e a isoterma de McGhee-Von Hippel, cujo objetivo era obter os parâmetros físico-químicos de interação [79]. Nesses trabalhos foi verificado que a molécula de Azure A interage com o DNA via intercalação independente da força iônica, com parâmetro de exclusão (N) estimado em torno de 4,5 e constante de associação química (K_i) na ordem de 10^5 M^{-1} .

Parte II

Técnica e metodologia

Capítulo 6

Pinça óptica

Neste capítulo será discutido com mais detalhes a respeito da história e desenvolvimento da pinça óptica, com os aspectos gerais do funcionamento da técnica aplicada ao estudo de sistemas DNA - Ligantes.

6.1 Aspecto histórico

Ao final do século XVII, no período posteriormente conhecido por Iluminismo surge a pergunta provocadora "*O que é a luz?*", aparece assim duas linhas de pensamento em busca de respostas a pergunta. Em 1690, o físico holandês Christiaan Huygens (1629–1695) em seu livro *Traité de la Lumière: Où sont expliquées les causes de ce qui luy arrive dans la reflexion dans la refraction*⁴(1690) ao tentar responder essa pergunta desenvolveu uma teoria que defendia a hipótese de que a luz possui um caráter ondulatório e os fenômenos como reflexão, refração ocorrem devido à presença e interação do Éter no universo. Posteriormente esses argumentos serviram de alicerce para Teoria Ondulatória. Em oposição a Huygens, o físico britânico Isaac Newton (1642–1727) em seu livro *Opticks: or, A treatise of the reflections, refractions, inflexions and colours of light*⁵ (1704) argumenta, a partir da formação de penumbra e fenômenos astronômicos, que a luz é formada por pequenas partículas de massa muito pequena, fundamentando assim o que posteriormente recebeu o nome de Teoria Corpuscular [80, 81, 82].

Quase 150 anos depois, após uma série de experimentos e hipóteses, em 1865 James Clark Maxwell propõe em seu artigo *A Dynamical Theory of the Electromagnetic Field* a unificação entre o eletromagnetismo e a óptica, dando origem assim a teoria clássica que temos hoje [83]. Além disso, Maxwell demonstrou de maneira teórica a pressão de radiação, relatada pela primeira vez em 1619 por Johannes Kepler observando as caudas de cometas sendo repelidas pelo Sol [84]. Faltava assim observar o fenômeno de maneira

⁴Tratado sobre a Luz: Onde são explicadas as causas do que acontece com ela na reflexão e na refração, em português.

⁵Óptica: ou, um tratado das reflexões, refrações, inflexões e cores da luz, em português.

experimental, ao longo dos anos foram realizados diversos experimentos, mas haviam dificuldades relacionadas ao espalhamento e baixa intensidade da luz.

A partir dos estudos teóricos de Albert Einstein sobre radiação estimulada e com cristal rubi, nos laboratórios da universidade da Califórnia durante a década de 1960 com Theodore Maiman e colaboradores, se tornou possível desenvolver o LASER (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*), feixe de luz monocromático, coerente e colimado. Pouco tempo depois, elaborou desenhos ilustrando a óptica dos LASERs, ilustrados na figura 6.1, e como ocorre a focalização da luz, refração em sistemas compostos por lentes, filamentos metálicos, etc. que posteriormente serviram como base para dispositivos e desenvolvimento de novos materiais [85].

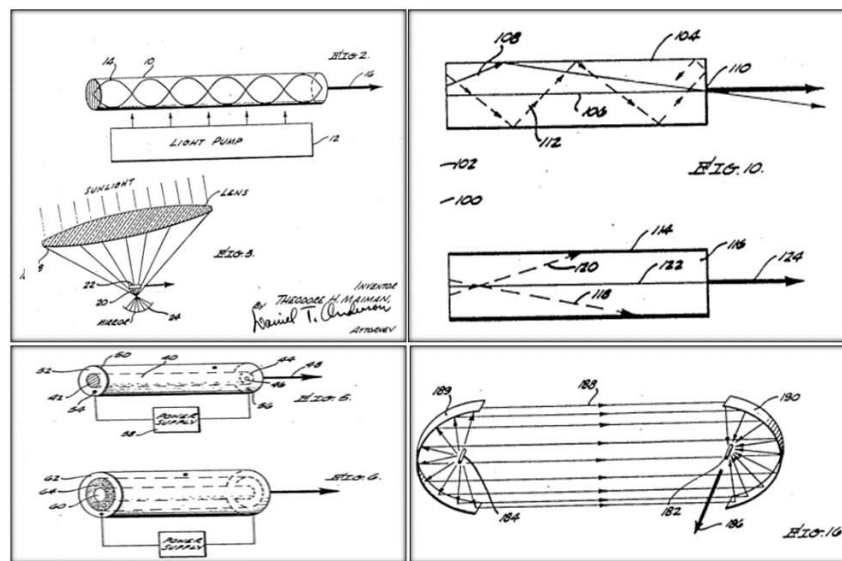


Figura 6.1: Desenhos de Theodore Maiman ilustrando os princípios físicos do LASER.[86]

O desenvolvimento do dispositivo possibilitou Arthur Ashkin em 1986 a criar uma técnica de aprisionamento, posteriormente denominada de pinça óptica [87]. Recentemente, no ano de 2018, Ashkin foi laureado pela academia sueca de ciência com o prêmio Nobel de Física pelo desenvolvimento da técnica de pinçamento óptico e as suas aplicações em sistemas biológicos [88].

6.2 Teoria da pinça óptica

A técnica de pinça óptica é fundamentada no uso de um LASER focalizado, cuja o objeto aprisionado seja da escala microscópica. Para que ocorra o pinçamento são necessárias duas condições, primeira condição é que o campo elétrico não seja uniforme e a outra que o índice de refração da partícula seja maior que o meio circundante. Respeitadas essas condições, a interação da luz com a matéria provoca uma competição entre duas forças ópticas, gradiente e espalhamento, cujos módulos dependem da potência do

equipamento e do perfil de intensidade do feixe [89].

Para estimar a força aplicada sobre uma microesfera podemos utilizar a segunda Lei de Newton, a força resultante é igual variação temporal do momento linear, $F = \frac{P}{dt}$. Podemos relacionar a energia do fóton com o momento linear da seguinte maneira $p = \frac{E}{c}$, em que p é o momento linear do fóton, E é a energia total e c é a velocidade da luz. Dessa maneira, é possível estimar a força que o fóton exerce sobre uma microesfera da seguinte maneira:

$$F = \frac{1}{c} \left(\frac{\partial E}{\partial t} \right) = \frac{P_{total}}{c}, \quad (6.1)$$

em que P_{total} é a potência do LASER, estabelecida pela fonte e c é a velocidade da luz.

A potência do laser é uma variável que podemos controlar experimentalmente, que nos permite alterar a constante de aprisionamento. Para um experimento de pinça óptica no regime entrópico do DNA, operamos um LASER cuja potência está na ordem de miliwatts (10^{-3} W). Substituindo esse valor na equação 6.1, podemos estimar a ordem de grandeza da força aplicada da seguinte forma:

$$F \approx \frac{1 \times 10^{-3}}{3 \times 10^8} \simeq 4 \times 10^{-12} N \quad (6.2)$$

6.3 Regimes ópticos - Pinça óptica

A manipulação de partículas com a pinça óptica será analisada em dois regimes extremos: o regime de Rayleigh e óptica geométrica.

O regime da óptica geométrica é aplicado quando temos partículas cujas dimensões são muito maiores do que o comprimento de onda da luz incidente. Nesse regime, não há efeitos de interferência, diferentemente de quando a luz interage com objetos de tamanho comparável ao seu comprimento de onda. No contexto da óptica geométrica, os feixes de luz propagam-se em linha reta, são independentes entre si e são reversíveis, sendo assim não há fenômenos de interferência e difração nesse regime [91].

Já no regime oposto (Rayleigh), é válido quando as dimensões das partículas são muito menores que o comprimento de onda da luz incidente, nesse contexto podemos aproximar as partículas por dipolos elétricos. Para que seja possível aprisionar nesse regime é necessário uma não uniformidade no campo elétrico [90].

Nas próximas seções, será realizada uma análise mais detalhada do processo de aprisionamento, considerando as características de cada regime óptico, conforme ilustrado na figura 6.2, que exemplifica cada regime óptico.

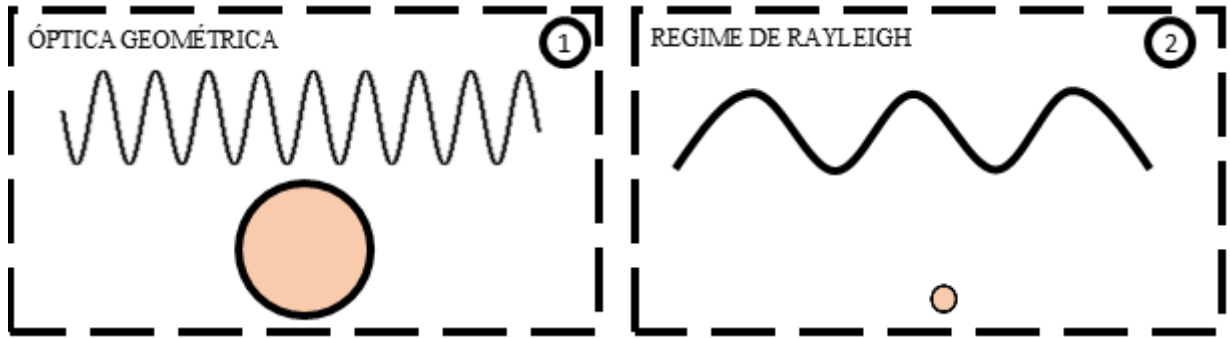


Figura 6.2: Representação dos diferentes regimes da pinça óptica, a esquerda Rayleigh e direita óptica geométrica. Fonte: Próprio autor.

Com a técnica de pinça óptica é possível aplicar forças na escala de femtonewton (10^{-15} N) até centenas de piconewton (10^{-12} N), dessa maneira ela é classificada como uma técnica não invasiva e precisa. Permitindo assim, explorar e compreender propriedades das mais diversas áreas, como por exemplo na biologia na manipulação de células, tecidos, etc. e ligas de materiais não usuais como nanopartículas semi-condutoras [92].

6.3.1 Óptica geométrica

No regime da óptica geométrica, consideramos as dimensões do objeto são muito maiores que o comprimento de onda da luz incidente, e que a luz se propaga em linha reta. Para que ocorra o aprisionamento óptico com, são necessárias duas condições: o índice de refração da partícula seja maior que o do meio em que ela está inserida e uma abertura numérica alta [93].

A primeira condição está relacionada ao efeito da refração. O fenômeno de refração ocorre quando a luz atravessa a interface entre dois meios com índices de refração diferentes, resultando em uma mudança na sua direção de propagação. Quando a luz passa de um meio com índice de refração menor para um meio com índice maior, ela se aproxima da normal da superfície de incidência. Tendo em vista que a luz carrega momento linear, a variação da quantidade de movimento faz com que a microesfera se movimente em direção a região focal do LASER [91]. A força que permite o aprisionamento na região de maior intensidade do LASER recebe o nome de gradiente.

Outro fenômeno relevante é a reflexão, que ocorre quando parte da luz incidente não é transmitida para o meio adjacente, mas sim refletida de volta para o meio de origem. A reflexão contribui para a conservação do momento linear do sistema, impulsionando a partícula na direção de propagação do feixe de luz. Já essa força que empurra a partícula na direção de propagação damos o nome de força de pressão de radiação [94].

Na Figura 6.3 temos uma representação simplificada das forças do sistema feixe-microesfera no regime da óptica geométrica.

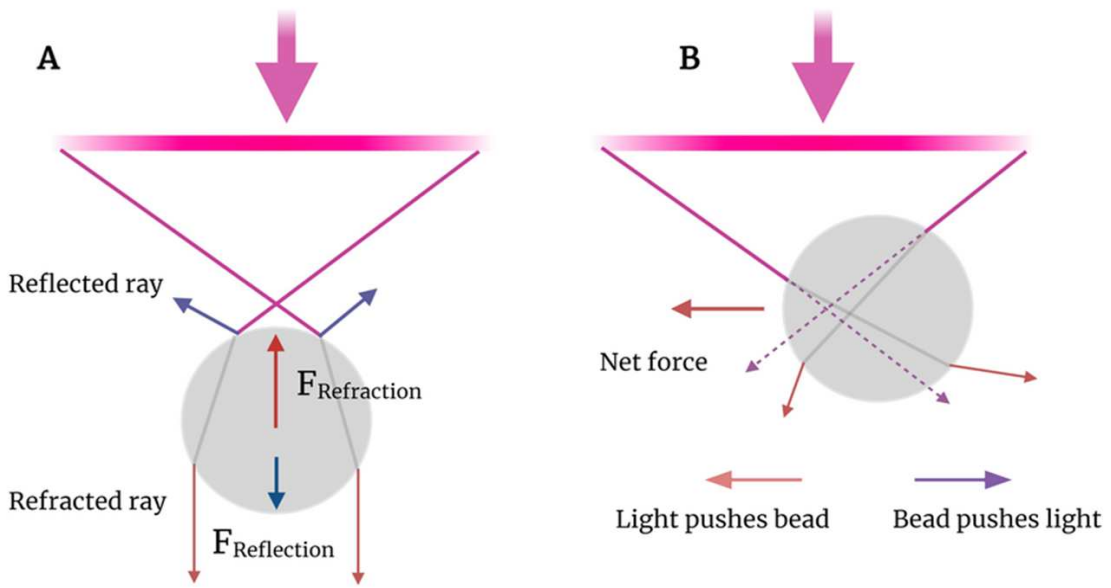


Figura 6.3: Forças ópticas no regime da Óptica Geométrica. Na figura (a) o raio refletido resulta numa força que empurra a esfera na direção de propagação da luz e a refração da luz resulta numa força que direciona a esfera para o foco. Na figura (b) o efeito da refração dos raios leva a um ganho de momento transversal pela luz e, assim, resulta numa força lateral líquida no sentido oposto. [95].

Além do índice de refração da partícula ser maior que o meio para que ocorra o aprisionamento, é necessário que tenhamos uma lente objetiva com alta abertura numérica. Ao utilizar uma lente com essa condição conseguimos fazer com que a força aprisionadora seja maior que a espalhadora [96].

6.3.2 Regime de Rayleigh - modelo do dipolo elétrico

No regime de Rayleigh, consideramos as dimensões das partículas muito menores que o comprimento de onda da luz incidente, dessa maneira podemos aproximar a microesfera por um dipolo elétrico. Nesse cenário, podemos escrever a força de Lorentz adaptada para um dipolo elétrico, apresentada em 6.3, cuja demonstração pode ser encontrada na referência [97]

$$\vec{F} = (\vec{p} \cdot \nabla) \vec{E} + \frac{d\vec{p}}{dt} \times \vec{B}, \quad (6.3)$$

onde \vec{p} é o momento de dipolo elétrico, \vec{E} e \vec{B} são os campos elétricos e magnéticos externos, respectivamente. Considerando que a microesfera é simétrica e está em um meio linear, podemos reescrever a equação 6.3 em termos da polarizabilidade elétrica, α ,

ao invés do momento de dipolo. Assim, a equação anterior pode ser reescrita como:

$$\vec{F} = \alpha \left[\frac{1}{2} \nabla |\vec{E}|^2 + \frac{d}{dt} (\vec{E} \times \vec{B}) \right] \quad (6.4)$$

Devido à intensidade do feixe, a variação temporal do vetor de Poynting é pequena, embora presente, pode ser aproximada como constante ao longo do tempo de interação. Isso faz com que a contribuição da variação temporal do vetor de Poynting seja irrelevante em comparação com a força exercida pelo gradiente do campo elétrico. Assim, ao descrever o comportamento das partículas na pinça óptica, podemos desprezar o segundo termo [98]

$$|\vec{F}| \propto \alpha \frac{1}{4} \nabla I \quad (6.5)$$

O módulo do vetor campo elétrico nos dá a intensidade do feixe de luz incidente na microesfera. Assim, quando analisamos na equação anterior (6.5), temos que a força atuante sobre a partícula é proporcional ao gradiente da intensidade do LASER. Nesse caso, estamos trabalhando com um feixe cujo perfil de intensidade é gaussiano.

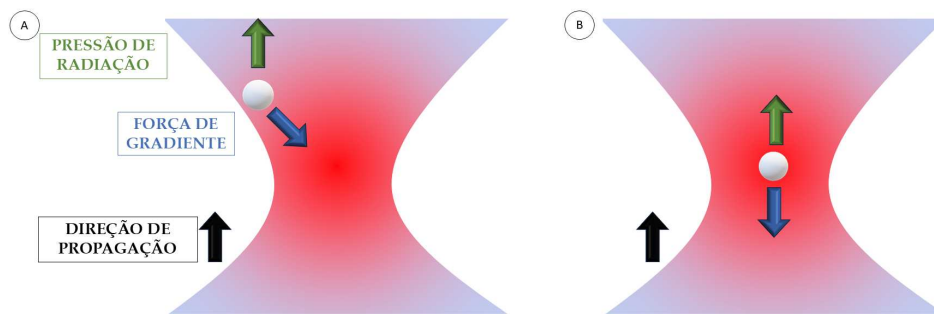


Figura 6.4: Forças ópticas do LASER em uma microesfera no regime dipolar. Fonte: Próprio autor.

Na Figura 6.4, temos uma representação das forças ópticas em dois pontos diferentes do LASER, em verde a pressão de radiação e em azul temos a força de gradiente. Na primeira (A) temos uma partícula localizada à esquerda e em cima do foco, enquanto na segunda (B) temos a mesma partícula posicionada sob o foco do LASER.

Capítulo 7

Rotina experimental e abordagem metodológica

Neste capítulo será apresentado com detalhes a metodologia utilizada no preparo de amostras e especificações dos equipamentos utilizados ao longo da pesquisa.

7.1 Aparato experimental

Na representação esquemática do experimento de pinça óptica utilizada em nosso laboratório na UFV, empregamos um microscópio invertido *Nikon Eclipse Ti-U*. Este microscópio possui uma lente objetiva com aumento de 100x e abertura numérica de 1,4. As microesferas são deslocadas em relação ao meio com um sistema de deslocamento, piezoelétrico, especificamente o modelo *PI nano E-727*. Este piezoelétrico é conectado a um computador equipado com um software capaz de produzir deslocamentos na escala nanométrica. O software permite o controle preciso e detalhado do deslocamento da amostra, fornecendo uma manipulação altamente controlada das partículas. Além disso, o equipamento conta com um estágio manual, que consegue movimentar a amostra ao longo dos eixos vertical e horizontal (eixos X Y).

Em nossos experimentos utilizamos um LASER infravermelho, modelo MIL III, cuja potência máxima é 1,5 W e comprimento de onda $\lambda = 1064$ nm. O feixe do laser percorre um trajeto óptico que inclui lentes, cuja função é expandir e colimar o feixe, além de espelhos, que direcionam o feixe em direção ao microscópio.

Outro fator importante é a calibração da pinça óptica, processo realizado toda vez em que há uma modificação na montagem experimental ou na potência utilizada. Esse procedimento é essencial para o experimento de DNA, pois a partir dele conseguimos determinar a constante de força, qual a força necessária para deslocar a microesfera em uma direção [99].

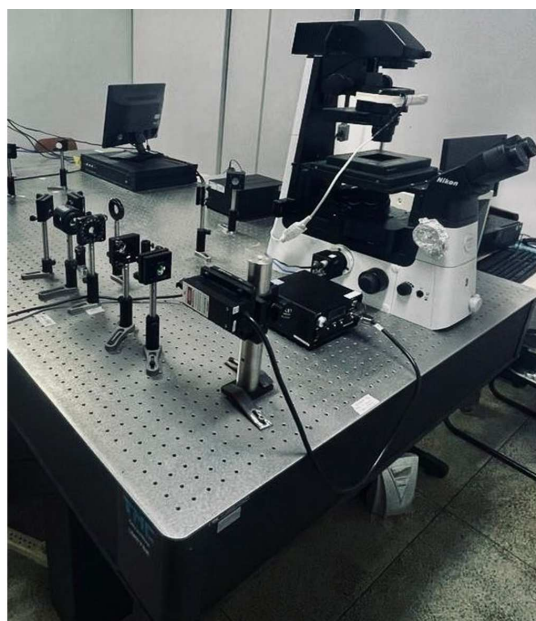
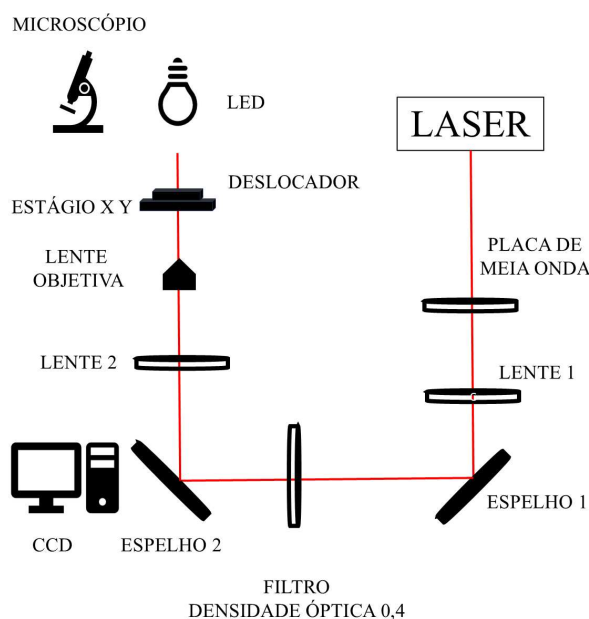


Figura 7.1: Figura esquemática do aparato experimental à esquerda, e à direita, uma fotografia da montagem óptica utilizada nas medidas. Fonte: Próprio autor.

Na Figura anterior, 7.1 , temos à esquerda uma representação esquemática da pinça óptica utilizada no laboratório de Física Biológica da Universidade Federal e à direita uma fotografia demonstrando o aparato experimental.

7.2 Preparo de amostra

Neste experimento, é fundamental que o DNA- λ (New England Biolabs) esteja firmemente fixado tanto ao porta-amostras quanto a uma microesfera em suas extremidades. Para realizar este procedimento, é necessário seguir um protocolo pré-estabelecido. Esse processo implica na montagem de um porta-amostras, onde um anel de borracha do tipo *O-ring* é aderido ao centro de uma lamínula de vidro com parafina. No interior deste anel, é aplicada uma solução contendo o DNA- λ juntamente com uma microesfera de poliestireno de $3,0 \mu\text{m}$ revestida por estreptavidina (Bangs Laboratories, Inc), em meio a solução salina Tamponada com Fosfato (PBS 150). Esse meio é utilizado afim de garantir condições salinas próximas aquelas encontradas no corpo humano.

Para o preparo da amostra de DNA, inserimos em um microtubo tipo Eppendorf, microesferas de poliestireno revestidas com estreptavidina, DNA biotinalado e PBS 150. Uma vez homogenizado esse meio com auxílio de uma pipeta, deixamos essa solução em banho térmico a 37°C durante uma hora, permitindo com que uma das extremidades do DNA se ligue à microesfera.

Para o preparo do porta amostra utilizamos uma lamínula de vidro revestida por $20 \mu\text{L}$ da solução de proteína albumina de soro bovino biotinizada (BSA-Biot), diluída em

Tampão A ⁶ na concentração de 1,8 mg/ml, e colocada no fluxo de luz ultravioleta afim de evitar a proliferação de bactérias. Após esse processo, retiramos o excesso de BSA-Biot e lavamos com Tampão A. Em seguida, repetimos o mesmo protocolo na mesma lamínula com uma solução de Estreptavidina diluída em PBS 150 na concentração 0,1-0,25mg/ml e lavamos com PBS 150. Após seguir esse protocolo, levamos o porta amostra até o microscópio e aguardamos a formação do padrão de estreptavidina. Uma vez formado padrão, adicionamos a solução de DNA que estava em banho térmico e começamos o experimento.

Na sequência, Figura 7.2, temos um esquema resumido demonstrando os passos para o preparo do porta-amostra.

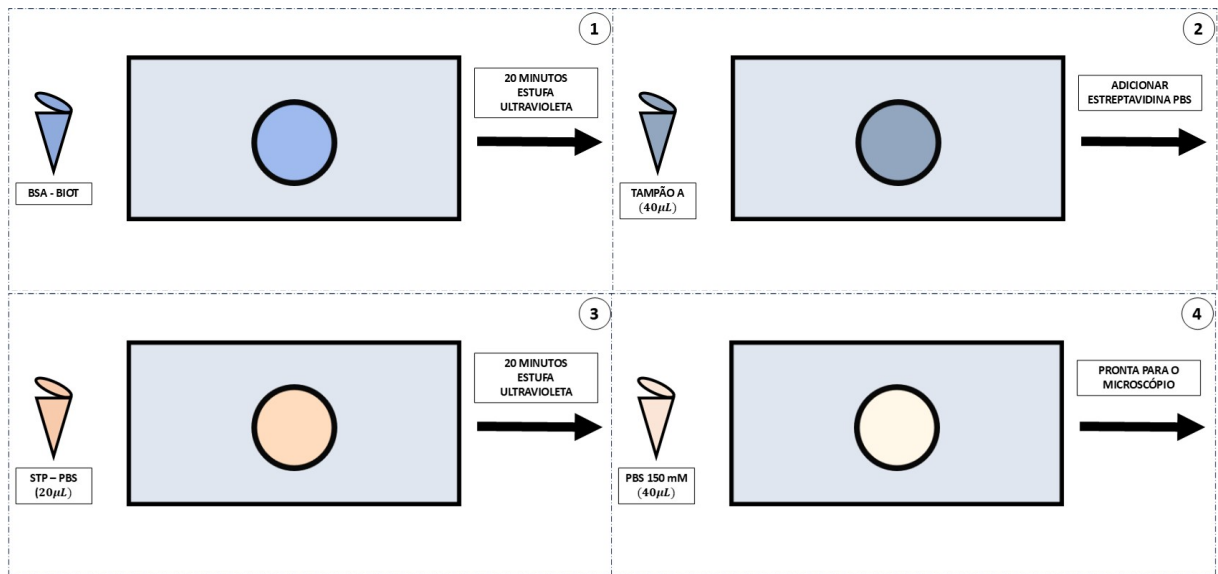


Figura 7.2: Representação esquemática de preparo do porta amostras da lamínula de DNA.

7.3 Experimento na pinça óptica

Uma vez depositada a amostra no microscópio, é possível encontrar configurações diferentes, como microesfera em movimento Browniano livre, presa ao fundo da lamínula e DNA aderido a microesfera. Para identificação de uma microesfera com DNA, é necessário que ao pinça-la e deslocar a lamínula temos microesfera retornando a posição de equilíbrio. Somente assim será possível retirar medidas mecânicas do DNA. Após encontrar essa configuração, serão realizadas cinco medidas a partir da posição de equilíbrio e retirada a média simples dos valores obtidos.

Para realizar uma medida é solicitado, via software, que o piezoelétrico se movimente ao longo de uma direção com velocidade constante. Em nosso experimento filmamos a microesfera presa em uma das pontas pelo DNA aderido ao fundo da lamínula e outra pela

⁶Solução preparada a partir de água deionizada com 10 mM de $MgCl_2$, 40 mM de KCl, e 25 mM de Tris-HCl, cujo resultado final é uma solução com pH 8.

pinça óptica, e deslocamos esse sistema com velocidade de $0,1 \mu\text{m/s}$. A partir do filme obtido, utilizando o software ImageJ torna-se possível obter informações sobre a posição da microesfera e quantidade de frames. A partir da relação pixel-micrômetro (obtida anteriormente), é possível determinar a posição da partícula e assim, obter a distância percorrida pela microesfera. Utilizando um software para análise gráfica e ajuste de curva, podemos utilizar a equação 3.15 para estimar persistência e o contorno do DNA.

Para um experimento ideal de pinça óptica é necessário que seu contorno natural L_0 esteja em torno de $16,5 \mu\text{m}$ e que a persistência esteja próxima de 50 nm [100]. Após completar as análises com o DNA natural, realizamos a troca do meio, depositando a solução de ligantes.

Durante o processo de troca do meio, retiramos a solução contida no anel de vedação, com DNA solto, e adicionamos cerca de $100 \mu\text{L}$ de reagente. Aguardamos o tempo necessário para ocorrer a reação entre o ligante e a molécula de DNA. Em seguida, realizamos cinco medições adicionais para obter os novos comprimentos de contorno e persistência do complexo DNA-ligante. Outras alíquotas são trocadas com concentrações crescentes e o processo é repetido, visando construir uma curva das propriedades mecânicas em relação às concentrações finais.

Na Figura 7.3, temos uma ilustração demonstrando como o experimento de estiramento do DNA é conduzido. Podemos ver em azul a lamínula, força que o DNA faz sobre a micro-esfera em verde e por fim, em amarelo a força gerada pela pinça óptica.

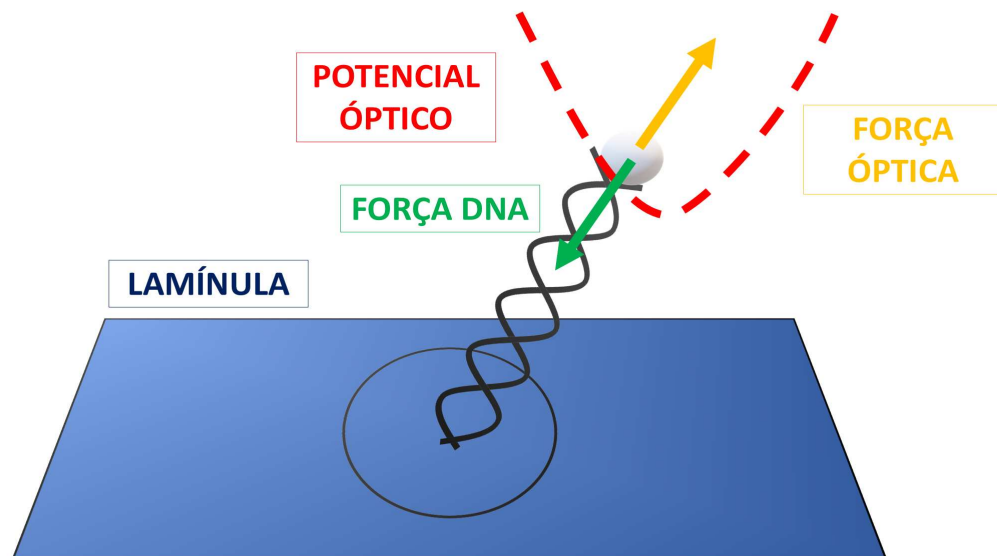


Figura 7.3: Estiramento da molécula de DNA via pinça óptica. Fonte: Autoria própria.

7.4 Preparo de alíquotas de corante Azure A

Considerando a fotossensibilidade do corante Azure A e a ausência de metodologias para a sua conservação, foi necessário desenvolver um protocolo que prevenisse a degradação e processos fotoquímicos, assegurando a manutenção do padrão de qualidade do composto.

Neste experimento, foram preparadas soluções a 5 mM e 100 μ M, que foram armazenadas em tubos Eppendorf escuros para proteção contra a luz. Esses tubos foram, por sua vez, colocados em caixas vedadas com papel alumínio e mantidos na geladeira por no máximo 7 e 15 dias, respectivamente. Na figura 7.4 temos a fotografia demonstrando como as soluções-mãe foram armazenadas.



Figura 7.4: Porta amostras utilizados na armazenagem do corante Azure A, à esquerda a caixa revestida por papel alumínio e direita microtubos translúcidos. Fonte: Próprio autor.

As soluções-filha, utilizadas no experimento de DNA possuíam concentrações de 0,5-3,0 μ M, nas eram feitas no dia do experimento e deixadas para reagir com DNA por um período de 30 minutos, após esse tempo eram feitas as medidas de força por extensão.

Capítulo 8

Modelo Quenched Disorder

Afim de obter os parâmetros físico-químicos de interação DNA-Ligantes via propriedades mecânicas, podemos utilizar o modelo proposto por Rocha. Nesse contexto, o DNA é tratado como uma associação de molas entrópicas⁷ revestidas por ligantes [101].

Por fins didáticos iremos comparar ao modelo de molas clássicas que seguem a Lei de Hooke. As constantes elásticas de mola são substituídas por comprimentos de persistência locais e os deslocamentos são trocados por funções de probabilidade da fração ligada, dessa forma obtemos função 8:

$$\frac{1}{A_E} = \frac{f_0(r)}{A_0} + \frac{f_1(r)}{A_1} + \dots + \frac{f_n(r)}{A_n} \quad (8.1)$$

Na função anterior (8), temos no denominador valores A_E , como comprimento de persistência efetivo, A_0 do DNA natural, e por fim A_1 ao valor de saturação, quando a molécula está parcialmente revestida por ligantes [102].

Vamos introduzir uma nova variável, x , que representa a fração normalizada de sítios ligados, ou seja $x = \frac{r}{r_{\text{máx}}}$. Tomando como base no princípio de que a soma das probabilidades é 1, a probabilidade de encontrar um sítio desocupado é $1 - x$. Assim, reescrevendo a equação anterior temos:

$$\frac{1}{A_E} = \frac{1 - x}{A_0} + \frac{x}{A_1} \quad (8.2)$$

Ao definir x dessa maneira, podemos relacionar essa probabilidade a uma isoterma adequada. O método de *Quenched-disorder* consiste em estabelecer uma relação entre o comprimento de persistência, determinado experimentalmente, e a concentração de um composto por meio de uma isoterma de ligação apropriada. Neste experimento específico, os dados foram analisados utilizando a isoterma de McGhee-Von Hippel (4.4), a fim de obter os parâmetros físico-químicos que regem essa interação.

Na figura 8.1 temos uma representação do DNA sem a presença de ligantes, com com-

⁷Mola entrópica é um polímero ou macromolécula em solução cuja elasticidade está no regime entrópico.

primeto de persistência A_0 (imagem A), na sequência (imagem B) o mesmo DNA com parte revestido por ligantes.

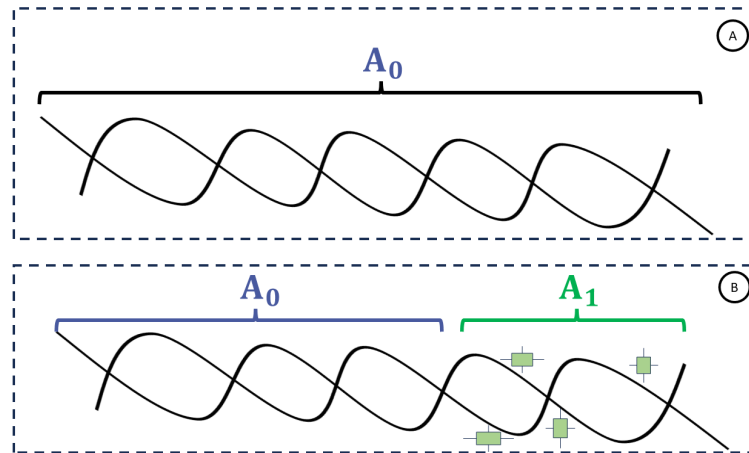


Figura 8.1: Na figura (A) temos o DNA natural, sem a presença de ligantes, enquanto na figura (B) temos o polímero revestido parcialmente por ligantes. Fonte: Próprio autor.

Considerando que o modelo de exclusão de vizinhos apresenta um número maior de parâmetros a serem determinados do que aqueles considerados livres, é necessário utilizar um software adicional para estimar esses valores, nesse caso, foi utilizado o *Matlab*. No experimento, foi considerado apenas A_1 , uma vez que a persistência apresentou um comportamento monotônico em relação à concentração

Parte III

Resultados e discussões

Capítulo 9

Resultados obtidos

Neste capítulo, apresentaremos os resultados obtidos com a técnica de pinça óptica para a interação entre DNA e Azure A nos regimes de força iônica 150mM, 10mM e 1mM em PBS. Além disso, discutiremos possíveis razões para as diferenças observadas em relação aos resultados descritos na literatura, que explicam a variação dos parâmetros mecânicos do DNA em função da concentração de Azure A.

9.1 Interação em força iônica 150mM e 10mM

9.1.1 Análise do comprimento do contorno

Cada ponto preto nos gráficos apresentados na Figura 9.1 representa a média simples de 5 medidas do contorno para cada concentração de corante Azure A. A margem de erro, indicada em vermelho, foi calculada de forma independente para cada conjunto de medidas. Para obter cada valor em cada concentração, utilizamos a equação de ajuste 3.15. As amostras foram diluídas em três diferentes forças iônicas, com o objetivo de reduzir a ordem de grandeza dos contra-íons em solução e avaliar possíveis mudanças no modo de interação.

Para garantir a precisão e confiabilidade dos resultados, o experimento foi repetido mais de uma vez, sempre seguindo o mesmo protocolo adotado anteriormente. Essa repetição foi necessária devido à sensibilidade do composto à luz. Com esse procedimento, foi possível manter a estabilidade da solução e assegurar o equilíbrio químico entre o DNA e o composto.

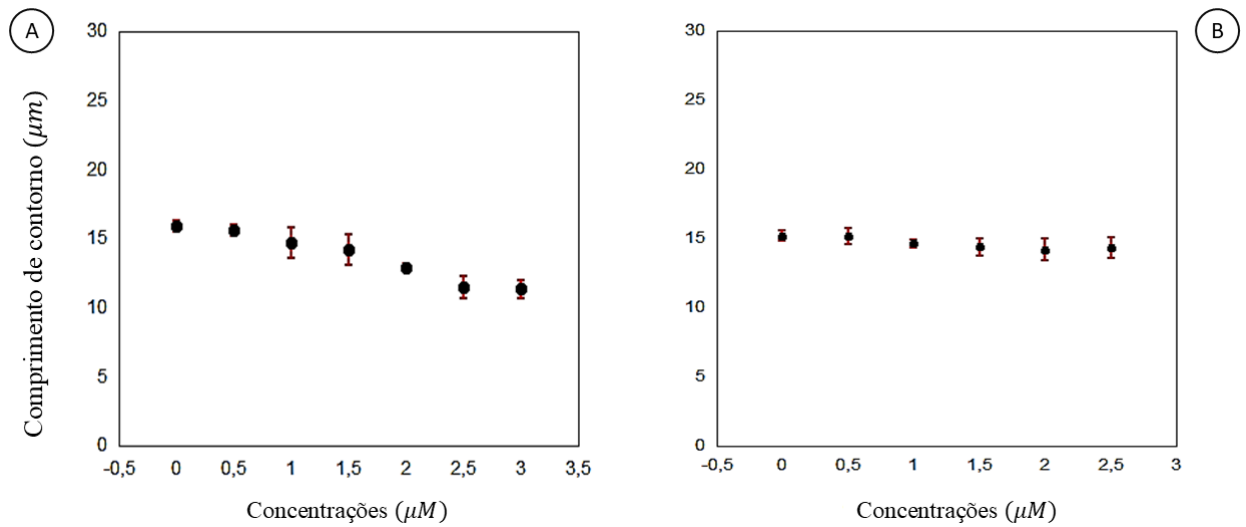


Figura 9.1: Gráfico do comportamento do comprimento de contorno do DNA na presença de Azure A diluído em PBS 150mM (A) e 10mM (B). Os pontos em preto representam a média obtida em cada concentração, em vermelho a barra de erro relativa a média. Dados do próprio autor.

Comparando o comprimento de contorno em alta força iônica, 150mM, e em intermediária, 10mM, notamos uma tendência do parâmetro se manter constante sob essas condições.

9.1.2 Análise do comprimento de persistência

Da mesma forma que foi discutido anteriormente na seção dedicada ao gráfico de comprimento de contorno, aqui adotamos uma abordagem semelhante para obtenção dos pontos experimentais.

Em solução salina com $[Na^+]=140mM$ e $[Na^+]=10mM$, na presença do corante Azure A, ocorre uma neutralização parcial das cargas do Azure A devido a blindagem dos íons presentes no PBS. Isso facilita a aproximação das cadeias de DNA, reduzindo a repulsão eletrostática entre elas. Conseqüentemente, o DNA adota conformações mais compactas, onde as cadeias se dobram e enrolam sobre si mesmas, resultando em uma diminuição dos parâmetros mecânicos de persistência e contorno do DNA. Essa redução indica um aumento na flexibilidade do DNA, com implicações em processos biológicos como a correção de danos em pares de bases e os processos de transcrição e replicação [103].

Na Figura 9.2 estão apresentados os dados obtidos para o comprimento de persistência em força iônica 150mM e 10mM, respectivamente.

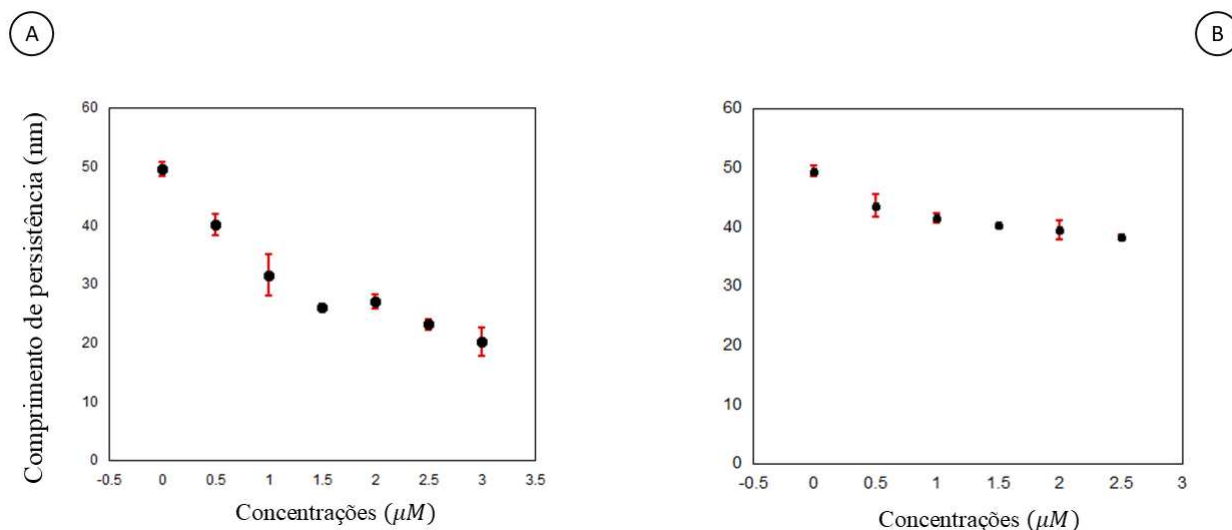


Figura 9.2: Gráfico do comportamento do comprimento de persistência do DNA na presença de Azure A diluído em PBS 150mM (A) e 10mM (B). Os pontos em preto representam a média obtida em cada concentração, em vermelho a barra de erro relativa a cada medida.

Comparando a persistência nos dois regimes percebemos nitidamente que a molécula apresenta um caráter mais flexível em força iônica intermediária quando comparada a alta força iônica. Em ambos os casos, PBS 150 e 10 mM, temos uma interação entre as fendas menores do DNA.

9.2 Interação em baixa força iônica - PBS 1mM

A força iônica do meio desempenha um papel fundamental como mediadora no sistema DNA-Ligantes, especialmente quando se trata de eletrólitos, estruturas capazes de dissociar em solução aquosa e liberar íons [104]. Atentando ao fato que o composto estudado possui caráter catiônico em meio aquoso foram realizados experimentos também no regime de baixa força iônica (1mM).

9.2.1 Comprimento de contorno em baixa força iônica

Ao diminuir a força iônica da solução, reduzimos a blindagem eletrostática entre os grupos fosfato do DNA e o Azure A, devido a presença do Na^+ do PBS. Dessa forma, ao reduzir a concentração de Na^+ em solução, favorecemos a ligação do corante Azure A com o DNA, permitindo que a molécula possa apresentar outros modos de interação entre as estruturas.

Na Figura 9.3 temos ilustrado o comportamento do contorno na presença do Azure A diluído em PBS 1mM.

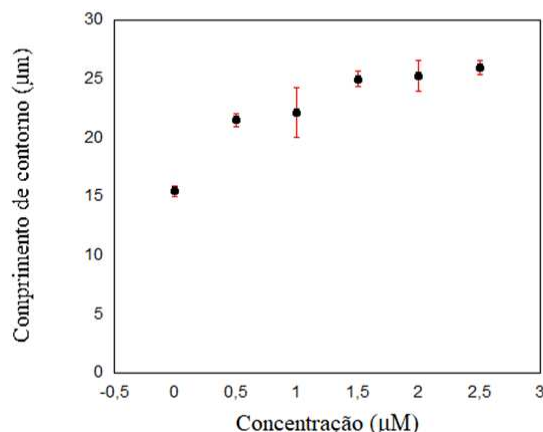


Figura 9.3: Gráfico do comportamento Contorno x Concentração em baixa força iônica 1mM. Os pontos azuis representam medidas experimentais, as barras em vermelho a margem de erro.

Observando o comportamento do comprimento do contorno em solução de Azure A com PBS 1 mM e comparando com resultados anteriores, nota-se que a interação apresenta um comportamento distinto. Diferentemente das soluções de PBS 150 mM e 10 mM, que mostraram um padrão típico de interação com as fendas do DNA, nesta condição vemos um crescimento monotônico do contorno em função da concentração, o qual é a principal característica de uma interação via intercalação.

O mecanismo de interação por empilhamento (ou intercalação) desempenha um papel essencial na eficácia dos quimioterápicos. Ao se inserir entre as bases do DNA, o composto induz uma torção na dupla hélice, no sentido de desfazer a estrutura, aumentando o contorno e impedindo a interação com outras moléculas. As modificações nas bases nitrogenadas resultantes bloqueiam a replicação do DNA, tornando o empilhamento uma estratégia eficaz no tratamento do câncer [50].

9.2.2 Comprimento de persistência em baixa força iônica

Em seções anteriores, o comprimento de persistência foi apresentado sob o ponto de vista qualitativos e quantitativos. Esse parâmetro mecânico fornece informações importantes sobre a rigidez do sistema e ocupa um papel fundamental como vínculo no modelo *Queenched Disorder*.

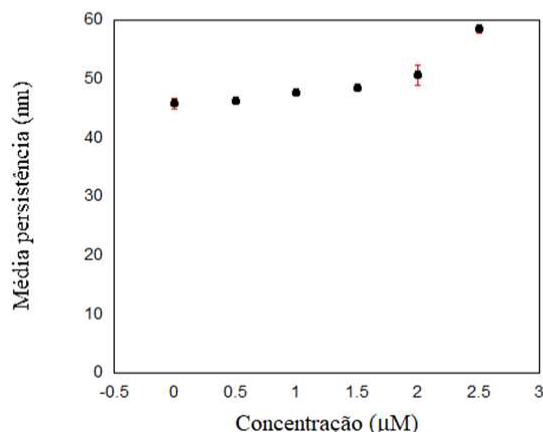


Figura 9.4: Gráfico do comportamento Persistência x Concentração em baixa força iônica 1mM. Os pontos azuis representam medidas experimentais, as barras em vermelho a margem de erro e a linha preta serve apenas como guia visual para experimento.

Ao analisar o gráfico do comprimento de persistência em função da concentração em condições de baixa força iônica, Figura 9.4, observa-se um comportamento distinto do registrado anteriormente. Nessas condições, a menor presença de contra-íons Na^+ em solução reduz a dissociação do composto Azure A, diminuindo a blindagem eletrostática. Com isso, os anéis aromáticos do composto podem interagir diretamente com os anéis das bases nitrogenadas do DNA, formando ligações mais fortes e aumentando o comprimento de persistência do DNA.

O aumento no comprimento de persistência do DNA exerce um impacto significativo na eficácia de agentes quimioterápicos intercalantes. Moléculas como o Azure A, ao se intercalarem, modificam a estrutura e rigidez do DNA, afetando processos celulares essenciais, como a reparação do DNA e a estabilidade cromossômica. Além disso, o aumento da rigidez do DNA devido à interação intercalante pode interferir na compactação do material genético, reduzindo a capacidade das células cancerígenas de manter sua integridade estrutural e funcional [105, 106].

9.3 Parâmetros físicos em força iônicas 150mM, 10mM e 1mM

Para obtenção dos parâmetros físico-químicos da interação entre o Azure A e DNA foram utilizados o modelo *Quenched Disorder* para as forças iônicas de 150mM e 10mM, tendo em vista que o comprimento de contorno manteve-se aproximadamente constante.

Na Figura a seguir (9.5), temos novamente os gráficos de persistência em função da

concentração de ligantes em alta e baixa força iônica, ajustados utilizando o modelo teórico *Quenched Disorder*.

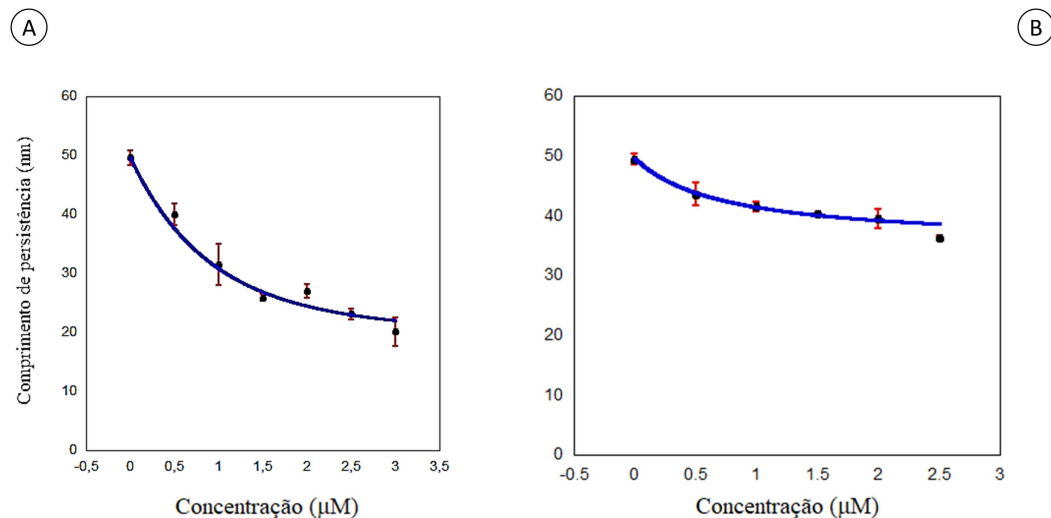


Figura 9.5: Gráfico do modelo Quenched Disorder da interação Azure A aplicada em duas forças iônicas diferentes; a) PBS 150mM b) PBS 10mM. Em preto os pontos obtidos experimentalmente, vermelho margem de erro e em azul curva de ajuste. Fonte: Próprio autor.

A partir do ajuste teórico foi possível estimar os parâmetros da interação, utilizando o método de mínimos quadrados. Em força iônica 150mM, obteve-se um valor para persistência local $A_1 = 19,3 \text{ nm}$, com uma constante química de associação $K_i = 8,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e o parâmetro de exclusão, sítios ocupados por molécula de ligante, $N = 0,48$, ou seja para que ocupar um sítio de ligação é preciso ter duas moléculas de Azure A.

Para analisar e estimar os parâmetros da interação em força iônica intermediária, PBS 10 mM, uma ordem de grandeza menor na força iônica, foi adotada uma metodologia similar à aquela utilizada em solução PBS 150 mM. Para essa condição, foi obtido $A_1 = 36 \text{ nm}$, com uma constante de associação $K_i = 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ e número de exclusão, $N = 1$, uma molécula para cada sítio de ligação. Esses resultados endossam de que o modo de interação em alta e intermediária força iônica ocorre entre as fendas do DNA.

Em condições de baixa força iônica, observamos que o modo de interação entre o Azure A e o DNA difere daquele observado em situações anteriores. Nessa faixa de força iônica, ocorre um aumento significativo no comprimento de contorno, resultante da torção da dupla hélice, que tende a desfazê-la à medida que o ligante se insere entre os pares de bases.

Para obtenção dos parâmetros físico-químicos usaremos a mesma isoterma, MCGhee - Von Hippel, com adaptações nos parâmetros para que seja possível analisar a concentração em função do contorno. Nessa adaptação, iremos reescrever os parâmetros em função dos

novos, apresentados a seguir

$$\Theta = \frac{L - L_0}{L_0} = r\gamma; \quad \frac{N_b}{N_{bp}} = \frac{C_b}{C_{bp}} = r; \quad C_f = C_T - C_b = C_T - rC_{bp} \quad (9.1)$$

Nessa formulação, Θ representa o comprimento de contorno relativo, γ é definido como a fração do espaçamento causado pelo ligante em relação ao espaçamento entre cada par de bases no DNA sem ligante, r é a fração ligada e C_T como a concentração total [107].

Escrevendo a isoterma de MCGhee-Von Hippel em termos desses novos parâmetros, temos a equação a seguir:

$$C_T = \frac{\Theta C_{bp}}{\gamma} + \frac{\Theta}{\gamma K_i (1 - \frac{N\Theta}{\gamma})} \left[\frac{1 - \frac{N\Theta}{\gamma}}{1 - (N-1)\frac{\Theta}{\gamma}} \right]^{1-N} \quad (9.2)$$

Ao escrever a isoterma dessa maneira, temos parâmetros a determinar, γ , K_i e N , e como parâmetro livre temos Θ . Assim, podemos plotar o gráfico da concentração e calcular os parâmetros físico-químicos. Na Figura 9.6, está apresentado o gráfico da concentração total em função do contorno relativo, cujo o ajuste teórico foi feito com a função anterior.

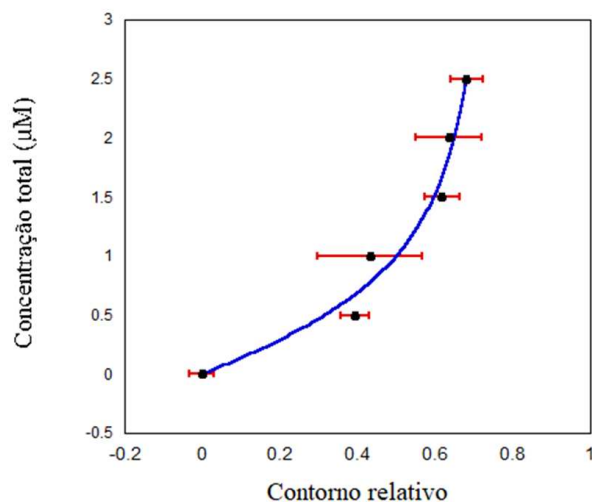


Figura 9.6: Concentração em função do comprimento de contorno relativo em baixa força iônica (PBS 1mM).

Como discutido anteriormente, o ajuste de curva é uma ferramenta fundamental para a determinação precisa dos parâmetros físico-químicos que regem a interação entre as moléculas. Ao analisar o comportamento em baixa força iônica, observou-se um valor de $N = 1,23$, indicando que a interação entre o Azure A e o DNA tem uma ocupação de múltiplos sítios de ligação por cada molécula de corante.

Além disso, a constante de equilíbrio estimada, $K_i = 3,0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, confirmando a

estabilidade dessa interação, indicando que o processo de intercalação entre o Azure A e o DNA é altamente favorável em condições de baixa força iônica. Em baixa força iônica, temos uma menor blindagem eletrostática favorecendo a aproximação do corante às bases nitrogenadas do DNA, favorecendo assim o modo de intercalação.

Capítulo 10

Conclusão

Com o uso da técnica de pinça óptica, é possível analisar a interação entre o DNA e ligantes de forma mais precisa e não invasiva, uma vez que podemos fazer a análise individualizada e sem danos estruturais na molécula, obtendo os parâmetros bioquímicos de interação a partir de mecânicos individuais. O aprofundamento no entendimento dessas interações pode abrir novos horizontes para a aplicação desse composto em áreas estratégicas.

A interação entre o corante Azure A e a molécula de DNA ainda é escassa na literatura. Esse foi o primeiro trabalho estudando a interação entre o corante fenotiazínico Azure A e a molécula individual de DNA, foi constatado que a interação é diretamente modificada pela força iônica do meio. Em condições de alta e média força iônica, 150mM e 10mM, temos uma interação entre fendas menores, enquanto em baixa força iônica temos uma interação similar aquela encontrada na literatura, intercalação.

Como mencionado ao longo do texto, ao longo desse trabalho tornou-se necessário criar um protocolo para armazenagem do ligante e estabelecer um tempo para atingir o equilíbrio. Nesse contexto, cabe-se aqui a possibilidade de estudar a interação e desenvolver novas metodologias tomando como base fatores relacionados a fotossensibilidade, ausência de luz, modos de interação dependentes da luz, etc. esses fatores são importantes, uma vez que permitem o desenvolvimento de novos marcadores biológicos, dispositivos eletrocromáticos e sensores oncológicos, entre outros.

Referências Bibliográficas

- [1] E. Gorab and P. L. S. Leme, “À frente (ou atrás) da descoberta do dna: Friedrich miescher, médico / ahead of (or behind) the dna discovery: Friedrich miescher, physician,” *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, June 2023.
- [2] G. Mendel, *The origin of genetics: A Mendel source book*. Freeman, 1966.
- [3] N. C. Mullins, “The development of a scientific specialty: The phage group and the origins of molecular biology,” *Minerva*, pp. 51–82, 1972.
- [4] E. Chargaff, R. Lipshitz, and C. Green, “Composition of the desoxypentose nucleic acids of four genera of sea-urchin,” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 195, no. 1, pp. 155–160, 1952.
- [5] R. E. Franklin and R. G. Gosling, “Molecular configuration in sodium thymonucleate,” *Nature*, vol. 171, no. 4356, pp. 740–741, 1953.
- [6] C. Molnar, J. Gair, S. Fowler, BC Open Textbook Project, and BCcampus, *Concepts of biology*. [Victoria]: BCcampus, BC Open Textbook Project [Victoria], 1st canadian edition ed., 2015.
- [7] Nobel Prize Outreach AB, “The nobel prize in physiology or medicine 1962.” NobelPrize.org, Mar 2024.
- [8] T. Matéria, “Nucleotídeos: Definição, estrutura e funções,” Ano de acesso.
- [9] J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine, and R. Losicke, *Biologia molecular do gene*. Artmed Editora, 2015.
- [10] W. L. Nyhan, “Disorders of purine and pyrimidine metabolism,” *Molecular genetics and metabolism*, vol. 86, no. 1-2, pp. 25–33, 2005.
- [11] P. R. Wright, *Predicting small RNA targets in prokaryotes-a challenge beyond the barriers of thermodynamic models*. PhD thesis, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, 2016.

- [12] D. Voet, J. G. Voet, and C. W. Pratt, *Fundamentos de Bioquímica-: A Vida em Nível Molecular*. Artmed Editora, 2014.
- [13] B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter, *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, 2002.
- [14] U. Heinemann and Y. Roske, “Symmetry in nucleic-acid double helices,” *Symmetry*, vol. 12, no. 5, 2020.
- [15] A. Uzunian, *Biologia: volume único*. Harbra, 2004.
- [16] Y.-F. Chang, “Some solutions of extensive quantum equations in biology, formation of dna and neurobiological entanglement,” *Neuroquantology*, vol. 13, pp. 304–309, 2015.
- [17] M. W. Nirenberg, “The genetic code,” *Scientific American*, vol. 208, no. 3, pp. 80–95, 1963.
- [18] D. W. Ussery, “Dna structure: A-, b-and z-dna helix families,” *Encyclopedia of life sciences*, vol. 1, p. e003122, 2002.
- [19] A. Ghosh and M. Bansal, “A glossary of dna structures from a to z,” *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, vol. 59, no. 4, pp. 620–626, 2003.
- [20] C. G. Ricci, “A, b e z-dna: caracterização conformacional e importância biológica,” 2007.
- [21] “Different form of DNA — bch.cuhk.edu.hk.” http://www.bch.cuhk.edu.hk/vr_biomolecules/different-form-of-dna.html. [Accessed 03-04-2024].
- [22] R. C. Hardison and T. Chu, “Working with molecular genetics,” 2021.
- [23] M. S. Rocha, “Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicação no estudo da interação dna-fármacos,” 2008.
- [24] S. V. Canevarolo Jr, “Ciência dos polímeros,” *Artiliber editora, São Paulo*, vol. 24, 2002.
- [25] M. Rabello, “Estrutura e propriedades de polímeros,” *do autor, ISBNB*, pp. 978–65, 2021.
- [26] J. C. Neto, “Medida da elasticidade entrópica de uma molécula de dna,” 2001.
- [27] I. Teraoka, *Polymer solutions*. 2002.
- [28] L. K. R. Duarte, “Simulações de monte carlo de polímeros semiflexíveis,” 2018.

- [29] W. Sung, *Statistical Physics for Biological Matter*. Springer, 2018.
- [30] M. S. Rocha, “Interações dna-ligantes: Uma introdução,” *São Paulo: Livraria da Física*, 2020.
- [31] U. Heinemann and Y. Roske, “Symmetry in nucleic-acid double helices,” *Symmetry*, vol. 12, no. 5, 2020.
- [32] A. C. Price, K. R. Pilkiewicz, T. G. Graham, D. Song, J. D. Eaves, and J. J. Loparo, “Dna motion capture reveals the mechanical properties of dna at the mesoscale,” *Biophysical Journal*, vol. 108, no. 10, pp. 2532–2540, 2015.
- [33] J. R. Villanueva Valencia, E. Tsimtsirakis, S. Krueger, and A. Evilevitch, “Temperature-induced dna density transition in phage λ capsid revealed with contrast-matching sans,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 120, no. 45, p. e2220518120, 2023.
- [34] O. Kratky and G. Porod, “Röntgenuntersuchung gelöster fadenmoleküle,” *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, vol. 68, no. 12, pp. 1106–1122, 1949.
- [35] M. Doi, *Introduction to polymer physics*. Oxford university press, 1996.
- [36] S. Geggier, A. Kotlyar, and A. Vologodskii, “Temperature dependence of dna persistence length,” *Biophysical Journal*, vol. 100, no. 3, p. 76a, 2011.
- [37] C. Singh and D. Hone, “Temperature-dependent behavior of conjugated polymers in solution,” *Synthetic metals*, vol. 62, no. 1, pp. 61–70, 1994.
- [38] P. A. Wiggins and P. C. Nelson, “Generalized theory of semiflexible polymers,” *Phys. Rev. E*, vol. 73, p. 031906, Mar 2006.
- [39] C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia, and S. Smith, “Entropic elasticity of λ -phage dna,” *Science*, vol. 265, no. 5178, pp. 1599–1600, 1994.
- [40] P.-G. De Gennes, *Introduction to polymer dynamics*. CUP Archive, 1990.
- [41] R. F. Bazoni, “Efeitos de forças externas nas propriedades mecânicas de complexos dna-ligantes,” 2016.
- [42] J. F. Marko and E. D. Siggia, “Stretching dna,” *Macromolecules*, vol. 28, no. 26, pp. 8759–8770, 1995.
- [43] P. Atkins, L. Jones, and L. Laverman, *Princípios de Química-: Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente*. Bookman Editora, 2018.
- [44] R. Chang, *Química geral*. AMGH Editora, 2009.

- [45] W. J. Moore, *Físico-química-vol. 2*, vol. 2. Editora Blucher, 1976.
- [46] G. Scatchard, “The attractions of proteins for small molecules and ions,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 51, no. 4, pp. 660–672, 1949.
- [47] HandWiki, “Chemistry:pi-stacking — handwiki,” 2022. [Online; accessed 11-February-2024].
- [48] L. Lerman, “Structural considerations in the interaction of dna and acridines,” *Journal of molecular biology*, vol. 3, no. 1, pp. 18–IN14, 1961.
- [49] É. R. Silva, *Estudo da cinética e dos mecanismos de fototransformação do corante Acridina Laranja na sua interação com sistemas micro-organizados sob a ação da luz visível*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, 2010.
- [50] W. D. Wilson and R. L. Jones, “Intercalating drugs: Dna binding and molecular pharmacology,” *Advances in Pharmacology*, vol. 18, pp. 177–222, 1981.
- [51] A. Mukherjee and W. D. Sasikala, “Drug–dna intercalation: From discovery to the molecular mechanism,” *Advances in protein chemistry and structural biology*, vol. 92, pp. 1–62, 2013.
- [52] W. R. ROCHA, “Interações intermoleculares,” *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, vol. 31, p. 36, 2001.
- [53] X. Cai, P. J. Gray Jr, and D. D. Von Hoff, “Dna minor groove binders: back in the groove,” *Cancer treatment reviews*, vol. 35, no. 5, pp. 437–450, 2009.
- [54] D. C. Hooper, “Mode of action of fluoroquinolones,” *Drugs*, vol. 58, pp. 6–10, 1999.
- [55] D. G. Soares, A. K. Larsen, and A. E. Escargueil, “The dna damage response to monofunctional anticancer dna binders,” *Drug Discovery Today: Disease Models*, vol. 9, no. 2, pp. e59–e67, 2012.
- [56] R. Enomoto, C. Suzuki, M. Ohno, T. Ohasi, R. Futagami, K. Ishikawa, M. Komae, T. Nishino, Y. Konishi, and E. Lee, “Cationic surfactants induce apoptosis in normal and cancer cells,” *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1095, no. 1, pp. 1–6, 2007.
- [57] E. A. Costa, A. P. Gonçalves, J. A. D. Batista, R. F. Bazoni, A. A. Santos, and M. S. Rocha, “New insights into the mechanism of action of the drug chloroquine: Direct interaction with dna and cytotoxicity,” *The Journal of Physical Chemistry B*, vol. 126, no. 19, pp. 3512–3521, 2022.
- [58] J. M. Berg and L. John, “Biochemistry 9th edition pdf,” 2002.

- [59] M. Rocha, N. Viana, and O. Mesquita, “Dna-psoralen interaction: A single molecule experiment,” *The Journal of chemical physics*, vol. 121, no. 19, pp. 9679–9683, 2004.
- [60] M. Rocha, A. Lúcio, S. Alexandre, R. Nunes, and O. Mesquita, “Dna-psoralen: Single-molecule experiments and first principles calculations,” *Applied Physics Letters*, vol. 95, no. 25, 2009.
- [61] S. M. Cohen and S. J. Lippard, “Cisplatin: from dna damage to cancer chemotherapy,” 2001.
- [62] V. Cepeda, M. A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo, and J. M. Pérez, “Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity,” *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, vol. 7, no. 1, pp. 3–18, 2007.
- [63] E. Reed, “Platinum-dna adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy,” *Cancer treatment reviews*, vol. 24, no. 5, pp. 331–344, 1998.
- [64] S. Ramotowska, A. Ciesielska, and M. Makowski, “What can electrochemical methods offer in determining dna–drug interactions?,” *Molecules*, vol. 26, p. 3478, June 2021.
- [65] S. C. Kowalczykowski, L. S. Paul, N. Lonberg, J. W. Newport, J. A. McSwiggen, and P. H. Von Hippel, “Cooperative and noncooperative binding of protein ligands to nucleic acid lattices: experimental approaches to the determination of thermodynamic parameters,” *Biochemistry*, vol. 25, no. 6, pp. 1226–1240, 1986.
- [66] J. D. McGhee and P. H. von Hippel, “Theoretical aspects of dna-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice,” *Journal of molecular biology*, vol. 86, no. 2, pp. 469–489, 1974.
- [67] I. R. Epstein, “Cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a finite one-dimensional lattice: a model for ligand-ougonucleotide interactions,” *Biophysical chemistry*, vol. 8, no. 4, pp. 327–339, 1978.
- [68] P. Campbell, H. Parish, A. Smith, F. Vella, and J. Stirling, *Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology*. Oxford University Press, 2006.
- [69] L. M. Pereira, G. B. Portapilla, G. T. P. Brancini, B. Possato, C. M. Bronzon da Costa, P. G. Abreu-Filho, M. Wainwright, A. P. Yatsuda, and G. Ú. L. Braga, “The potential of phenothiazinium dyes as cytotoxicity markers in cisplatin-treated cells,” *Scientific Reports*, vol. 13, no. 1, p. 10203, 2023.

- [70] M. Wainwright and R. M. Giddens, “Phenothiazinium photosensitisers: choices in synthesis and application,” *Dyes and Pigments*, vol. 57, no. 3, pp. 245–257, 2003.
- [71] W. J. M. Neal, “Methylene violet and methylene azure a and b,” *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 36, no. 6, pp. 538–546, 1925.
- [72] M. Wainwright, M. Byrne, and M. Gattrell, “Phenothiazinium-based photobactericidal materials,” *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 84, pp. 227–230, Sep 2006.
- [73] P. Pakavathkumar, G. Sharma, V. Kaushal, B. Foveau, and A. C. LeBlanc, “Methylene blue inhibits caspases by oxidation of the catalytic cysteine,” *Scientific reports*, vol. 5, no. 1, p. 13730, 2015.
- [74] N. Motohashi, S. R. Gollapudi, J. Emrani, and K. R. Bhattiprolu, “Antitumor properties of phenothiazines,” *Cancer investigation*, vol. 9, no. 3, pp. 305–319, 1991.
- [75] C. M. Francisco, J. M. Goncalves, B. S. Brum, T. P. Santos, A. Lino-dos Santos-Franco, D. F. Silva, and C. Pavani, “The photodynamic efficiency of phenothiazinium dyes is aggregation dependent,” *New Journal of Chemistry*, vol. 41, no. 23, pp. 14438–14443, 2017.
- [76] D. Wittekind, “Romanowsky-giemsa stains,” in *Conn’s Biological Stains*, pp. 303–312, Taylor & Francis, 2020.
- [77] M. Kumar, M. Kaushik, S. Chaudhary, and S. Kukreti, “Spectroscopic studies of the binding interactions of phenothiazinium dyes (thionine acetate, azure a and azure b) with calf-thymus dna,” *J. Drug Metab. Toxicol*, vol. 7, no. 3, pp. 1–7, 2016.
- [78] Y. F. Li, C. Z. Huang, X. H. Huang, and M. Li, “Determination of dna by its enhancement effect of resonance light scattering by azur a,” *Analytica chimica acta*, vol. 429, no. 2, pp. 311–319, 2001.
- [79] P. Paul and G. S. Kumar, “Thermodynamics of the dna binding of phenothiazinium dyes toluidine blue o, azure a and azure b,” *The Journal of Chemical Thermodynamics*, vol. 64, pp. 50–57, 2013.
- [80] T. C. de Mello Forato, “Curso: O éter, a luz e a natureza da ciência.” *Revista Brasileira de Ensino de Física* 18, vol. 4, pp. 313–27, 1996.
- [81] I. Newton, *Opticks: Or, A treatise of the reflections, refractions, inflexions and colours of light*. S. Smith, and B. Walford, 1704.

- [82] C. Huyghens, “Traité de la lumière: où sont expliquées les causes de ce qui luy arrive dans la reflexion, & dans la refraction, et particulièrement dans l’étrange refraction du cristal d’islande,” *Pierre Vander AA: Leiden, The Netherlands*, vol. 1690.
- [83] J. C. Maxwell, “A dynamical theory of the electromagnetic field,” *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, vol. 155, pp. 459–512, 1865.
- [84] V. S. Zanuto, “Pressão de radiação: sobre os efeitos das forças de radiação em água,” 2015.
- [85] J. Hecht, “Short history of laser development,” *Optical engineering*, vol. 49, no. 9, pp. 091002–091002, 2010.
- [86] A. L. Schawlow and C. H. Townes, “Ruby laser systems,” *Applied Physics Letters*, vol. 1, no. 7, pp. 1–3, 1962.
- [87] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu, “Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles,” *Optics letters*, vol. 11, no. 5, pp. 288–290, 1986.
- [88] N. P. O. AB, “Arthur ashkin – facts – 2018.” NobelPrize.org, 2024. Thu. 15 Feb 2024.
- [89] C. H. M. Lima, “Prêmio nobel de física: O que são pinças ópticas?,” *South American Journal of Basic Education, Technical and Technological*, vol. 7, no. 1, pp. 78–93, 2020.
- [90] A. Ashkin, “Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 10, pp. 4853–4860, 1997.
- [91] G. R. Fowles, *Introduction to modern optics*. Courier Corporation, 1989.
- [92] T. Moura, U. Andrade, J. Mendes, and M. Rocha, “Modulating the trapping and manipulation of semiconductor particles using bessel beam optical tweezers,” *Optics and Lasers in Engineering*, vol. 170, p. 107778, 2023.
- [93] M. D. Koch and J. W. Shaevitz, “Introduction to optical tweezers,” *Optical Tweezers: Methods and Protocols*, pp. 3–24, 2017.
- [94] A. Ashkin, “The pressure of laser light,” *Scientific American*, vol. 226, no. 2, pp. 62–71, 1972.
- [95] S. K. Cheppali, R. Dharan, and R. Sorkin, “Forces of change: optical tweezers in membrane remodeling studies,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 255, no. 6, pp. 677–690, 2022.

- [96] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu, “Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles,” *Opt. Lett.*, vol. 11, pp. 288–290, May 1986.
- [97] V. Twersky, “Rayleigh scattering,” *Applied Optics*, vol. 3, no. 10, pp. 1150–1162, 1964.
- [98] P. Jones, O. Maragò, and G. Volpe, *Optical Tweezers: Principles and Applications*. Cambridge University Press, 2015.
- [99] R. R. d. Santi and A. M. Alencar, *Montagem de uma pinça óptica e sua calibração: estudo teórico e simulação computacional de sua força*. PhD thesis, Universidade de São Paulo, 2020.
- [100] T. Strick, J.-F. Allemand, V. Croquette, and D. Bensimon, “Twisting and stretching single dna molecules,” *Progress in biophysics and molecular biology*, vol. 74, no. 1-2, pp. 115–140, 2000.
- [101] M. Rocha, “Modeling the entropic structural transition of dna complexes formed with intercalating drugs,” *Physical biology*, vol. 6, June 2009.
- [102] L. Siman, I. S. S. Carrasco, J. K. L. da Silva, M. C. de Oliveira, M. S. Rocha, and O. N. Mesquita, “Quantitative assessment of the interplay between dna elasticity and cooperative binding of ligands.,” *Physical review letters*, vol. 109 24, p. 248103, 2012.
- [103] P. J. Perry and T. C. Jenkins, “Dna tetraplex-binding drugs structure-selective targeting is critical for antitumour telomerase inhibition,” *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 1, no. 1, pp. 31–41, 2001.
- [104] C. G. Baumann, S. B. Smith, V. A. Bloomfield, and C. Bustamante, “Ionic effects on the elasticity of single dna molecules,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 94, no. 12, pp. 6185–6190, 1997.
- [105] L. H. Hurley, “Dna and its associated processes as targets for cancer therapy,” *Nature Reviews Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 188–200, 2002.
- [106] S. Neidle, *Molecular aspects of anticancer drug DNA interactions*, vol. 2. CRC Press, 1994.
- [107] M. S. Rocha, “Dna interactions with drugs and other small ligands: single molecule approaches and techniques,” (*No Title*), 2023.