

BRUNO CARVALHO PÚBLIO

**CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DNA-PUTRESCINA  
VIA PINÇA ÓPTICA**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2017

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

T

P976c  
2017 Púbio, Bruno Carvalho, 1991-  
Caracterização do complexo DNA-Putrescina via pinça óptica /  
Bruno Carvalho Púbio. - Viçosa, MG, 2017.  
viii, 52f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui apêndice.

Orientador: Márcio Santos Rocha.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.51-52.

1. Óptica física. 2. Instrumentos ópticos. 3. DNA - Análise.  
4. Putrescina. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de  
Física. Programa de Pós-graduação em Física Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 535.2

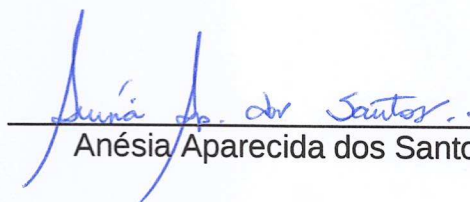
BRUNO CARVALHO PÚBLIO


**CARACTERIZAÇÃO DO COMPLEXO DNA-PUTRESCINA VIA PINÇA ÓPTICA**

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

APROVADA: 26 de julho de 2017.

  
Mariana da Costa Novo P. Brandão

  
Anésia Aparecida dos Santos

  
Márcio Santos Rocha  
(Orientador)

# Agradecimentos

A Deus, por mais uma etapa conquistada.

Aos meu pais, Cândido e Ana Amélia, por acreditarem.

Aos meus irmãos, Pedro e Samuel, pela amizade.

Ao amigo, Gabriel, pelas discussões de física, resolução de problemas e amizade.

Ao amigo, Paulo Henrique, pela ajuda com a resolução de problemas e amizade.

Ao professor e orientador, Márcio Santos Rocha, pelos ensinamentos e orientação.

Às agências de fomento: CAPES, FAPEMIG e CNPq pela concessão da bolsa de estudos e pelo financiamento da estrutura do laboratório de Física Biológica.

# Conteúdo

Lista de Figuras	v
Resumo	vii
Abstract	viii
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 A molécula de DNA</b>	<b>3</b>
2.1 Breve histórico . . . . .	3
2.2 Estrutura química da molécula de DNA . . . . .	3
2.3 Tipos de DNA . . . . .	6
2.4 O $\lambda$ -DNA . . . . .	7
2.5 Propriedades mecânicas: DNA como polímero . . . . .	7
2.6 Interação DNA-ligante . . . . .	9
2.6.1 Interação eletrostática . . . . .	9
2.6.2 Ligação de fenda . . . . .	9
2.7 Equilíbrio químico nas interações DNA-ligantes . . . . .	10
<b>3 Modelo de Hill e cooperatividade</b>	<b>12</b>
<b>4 Pinça Óptica</b>	<b>16</b>
4.1 A ordem de grandeza associada à Pinça Óptica . . . . .	16
4.2 Forças responsáveis pelo pinçamento óptico . . . . .	17
4.3 Montagem experimental . . . . .	20
4.4 Calibração da Pinça Óptica . . . . .	21
4.5 Preparação da Amostra . . . . .	23
4.5.1 Preparação da solução . . . . .	23
4.5.2 Preparação do porta amostra . . . . .	24
4.6 Procedimento experimental . . . . .	24
<b>5 Conexão entre parâmetros distintos</b>	<b>27</b>

<b>6</b>	<b>Dicloridrato de Putrescina</b>	<b>30</b>
6.1	Estrutura e importância da Putrescina . . . . .	30
6.2	Preparação das alíquotas . . . . .	31
<b>7</b>	<b>Resultados</b>	<b>32</b>
7.1	Para $[Na] = 150 \text{ mM}$ . . . . .	32
7.2	Para $[Na] = 10 \text{ mM}$ . . . . .	34
7.3	Para $[Na] = 1 \text{ mM}$ . . . . .	35
<b>8</b>	<b>Discussões</b>	<b>37</b>
8.1	Variação dos parâmetros físico-químicos . . . . .	37
8.2	Modos de ligação . . . . .	38
<b>9</b>	<b>Conclusão</b>	<b>41</b>
<b>A</b>	<b>Mecânica de Polímeros</b>	<b>42</b>
A.1	Cadeias semi-flexíveis . . . . .	42
A.2	Modelo de Kratky – Porod . . . . .	43
A.3	Elasticidade entrópica . . . . .	44
A.4	Comprimento de persistência . . . . .	44
A.5	Cálculo da distância quadrática média entre pontos de um polímero, $\langle r_{ee}^2 \rangle$	46
A.6	Modelo WLC . . . . .	47
A.6.1	Estiramentos perto da configuração de equilíbrio ( limite flexível ) .	47
A.6.2	Estiramentos longe da conformação de equilíbrio ( limite rígido ) . .	48
A.6.3	Estiramentos arbitrários . . . . .	50
	<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>51</b>

# Lista de Figuras

2.1	Estrutura química das bases nitrogenadas. . . . .	4
2.2	Estrutura química de um polinucleotídeo . . . . .	4
2.3	Estrutura do DNA em um plano, e em formato de dupla hélice. . . . .	5
2.4	Localização das fendas do DNA. . . . .	5
2.5	Os tipos de DNA encontrados na natureza. . . . .	6
2.6	Representação do comprimento de persistência da molécula de DNA para configurações discretas. . . . .	8
2.7	Representação da ligação de fenda. . . . .	10
3.1	Representação da interação entre a hemoglobina e o oxigênio. . . . .	12
4.1	Reflexão do laser na microesfera. Pressão de radiação. . . . .	18
4.2	Refração do laser na microesfera. Microesfera entre a objetiva e a região focal. . . . .	19
4.3	Refração do laser na microesfera. Microesfera além da região focal. . . . .	19
4.4	Representação da montagem experimental. . . . .	20
4.5	Representação das forças sofridas pela microesfera pinçada para quando há, e para quando não há, fluxo do fluido. . . . .	22
4.6	Representação das possíveis configurações na solução contendo DNA e microesferas. . . . .	24
4.7	Representação do pinçamento e estiramento da molécula de DNA. . . . .	25
4.8	Curva de força por extensão da molécula de DNA em resposta ao estiramento. . . . .	26
6.1	Estrutura química da molécula de putrescina. . . . .	30
7.1	Gráfico da variação do comprimento de persistência em $\text{Na}^+ = 150 \text{ mM}$ . . . . .	32
7.2	Gráfico da variação do comprimento de contorno em $\text{Na}^+ = 150 \text{ mM}$ . . . . .	33
7.3	Gráfico da variação do comprimento de persistência em $\text{Na}^+ = 10 \text{ mM}$ . . . . .	34
7.4	Gráfico da variação do comprimento de contorno em $\text{Na}^+ = 10 \text{ mM}$ . . . . .	35
7.5	Gráfico da variação do comprimento de persistência em $\text{Na}^+ = 1 \text{ mM}$ . . . . .	35
7.6	Gráfico da variação do comprimento de contorno em $\text{Na}^+ = 1 \text{ mM}$ . . . . .	36

---

8.1	Gráfico da variação do log da constante de ligação, $K_i$ , pelo log da concentração de $[\text{Na}^+]$ . . . . .	37
8.2	Gráfico da variação do coeficiente de Hill, $n$ , pelo log da concentração de $[\text{Na}^+]$ . . . . .	38
A.1	Representação de uma vareta rígida sendo flexionada. . . . .	42
A.2	Representação de um polímero à uma distância do sistema de referências. .	43

# Resumo

CARVALHO PÚBLIO, Bruno, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2017. **Caracterização do complexo DNA-Putrescina via pinça óptica.** Orientador: Márcio Santos Rocha.

No presente trabalho foram estudadas as mudanças conformacionais da molécula de DNA devido a sua interação com variadas concentrações de Putrescina, e também para distintas forças iônicas ( $[\text{Na}^+]$ : 150 mM, 10 mM e 1 mM). Para análise do complexo DNA-Putrescina foi utilizado o método experimental de pinçamento óptico para obtermos, na primeira parte do trabalho, dois relevantes parâmetros mecânicos, o comprimento de contorno e o comprimento de persistência, para concentrações distintas de Putrescina. Na segunda parte do trabalho os dados obtidos dos parâmetros mecânicos foram utilizados para determinarmos os parâmetros físico-químicos relacionados ao complexo DNA-Putrescina; a conexão entre estes, aparentemente, distintos grupos de parâmetros é feita a partir de uma modelagem estatística que faz uso da isoterma de ligação de Hill. Da análise destes resultados, e também levando em conta os trabalhos de outros pesquisadores, sugerimos que o tamanho do complexo formado pela putrescina, em cada concentração de  $[\text{Na}^+]$ , é significante para o efeito mecânico causado na molécula de DNA.

# Abstract

CARVALHO PÚBLIO, Bruno, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2017. **Characterization of the DNA-Putrescine complex by optical tweezers.** Adviser: Márcio Santos Rocha.

The present work aims to study the coformation changes of the DNA molecule due to its interaction with various concentrations of putrescine, as well as to different ionic strengths ( $[\text{Na}^+]$ : 150 mM, 10 mM e 1 mM). In order to perform the analysis of the DNA-Putrescine complex, the optical tweezers experimental technique was used, in order to achieve two relevant mechanical parameters (i. e., the persistence and contour lengths) for different concentration of putrescine. In a second part of the work, the data obtained was used to determine the physicochemical parameters associated with the DNA-Putrescine complex; the connection between these apparently distinct groups of parameters is obtained from a statistical model which includes the Hill binding isotherm. From the analysis of these results, and also taking into account the work of other researchers, we suggest that the size of the complex formed by putrescine, in each concentration of  $[\text{Na}^+]$ , is significant for the mechanical effect caused in the DNA molecule.

# Capítulo 1

## Introdução

Em organismos vivos as poliaminas biogênicas são comuns ao meio intracelular, gerando portanto estudos para entender como as poliaminas podem contribuir com a dinâmica do meio intracelular. A putrescina é uma das poliaminas biogênicas presentes nos organismos vivos, mas uma das menos estudadas. Assim, ainda é bem controverso como esta molécula influencia o meio intracelular, e em especial a molécula de DNA. Portanto esperamos que a elucidação da interação DNA-Putrescina possa contribuir com estudos farmacêuticos, de modo a ajudar na saúde dos seres vivos.

Para tentar contribuir na elucidação deste fenômeno biológico, utilizamos um método que possui a capacidade de avaliar uma única molécula de DNA. Este método é a pinça óptica, e foi primeiro proposto por Arthur Ashkin, em 1969, nos laboratórios Bell. Com este método conseguimos estirar a molécula de DNA, obtendo então uma curva de força por extensão. Ao avaliar esta curva experimental utilizando o modelo de cadeias poliméricas semi-flexíveis, conseguimos obter os parâmetros mecânicos da molécula estirada. Estes parâmetros são o comprimento de contorno e de persistência. O comprimento de contorno não é nada além do comprimento ponta à ponta da molécula completamente estirada. Já o comprimento de persistência nos dá ideia da rigidez do DNA. Quanto maior o comprimento de persistência maior a rigidez. Além disso, há uma conexão entre estes parâmetros mecânicos, e os parâmetros físico-químicos do complexo DNA-putrescina. Essa conexão é importante, pois do conjunto de todos os parâmetros (mecânicos e físico-químicos), temos a possibilidade de tentar compreender o que ocorre na interação.

Neste trabalho, três concentrações distintas de sal foram usadas, 150 mM, 10 mM e 1 mM. Isto foi feito pois, além do interesse biológico (uma vez que, no meio intracelular a concentração de sal é variável), a variação de contra-íons nos fornece evidências da interação esperada para ser a mais influente entre o DNA e a putrescina, a interação eletrostática.

A dissertação possui uma breve explicação da molécula de DNA, seus possíveis modos de ligação com a putrescina e sobre o equilíbrio químico nas interações DNA-ligantes, no capítulo 2. Uma apresentação do modelo de Hill no capítulo 3. Sobre o método de pinça

---

óptica no capítulo 4. Como é feita a conexão entre os parâmetros mecânicos e físico-químicos, no capítulo 5. Comentários sobre a putrescina no capítulo 6. Os resultados obtidos do complexo DNA-putrescina, no capítulo 7. Discussões sobre os resultados no capítulo 8. E as conclusões sobre o trabalho no capítulo 9.

# Capítulo 2

## A molécula de DNA

### 2.1 Breve histórico

Em 1869 se inicia a história do DNA com um jovem físico suíço chamado Friedrich Miescher, pois este começou seus estudos no laboratório de bioquímica Hoppe-Seyler com o objetivo de elucidar os blocos construtores da vida. Considerando leucócitos como células relevantes para este estudo, ele analisou suas proteínas. Porém no interior destas células havia um componente, e ele provou isso, com propriedades e composição desconhecidas e distintas das propriedades e composição das proteínas. Friedrich Miescher as chamou de “nuclein”, o que mais tarde viria a se chamar ácido desoxirribonucleico [1].

Na década de 1940, os cientistas tinham problemas em aceitar o DNA como sendo o material genético, já que possuía aparente simplicidade química. Esta simplicidade química era do fato de que o DNA é um polímero longo composto de somente quatro tipos de subunidades distintas, mas se assemelhando quimicamente umas as outras. Pela análise da difração de raios X interagindo com o DNA, na década de 1950, os cientistas puderam perceber a estrutura de dupla fita enroladas em uma hélice. Mais tarde, em 1953, esses resultados se mostraram cruciais para criação de um modelo correto para a sua estrutura, o modelo de Watson-Crick. A partir deste modelo, o potencial para replicação e codificação da informação pode ser “visualizado” e entendido [2].

### 2.2 Estrutura química da molécula de DNA

A estrutura química da molécula de DNA é composta por três “tijolos” fundamentais, o grupo fosfato, o açúcar (ou desoxirribose) e a base nitrogenada, sendo este último podendo diferir entre adenina (A), citosina (C), guanina (G) ou timina (T), vistas na Figura (2.1), formando um nucleotídeo.

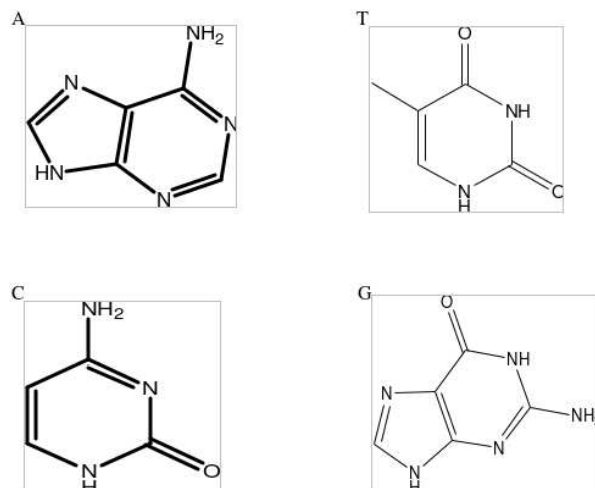


Figura 2.1: Estrutura química das bases nitrogenadas, adenina (A), citosina (C), guanina (G) e timina (T).

A desoxirribose possui um anel formado por cinco carbonos, dois deles ( 3' e 5' ) se ligam ao grupo fosfato e o terceiro ( carbono 1' ) com a base nitrogenada por ligação simples. Os grupos fosfato se ligam a duas desoxirriboses por uma ligação fosfodiéster, utilizando para a ligação o carbono 3', e para a desoxirribose posterior o carbono 5', assim subsequentes ligações formam uma cadeia de polinucleotídeos [2, 3]; como visto na Figura (2.2).

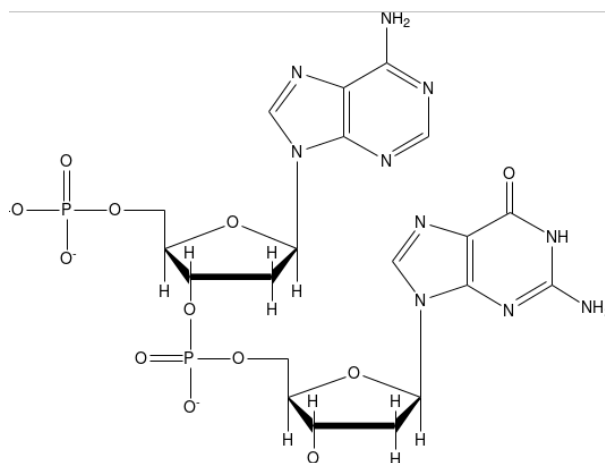


Figura 2.2: Estrutura química de um polinucleotídeo

É importante notar que se uma cadeia de polinucleotídeos “começar” com uma ligação do carbono 3', então esta cadeia irá possuir no fim de sua sequência uma ligação do carbono 5' no que diz respeito a junção entre o grupo fosfato e a desoxirribose.

Duas destas cadeias se unem para formar a estrutura de dupla hélice do DNA. Porém esta união não se dá de qualquer modo; se uma das cadeias de polinucleotídeos se orienta de 3' → 5', então a outra cadeia deve se orientar de 5' → 3'. Para que as bases nitrogenadas se liguem, e elas o fazem por ligação de hidrogênio, deve haver uma relação de bases

nitrogenadas entre as duas cadeias de 1:1. As bases nitrogenadas não pareiam ao acaso, devemos sempre encontrar adenina pareando com timina por duas ligações de hidrogênio, e guanina pareando com citosina por três ligações de hidrogênio. Porém podendo existir diferentes razões entre A-T e G-C para distintos DNAs [3], como visto na Figura (2.3).

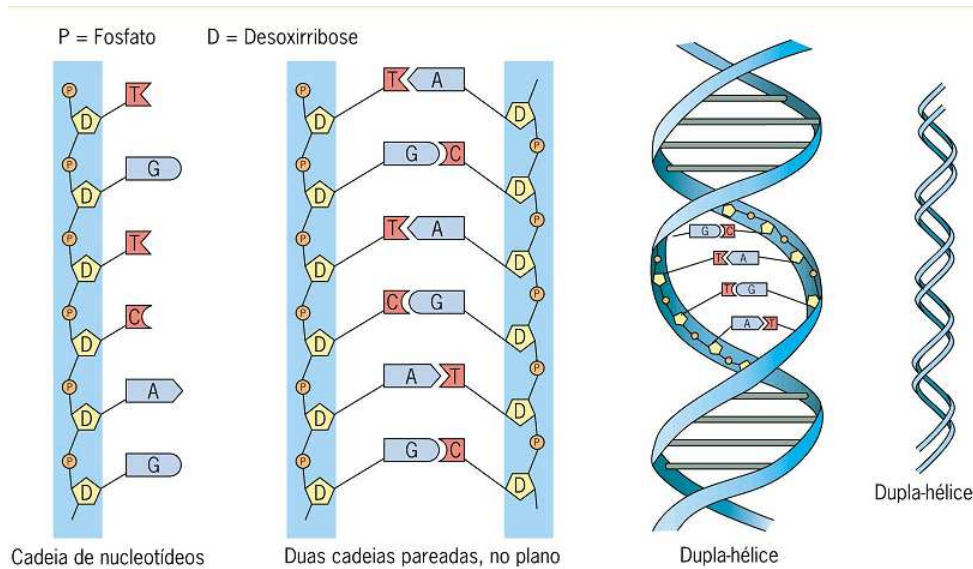


Figura 2.3: Estrutura do DNA em um plano, e em formato de dupla hélice. Extraída do site [http://escolamirella.blogspot.com.br/p/biologia\\_27.html](http://escolamirella.blogspot.com.br/p/biologia_27.html)

O tamanho de um par de base A-T é igual ao tamanho de um par de base G-C (11 Å), gerando estabilidade à dupla hélice. A dupla hélice exibe em sua conformação o que denominamos de fenda maior e fenda menor, como visto na Figura (2.4). Essas regiões podem ser ocupadas por compostos químicos sem que modificações na estrutura do DNA sejam causadas.

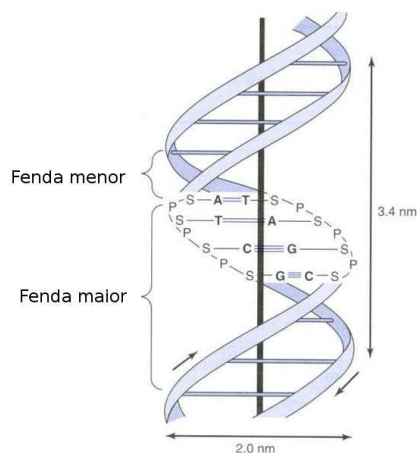


Figura 2.4: Localização das fendas do DNA. Extraída do site <https://pt.slideshare.net/cristianemedeiros921/ga-aula-2oscromossomos>

## 2.3 Tipos de DNA

Existem na natureza, até onde se sabe, três tipos conformacionais para o DNA em meio fisiológico. São eles do tipo A, B ou Z, como podemos ver na Figura (2.5), sendo o tipo B o mais comum na natureza. A estrutura de dupla hélice é encontrada em cada um dos tipos de DNA, assim a distinção entre os tipos está na espessura na dupla hélice, no número de pares de base por volta e a disposição das bases nitrogenadas em relação ao meio externo. Estas alterações podem facilitar ou dificultar a interação com alguns compostos [4].

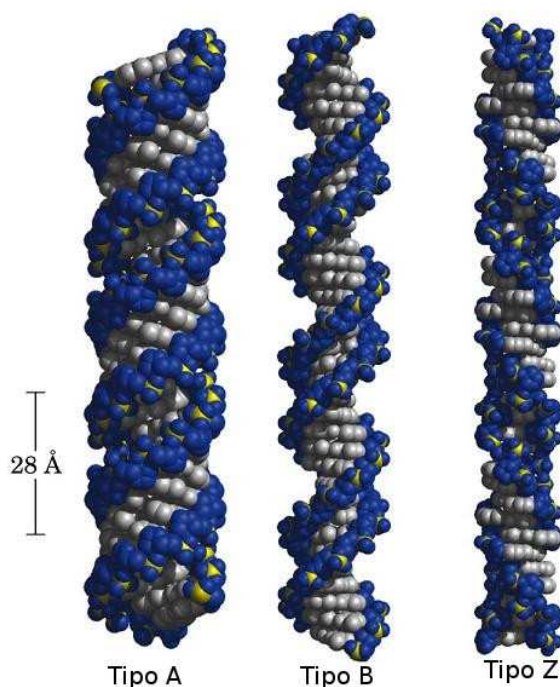


Figura 2.5: Os tipos de DNA encontrados na natureza. Extraída do site <http://www.bifi.es/~jsancho/estructuramacromoleculas2015/12DNA/12DNA.htm>

O tipo B apresenta a dupla hélice girada para a direita, com rotação entre dois pares de bases consecutivos possuindo um ângulo de  $34,6^\circ$  e diâmetro aproximado de  $2,37\text{nm}$ . Desta informação podemos notar que uma volta completa é realizada a cada 10,4 pares de base (pb) aproximadamente. Uma volta completa na dupla hélice possui  $3,40\text{nm}$ , onde a distância média entre cada pb é  $0,33\text{nm}$ .

O tipo A apresenta a dupla hélice girada para a direita, porém é mais curta e espessa, de modo que a fenda maior se tornará mais estreita e mais profunda, e a fenda menor menos estreita e menos profunda. O tamanho de uma volta completa é de  $2,60\text{nm}$  por volta, com diâmetro de aproximadamente  $2,55\text{nm}$ . O número de pares de bases por volta aumenta para 11 pb, com distância média entre os pb de  $0,25\text{nm}$ .

O tipo Z apresenta a dupla hélice girada para a esquerda, sendo mais longo e fino

que o tipo B. Uma volta completa da hélice, com tamanho de aproximadamente 4,56 nm, possui 12 pb com distância média entre eles de 0,456 nm, e diâmetro de aproximadamente 1,84 nm. Esta configuração leva ao desaparecimento da fenda maior, aumentando a profundidade da fenda menor.

## 2.4 O $\lambda$ -DNA

Para os experimentos realizados, o DNA utilizado é extraído do vírus fago  $\lambda$ , obtido da empresa Sigma-Aldrich. Este vírus é capaz de infectar a bactéria *E. coli*. Foi escolhido por ser um DNA relativamente longo (possuindo aproximadamente 48.500 pb, e comprimento médio de 16,5  $\mu\text{m}$ ), pois para estiramento é assim mais conveniente [5, 6].

## 2.5 Propriedades mecânicas: DNA como polímero

O DNA é um polímero, ou seja, é formado por uma cadeia de componentes menores, os chamados monômeros. Para o DNA os quatro monômeros básicos são os nucleotídeos. A cadeia formada pelos nucleotídeos resulta em um polímero semi-flexível, portanto para que uma parte do DNA seja flexionada, um gasto de energia do meio externo (causador da flexão) precisa ser fornecida.

Em meio aquoso o DNA sofrerá colisões devido ao movimento das partículas do meio em que se encontra, mudando a sua conformação. Esta dinâmica é estabilizada no equilíbrio termodinâmico. Portanto quanto maior a temperatura, maior o número e a intensidade das colisões, aumentando a probabilidade de encontrarmos o DNA mais dobrado, representando aumento no número de configurações possíveis para a mesma energia conformacional, aumentando conseqüentemente sua entropia,

$$S = K_B \ln \Omega \quad (2.1)$$

com  $\Omega$  sendo o número de configurações possíveis, e  $K_B$  a constante de Boltzmann.

Para entendermos as mudanças conformacionais do DNA precisamos definir duas de suas propriedades mecânicas: o comprimento de contorno e o comprimento de persistência. O comprimento de contorno ( $L$ ) é o comprimento ponta a ponta do polímero estirado (sem danos), ou seja, o seu tamanho linear. Já o comprimento de persistência, ( $A$ ), é o comprimento médio de uma dobra a outra no polímero, ou seja, a distância média de pontos no polímero que são direcionalmente correlacionados. Intuitivamente está associado a rigidez do polímero, de modo que quanto maior sua persistência maior sua rigidez e vice-versa. A Figura (2.6) ilustra o comprimento de persistência da molécula de DNA para configurações discretas.

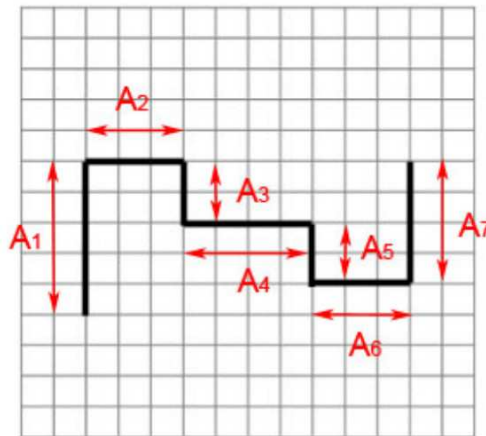


Figura 2.6: Representação do comprimento de persistência da molécula de DNA para configurações discretas. Extraída da referência [5]

Em física de polímeros o modelo WLC (Worm-Like Chain), desenvolvido por Marko e Siggia para estiramentos arbitrários de polímeros [7], é bastante utilizado para obtermos os parâmetros mecânicos discutidos, e foi por nós utilizado. Este modelo é válido no regime entrópico, ou seja, regime este que garante apenas mudanças conformacionais do polímero (variação da sua entropia), e não mudanças estruturais. Nesta seção apresentaremos apenas a equação que descreve o estiramento, deixando o desenvolvimento de suas ideias matemáticas e conceituais para o apêndice A.

No ano de 1995 Marko e Siggia [7] propuseram o modelo analiticamente, expressando uma igualdade entre a força para estiramento, ( $F$ ) e a extensão do polímero ( $L$ ),

$$F = \frac{K_B T}{A} \left[ \frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right] \quad (2.2)$$

sendo  $K_B$  a constante de Boltzmann,  $T$  a temperatura ambiente,  $z$  a extensão do estiramento e ( $A$ ) o comprimento de persistência da molécula de DNA. Vale a pena deixar claro que a força, ( $F$ ), será obtida via experimento, já que para isso precisaremos apenas calibrar nosso aparato experimental (pinça óptica), e obter o deslocamento da microesfera em que o DNA analisado estará preso durante o experimento de estiramento. Assim, igualamos à parte direita da expressão do modelo WLC para obtermos os parâmetros mecânicos. É importante não confundir o deslocamento da microesfera no estiramento,

e o comprimento  $z$ , que está diretamente relacionado ao tamanho da molécula de DNA sendo estirada, que também é obtido experimentalmente.

Para o regime entrópico, a força deve ser no máximo de ( $\sim 5\text{pN}$ ), e o estiramento não deve atingir  $z = L$  (note que a expressão diverge), já que isso representaria mudanças estruturais. Devemos ressaltar que apesar de ser uma expressão válida, é uma expressão aproximada.

## 2.6 Interação DNA-ligante

Ligante é toda a substância química capaz de interagir com a molécula de DNA, alguns exemplos são as enzimas, as proteínas, fármacos, etc. A especificidade da interação depende de alguns fatores como a estrutura química do ligante, e das condições fisiológicas do meio em que se encontram o complexo DNA-ligante. Discutiremos dois dos modos de interações possíveis, pois são estes os encontrados entre o DNA e o composto estudado: interação eletrostática e interação por ligação de fenda.

### 2.6.1 Interação eletrostática

Grupos fosfato ( $\text{PO}_4^-$ ) dão à molécula de DNA densidade de carga negativa, com duas cargas elementares a cada 0,33 nm, já que essa é a distância entre pares de bases em um DNA tipo B. Esta densidade de carga negativa ao longo da molécula faz com que suas partes, ao interagirem eletrostaticamente, sofram repulsão. Portanto, uma vez que a molécula de DNA possui densidade de carga negativa, interações eletrostáticas entre ligantes carregados positivamente são esperadas. Com a interação entre a molécula de DNA e ligantes positivos, a densidade de carga negativa efetiva do DNA irá diminuir. A aproximação dos ligantes positivos blinda parcialmente as cargas negativas entre as partes do DNA. Portanto, com a diminuição da repulsão, as partes da molécula de DNA irão se aproximar [7].

### 2.6.2 Ligação de fenda

Alguns ligantes que interagem com o DNA por interação eletrostática demonstram preferência em se ligar as fendas maior e menor da molécula de DNA. Mas interação eletrostática não é o único mecanismo de interação de um ligante com as fendas, podendo também interagir por forças de van der Waals ou ligações de hidrogênio [7].

Ligantes que possuem densidade de carga, e que interagem com as fendas, são capazes de produzir curvatura, ou dobras, na molécula de modo a diminuir seu comprimento de persistência. Este efeito não pode ser atribuído simplesmente a blindagem eletrostática em outras regiões do DNA, pois concentrações elevadas de sal monovalentes não são capazes de fazê-lo, exibindo uma especificação, referente a região, entre o ligante e a molécula de

DNA. Essa dobra pode chegar a 30° ou mais, sendo distribuída ao longo de 6pb dentro da fenda maior [8]. A Figura (3.1) ilustra a ligação de fenda.

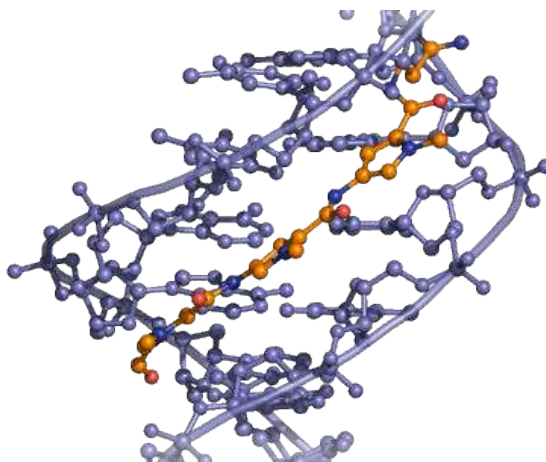


Figura 2.7: Representação da ligação de fenda. Onde a parte laranjada representa o ligante. Extraída do site <http://www.atdbio.com/content/16/Nucleic-acid-drug-interactions>

## 2.7 Equilíbrio químico nas interações DNA-ligantes

O equilíbrio químico de um sistema se dá quando o número médio de moléculas, ou partículas, em cada partição do sistema é constante. Em nosso estudo o sistema possui duas partições, sendo uma delas o DNA, e a solução aquosa contendo o ligante estudado como sendo a segunda partição. Estudar o equilíbrio químico para este sistema nos permite obter seus parâmetros físico-químicos, nos ajudando a elucidar os aspectos da interação.

Para o nosso estudo vamos considerar duas moléculas, A e B, elas podem se associar em solução para produzir um complexo C. Esta dinâmica pode ser expressada como,



onde  $K_i$  é a constante química intrínseca de associação, que representa a reação de associação entre as moléculas A e B para formar a molécula C; enquanto  $K_d$  é a constante química intrínseca de dissociação, que representa a dissociação da molécula C em moléculas A e B.

As constantes  $K_i$  e  $K_d$  são definidas a partir das concentrações molares das substâncias envolvidas na reação química,

$$K_i = \frac{[C]}{[A][B]} \quad (2.4)$$

e,

$$K_d = \frac{[A][B]}{[C]} = K_i^{-1} \quad (2.5)$$

No intuito de formalizar nosso estudo vamos definir  $[A] \equiv C_f$  como sendo a concentração de ligantes livres em solução, enquanto que  $[C] \equiv C_b$  como a concentração de ligantes ligados à molécula de DNA, e  $[B] \equiv C_{pb} - C_b$ , sendo a concentração de sítios livres ligáveis ao DNA, onde  $C_{pb}$  é a concentração constante de pares de bases.

A partir desses parâmetros podemos definir também a fração de sítios ligados  $r$ , como sendo

$$r = \frac{C_b}{C_{pb}} \quad (2.6)$$

## Capítulo 3

# Modelo de Hill e cooperatividade

Em 1910, A. V. Hill era um estudioso interessado em entender sistemas físicos que exibiam dinâmica do número de partículas entre partes distintas do sistema longe do equilíbrio químico, e com o decorrer do tempo atingiam o equilíbrio químico, ou seja, na média o número de partículas entre as distintas partes do sistema era constante no tempo. Em determinados sistemas temos de avaliar se há cooperação para se ligar ao substrato entre as partículas do meio, pois cooperação está intimamente relacionada ao entendimento da evolução do sistema estudado.

A.V. Hill estudou a interação entre o oxigênio e as moléculas de hemoglobina no interior das hemácias. Ao confrontar o problema de forma empírica, ele notou que modelos feitos até então não descreviam o problema com precisão, mas percebeu que se utilizasse do conceito de cooperatividade em seu modelo, negligenciado pelos outros modelos, poderia resolver o problema. Podemos ver na Figura (3.1) a ilustração deste fenômeno.

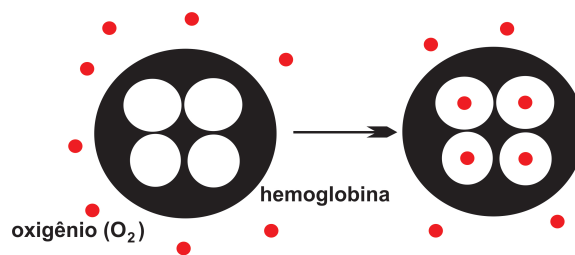


Figura 3.1: Representação da interação entre a hemoglobina e o oxigênio. Onde os pontos vermelhos são os oxigênios, e o substrato preto representa a hemoglobina com quatro sítios.

A reação química global entre a hemoglobina,  $H_b$ , e o oxigênio,  $O_2$ , é descrita pela expressão,



onde  $H_b$  descreve a molécula de hemoglobina e  $H_b(O_2)_n$  descreve o composto final (hemoglobina + n moléculas de oxigênio ligadas), sendo n o coeficiente de Hill, que é o número

de sítios que a molécula de hemoglobina fornece para a molécula de oxigênio se ligar a ela, quatro para este caso. Note que o conceito de cooperatividade neste modelo foi usado em uma de suas duas condições de extremo, a cooperatividade em sua totalidade. Isso pode ser visto na equação acima, já que a molécula de hemoglobina está, ou com nenhuma molécula de oxigênio ligada a ela, ou com todos os seus quatro “sítios” preenchidos devido a interação entre as moléculas.

Destas reações químicas é bastante comum definir a constante química aparente de associação  $K_A$  como,

$$K_A = \frac{[H_b(O_2)_n]}{[H_b][O_2]^n} \quad (3.2)$$

A constante química aparente de associação diz respeito à hemoglobina como um todo, com os seus quatro sítios sendo ocupados de uma só vez; já a anteriormente discutida, constante química intrínseca, diz respeito a um único sítio da hemoglobina. É fácil notar que se o componente do sistema tem apenas um sítio, as constantes, aparente e intrínseca, se igualam.

Para melhor entendimento vamos considerar o caso em que não há cooperatividade, ou seja, uma partícula por vez se liga à hemoglobina. Na primeira ligação vemos que a reação química pode ser descrita pela expressão,



com constante intrínseca  $K_i$ ,

$$K_i = \frac{[H_b(O_2)]}{[H_b][O_2]} \quad (3.4)$$

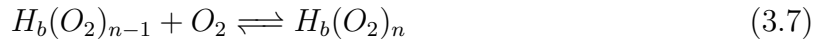
A segunda reação,



com constante intrínseca  $K_2$ ,

$$K_2 = \frac{[H_b(O_2)_2]}{[H_bO_2][O_2]} \quad (3.6)$$

A n-ésima reação,



com constante intrínseca  $K_n$ ,

$$K_n = \frac{[H_b(O_2)_n]}{[H_b(O_2)_{n-1}][O_2]} \quad (3.8)$$

Sabendo disso, podemos notar que,

$$K_A = \frac{[H_b(O_2)_n]}{[H_b][O_2]^n} = \frac{[H_bO_2]}{[H_b][O_2]} \frac{[H_b(O_2)_2]}{[H_bO_2][O_2]} \cdots \frac{[H_b(O_2)_n]}{[H_b(O_2)_{n-1}][O_2]} = K_1 K_2 \cdots K_n \quad (3.9)$$

Isso indica que a constante química aparente pode ser vista como a multiplicação das constantes químicas intrínsecas de cada etapa. Para o caso em que as constantes químicas intrínsecas são todas iguais, teremos

$$K_A = K_i^n \quad (3.10)$$

No intuito de elucidar estes parâmetros para o estudo da interação entre a molécula de DNA e possíveis ligantes, podemos estabelecer que  $[H_b (O_2)_n] = C_b$ ,  $[O_2] = C_f$  e  $[H_b] = C_{pb} - C_b$ , considerando por simplicidade que um ligante ocupa apenas um par de base, sendo  $C_b$  a concentração de ligante ligado à molécula de DNA,  $C_f$  a concentração de ligante livre em solução e  $C_{pb}$  a concentração de pares de base na molécula de DNA, que é uma constante [5]. Portanto podemos escrever que,

$$K_A = \frac{C_b}{(C_{pb} - C_b)C_f^n} \quad (3.11)$$

A fração de sítios ligados  $r$  na molécula de DNA pode ser escrito como,

$$r = \frac{K_A C_f^n}{1 + K_A C_f^n} \quad (3.12)$$

de forma que podemos escrever,

$$r = \frac{(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n} \quad (3.13)$$

tomando todas as constantes intrínsecas iguais.

A Equação (3.13) é conhecida como equação de Hill ou isoterma de ligação de Hill. Uma isoterma de ligação é uma equação que só pode descrever sistemas à temperatura constante, já que seus parâmetros dependem da temperatura.

Para generalizarmos a isoterma de ligação de Hill à ligantes que ocupam mais de um par de base devemos acrescentar o parâmetro  $r_{max}$ , que deve possuir valor menor ou igual a 1, ou seja, para  $r_{max} = 1$  temos a situação do ligante ocupando apenas um par de base, e voltaremos à expressão anterior. Teremos assim,

$$r = \frac{r_{max}(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n} \quad (3.14)$$

Para valores fixos de  $K_i$  e  $r_{max}$ , e valores variados de  $n$ , podemos notar que a saturação de ligantes ligados à molécula de DNA é alcançada mais rapidamente para maiores valores de  $n$ , ou seja, com menor quantidade de concentração de ligantes livres obtemos a saturação da molécula de DNA para maiores valores de  $n$ , ou coeficiente de Hill. Isto sugere que o coeficiente de Hill pode ter uma interpretação interessante, além do número

de sítios possíveis para ligação do ligante. Esta interpretação pode ser dada observando que quanto maior o coeficiente de Hill maior a afinidade química dos ligantes ao DNA, já que isso indica o fato da saturação ocorrer para menores valores de  $C_f$ , ou seja, podemos interpretá-lo como o parâmetro que contabiliza o conceito de cooperatividade. Teremos três situações,

- 1) Para  $n > 1$ ,  $K_A$  aumenta com  $n$ , ou seja, a cada ligante ligado teremos maior probabilidade de que outras moléculas de ligante se liguem à molécula de DNA.
- 2) Para  $n < 1$ ,  $K_A$  diminui com  $n$ , ou seja, a cada ligante ligado teremos menor probabilidade de que outras moléculas de ligante se liguem à molécula de DNA.
- 3) Para  $n = 1$ ,  $K_A$  é igual ao produto das constantes intrínsecas de cada etapa da interação de modo independente, ou seja, a ligação de um ligante ao DNA nada interfere na probabilidade do próximo ligante se ligar ao DNA.

Precisamos neste ponto notificar que, Hill ao usar este modelo para a hemoglobina encontrou o valor de 2,5 para  $n$ . A princípio isso traz dúvidas a aceitação do modelo, pois sabemos previamente que Hill deveria ter encontrado  $n = 4$ , pois este é o número de sítios possíveis para a ligação que a hemoglobina possui. Como dito, Hill usou o conceito de cooperatividade em sua totalidade, e deveríamos esperar que isso estivesse incorreto. Portanto, para contornar este problema, o valor de  $n$  encontrado pelo modelo é usualmente interpretado como um limite inferior ao número de sítios que cooperam de modo efetivo [5].

# Capítulo 4

## Pinça Óptica

Neste capítulo iremos discutir sobre a física envolvida, a montagem experimental, calibração e procedimento experimental da pinça óptica. Esta técnica possui a importante característica de podermos analisar uma única molécula, e com isso descartar incertezas envolvidas em médias sobre um ensemble de moléculas.

### 4.1 A ordem de grandeza associada à Pinça Óptica

Da teoria eletromagnética sabemos que a luz pode exercer força sobre objetos. Com uso deste fato Arthur Ashkin e colaboradores construíram o que hoje conhecemos como pinça óptica, e conseguiram com ela manipular objetos dielétricos de tamanho da ordem de micrômetros [9].

Para que possamos estimar a ordem de grandeza das forças envolvidas com o pinçamento óptico devemos lembrar que o fóton possui momento linear,  $\vec{p}$ , dado por,

$$\vec{p} = \hbar \vec{k} \quad (4.1)$$

onde  $\hbar$  é a constante de Planck,  $h$ , dividido por  $2\pi$ , e  $\vec{k}$  é o vetor de onda do fóton com módulo de,  $k = \omega/c$ , onde  $\omega$  é a frequência angular, e  $c$  velocidade da luz.

Sabemos que o fóton possui energia dada por,

$$E = \hbar \omega \quad (4.2)$$

de modo que o módulo do momento linear,  $p$ , pode se reescrito como,

$$p = \frac{E}{c} \quad (4.3)$$

Como o feixe de luz possui  $N$  fótons, podemos ver facilmente que a energia de um feixe

de luz com  $n$  fótons é,

$$E_{\text{tot}} = N\hbar\omega = NE \quad (4.4)$$

Da segunda Lei de Newton sabemos que a força é igual a variação temporal do vetor momento linear, portanto usando a segunda Lei de Newton e a Equação (4.4) podemos obter o módulo da força associada ao feixe de luz com  $n$  fótons como,

$$F_{\text{tot}} = \frac{dp}{dt} = \frac{d}{dt} \left( \frac{E_{\text{tot}}}{c} \right) = \frac{P_{\text{tot}}}{c} \quad (4.5)$$

onde  $P_{\text{tot}}$  é a potência total do feixe incidente sobre o objeto.

Como o laser, ou feixe de luz, utilizado para os experimentos de pinça óptica possui potência na ordem de  $\text{mW}$ , as forças associadas ao pinçamento óptico possuem módulo da ordem de grandeza de pico-Newtons, já que,

$$F_{\text{tot}} \approx \frac{1 \times 10^{-3} \text{ W}}{3 \times 10^8 \text{ m/s}} \approx 10^{-11} \text{ N} = 10 \text{ pN} \quad (4.6)$$

## 4.2 Forças responsáveis pelo pinçamento óptico

Para entendermos de modo qualitativo como funciona o pinçamento óptico, vamos analisar o que ocorre a uma microesfera dielétrica localizada nas proximidades da região focal de um laser que passa por uma lente objetiva. Note que para esta situação temos uma região focal e não um ponto focal, isso se deve ao fato do laser sofrer refração ao passar pela objetiva, uma vez que os índices de refração da objetiva e do ar são distintos. Note também o uso de um objeto dielétrico, que se justifica pois para um objeto metálico teríamos absorção da energia do laser, perdendo então eficiência no pinçamento.

O pinçamento óptico se deve ao fato da competição entre duas forças, a força devido a pressão de radiação do laser incidente sobre a microesfera, e a força de gradiente devido ao laser refratado pela microesfera. A pressão de radiação ocorre quando o laser é refletido ou absorvido pela microesfera em que ela incide. Assim, pela conservação do momento linear do sistema laser-microesfera surge na microesfera uma força resultante. A força de gradiente ocorre quando o laser é refratado ao entrar e sair da microesfera, pois com a mudança na direção de propagação há variação do momento linear, mas novamente pelo princípio da conservação do momento linear surge uma força resultante sobre a microesfera com sentido à região focal. Da competição destas duas forças conseguimos pinçar a microesfera.

Com intuito de elucidar o pinçamento óptico vamos analisar as Figuras (4.1-4.3), notando que o perfil de intensidade do laser é gaussiano no intuito de otimizar o pinçamento, e que o comprimento de onda do laser é bem menor que o raio da microesfera, ou seja, estamos no regime da óptica geométrica.

Na Figura (4.1), vamos analisar a trajetória dos raios (1) e (2) que passam pelas extremidades da objetiva. Os raios incidem sobre a superfície da microesfera e são refletidos. Das reflexões ambos os raios exercem força sobre a microesfera, o raio (1) exerce uma força  $\vec{F}_1$  e o raio (2) exerce uma força  $\vec{F}_2$ ; a resultante destas forças possui direção e sentido tais que a microesfera se afasta da região focal.

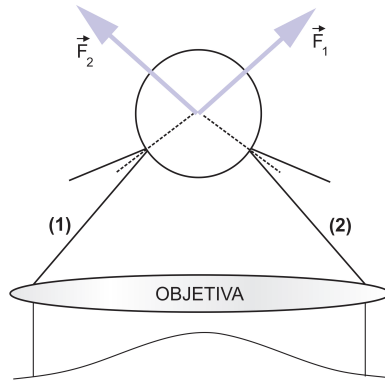


Figura 4.1: Reflexão do laser na microesfera. Pressão de radiação. Onde  $\vec{F}_1$  é a força associada a reflexão do raio (1), e  $\vec{F}_2$  é a força associada a reflexão do raio (2).

Para análise da força de gradiente é interessante avaliarmos duas situações; quando a microesfera se encontra acima e abaixo da região focal. Na Figura (4.2) podemos ver a microesfera abaixo da região focal, com dois raios do laser, (1) e (2), incidindo sobre a microesfera e sofrendo refração. Os raios (1) e (2) (o raio (1) para esta situação é analisado como saindo da região central da objetiva) incidem sobre a microesfera, percorrem uma certa distância no interior da microesfera, e emergem novamente ao meio externo, sofrendo modificações em suas trajetórias. Portanto como os raios incidentes (1) e (2) variam suas trajetórias, há uma modificação do momento linear do sistema se olharmos somente para os raios do laser, mas, como já dito, há conservação de momento linear neste sistema. Assim na microesfera irá surgir momento linear de mesmo módulo e sentido contrário originando as forças  $\vec{F}_1$ , do raio (1), e  $\vec{F}_2$ , do raio (2). E como podemos notar a força resultante está no sentido de empurrar a microesfera para a região focal de modo claramente eficiente, já que a intensidade da força do raio (1) é superior a do raio (2) devido ao perfil gaussiano. Vale a pena ressaltar ainda que, as modificações nas trajetórias podem ser quantitativamente analisadas pela lei de Snell, tomando o fato de que o índice de refração da microesfera é maior do que o índice de refração do meio externo, caso contrário não ocorreria pinçamento.

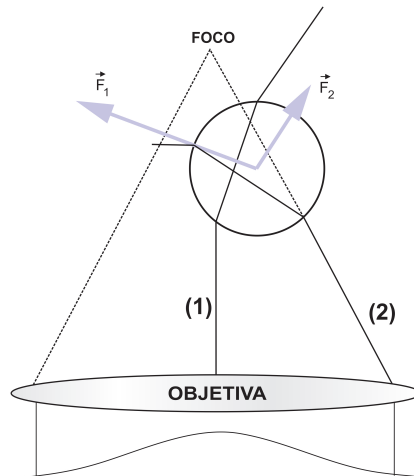


Figura 4.2: Refração do laser na microesfera. Microesfera entre a objetiva e a região focal. Onde  $\vec{F}_1$  é a força associada a refração do raio (1), e  $\vec{F}_2$  é a força associada a refração do raio (2).

Na Figura (4.3) podemos ver a microesfera acima da região focal, com dois raios do laser, (1) e (2), incidindo sobre a microesfera e sofrendo refração. Novamente os raios considerados estão sendo avaliados nos extremos da objetiva, e estão sofrendo refração. O motivo do surgimento das forças  $\vec{F}_1$ , do raio (1), e  $\vec{F}_2$ , do raio (2), são as mesmas, porém agora a força resultante não se encontra na mesma direção e sentido da análise anterior. Mas novamente a resultante das forças aponta para a região focal.

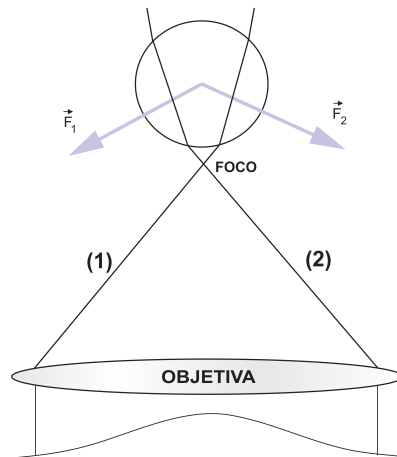


Figura 4.3: Refração do laser na microesfera. Microesfera além da região focal. Onde  $\vec{F}_1$  é a força associada a refração do raio (1), e  $\vec{F}_2$  é a força associada a refração do raio (2).

O comprimento de onda usado é menor do que o raio da microesfera, o que garante o regime da óptica geométrica, mas além disso esse comprimento de onda está na faixa do infravermelho, que é importante em nossos experimentos pois o DNA estava em meio aquoso e tínhamos interesse de que houvesse baixa absorção.

No regime em que a microesfera tem raio menor do que o comprimento de onda do laser, a teoria de Rayleigh prediz que a microesfera irá se comportar como um dipolo elétrico em um campo elétrico, com a força sendo proporcional ao gradiente da intensidade do campo elétrico do laser incidente, mas ainda assim será pinçada, pois será empurrada para a região de campo elétrico mais intenso, sendo esta região a região focal [5, 7]. Há também uma teoria mais geral sobre pinças ópticas, a teoria MDSA (Mie Debye Spherical Aberration), que consegue prever a força do laser sobre uma microesfera com quaisquer raio e índice de refração [10, 11].

### 4.3 Montagem experimental

Na Figura (4.4) podemos ver, de modo representativo, a montagem experimental usada para fazermos nossos experimentos.

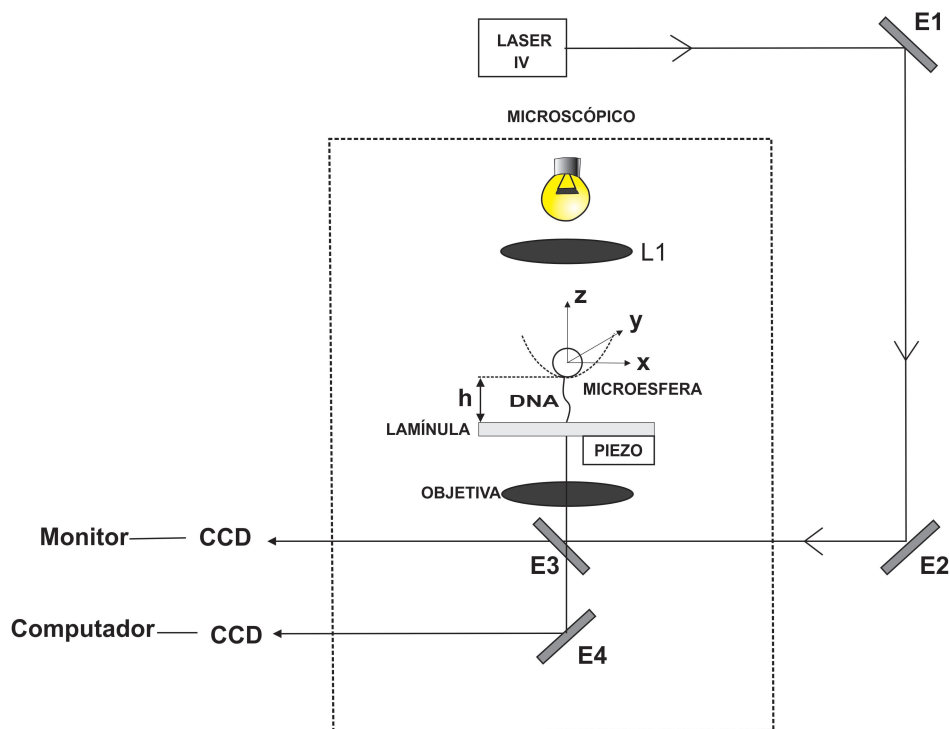


Figura 4.4: Representação da montagem experimental. Onde  $E_1, E_2, E_3$  e  $E_4$  são espelhos, e  $L_1$  é uma lente.

Podemos ver na parte superior, o laser. Nós usamos um laser infravermelho, modelo IPG Photonics YLR- 5-1064-LP, possuindo comprimento de onda de 1064 nm, potência máxima de 6,0 W, com perfil gaussiano e operando no modo  $TEM_{00}$ .

Ao sair da fonte, o laser percorre um caminho óptico de modo a ser refletido pelos espelhos  $E_1$  e  $E_2$ , podendo então ser alinhado para entrar no microscópio. Foi usado um microscópio invertido, Nikon Ti-S. Como podemos ver na figura, ao entrar no microscópio

o laser passa pelo espelho dicróico  $E_3$ , que possui alta transmitância para a luz visível e alta reflectância para o infravermelho. O laser é refletido, já que está no infravermelho, e passa por uma lente objetiva, com abertura numérica de 1,4, para ser focalizado. Entre a região focal e a objetiva está a lamínula, de modo que a região focal se encontra no interior do porta amostra, ou seja, a uma altura  $h$  na solução aquosa contendo as microesferas. A lamínula pode ser manipulada, com precisão nanométrica, pois está sobre o estágio piezoelétrico que é controlado pelo computador. A informação visual do pinçamento da microesfera é obtido quando a luz (gerada pela lâmpada), após passar pela lente  $L_1$ , passa pelo porta amostra em direção ao espelho dicróico  $E_3$ , sendo transmitida e refletida. Da transmissão, a luz no visível reflete no espelho  $E_4$  para uma câmera CCD, modelo Jai BM-500GE, que envia a imagem para o computador, permitindo a coleta de dados. Da reflexão, a luz no visível vai para uma outra câmera CCD, modelo Jai CV-A50IR, que envia a imagem para o monitor de visualização do experimento.

## 4.4 Calibração da Pinça Óptica

Para podermos fazer uso da pinça óptica, sabendo com precisão a força envolvida ao pinçamento, é preciso calibrá-la. Uma vez pinçada a microesfera está sujeita, em uma boa aproximação, à um poço de potencial harmônico. A constante de força,  $\kappa$ , está associada ao “formato” desse potencial, onde o seu aumento representa um potencial harmônico mais “acentuado”.

Quando não há fluxo do fluido, a microesfera se encontra no fundo do poço de potencial harmônico realizando movimento browniano, já que as partículas do meio se chocam contra a microesfera, mas ainda assim, por considerações da física estatística, podemos dizer que na média sua velocidade é nula.

O método envolvido na calibração é o método de Stokes. Este método consiste em gerar um fluxo contínuo do fluido, já que a microesfera pinçada está imersa em solução aquosa, causando uma força de atrito sobre a microesfera. Para conseguirmos aplicar esse método e determinar a constante de força devemos mover o porta amostra, a uma velocidade constante  $v$ , contendo uma solução aquosa com uma microesfera pinçada. Isso é possível uma vez que a lamínula contendo o porta amostra está sujeita a movimentos controlados pelo piezoelétrico.

Assim, a nova posição de equilíbrio será distinta da sua posição inicial, quando a microesfera estava somente pinçada com o fluido macroscopicamente estático. Podemos ver a ilustração deste fenômeno na Figura (4.5).

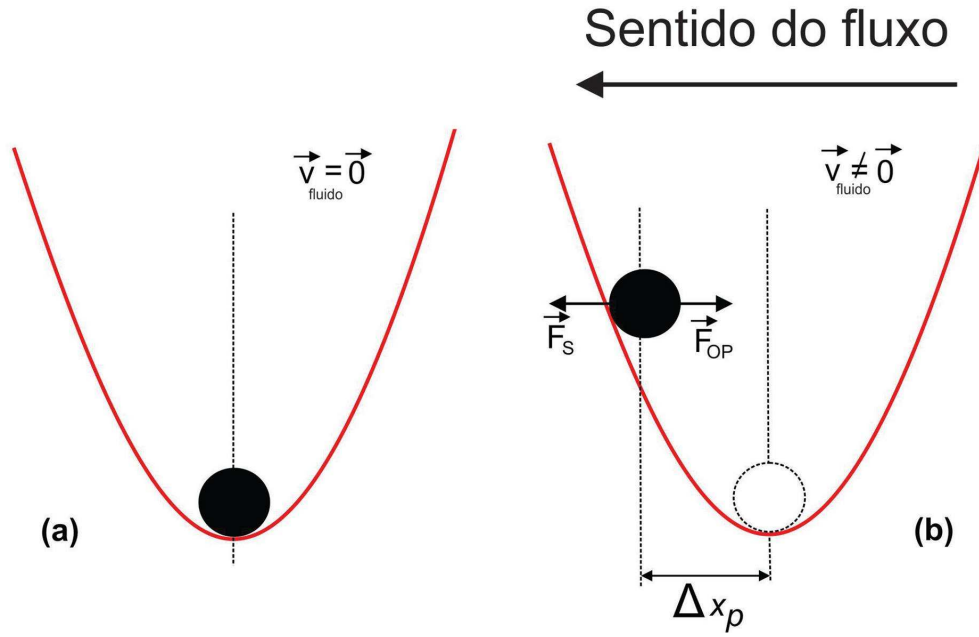


Figura 4.5: Representação das forças sofridas pela microesfera pinçada para quando há, e para quando não há, fluxo do fluido. Onde  $\vec{F}_{\text{stokes}}$  e  $\vec{F}_{\text{OP}}$  são a força de Stokes e a força óptica associada ao pinçamento, respectivamente.

A força de Stokes, gerada pelo fluxo do fluido, sobre a microesfera é dada por,

$$\vec{F}_{\text{stokes}} = \delta \vec{v} \quad (4.7)$$

sendo  $v$  a velocidade do fluido induzida pelo piezoelétrico e  $\delta$  o coeficiente de atrito viscoso.

Para esta situação, o coeficiente de atrito viscoso sobre a microesfera é dado pela expressão aproximada [12],

$$\delta = 6\pi\eta a \left[ 1 - \frac{9}{16} \left( \frac{a}{h} \right) + \frac{1}{8} \left( \frac{a}{h} \right)^3 - \frac{45}{256} \left( \frac{a}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left( \frac{a}{h} \right)^5 + \dots \right]^{-1} \quad (4.8)$$

onde  $\eta$  é a viscosidade do meio aquoso em que a microesfera está imersa, que depende da temperatura do meio,  $a$  é o raio da microesfera e  $h$  é a distância da lamínula ao centro da microesfera.

Sabe-se que a força restauradora associada ao potencial harmônico obedece a lei de Hooke,

$$\vec{F}_{\text{optica}} = -k\Delta\vec{x} \quad (4.9)$$

onde  $k$  é a constante de força, que é o parâmetro que queremos determinar empiricamente, e  $\Delta x$  é o deslocamento da posição de equilíbrio que podemos ver na Figura (4.5).

Na posição de equilíbrio, quando há fluxo do fluido, a microesfera está sujeita a duas forças, a força de Stokes e a força restauradora devido ao pinçamento. Portanto

os módulos, das duas forças, são iguais,

$$F_{\text{stokes}} = F_{\text{otica}} \quad (4.10)$$

ou ainda,

$$k\Delta x = \delta v \quad (4.11)$$

Agora, portanto, conseguimos determinar a constante de força, pois  $k$  depende somente de parâmetros conhecidos, tais como a temperatura do meio ( $T = 20^\circ\text{C}$ ), o raio da microesfera ( $a = 3 \mu\text{m}$ ) e a altura ( $h = 4,43 \mu\text{m}$ ) entre a lamínula e a microesfera, que pode ser determinada movimentando o foco do microscópio.

Para os nossos experimentos o valor da constante de força,  $k$ , foi de  $7,2 \text{ pN}/\mu\text{m}$ .

## 4.5 Preparação da Amostra

Para o nosso experimento preparamos uma solução aquosa contendo  $\lambda$ -DNA (DNA do bacteriófago  $\lambda$ ) e microesferas de poliestireno, em um microtubo. Além disso preparamos o porta amostra, que é constituído pelo o-ring, com diâmetro de 0,7 cm, fixado sobre uma lamínula com espessura de 0,15 mm.

### 4.5.1 Preparação da solução

Na preparação da solução aquosa, utilizamos  $20 \mu\text{l}$  da solução tampão PBS 150 mM (Phosphater Buffer Saline) com pH 7,4;  $1,5 \mu\text{l}$  da solução contendo microesferas revestidas com a proteína estreptavidina; e  $5 \mu\text{l}$  de  $\lambda$ -DNA previamente biotinilado pela empresa Sigma-Aldrich, ou seja, com as extremidades contendo a vitamina biotina, que é uma vitamina do complexo B. Sabe-se que a biotina e a estreptavidina tem alta afinidade para ligação entre elas. A biotinização do DNA é feita usando o protocolo disponível na referência [13].

O microtubo contendo esta solução é colocada em um banho térmico à uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , por uma hora. Isso é necessário, pois o banho térmico aumenta a probabilidade de que a ligação entre a biotina, em uma das pontas do DNA, se ligue a estreptavidina que reveste a microesfera.

Como última etapa, após o término de uma hora, completamos o microtubo com PBS 150 mM, de modo que a solução totalize  $100 \mu\text{l}$ . A colocamos de volta ao banho térmico por 20 minutos. Por fim levamos a solução ao microscópio e a colocamos sobre o porta amostra.

### 4.5.2 Preparação do porta amostra

O porta amostra é feito, como já dito, fixando um o-ring (anel de borracha de formato circular) sobre uma lamínula de vidro. Com essa estrutura montada, devemos prepará-la para receber a solução aquosa contendo o DNA e as microesferas. Para isso colocamos sobre a lamínula 20  $\mu\text{l}$  de BSA biotinilada (1,9 mg/ml em uma solução tampão contendo magnésio, ao qual denominamos tampão A), e esperamos 30 minutos com o porta amostra sobre luz ultravioleta. Após o tempo de espera, retiramos o excesso de BSA e lavamos a lamínula com 30  $\mu\text{l}$  de tampão A puro. Acrescentamos então 20  $\mu\text{l}$  de estreptavidina (0,2 mg/ml em tampão PBS 150 mM), e esperamos novamente 30 minutos com o porta amostra sobre luz ultravioleta. No fim deste tempo lavamos o porta amostra com PBS 150 mM. Como última etapa deixamos o porta amostra secar por 20 minutos sobre a luz ultravioleta, e então o levamos para o microscópio.

## 4.6 Procedimento experimental

O porta amostra contendo a solução de DNA e microesferas pode conter distintas configurações, como pode ser visto na Figura (4.6). Pode-se encontrar microesfera ligadas diretamente à lamínula, microesferas com um ou mais DNA's, e dentre outras configurações. Entretanto, a configuração desejada é aquela em que uma ponta do DNA está ligada à lamínula e a outra à microesfera. Vale a pena salientar que a biotina é fixada, em cada ponta, em uma das fitas, de modo que o DNA ao se ligar à lamínula ou microesfera, o faz por meio de uma de suas fitas, e não pela duas.

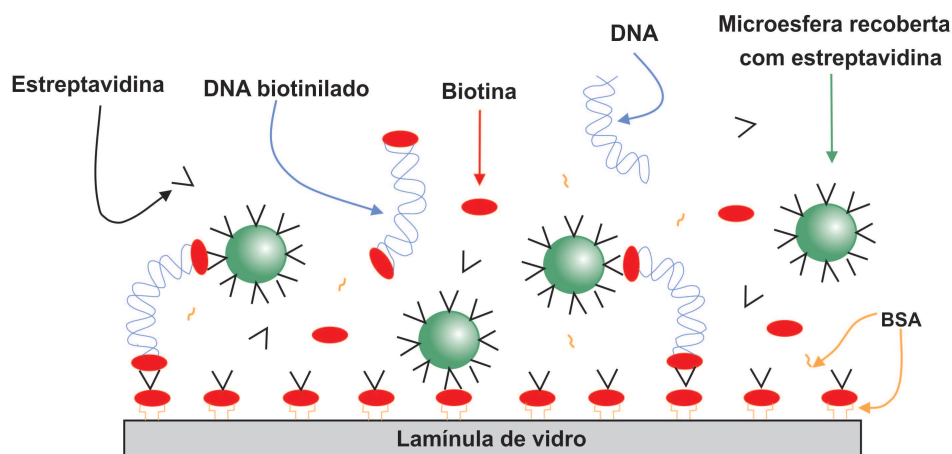


Figura 4.6: Representação das possíveis configurações na solução contendo DNA e microesferas.

Para sabermos se encontramos a configuração ideal devemos pinçar a microesfera e aplicá-la um deslocamento. Na verdade, o deslocamento é feito na lamínula a partir do

piezoelétrico, como pode ser visto na Figura (4.7). Esse deslocamento deve ser lento o suficiente para que a força de Stokes seja desprezível comparado à força de pinçamento. Caso a microesfera consiga escapar do pinçamento, podemos afirmar que há DNA preso à microesfera e à lamínula. Essa afirmação pode ser feita pois o DNA causa uma força restauradora na microesfera que após um tempo “vence” o poço de potencial, ou seja, uma força com sentido a restaurar a posição de equilíbrio inicial da microesfera que aumenta seu módulo a medida que o deslocamento aumenta. E como desconsideramos a força de Stokes essa é a única possibilidade possível pra a microesfera “vencer” as forças de pinçamento.

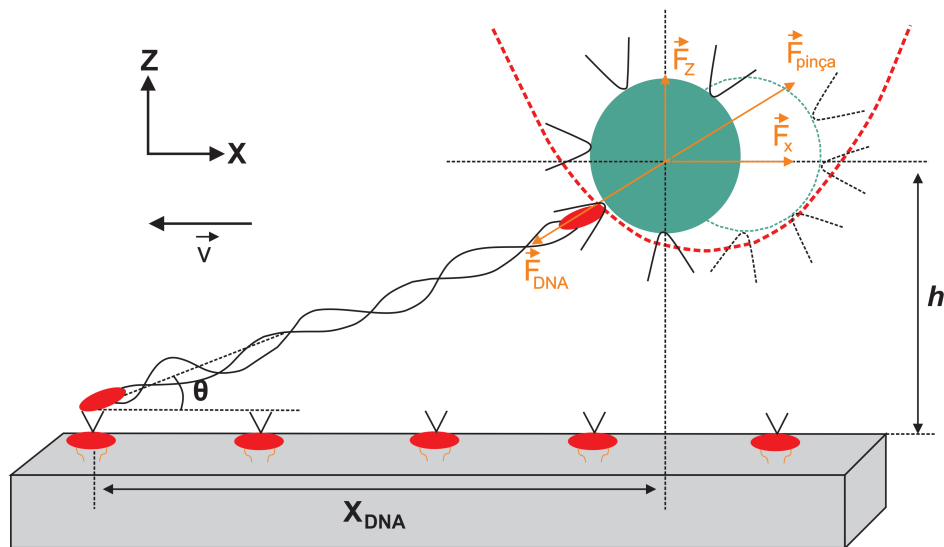


Figura 4.7: Representação do pinçamento e estiramento da molécula de DNA. Onde  $\vec{v}$  é a velocidade de deslocamento do piezoelétrico,  $h$  é a altura da microesfera em relação a lamínula,  $\theta$  é o ângulo entre a molécula de DNA e a lamínula, e  $X_{DNA}$  é a componente horizontal do tamanho da molécula estirada,  $z$ . Ao estirar a molécula de DNA, além da força de pinçamento,  $\vec{F}_{optica}$ , aparece uma força na microesfera, de sentido contrário, associada ao DNA preso à lamínula,  $\vec{F}_{DNA}$ .

Quando a microesfera escapa do poço de potencial, o DNA volta a uma configuração inicial, devido aos choques das partículas da solução, de modo que a entropia do sistema DNA-solução possua a mesma entropia de quando o DNA não tinha sido deslocado.

Mas não basta só encontrarmos a configuração ideal. Esta configuração não deve retornar quaisquer valores para os comprimentos de contorno e persistência. Os valores aceitáveis devem ser aproximadamente  $16,5 \mu\text{m}$  para o contorno e  $50 \text{ nm}$  para a persistência, uma vez que estes valores já são bem estabelecidos para o  $\lambda$ -DNA [5, 14].

Para avaliar os parâmetros mecânicos do DNA encontrado, devemos novamente estirá-lo. Porém agora de modo mais controlado, para garantir que o estiramento seja realizado em processo quase estático, ou seja, garantir que a força Stokes seja desprezada. A velocidade de estiramento para análise dos parâmetros mecânicos é de  $0,1 \mu\text{m/s}$ .

Com auxílio do software ImageJ, calculamos a posição  $(x,y)$  do centro de massa da microesfera. Destes dados obtemos o deslocamento  $\Delta x$ . Como a pinça óptica foi calibrada, sabemos o valor da constante de força,  $\kappa$ , portanto conseguimos estimar a força associada ao DNA. Assim podemos gerar o gráfico de força por extensão da molécula de DNA utilizando o programa KaleidaGraph. Um exemplo da resposta da molécula de DNA ao estiramento é mostrado na Figura (4.8).

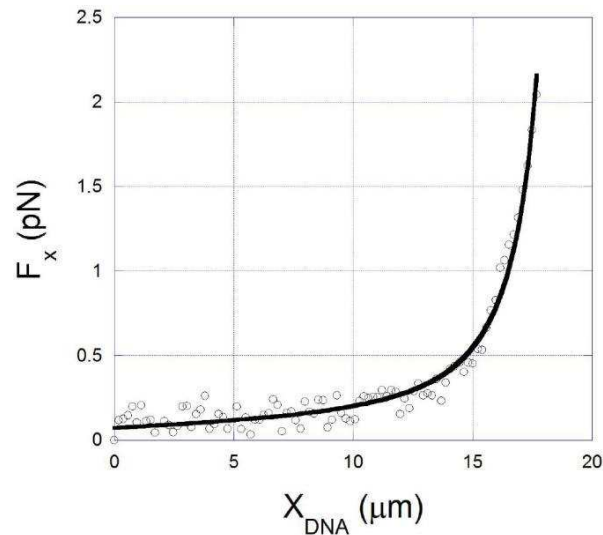


Figura 4.8: Curva de força por extensão da molécula de DNA em resposta ao estiramento.

A curva exibida na Figura (4.8), pode ser ajustada pelo modelo WLC (Worm - Like Chain) [15]. Este modelo descreve satisfatoriamente o comportamento do DNA no regime entropico, ou seja, forças menores que 5 pN, garantindo que não haja rupturas na estrutura da molécula. Por uso do modelo WLC podemos obter os parâmetros mecânicos do DNA.

Caso os parâmetros mecânicos exibam os valores já citados (16,5  $\mu\text{m}$  para o comprimento de contorno e 50 nm para o comprimento de persistência), após a molécula de DNA passar por cinco estiramentos, podemos adicionar no porta amostra concentrações distintas de algum ligante, e assim avaliar qual a relação entre a variação dos parâmetros mecânicos com a concentração do ligante.

## Capítulo 5

# Conexão entre parâmetros distintos

Ao obtermos experimentalmente como o comprimento de persistência varia com a concentração de ligante em solução, podemos também obter, a partir destes dados, parâmetros físico-químicos da interação DNA-ligante, tais como a constante de ligação intrínseca e coeficiente de Hill.

Para entendermos como é feita a conexão entre os parâmetros mecânicos e físico-químicos, devemos considerar a molécula de DNA como sendo formada por molas entrópicas em associação em série. O que dá a distinção entre as partes do DNA é se o sítio de ligação está ocupado ou não. Um sítio é o local ocupado por um agregado de moléculas, caso a cooperatividade seja positiva, uma vez que o coeficiente de Hill dá o tamanho característico do agregado.

Tomando a molécula de DNA como a associação em série de molas, e sendo essas molas formadas por dois sítios, podemos obter a expressão para o comprimento de persistência efetivo,  $A_E$ , de toda a molécula [5],

$$\frac{1}{A_E} = \frac{f(r)}{A_0} + \frac{g(r)}{A_1} + \frac{h(r)}{A_2} \quad (5.1)$$

Na Equação (5.1),  $A_0$  representa o comprimento de persistência de um local onde dois sítios consecutivos estão desocupados, e  $f(r)$  é a probabilidade de encontrarmos esta configuração ao longo da molécula;  $A_1$  representa o comprimento de persistência de um local onde, consecutivamente, um sítio está ocupado e o outro está desocupado, e  $g(r)$  é a probabilidade de encontrarmos esta configuração ao longo da molécula;  $A_2$  representa o comprimento de persistência de um local onde os dois sítios consecutivos estão ocupados, e  $h(r)$  é a probabilidade de encontrarmos esta configuração ao longo da molécula. Note que as probabilidades são funções da fração de sítios ocupados (ou ligados).

A probabilidade de encontrarmos dois sítios consecutivos ocupados é dada por,

$$h(r) = \left( \frac{r}{r_{\max}} \right)^2 \quad (5.2)$$

onde  $r/r_{max}$  é a fração de sítios ligados normalizada. Já a probabilidade de encontrarmos dois sítios consecutivos desocupados é dada por,

$$f(r) = \left(1 - \frac{r}{r_{max}}\right)^2 \quad (5.3)$$

e a probabilidade de encontrarmos, consecutivamente, um sítio ocupado e outro desocupado, não interessando a ordem, é dada por,

$$g(r) = 2 \left(\frac{r}{r_{max}}\right) \left(1 - \frac{r}{r_{max}}\right) \quad (5.4)$$

Portanto resultando na equação,

$$\frac{1}{A_E} = \frac{1}{A_0} + \left(\frac{2}{A_1} - \frac{2}{A_0}\right) \left(\frac{r}{r_{max}}\right) \left(\frac{1}{A_0} - \frac{2}{A_1} + \frac{2}{A_2}\right) \left(\frac{r}{r_{max}}\right)^2 \quad (5.5)$$

Por outro lado a isoterma de Hill, como já visto, pode ser expressa como,

$$\frac{r}{r_{max}} = \frac{(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n} \quad (5.6)$$

Fazendo uso do vínculo,  $C_f = C_T - r C_{pb}$ ,

$$\frac{r}{r_{max}} = \frac{[K_i(C_T - r_{max} C_{pb}(\frac{r}{r_{max}}))]^n}{1 + [K_i(C_T - r_{max} C_{pb}(\frac{r}{r_{max}}))]^n} \quad (5.7)$$

Ao analisarmos as Equações (5.7) e (5.5) podemos perceber que o termo  $r/r_{max}$  aparece em ambas. Dito isto, percebemos que há uma conexão entre os parâmetros físico-químicos e mecânicos.

Mas para realmente conseguirmos obter os parâmetros físico-químicos, a partir deste resultado, teremos de realizar o seguinte algoritmo:

- 1) Tomamos valores quaisquer para os parâmetros físico-químicos, e consideramos concentrações de ligante estudadas em experimento, assim a Equação (5.7) pode ser resolvida numericamente para  $r/r_{max}$ .
- 2) Os valores obtidos de  $r/r_{max}$  são usados na Equação (5.5), e ajusta-se aos dados experimentais da variação do comprimento de persistência pela concentração de ligante.

É esperado que este primeiro ajuste não seja compatível com os dados experimentais, pois é provável que os valores-tentativa não correspondam aos reais. O algoritmo portanto irá ser feito com outros valores-tentativa, de modo a se ajustar melhor a Equação (5.7) com o dados obtidos experimentalmente. Este processo é repetido várias vezes até

conseguirmos ajustar a curva satisfazendo os critérios para convergência do método dos mínimos quadrados.

Portanto, com a finalização do algoritmo, conseguimos obter os parâmetros físico-químicos do complexo DNA-ligante, além dos comprimentos de persistência  $A_0$ ,  $A_1$  e  $A_2$ .

## Capítulo 6

# Dicloridrato de Putrescina

### 6.1 Estrutura e importância da Putrescina

O composto usado em nosso experimento foi a poliamina biogênica conhecida por Dicloridrato de Putrescina, com fórmula química  $C_4 H_{12} N_2 \cdot 2HCl$ , dissociado em solução, possuindo carga  $2^+$ , como podemos ver na Figura (6.1).

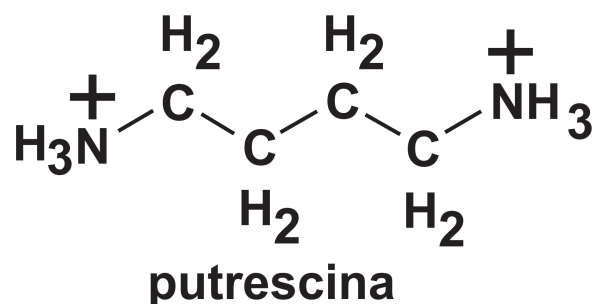


Figura 6.1: Estrutura química da molécula de putrescina.

As poliaminas biogênicas são pequenos policátions alifáticos (que não possuem anéis aromáticos) envolvidos em inúmeros processos biológicos, tal como a habilidade para a expressão gênica e atividade enzimática, ativação da síntese do DNA, proliferação celular, entre outros [16].

As poliaminas biogênicas, tal como a putrescina, são moléculas essenciais para todo organismo vivo. Interações diretas entre as poliaminas e ácidos nucleicos, ambos RNA e DNA, foram propostos para explicar algumas funções biológicas, e recentemente, a eficiência das poliaminas em proteger o DNA de ruptura oxidativa e radiação tem sido sugerido [17]. Entretanto, a questão a cerca de como elas se ligam aos ácidos nucleicos não tem sido claramente estabelecido.

Estudos sugerem que a estabilidade do DNA compactado no interior das células, pode ser influenciada, entre outras coisas, pelas poliaminas [18]. Em condições já estudadas, a

putrescina estabiliza a molécula de DNA nas concentrações entre 6.25 mM e 25 mM, que está perto das condições fisiológicas (concentrações intracelulares de poliaminas alcançam a ordem de milimolar) [16]. Mas, mesmo à concentração de 50 mM, não foi observado a condensação do DNA [17].

Tem sido entendido que a interação específica entre poliaminas catiônicas e ânions do grupo fosfato do DNA pode proteger a estrutura da dupla hélice, pelo menos da desnaturação térmica [19].

O tamanho da molécula de putrescina foi calculada como  $\sim 6,2 \text{ \AA}$ , separada por uma cadeia de tetrametileno [17]. Foi observado em 1964 que a distância entre as entidades carregadas das poliaminas correspondem bem as distâncias entre os grupos fosfato do DNA [18].

Em geral a concentração de putrescina é levemente menor do que a concentração de espermina e espermidina (milimolar *in vivo*) [16]. Numerosos estudos tem mostrado que poliaminas acumulam-se em células cancerosas, e uma alta concentração de poliaminas é geralmente correlatada para crescimento de tumores [20]. Estudos tem também demonstrado que a redução da concentração de poliaminas geralmente tem efeito de citotoxicidade nas células através da inibição do crescimento ou promoção da apoptose celular [20].

## 6.2 Preparação das alíquotas

Nosso experimento foi feito analisando a interação da putrescina em três concentrações distintas de sal,  $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$ ,  $10 \text{ mM}$  e  $1 \text{ mM}$ . E para cada concentração salina preparamos dez alíquotas, diluindo a putrescina em solução de PBS 7.4, com concentrações de putrescina de  $2 \mu\text{M}$  à  $20 \mu\text{M}$ . Aqui vale ressaltar que, como não há muitos estudos entre o DNA e a putrescina, estes valores foram escolhidos inicialmente como valores teste, mas como veremos estas concentrações produziram alterações significativas na molécula de DNA.

Adicionamos a alíquota na solução preparada com DNA, e esperamos 20 minutos para que o equilíbrio do complexo DNA-putrescina fosse estabelecido. Após a espera realizamos cinco estiramentos, e obtendo com os estiramentos a caracterização do complexo para essas determinadas condições. Este processo foi realizado para cada concentração de sal e de putrescina, ou seja, foram avaliadas trinta alíquotas com concentrações distintas de sal e putrescina.

Vale ressaltar que o estudo de concentrações distintas de sal é de nosso interesse pois como o  $\text{Na}^+$  possui carga positiva ele é capaz de blindar parcialmente a interação eletrostática entre a putrescina (carga  $2^+$ ) e o DNA (que possui densidade de carga negativa). Assim com a variação na concentração salina seríamos capazes de evidenciar a interação eletrostática entre a putrescina e a molécula de DNA. Além disso, temos motivação biológica pois, em meio celular, há variação da concentração de sal.

# Capítulo 7

## Resultados

Neste capítulo iremos apresentar os resultados da interação da molécula de DNA com o composto putrescina, para as concentrações de 150 mM, 10 mM e 1 mM de  $[\text{Na}^+]$ . Esses resultados consistem no modo como os parâmetros mecânicos, comprimento de persistência e de contorno, variaram com o aumento da concentração da putrescina.

### 7.1 Para $[\text{Na}^+] = 150 \text{ mM}$

A Figura (7.1) mostra a variação do comprimento de persistência para distintas concentrações de putrescina.

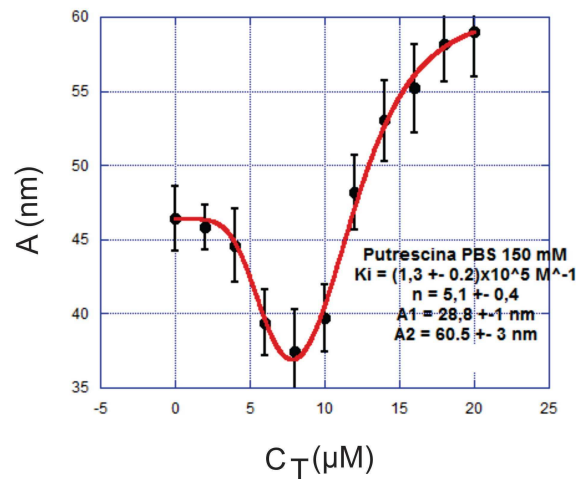


Figura 7.1: Gráfico da variação do comprimento de persistência da molécula de DNA em  $[\text{Na}^+] = 150 \text{ mM}$ .

Como podemos ver, inicialmente há queda do comprimento de persistência, e a partir da concentração de  $8 \mu\text{M}$  o comprimento de persistência aumenta, mas com uma intensidade cada vez menor, parecendo atingir um valor de saturação para concentrações além das estudadas por nós.

Este comportamento indica que há uma competição entre distintos modos de ligação da putrescina à molécula de DNA, uma vez que um único modo de ligação, para um mesmo composto, não é capaz de gerar comportamentos diferentes para o comprimento de persistência, isso não faria sentido. Como reportado em alguns estudos [8, 16, 18], esses modos de ligação podem ser com as fendas, e via interação puramente eletrostática. Mas, note que para concentrações de putrescina menores que  $8 \mu\text{M}$  há prevalência de um modo de ligação, e acima desta concentração há prevalência de outro modo de ligação.

A curva em vermelho é o ajuste teórico utilizando o modelo estatístico de dois sítios, que nos dá os valores para os parâmetros físico-químicos:  $K_i = (1,3 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ , para a constante química intrínseca;  $n = (5,1 \pm 0,4)$ , para o coeficiente de Hill;  $A_1 = (28,8 \pm 1) \text{ nm}$ , para o comprimento de persistência associado à uma região da molécula de DNA onde, consecutivamente, um sítio está ocupado e o outro está desocupado;  $A_2 = (60,5 \pm 3) \text{ nm}$ , para o comprimento de persistência associado à uma região da molécula de DNA onde dois sítios consecutivos estão ocupados.

A ordem de grandeza para a constante química,  $K_i$ , indica forte ligação entre o DNA e a putrescina, como também proposto por alguns estudos [16, 20]. É importante notar também o fato da putrescina ter cooperatividade positiva, pois o coeficiente de Hill,  $n$ , é maior que 1. Isso pode ser interpretado como a ligação de aproximadamente 5 moléculas de putrescina simultaneamente à molécula de DNA. A cooperatividade positiva da putrescina foi encontrado também em outro estudo [16].

A Figura (7.2) mostra o comportamento do comprimento de contorno da molécula de DNA para distintas concentrações de putrescina.

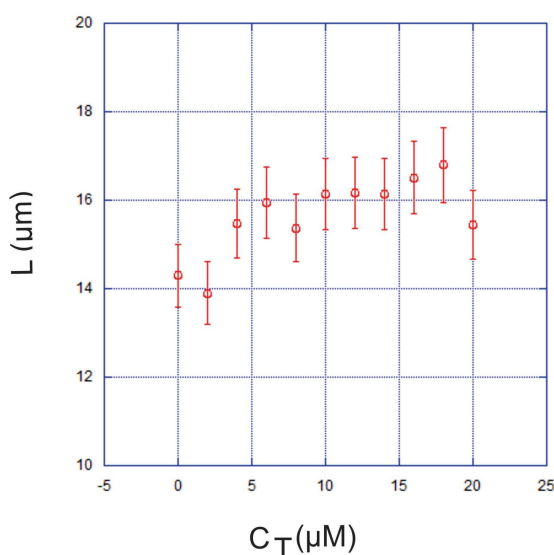


Figura 7.2: Gráfico da variação do comprimento de contorno da molécula de DNA em  $[\text{Na}^+] = 150 \text{ mM}$ .

Como podemos ver, não há alterações significativas no comprimento de contorno (note

que as variações estão dentro da barra de erro). Portanto, o comprimento de contorno permanece constante para as concentrações estudadas, em  $[\text{Na}^+] = 150 \text{ mM}$ .

## 7.2 Para $[\text{Na}^+] = 10 \text{ mM}$

A Figura (7.3) abaixo mostra a variação do comprimento de persistência para distintas concentrações de putrescina para  $[\text{Na}^+] = 10 \text{ mM}$ .

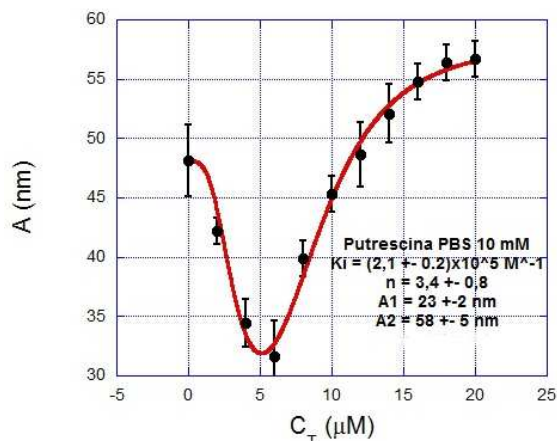


Figura 7.3: Gráfico da variação do comprimento de persistência da molécula de DNA em  $[\text{Na}^+] = 10 \text{ mM}$ .

Novamente, para o comprimento de persistência, temos o comportamento de queda seguido de um aumento, com indício de saturação para além das concentrações estudadas. Para este caso também notamos que há competição entre modos distintos de ligação. Porém, os acontecimentos aqui são mais prematuros e intensos, já que o comprimento de persistência atinge valores menores e tem aumento para a concentração aproximada de  $5 \mu\text{M}$  (no caso anterior o aumento ocorreu em  $8 \mu\text{M}$ ).

O ajuste teórico com o modelo estatístico de dois sítios nos forneceu os seguintes parâmetros mecânicos:  $k_i = (2,1 \pm 0,2) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ;  $n = (3,4 \pm 0,8)$ ;  $A_1 = (23 \pm 2) \text{ nm}$ ;  $A_2 = (58 \pm 5) \text{ nm}$ . Note que o coeficiente de Hill para  $[\text{Na}^+] = 10 \text{ mM}$  é menor do que para  $[\text{Na}^+] = 150 \text{ mM}$ , e também que, a ordem de grandeza para a constante de ligação continua indicando a forte interação entre a putrescina e o DNA.

A Figura (7.4) mostra o comportamento do comprimento de contorno da molécula de DNA para distintas concentrações de putrescina, em  $[\text{Na}^+] = 10 \text{ mM}$ .

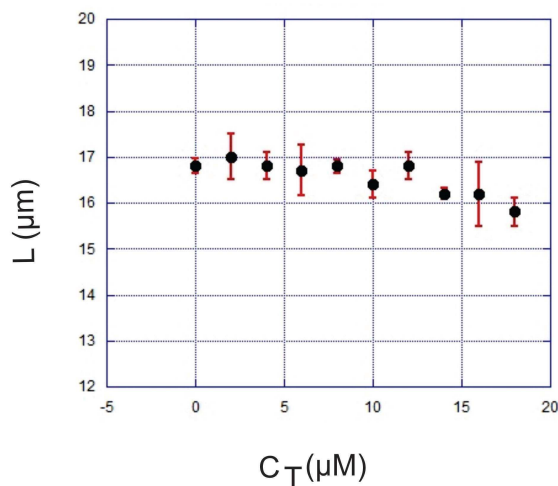


Figura 7.4: Gráfico da variação do comprimento de contorno da molécula de DNA em  $[\text{Na}^+] = 10 \text{ mM}$ .

Aqui, na concentração de  $10 \text{ mM}$  de  $[\text{Na}^+]$ , novamente o comprimento de contorno se manteve aproximadamente constante, indicando que a putrescina não gera mudanças significativas neste parâmetro mecânico da molécula de DNA.

### 7.3 Para $[\text{Na}] = 1 \text{ mM}$

A Figura (7.5) mostra a variação do comprimento de persistência para distintas concentrações de putrescina para  $[\text{Na}^+] = 1 \text{ mM}$ .

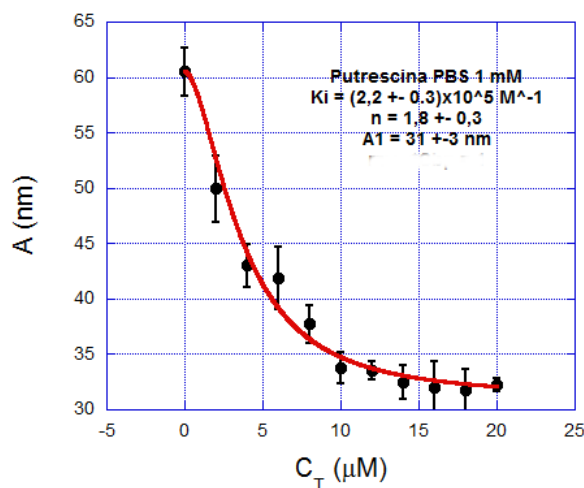


Figura 7.5: Gráfico da variação do comprimento de persistência da molécula de DNA em  $[\text{Na}^+] = 1 \text{ mM}$ .

Em  $[\text{Na}^+] = 1 \text{ mM}$ , para as concentrações iniciais, o comprimento de persistência apresenta apenas queda, e a partir de  $10 \mu\text{M}$  podemos ver o comportamento de saturação

para este parâmetro mecânico, diferente do comportamento encontrado para as outras concentrações salinas.

O ajuste teórico com o modelo estatístico nos forneceu os seguintes parâmetros mecânicos:  $K_i = (2,2 \pm 0,3) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ ;  $n = (1,8 \pm 0,3)$ ;  $A_1 = (31 \pm 3) \text{ nm}$ . Note que o coeficiente de Hill para  $[\text{Na}^+] = 1 \text{ mM}$  é menor do que para  $[\text{Na}^+]$  igual à 150 mM e 10 mM, e, novamente, a ordem de grandeza para a constante de ligação continua indicando a forte interação entre a putrescina e o DNA.

Neste caso é importante notar que apenas o parâmetro  $A_1$  é necessário para descrever o comportamento experimental, ou seja, foi utilizado o modelo estatístico avaliando apenas um sítio de comprimento de persistência  $A_1$ .

A Figura (7.6) mostra o comportamento do comprimento de contorno da molécula de DNA para distintas concentrações de putrescina, em  $[\text{Na}^+] = 1 \text{ mM}$ .

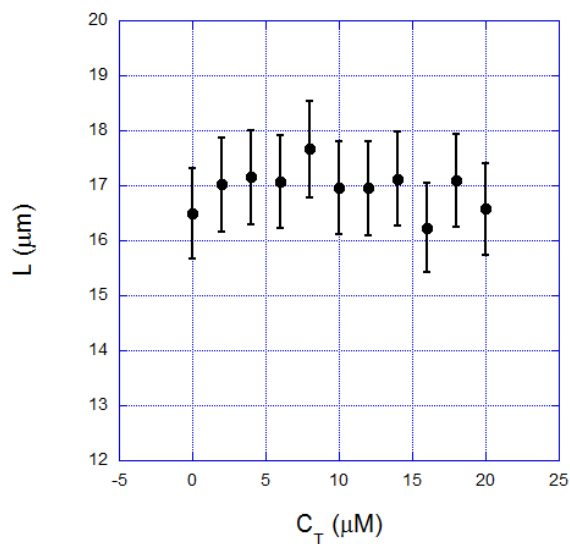


Figura 7.6: Gráfico da variação do comprimento de contorno da molécula de DNA em  $[\text{Na}^+] = 1 \text{ mM}$ .

E mais uma vez o comprimento de contorno apresenta comportamento constante, mostrando que para as concentrações de putrescina e de  $[\text{Na}^+]$  estudadas, este parâmetro não é afetado significativamente.

# Capítulo 8

## Discussões

### 8.1 Variação dos parâmetros físico-químicos

Dos nossos resultados conseguimos obter uma relação entre a concentração de  $[\text{Na}^+]$  e a constante de ligação intrínseca (apesar da ordem de grandeza ter se mantido constante). Observamos queda do logaritmo de  $K_i$  com o aumento do logaritmo da concentração de  $[\text{Na}^+]$ , que também é mostrada no trabalho de Ayesha Kabir e colaboradores [20]. Este gráfico não obedece o modelo de Record-Lohman [21], que prevê um decaimento linear (reta), que não ocorre aqui. Provavelmente isto é porque este modelo leva em conta apenas interações eletrostáticas, enquanto neste sistema existe uma interação diferente (fendas). Esta deve ser a causa principal do desvio do modelo. A Figura (8.1) mostra a relação entre estes dois parâmetros,

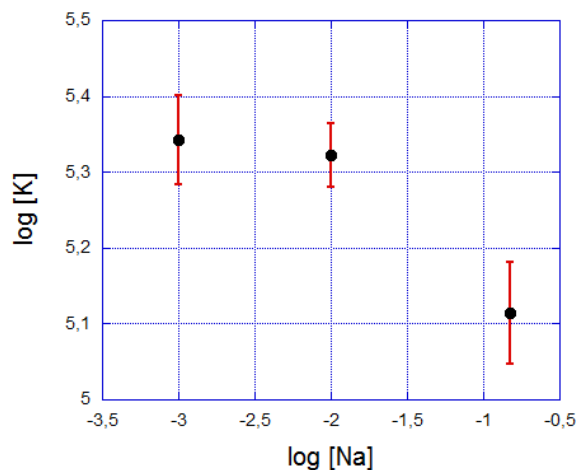


Figura 8.1: Gráfico da variação do log da constante de ligação,  $K_i$ , pelo log da concentração de  $[\text{Na}^+]$ .

Esta constante está associada a intensidade da interação entre a molécula de DNA e a putrescina, assim quanto maior o valor da constante,  $K_i$ , maior é a intensidade da interação. Podemos ver, portanto, que o gráfico indica diminuição da intensidade da interação

com o aumento de  $[\text{Na}^+]$ . Isto ocorre pois os  $[\text{Na}^+]$  servem como contra-íons dos grupos fosfato da molécula de DNA, diminuindo a densidade de carga “enxergada” pelas cargas positivas da molécula de putrescina. Este resultado mostra a relevância da interação eletrostática para o sistema estudado, uma vez que evidenciou a mudança da intensidade da interação entre o DNA e a putrescina apenas pelo efeito da blindagem eletrostática.

Além disso, temos comportamento linear, entre o logaritmo da concentração de  $[\text{Na}^+]$  e o coeficiente de Hill. A Figura (8.2) mostra o comportamento linear entres estes parâmetros,

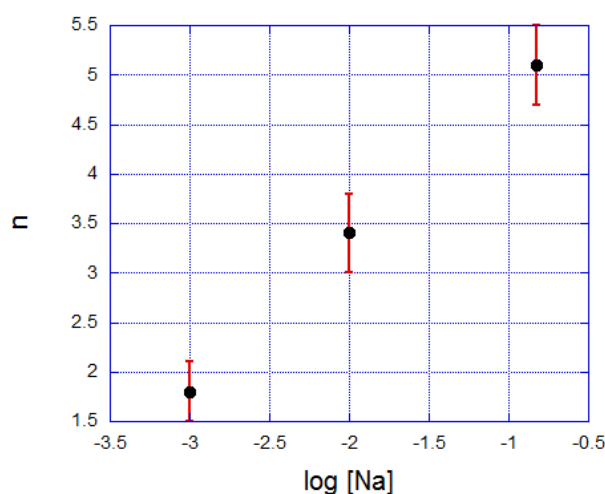


Figura 8.2: Gráfico da variação do coeficiente de Hill,  $n$ , pelo log da concentração de  $[\text{Na}^+]$ .

A Figura (8.2) nos mostra que a cooperatividade, ou coeficiente de Hill, é maior para maiores concentrações de sal. Isso ocorre pois, uma vez que sabemos que a putrescina possui cooperatividade positiva, é de se esperar maiores valores da cooperatividade com a blindagem das moléculas de putrescina pelo contra-íon  $\text{Cl}^-$ , já que por eletrostática elas iriam se repelir, dificultando a cooperatividade. E novamente a interação eletrostática rege a dinâmica do sistema.

## 8.2 Modos de ligação

Sabemos que um componente importante da interação entre a molécula de putrescina e de DNA é a eletrostática. De estudos feitos por outros pesquisadores foi reportado a preferência da putrescina se ligar as fendas do DNA [20, 22]. E de forma mais específica, que a preferência é da fenda menor, para baixas concentrações de putrescina, e para a fenda maior, em maiores concentrações [22].

Além dessa informação, já foi dito em nosso trabalho que o tamanho da molécula de putrescina é  $\sim 6,2 \text{ \AA}$ , mas temos é que avaliar o tamanho do complexo que está ligado

às partes da molécula de DNA. Para isto, basta utilizarmos o coeficiente de Hill. Essa análise nos retorna os valores aproximados de 3,2, 2,2 e 1,1 nm, para as concentrações de 150 mM, 10 mM e 1 mM, de  $[\text{Na}^+]$ , respectivamente. E é também conhecido os tamanhos das fendas, com valores de 2,2 nm para a maior e 1,1 nm para a menor [23]. Note que, o tamanho dos complexos é maior ou igual a fenda menor, e nas concentrações de 150 mM ou 10 mM, temos o tamanho do complexo maior ou igual, respectivamente, à fenda maior; mas para 1 mM o tamanho do complexo é inferior a fenda maior.

Para nós, isso indica que pequenas moléculas carregadas devem conduzir enrijecimento à molécula de DNA caso estejam ligadas à fenda menor (ou seja, aumento do comprimento de persistência), e dobra do DNA quando estas pequenas moléculas carregadas se ligam a fenda maior (ou seja, diminuição do comprimento de persistência) [8], deve levar em conta o coeficiente de Hill, ou de modo mais claro, a cooperatividade. Estamos sugerindo isto pois, claramente, ao avaliarmos os tamanhos das fendas com os tamanhos dos complexos de putrescina formados pela cooperatividade, estes complexos não devem causar no DNA o mesmo efeito de pequenos cátions carregados. Esta sugestão pode, talvez, esclarecer a afirmação feita no trabalho de Lorens van Dam e colaboradores, pois comentam que apesar de estruturas semelhantes, as poliaminas mostram diferenças em suas interações com o DNA [18]. Evidenciando esta ideia, pesquisadores mostraram que o coeficiente de Hill é distinto para as poliaminas estudadas em seus trabalhos [16].

Para baixas concentrações de putrescina, como dito, a putrescina tem preferência em se ligar à fenda menor, mas o tamanho do complexo é superior, ou do mesmo tamanho, comparado ao tamanho da fenda para as três concentrações de  $[\text{Na}^+]$ , assim sugerimos que ao invés do complexo causar enrijecimento da molécula de DNA, irá ocorrer dobramento do DNA, pois o complexo não conseguirá se localizar no interior da fenda (como os pequenos cátions fariam), e então o complexo causará blindagem dos grupos fosfato externos à fenda, e então desta blindagem o DNA se dobraria em torno do complexo de putrescina, causando queda no comprimento de persistência. Isto explica a queda do comprimento de persistência para as três concentrações de  $[\text{Na}^+]$  vistas na figuras (7.1, 7.3 e 7.5).

Nossa análise agora, deve continuar, tendo em mente que o DNA está levemente mais compactado comparado a situação inicial, e levar em conta a sugestão de outros pesquisadores de que a putrescina irá mudar sua preferência de ligação para a fenda maior. Neste ponto, podemos considerar que o tamanho dos complexos de putrescina para 150 mM e 10 mM são maiores que o tamanho da fenda maior, já que agora o DNA está levemente compactado. Assim, sugerimos que quando estes complexos de putrescina se formam na fenda maior, eles tendem a desfazer as dobras da fenda maior, já que os seus tamanhos são superiores ao da fenda não dando espaço para o DNA se manter dobrado naquele ponto, assim o comprimento de persistência irá aumentar, explicando o aumento do comprimento de persistência, visto nas figuras (7.1, 7.3), devido à um efeito mecânico, para  $[\text{Na}^+] = 150 \text{ mM}$  e  $10 \text{ mM}$ .

Para 1 mM de  $[\text{Na}^+]$ , o tamanho do complexo de putrescina formado na fenda maior permite espaços para a permanência das dobras da molécula de DNA naquele ponto, explicando portanto porque não visualizamos aumento para o comprimento de persistência, visto na figura (7.5), para esta concentração de  $[\text{Na}^+]$ .

O comprimento de contorno, como visto nos resultados, não apresenta variações significativas (ou seja, as variações oscilam dentro das barras de erro), mesmo à distintas concentrações de sal e dicloridrato de putrescina. Este resultado corrobora com os resultados de outros pesquisadores [19]. Pois em seus trabalhos revelam que a putrescina não é capaz de causar mudança no DNA do tipo B para o A. Mas isto não seria verdade caso o comprimento de contorno tivesse variado significativamente, uma vez que esta variação causaria mudanças conformacionais ao DNA que caracterizariam mudança do tipo B para o A.

Outro ponto é a saturação. Sugerimos que este efeito ocorre pois, para alta concentração de putrescina, haverá tantos complexos de putrescina com alta densidade de carga positiva na molécula de DNA, que a repulsão eletrostática entre os complexos ligados e os não ligados será predominante na dinâmica do sistema, não permitindo assim que outras moléculas de putrescina se aproximem significativamente do DNA.

## Capítulo 9

### Conclusão

Concluimos deste trabalho que a molécula de putrescina realmente é capaz de interagir com a molécula de DNA, mas alterando significativamente somente seu comprimento de persistência. Vimos que essas alterações são dependentes da concentração de  $[\text{Na}^+]$ , podendo até mudar drasticamente para baixas concentrações. Mostramos também que a putrescina possui cooperatividade maior que 1, e que este parâmetro, e a constante intrínseca de ligação, variam com a concentração de sal.

Sugerimos que a cooperatividade entre as moléculas de putrescina deve ter um papel fundamental na conformação da molécula de DNA, não causando assim os mesmos efeitos caso não houvesse cooperatividade. Portanto, concluindo que os tamanhos das partes do sistema, por nós estudado, influenciam significativamente no equilíbrio mecânico de todo o sistema.

Esperamos que, como sugerido por Ayesha Kabir e colaboradores [20], esses resultados possam ajudar a construir poliaminas sintéticas que afetarão a função celular e inibirão o crescimento de células cancerosas.

# Apêndice A

## Mecânica de Polímeros

Este apêndice foi baseado na referência [6].

### A.1 Cadeias semi-flexíveis

Naturalmente, polímeros biológicos, apresentam rigidez para sofrer curvatura. Assim é necessário gastarmos energia para causar curvatura na molécula de DNA, que é um polímero semiflexível.

Para avaliarmos quantitativamente a energia associada a curvatura vamos considerar, a princípio, uma vareta flexível. A Figura (A.1) mostra uma vareta rígida linear de comprimento  $L$ , e também a mesma vareta encurvada de modo a formar um semicírculo de raio  $R$ .



Figura A.1: Representação de uma vareta rígida sendo flexionada.

De acordo com a mecânica do contínuo, a energia associada a deformação da vareta é,

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

sendo  $k_f$  a rigidez flexural da vareta, dada pela expressão,

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

sendo  $Y$  o módulo de Young da vareta e  $I$  o momento geométrico de segunda ordem da seção reta, a ser definido. Vale ressaltar que o momento geométrico de segunda ordem da seção reta é definido similarmente ao momento de inércia associada a massa.

## A.2 Modelo de Kratky – Porod

Como dito, o DNA é um polímero semiflexível, e portanto a expressão para a energia associada a curvatura deve ser melhor analisada. Para isso consideraremos o modelo de Kratky – Porod.

Primeiro, vamos notar que  $1/R$  é a curvatura do semicírculo, portanto, para uma curvatura arbitrária podemos definir  $C$  como sendo a curvatura. Então, na expressão da energia para uma vareta, substituímos  $1/R^2$  por  $C^2$ .

Se considerarmos, como visto na Figura (A.2), uma curva arbitrária com sua localização espacial descrita por um certo sistema de referência. Assim, a distância de um ponto arbitrário da curva à origem do sistema de referência é dada pelo vetor posição  $\vec{r}(s)$ , parametrizado pelo comprimento de arco  $s$  ao longo da curva. E  $\hat{t}(s)$  é o vetor unitário tangente à curva no ponto em questão, e também parametrizado pelo comprimento de arco  $s$ .

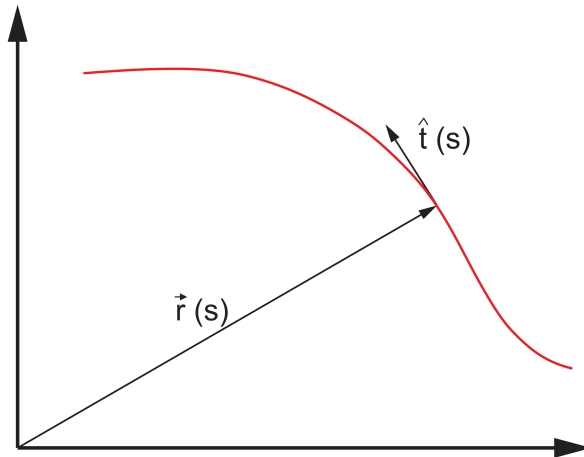


Figura A.2: Representação de um polímero à uma distância do sistema de referências.

É fácil notar que,

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s} \quad (\text{A.3})$$

Portanto a curvatura é dada por,

$$C = \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right| = \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right| \quad (\text{A.4})$$

Agora, tomando esta expressão mais rigorosa para a curvatura e generalizando as possíveis configurações (curvatura) da vareta, podemos escrever uma expressão mais geral para a energia associada a curvatura de uma vareta e assim considerá-la como um polímero

semiflexível. A expressão é então dada por,

$$E_{KP} = \frac{1}{2}k_f \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds \quad (\text{A.5})$$

que é a expressão para a energia associada a curvatura de um polímero semiflexível do modelo de Kratky – Porod.

### A.3 Elasticidade entrópica

Um polímero em solução sofre choques com as partículas do meio, mudando assim a sua conformação até o sistema atingir o equilíbrio termodinâmico. Este equilíbrio dependerá, dentre outros fatores, da temperatura do sistema e da energia associada a curvatura do polímero.

As extremidades do polímero podem se aproximar ou se afastar, dependendo da sua configuração inicial, para uma temperatura fixa do sistema. O fato é que para  $T \rightarrow 0$ , o polímero tende à uma vareta rígida, ou seja, possuindo um número mínimo de configurações possíveis, podendo então afirmarmos que a entropia do sistema é mínima. Essa afirmação é válida, já que a entropia é proporcional ao logaritmo do número de configurações,

$$S = k_B \ln \Omega \quad (\text{A.6})$$

sendo  $k_B$  a constante de Boltzmann, e  $\Omega$  o número de configurações possíveis ao polímero em solução.

Quando  $T$  aumenta, as partículas do meio ganham energia cinética, e portanto conseguem chocar-se contra o polímero com a energia necessária para mudar a curvatura deste, mudando portanto sua configuração, aumentando a entropia do sistema.

### A.4 Comprimento de persistência

Vamos considerar um setor circular em um polímero, de modo que a distância de qualquer ponto deste setor circular à origem do sistema de referência seja  $R$ ; e de modo que o ângulo formado entre o ponto inicial e final deste semicírculo seja  $\theta$ , e o comprimento do arco formado pelo polímero seja  $s$ . Assim, a energia associada à curvatura deste pedaço do polímero é,

$$E = \frac{k_f s}{2R^2} = \frac{k_f \theta^2}{2s} \quad (\text{A.7})$$

Para analisar a magnitude das flutuações da curvatura, podemos avaliar o valor de

$\langle \theta^2 \rangle$ . Para este fim, vamos tomar a média dos dois lados da expressão anterior,

$$\langle E \rangle = \frac{k_f \langle \theta^2 \rangle}{2s} \quad (\text{A.8})$$

Sabemos, pelo princípio da equipartição da energia, que  $\langle E \rangle = k_B T$ , já que as flutuações de curvatura estão sujeitas a dois graus de liberdade (as flutuações ocorrem em um plano). Portanto,

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{\beta k_f} \quad (\text{A.9})$$

sendo  $\beta = 1/k_B T$ .

O comprimento de persistência do polímero,  $A$ , é definido como sendo,

$$A = \beta k_f \quad (\text{A.10})$$

Note que  $A$  é diretamente proporcional à rigidez flexural  $k_f$ , e inversamente proporcional à temperatura. Como sabemos, quanto maior a rigidez flexural e menor a temperatura, a molécula está mais parecida com uma vareta rígida. Assim podemos pensar que  $A$  grande significa que a molécula possui poucas dobras. O inverso também é verdadeiro. Portanto este parâmetro nós dá uma ideia da rigidez da molécula.

Agora, para termos uma interpretação geométrica do comprimento de persistência, vamos considerar um vetor unitário tangente ao ponto inicial do polímero como  $\hat{t}(0)$ , e outro vetor unitário,  $\hat{t}(s)$ , tangente à um ponto arbitrário  $s$  no polímero. Semelhante a Figura (A.2), porém agora estamos considerando dois vetores unitários em pontos distintos do polímero.

Vamos avaliar o valor médio do produto escalar  $\hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s)$ . Note que,

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

já que  $\hat{t}(0)$  e  $\hat{t}(s)$  são vetores unitários, e sendo  $\gamma$  o ângulo entre eles.

Para pequenas flutuações,  $\gamma$  é pequeno, permitindo a aproximação,  $\cos \gamma \approx (1 - \gamma^2/2)$ . Assim, obtemos

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \simeq 1 - \frac{\langle \theta^2 \rangle}{2} = 1 - \frac{s}{A} \quad (\text{A.12})$$

em aproximação de primeira ordem.

Note que o termo à extrema direita da Equação (A.12) é a expansão em primeira ordem da função exponencial. Tomando todos os termos da expansão,

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

O que nós mostra que, o comprimento de persistência, está associado ao comprimento que define quando não há mais correlação entre as direções de pontos consecutivos do

polímero.

## A.5 Cálculo da distância quadrática média entre pontos de um polímero, $\langle r_{ee}^2 \rangle$

Novamente, vamos considerar um polímero, com comprimento de contorno  $L$ , parametrizado pela variável  $s$ . Assim, o vetor  $\vec{r}(s=0)$  fornece a posição de um ponto inicial do polímero à origem do sistema de referência, e o vetor  $\vec{r}(s=L)$ , como sendo a posição da outra extremidade do polímero à origem do sistema de referência.

A distância entre as duas extremidades do polímero é,

$$\vec{r}_{ee} = \vec{r}(L) - \vec{r}(0) \quad (\text{A.14})$$

Mas, na realidade, o polímero realiza vibrações, então temos de avaliar a distância quadrática média entre os pontos extremos do polímero, ou seja,

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = \langle [\vec{r}(L) - \vec{r}(0)]^2 \rangle \quad (\text{A.15})$$

Vamos lembrar que,

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s} \quad (\text{A.16})$$

então,

$$\vec{r}(s) - \vec{r}(0) = \int_0^s \hat{t}(s) ds \quad (\text{A.17})$$

Portanto, podemos reescrever a Equação (A.15) como,

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = \left\langle \left[ \int_0^L \hat{t}(s) ds \right]^2 \right\rangle \quad (\text{A.18})$$

ou ainda,

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = \left\langle \left[ \int_0^L \hat{t}(s) ds \right] \cdot \left[ \int_0^L \hat{t}(s') ds' \right] \right\rangle \quad (\text{A.19})$$

de modo que,

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = \int_0^L ds \int_0^L ds' \langle \hat{t}(s) \cdot \hat{t}(s') \rangle \quad (\text{A.20})$$

E lembrando que,

$$(\text{A.21})$$

podemos reescrever a Equação (A.20) como,

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = \int_0^L ds \int_0^L ds' \exp\left(-\frac{|s-s'|}{A}\right) \quad (\text{A.22})$$

ou ainda,

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = \int_0^L \exp\left(-\frac{s}{A}\right) ds \int_0^L \exp\left(-\frac{s'}{A}\right) ds' \quad (\text{A.23})$$

Resolvendo a integral, temos o seguinte resultado,

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = 2AL - 2A^2 \left[ 1 - \exp\left(-\frac{L}{A}\right) \right] \quad (\text{A.24})$$

Analisando as condições de extremo:

(i) Limite flexível ( $L \gg A$ )

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \simeq 2AL \quad (\text{A.25})$$

Nos mostrando que a distância entre as extremidades, para esta condição, depende do comprimento de persistência.

(ii) Limite rígido ( $L \ll A$ )

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \simeq L^2 \quad (\text{A.26})$$

Como era de se esperar, a distância entre os extremos, para esta condição, depende somente do comprimento de contorno, já que o polímero se encontra na conformação de vareta rígida.

## A.6 Modelo WLC

O modelo WLC é comumente usado para descrever o comportamento elástico do DNA para estiramentos pequenos (perto da conformação de equilíbrio), e para longos (perto da conformação retilínea), no regime entrópico. Este modelo nos fornece a expressão analítica para a curva de força por extensão do DNA no regime entrópico. Vamos, primeiramente, analisar estiramentos pequenos, e logo após estiramentos longos. Por fim, vamos chegar em uma expressão geral, válida para qualquer estiramento dentro do regime entrópico.

### A.6.1 Estiramentos perto da configuração de equilíbrio ( limite flexível )

Para este caso, a força para realizar o estiramento é pequena, e assim podemos considerar apenas o termo de primeira ordem da força, que é dada pela Lei de Hooke,

$$F = -kz \quad (\text{A.27})$$

sendo  $k$  a constante de mola, e  $z$  o estiramento da molécula.

Pelo princípio da equipartição da energia, o termo de energia potencial elástica da

molécula é dado por,

$$\frac{1}{2}kz^2 = \frac{3}{2}k_B T \quad (\text{A.28})$$

Por outro lado, como o estiramento é perto da configuração de equilíbrio,  $z$  pode ser aproximado como a distância entre os pontos extremos da molécula, ou seja,

$$z \simeq \sqrt{\langle r_{ee}^2 \rangle} \quad (\text{A.29})$$

Mas, sabemos que no limite flexível  $\langle r_{ee}^2 \rangle \sim 2AL$ , e então,

$$z \simeq \sqrt{2AL} \quad (\text{A.30})$$

Agora, substituindo a Equação (A.30) na Equação (A.28), encontramos a constante de mola  $k$  como sendo dada por,

$$k = \frac{3}{2} \frac{k_B T}{AL} \quad (\text{A.31})$$

Logo, escrevemos a força para este regime como,

$$F = -\frac{3}{2} \frac{k_B T}{A} \frac{z}{L} \quad (\text{A.32})$$

### A.6.2 Estiramentos longe da conformação de equilíbrio ( limite rígido )

Aqui, a situação é da molécula bastante estirada. Então, a energia é aproximada à energia do modelo de Kratky - Porod, excluindo o trabalho necessário, exercido pela força, para manter a molécula estirada. A expressão para a energia é então dada por,

$$E_{WLC} = \frac{1}{2}k_f \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - Fz \quad (\text{A.33})$$

sendo  $F$  um multiplicador de Lagrange para manter  $z$  constante.

Podemos dizer que  $z \sim L$ , e o vetor  $\hat{t}$  é praticamente paralelo à curva  $s$ , ou seja, a componente  $t_z$  é bem maior que as componentes  $t_x$  e  $t_y$ .

Sabemos que,

$$\hat{t} = t_x \hat{i} + t_y \hat{j} + t_z \hat{k} \quad (\text{A.34})$$

e,

$$|\hat{t}|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2 + |t_z|^2 = |t_z|^2 + |t_\perp|^2 = 1 \quad (\text{A.35})$$

onde,  $|t_\perp|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2$ .

Note que,

$$|t_z| = \sqrt{1 - |t_\perp|^2} \quad (\text{A.36})$$

e usando o fato de que  $|t_{\perp}|^2 \ll 1$ , fazemos uma aproximação em primeira ordem, e obtemos

$$|t_z| \simeq 1 - \frac{1}{2}|t_{\perp}|^2 \quad (\text{A.37})$$

Podemos ver que, como a molécula está bem estirada,

$$z = \int_0^L |t_z| ds \quad (\text{A.38})$$

Portanto, utilizando essas considerações, podemos reescrever a expressão para a energia como,

$$\begin{aligned} E_{WLC} &= \frac{1}{2}k_B T A \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - F \int_0^L \left( 1 - \frac{|t_{\perp}|}{2} \right) ds \\ &= \frac{1}{2}k_B T A \int_0^L \left[ A \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_B T} |t_{\perp}|^2 \right] ds - FL \end{aligned} \quad (\text{A.39})$$

usando a aproximação de que  $\partial t / \partial s \simeq \partial t_{\perp} / \partial s$ , já que  $t_z$  é praticamente constante ao longo da molécula.

Pela transformada de Fourier, podemos decompor a energia em modos normais,

$$\tilde{t}_{\perp}(q) = \int ds \exp(iqs) t_{\perp}(s) \quad (\text{A.40})$$

que nos dá o resultado para a energia,

$$E_{WLC} = \frac{1}{2}k_B T \int \frac{dd}{2\pi} \left[ Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right] |\tilde{t}_{\perp}(q)|^2 - FL \quad (\text{A.41})$$

Da Equação (A.41) podemos calcular o valor quadrático médio de  $|t_{\perp}|$ . Este cálculo é feito na referência [5]. E o resultado é dado por,

$$\langle |t_{\perp}|^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T}{FA}} \quad (\text{A.42})$$

Da aproximação,  $z/L \approx |t_z| \approx 1 - |t_{\perp}|^2/2$ , temos que

$$\frac{z}{L} \simeq 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{FA}} \quad (\text{A.43})$$

Da Equação (A.43), podemos isolar F para obter a expressão da força para o regime de longos estiramentos,

$$F = \frac{1}{4} \frac{k_B T}{A} \left[ \frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \right] \quad (\text{A.44})$$

### A.6.3 Estiramentos arbitrários

É importante notar neste ponto que a expressão para estiramentos longe do equilíbrio não recupera a expressão para estiramentos no equilíbrio, em uma expansão de primeira ordem, que é dada por,

$$F^{(1)} \simeq \frac{k_B T}{A} \left( \frac{1}{4} + \frac{z}{2L} \right) \quad (\text{A.45})$$

Para fazer a conexão entre os dois regimes, Marko e Siggia propuseram uma interpolação, adicionando dois termos de correção na expressão para estiramentos longe do equilíbrio, que são irrelevantes para  $z \sim L$ . A correção é feita adicionando o termo  $(z/L - 1/4)$  dentro do colchete da Equação (A.44). Com isso, chegamos na expressão de Marko e Siggia [15] para a força no regime entrópico em função da extensão,

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[ \frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right] \quad (\text{A.46})$$

que, com sua expansão em primeira ordem, recuperamos a expressão de força para estiramentos perto da conformação de equilíbrio.

Note que a Equação (A.46) diverge para  $z = L$ . Portanto esta expressão só é válida para  $z$  até  $\sim 0,9 L$ , já que acima deste valor a força não corresponde ao regime entrópico.

# Bibliografia

- [1] R. Dahm, “Friedrich Miescher and the discovery of DNA”, *Developmental biology*, **278(2)**, 274–288, 2005.
- [2] B. Albert, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walter, *Fundamentos da Biologia Celular*, **2. Ed.** Porto Alegre, 2006.
- [3] E. D. P. de Robertis, E. M. F. de Roberts, *Cell Biology - 5nd edition*, Philadelphia, 1970.
- [4] A.Zaha, H. B. Ferreira e L. M. P. Passaglia, *Biologia Molecular Básica*, **5. Ed.**, São Paulo, 2014.
- [5] Márcio Santos Rocha, *Pinças Ópticas: Experimento, Teoria e Aplicação no estudo da interação DNA-fármacos*. PhD thesis, Tese de Doutorado, UFMG, 2008.
- [6] Fabiano Augusto de Paula Crisafuli. *Caracterização da interação DNA-cisplatina usando pinça óptica e videomicroscopia*. 2012.
- [7] M. Santos Rocha. *Interações DNA-ligantes: uma introdução*.
- [8] I. Rouzina and V. A. Bloomfield, “DNA Bending by Small, Mobile Multivalent Cations”, *Biophysical Journal*, **74**, 3152-3164, 1998.
- [9] Arthur Ashkin, “Acceleration and trapping of particles by radiation pressure”, *Physical review letters*, **24(4)**, 156, 1970.
- [10] A Mazolli, PA Maia Neto, and HM Nussenzveig, “Theory of trapping forces in optical tweezers”, *In Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, **459**, 3021–3041, 2003.
- [11] P.A. Maia Neto and H.M. Nussenzveig, “Theory of optical tweezers”, *Europhysics Letters*, **50(5)**, 702, 2000.
- [12] J. R. Moffitt, Y. R. Chemla, S. B. Smith and C. Bustamante, “Recent advances in optical tweezers”, *Annu. Rev. Biochem.*, **77**, 205 – 228, 2008.

- [13] S.B. Smith, Y. Cui, and C. Bustamente, “Overstretching B-DNA: the elastic response of individual double-stranded and single-stranded DNA molecules”, *Science*, **271(5250)**,795, 1996.
- [14] M.D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S.M. Block, “Stretching DNA with optical tweezers”, *Biophysical journal*, **72(3)**,1335, 1997.
- [15] J.F. Marko and E.D. Siggia, “Stretching dna”, *Macromolecules*, **28(26)**,8759–8770, 1995.
- [16] A. A. Ouameur and H. Tajmir-Riahi, “Structural Analysis of DNA Interactions with Biogenic Polyamines and Cobalt(III)hexamine Studied by Fourier Transform Infrared and Capillary Electrophoresis”, *The Journal of Biological Chemistry*, **279**, 42041-42054, 2004.
- [17] J. Ruiz-Chica, M. A. Medina, F. Sánchez-Jiménez and F. J. Ramírez, “Fourier Transform Raman Study of the Structural Specificities on the Interaction between DNA and Biogenic Polyamines”, *Biophysical Journal*, **80**, 443-454, 2001.
- [18] L. van Dam, N. Korolev and L. Nordenskiöld, “Polyamine-nucleic acid interactions and the effects on structure in oriented DNA fibers”, *Nucleic Acids Research*, **30**, 419-428, 2002.
- [19] Y. Takeda, H. Nara, K. Iwahashi, Y. Mitsui and Y. Iitaka, “Preliminary Chemical and X-ray Studies on the Interactions of E. coli DNA with Putrescine”, *J. Biochem.*, **94**, 275-282, 1983.
- [20] A. Kabir and G. S. Kumar, “Binding of the Biogenic Polyamines to Deoxyribonucleic Acids of Varying Base Composition: Base Specificity and the Associated Energetics of the Interaction”, *PLoS ONE*, **8**, e70510, 2013.
- [21] M. J. Record, C . Anderson, T. Lohman, “Thermodynamic analysis of ion effects on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: The role of ion association or release, screening, and ion effects on water activity”, *Q. Rev. Biophys.*, **11**, 103-178, 1978.
- [22] R. Lavery, H. Sklenar, B. Pullman, “The flexibility of the nucleic acids: (III) The interaction of an aliphatic diamine, putrescine, with flexible B-DNA”, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, **3**, 1015-1031, 1986.
- [23] R. Wing, H. Drew et. al, “Crystal structure analysis of a complete turn of B-DNA”, *Nature*, **287**, 755-758, 1980.