

RANIELLA FALCHETTO BAZONI

**EFEITOS DE FORÇAS EXTERNAS NAS PROPRIEDADES  
MECÂNICAS DE COMPLEXOS DNA-LIGANTES.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Física Aplicada, para a obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2016

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

T

B364e  
2016 Bazoni, Raniella Falchetto, 1988-  
Efeito de forças externas nas propriedades mecânicas  
de complexos DNA-ligantes / Raniella Falchetto Bazoni. -  
Viçosa, MG, 2016.  
vi, 78f. : il. ; 29 cm.

Inclui apêndices.

Orientador : José Ésio Bessa Ramos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.71-78.

1. Ácido desoxirribonucleico - Análise. 2. Propriedades  
mecânicas. 3. Propriedades físicas. I. Universidade Federal  
de Viçosa. Departamento de Física. Programa de  
Pós-graduação em Física. II. Título.

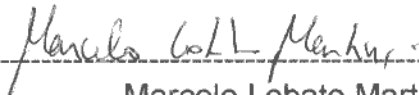
CDD. 22 ed. 572.86

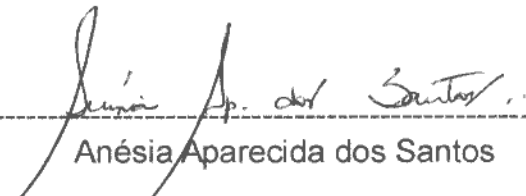
RANIELLA FALCHETTO BAZONI

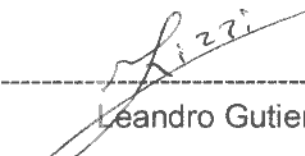
**EFEITO DE FORÇAS EXTERNAS NAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DE  
COMPLEXOS DNA-LIGANTES**

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

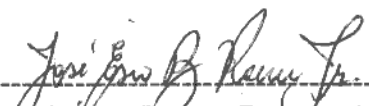
APROVADA: 01 de Agosto de 2016.

  
-----  
Marcelo Lobato Martins  
(Coorientador)

  
-----  
Anésia Aparecida dos Santos

  
-----  
Leandro Gutierrez Rizzi

  
-----  
Renko Jacob de Vries

  
-----  
José Ésio Bessa Ramos Júnior  
(Orientador)

# Agradecimentos

Agradeço a todos que não desistiram de mim. Agradeço a minha família: meu pai, minha mãe e meus irmãos. Agradeço também ao Arthur, Rodrigo e a família dele. Agradeço a todos os amigos que de alguma forma torceram por mim. Agradeço ao meu orientador, professor Ésio, ao meu coorientador, professor Marcio, e a todos os colegas de laboratório que tanto me ajudaram (Eduardo, Viviane, Josiane, Luana, Fabiano, Bruno e Thiago). Um agradecimento especial ao Carlos, por ter realizado parte dos experimentos comigo. Agradeço, por fim, a FAPEMIG, ao CNPq e a CAPES pelo auxílio financeiro, sem as agências de fomento nada disso poderia se tornar real.

# Sumário

<b>Resumo</b>	<b>iv</b>
<b>Abstract</b>	<b>v</b>
<b>1 Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2 A Molécula de DNA e Alguns Ligantes</b>	<b>4</b>
2.1 Principais características da molécula de DNA . . . . .	4
2.2 Conformações do DNA . . . . .	7
2.3 Manipulação e Propriedades Mecânicas . . . . .	9
2.4 Regime Entrópico e Entálpico . . . . .	11
2.5 Interação DNA-ligantes . . . . .	12
2.5.1 Intercalação . . . . .	13
2.5.2 Ligação Covalente . . . . .	15
2.5.3 Condensação do DNA . . . . .	16
2.5.4 Ligantes de Fenda . . . . .	18
<b>3 Caracterização</b>	<b>20</b>
3.1 Pinçamento Óptico (PO) . . . . .	20
3.1.1 Equipamento . . . . .	21
3.1.2 Funcionamento . . . . .	21
3.1.3 Preparação de amostras . . . . .	25
3.1.4 Procedimento . . . . .	26
3.1.5 Equação de Marko e Siggia . . . . .	29

3.2	Microscopia de Força Atômica (AFM) . . . . .	30
3.2.1	Equipamento . . . . .	31
3.2.2	Funcionamento . . . . .	31
3.2.3	Preparação de amostras . . . . .	32
3.2.4	Procedimento . . . . .	35
3.2.5	Worm-Like Chain 2D . . . . .	35
<b>4</b>	<b>Mudanças causadas pela <math>F_{ext,max}</math> em complexos com intercalantes</b>	<b>37</b>
4.1	Doxorrubicina, BrEt e o $\lambda$ -DNA . . . . .	38
4.2	Dependência dos complexos com a $F_{ext}$ . . . . .	38
<b>5</b>	<b>Experimentos com Bottle Brush</b>	<b>50</b>
5.1	DNA 3kbp e Sso7d-C8 . . . . .	51
5.2	Estudo do bottle brush formado com Sso7d-C8 . . . . .	53
<b>6</b>	<b>Conclusões e Perspectivas</b>	<b>61</b>
<b>A</b>	<b>Modelo WLC 3D</b>	<b>63</b>
A.0.1	Pequenos estiramentos . . . . .	63
A.0.2	Estiramentos longe da conformação de equilíbrio . . . . .	64
<b>B</b>	<b>Cálculo de <math>\langle R_{ee}^2 \rangle</math> para o modelo WLC 3D</b>	<b>67</b>
<b>C</b>	<b>Artigos Publicados e Submetidos.</b>	<b>69</b>

# Resumo

BAZONI, Raniella Falchetto Ph.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2016. **Efeitos de forças externas nas propriedades mecânicas de complexos DNA-ligantes.** Orientador: José Ésio Bessa Ramos. Coorientadores: Marcio Santos Rocha e Marcelo Lobato Martins.

Os estudos de complexos formados com a molécula de DNA normalmente visam obter informações sobre às propriedades físico-químicas para aplicações biomédicas, como por exemplo, o número de exclusão (quantos sítios de ligação do DNA são ocupados na interação), a constante de ligação  $k_i$ , etc. Neste trabalho, o enfoque se torna um pouco diferente. Além de realizar a caracterização físico-química (variação das propriedades mecânicas com a concentração do ligante) analisou-se a influência de forças externas nas propriedades mecânicas dos complexos. Já é sabido que no regime entálpico (altas forças) a estrutura do polímero se altera levando até à desnaturação. Porém, nosso objetivo foi estudar o regime onde as propriedades da molécula de DNA não se alteram, o regime entrópico. Os resultados mostram que os polímeros analisados (complexos formados com intercalantes (Doxorrubicina e Brometo de Etídio) e com a proteína recombinante Sso7d-C8) se comportam de maneira intrigante. Ou seja, as propriedades (principalmente elasticidade) dos complexos dependem da técnica utilizada e da força externa aplicada. Isso fornece a liberdade de sintetizar um polímero específico que modifique suas propriedades dependendo da força aplicada sob o mesmo. Além disso, o comportamento observado por esses polímeros equivale ao de uma mola convencional variando sua constante de força dentro do regime elástico, o que é algo inesperado, já que os cientistas do ramo consideram que forças dentro do regime entrópico não causam alterações nas constantes mecânicas.

# Abstract

BAZONI, Raniella Falchetto. Ph.Sc., Universidade Federal de Viçosa, august 2016. **External forces effects on mechanical properties of DNA-binding complexes.** Adviser: José Ézio Bessa Ramos. Co-Advisers: Marcio Santos Rocha and Marcelo Lobato Martins.

The studies performed with DNA molecules usually aim to obtain the physico-chemical properties for biomedical applications. Such as exclusion number (how many DNA sites will be occupied in interaction), the binding constant  $k_i$ , etc. In this work, the focus is a little different. In addition to perform the physico-chemical characterization (mechanical properties variation with the binder concentration), we analyzed the influence of an external force influence on the mechanical properties of the complex. It is a fact that in the Enthalpic regime (high forces) the polymer structure changes achieving the denaturation. However, our aim was to study the regime in which the properties of the DNA molecule do not change, the Entropic regime. The results show us that the behavior of the analyzed complexes (formed with intercalators (Doxorubicin and Etiditum Brometo) and with Sso7d-C8) is intriguing. In other words, their properties (mainly the elasticity) depend on the technique used and on the external forces applied. This give us the freedom of building an specific polymer that can change their properties depending on the applied force. Beside this, the behavior observed is analogous to a conventional spring modifying its own force constant within the elastic regime, what is something unexpected, as the scientists consider that forces, in the entropic regime, do not modify the complex properties.

# Capítulo 1

## Introdução

Os polímeros são macromoléculas construídas pela repetição de subunidades chamadas monômeros [1,2]. As suas propriedades os tornaram amplamente utilizados, desde a fabricação de pneus até em implantes cirúrgicos [3,4].

Além dos polímeros sintéticos, existem polímeros naturais extremamente importantes para a vida. O portador da informação genética (DNA) é um polímero, bem como o RNA. As propriedades destes polímeros naturais já são bem conhecidas na literatura [1,5–8]. Porém, pode-se inserir uma nova variável ao sistema cuja interação com a molécula de DNA resulte em um novo conjunto de propriedades. A essa nova variável dá-se o nome de ligante. Essas moléculas interagem de forma física ou química (ligações) com os polímeros modificando suas propriedades originais. No caso do DNA, existem ligantes que intercalam entre os pares de base, que se ligam covalentemente, que se encaixam entre a fenda maior ou menor da estrutura secundária helicoidal<sup>1</sup> e outros que interagem sem preferência por sítios. Pensando dessa forma, pode-se construir e estudar novos polímeros com estrutura e propriedades controladas.

No estudo dos polímeros, os ácidos desoxirribonucleicos apresentam destaque. Isso devido as intensas investidas no tratamento de cânceres e o desenvolvimento de terapias, mapeamento e sequenciamento genéticos [9]. Experimentos para compreender a origem da interação entre a molécula de DNA e os vários ligantes são exaustivamente realizados. As técnicas mais utilizadas na caracterização dos complexos são: os pinça-

---

<sup>1</sup>Estrutura do DNA fita dupla em condições fisiológicas.

## 1 Introdução

---

mentos (óptico (PO) e magnético (PM)), microscopia e espectroscopia de fluorescência, microscopia de força atômica (AFM) e espalhamento de luz [10–26]. É interessante ressaltar que com somente uma técnica experimental (por exemplo, pinça óptica) todas as propriedades físico-químicas podem ser obtidas [27]. Observando-se a evolução das propriedades mecânicas com o aumento da concentração total do ligante.

Já que a molécula de DNA e seus complexos se comportam como molas entrópicas em soluções <sup>2</sup>, usualmente as caracterizações visam as propriedades elásticas e alterações em seu comprimento [1,5]. O comprimento de persistência  $A$  está relacionado com a elasticidade do complexo, enquanto que o comprimento de contorno  $L_o$  é dado pela distância ponta a ponta quando o polímero está completamente estirado. Por exemplo, em deposições de complexos formados com intercalantes observou-se um aumento tanto na rigidez ( $A$ ) quanto no comprimento ( $L_o$ ) quando a concentração do ligante foi acrescida.

Experimentos que utilizam forças externas <sup>3</sup> devem ser realizados com cautela. Isso porque pode-se forçar excessivamente o polímero causando modificações que podem ser irreversíveis (desnaturação). Para evitar tal fenômeno, deve-se trabalhar dentro do chamado regime de baixas forças, ou seja, o regime entrópico. Nesse regime, as forças são da ordem de poucos  $pN$  e não causam alterações nas propriedades mecânicas da molécula de DNA. Assim, após o experimento o polímero retornará para a posição de equilíbrio original. Mas e quanto aos complexos? Será que suas propriedades também serão independentes da força dentro do regime entrópico?

Existem trabalhos na literatura que nos instigam a procurar respostas para essas perguntas. Experimentos de pinçamento com complexos formados com intercalantes apresentam resultados distintos [10–13,16,22–25,28]. Resultados de fluorescência e AFM diferem muito dos de pinçamentos para os mesmos complexos [10–13,16–21,28]. O ponto em questão é que todos foram realizados dentro do regime de baixas forças e analisavam complexos formados com intercalantes (Doxorrubicina, Brometo de Etídio, etc.).

---

<sup>2</sup>A molécula de DNA em solução à uma temperatura  $T$  ( $T \neq 0$ ) se chocando com as moléculas do meio se comporta como uma mola, por isso mola entrópica.

<sup>3</sup>Os pinçamentos (óptico e magnético) são exemplos de experimentos que utilizam forças externas.

## 1 Introdução

---

Com o intuito de averiguar tal fenômeno, utilizou-se a pinça óptica para estudar complexos formados com os intercalantes Doxorrubicina e Brometo de Etídio (BrEt). O experimento consiste em submeter os complexos a diferentes forças externas máximas ( $F_{ext,max}$ ), dentro do regime entrópico. Assim, pode-se constatar se há alguma dependência de  $A$  e  $L_o$  com a  $F_{ext,max}$ . O capítulo 4 fornece mais informações.

Além do trabalho acima descrito, analisamos o complexo formado com uma proteína recombinante (Sso7d-C8) de duas maneiras. Utilizamos primeiramente a pinça óptica (PO) e em seguida a caracterização foi realizada via microscopia de força atômica (AFM). Esta proteína, formada por uma proteína de uma arqueobactéria, Sso7d (63 aminoácidos) e uma cauda de aminoácidos, C8(796 aminoácidos), (desenvolvida pelo grupo do professor Renko de Vries, Universidade de Wageningen, Holanda) essencialmente liga-se a moléculas de DNA de maneira não-específica (eletrostática => independente da sequência de pares de base) e isola essa molécula. Isto é, evita a agregação dos complexos, mesmo em soluções concentradas com DNA de alto peso molecular. [29]. O complexo final com várias proteínas ligadas é conhecido como "bottle brush", devido às saliências que são formadas pela cauda de aminoácidos hidrofílica (C8). O capítulo 5 oferece mais informações a cerca do polímero DNA-Sso7d-C8.

Resumindo, este trabalho visa estudar algumas propriedades físico-químicas, como número de exclusão de complexos DNA-ligantes, analisar o comportamento desses complexos como molas entrópicas dentro do regime de baixas forças, estudando a dependência dos parâmetros mecânicos com a  $F_{ext,max}$ , e, finalmente, discutir a possível síntese de polímeros que respondam efetivamente de forma distinta a forças externas.

Esta tese apresenta 6 capítulos, sendo que no capítulo 2, serão discutidos: as principais características e propriedades dos nucleotídeos e das estruturas formadas com o mesmo, bem como os principais modos de ligação entre os ligantes e a molécula de DNA. O próximo capítulo (capítulo 3) trata das técnicas experimentais utilizadas e dos modelos matemáticos para extrair  $A$  e  $L_o$ . No capítulo 4 os intercalantes, o DNA e os resultados do experimento de variação de força externa serão abordados. Os experimentos do complexo "bottle brush" serão discutidos no capítulo 5. Por fim, o capítulo 6 apresenta as conclusões e as perspectivas para novos trabalhos.

# Capítulo 2

## A Molécula de DNA e Alguns Ligantes

Os objetos de estudo deste trabalho são: a molécula de DNA e complexos formados com a mesma. Portanto, um bom entendimento da estrutura da molécula de DNA e de suas interações básicas se faz necessário. Logo, neste capítulo introduziremos as principais características e propriedades do DNA e de alguns ligantes, bem como de suas principais interações.

### 2.1 Principais características da molécula de DNA

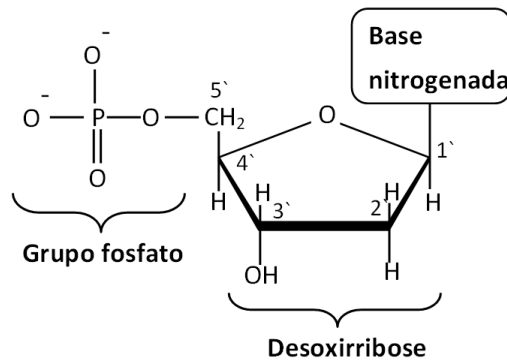
A elucidação do papel da molécula de DNA como portadora da informação genética iniciou uma grande busca pelo conhecimento de sua estrutura tridimensional e química por volta dos anos 40 e 50. Assim, em 1953, utilizando dados de raios-x e de composição química, Watson e Crick idealizaram uma estrutura secundária helicoidal para a mesma. Este trabalho culminou com o prêmio Nobel em 1960. [5–7]

Desde então considera-se que a molécula de DNA é constituída por monômeros (subunidades) conhecidos como nucleotídios. Como pode ser visto na figura 2.1, estes são formados por uma base nitrogenada juntamente com um açúcar (desoxirribose) e um grupo fosfato. Cada grupo fosfato liga-se ao carbonos 5' do açúcar por meio da ligação éster, enquanto que a base nitrogenada liga-se ao carbono 1' por meio da ligação glicosídica.

Ao se aproximarem, os nucleotídios ligam-se sequencialmente por meio de liga-

## 2.1 Características básicas

---



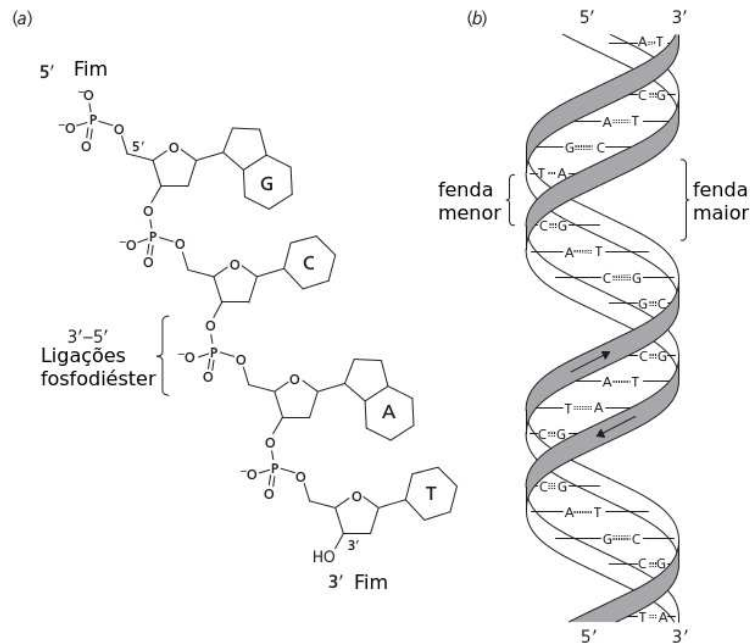
**Figura 2.1:** Esquema da constituição de um nucleotídeo: um grupo fosfato, um açúcar (desoxirribose) e uma base nitrogenada.

ções fosfo-diéster. Esta longa cadeia é conhecida como a estrutura primária da molécula de DNA e pode ser observada na letra a) da figura 2.2. Pode-se observar também que a orientação dos carbonos do açúcar ao longo da cadeia formada é a mesma. Portanto, a orientação relativa para a molécula de DNA pode ser padronizada, sua orientação convencional é  $5' \rightarrow 3'$ .

Quando duas fitas com bases complementares se aproximam (veja o processo de duplicação em [7,30,31]), há a formação de ligações de hidrogênio entre as bases e as duas fitas se organizam de tal forma que a estrutura final seja uma dupla hélice, também conhecida como estrutura secundária do DNA [27,31]. A figura 2.2 nos mostra que a dupla hélice não é perfeitamente simétrica. Pois a interação entre as bases nitrogenadas e as desoxirriboses geram ligações glicosídicas em cada um dos corrimões da molécula e, além disso, estas não estão no mesmo plano. Isso acaba gerando uma torção interna assimétrica e conseqüentemente um sulco (fenda) menor e outro maior [6,31].

As bases nitrogenadas podem ser de 4 tipos, no caso da molécula de DNA: adenina(A), timina(T), guanina(G) e citosina(C). A correspondência entre elas é única segundo o pareamento convencional do tipo Watson-Crick, o que significa que a adenina só se pareia com a timina, enquanto a guanina se pareia com a citosina. Logo, a quantidade de adenina é igual a de timina ( $A=T$ ) e a de citosina igual a da guanina ( $C=G$ ), porém as quantidades de timina variam bastante das de citosina (Regra de

## 2.1 Características básicas



**Figura 2.2:** Em a) tem-se o esquema de vários nucleotídios ligados por ligações fosfodiéster onde pode-se determinar uma direção específica para o DNA ( $5' \rightarrow 3'$  por exemplo). Em b) tem-se um esquema da dupla hélice. [6]

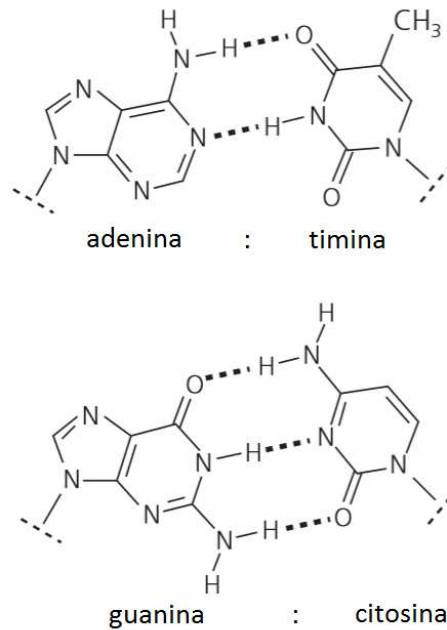
Chagaff).

Quanto à estrutura química, a guanina (G) e a adenina (A) são muito semelhantes e por esse motivo são classificadas como purinas, enquanto que a timina (T) e a citosina (C) são classificadas como pirimidinas (figura 2.3). Como as bases pirimidinas são usualmente menores que as purinas e as correspondências ocorrem entre purinas e pirimidinas, as dimensões são mantidas constantes entre pares distintos após a formação da dupla hélice. A figura 2.3 nos mostra a correspondência entre as bases e além disso, evidencia a maior estabilidade da interação entre citosina e guanina, já que a quantidade de ligações de hidrogênio no par CG (3 ligações) é maior do que no par AT (2 ligações) [5–7].

Note que a estrutura secundária do DNA é um empecílo para as funções fundamentais da célula já que a leitura do código genético e a consequente replicação dependem de uma total abertura da dupla fita. E para que essa abertura ocorra o giro da dupla hélice deve ser desfeito com a posterior quebra das ligações de hidrogênio.

## 2.2 Formas da molécula de DNA em condições fisiológicas

---



**Figura 2.3:** Esquema do pareamento entre os pares de bases nitrogenadas. Três pontes de hidrogênio são formadas entre a guanina e a citosina e duas entre a timina e a adenina [6,7].

As ligações de hidrogênio são relativamente fracas, da ordem de  $1 - 10 \text{ kJ/mol}$  (cerca de 10x menor do que uma ligação covalente) [32], e podem, em determinadas situações, se romper formando duas fitas simples (desnaturação). Mesmo sendo um efeito coletivo, a desnaturação pode ser parcial ou total. Sua causa pode ser a temperatura, o meio no qual o DNA está inserido ou a ação de forças externas [10–13,28].

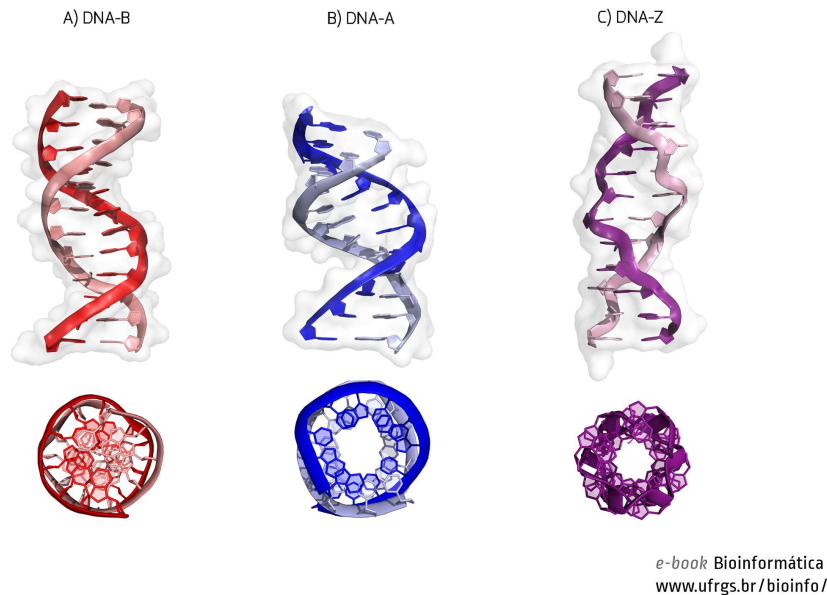
Mesmo após a desnaturação parcial, as ligações de hidrogênio podem se refazer. Isso depende do processo utilizado na desnaturação ser reversível (lento ou quase estático) e também do processo utilizado na renaturação. Por exemplo, caso a desnaturação ocorra devido ao aumento da temperatura, o decréscimo controlado da mesma pode renaturar o DNA [1,5,8,33].

## 2.2 Conformações do DNA

Existem basicamente três conformações estruturais da molécula de DNA: as formas B, A e Z [5–7]. A forma B é a mais encontrada na natureza e é objeto de estudo

## 2.3 Pinças e propriedades do DNA

---



**Figura 2.4:** Em a) tem-se a forma mais comum do DNA em condições fisiológicas, ou forma B. Em b) tem-se a forma A e em c) a forma Z.

neste trabalho. Nesta forma a distância entre os pares de base é aproximadamente 0.34nm, a hélice apresenta um diâmetro médio de 2.37nm e possui por volta de 10.4 pares de base de uma fenda a outra. Comparando com a forma B, a forma A é menor e mais grossa, tendo 0.26nm entre os pares de base e um diâmetro de 2.55nm. Completamente distinta, tem-se a forma Z, a qual possui a hélice com o giro para a esquerda ao contrário das outras duas. Além disso, ela é mais fina e comprida, com 0.456nm entre cada par de base e um diâmetro de 1.84nm (figura 2.4).

Os dados anteriormente mencionados foram obtidos inicialmente com a interpretação de medidas de raios-x, podendo haver uma variação sequencial local, alterando ligeiramente os parâmetros.

As conformações dependem principalmente do meio onde o DNA foi inserido (humidade e força iônica), ou seja, ele pode transitar entre uma conformação e outra dependendo do ambiente. Isso supondo um ambiente com uma quantidade ínfima de proteínas.

### 2.3 Manipulação e Propriedades Mecânicas

Quando polímeros semi-flexíveis (molas entrópicas) são inseridos em soluções (usualmente soluções-tampão) suas conformações se alteram até que um estado de equilíbrio termodinâmico seja atingido com o meio. Isso ocorre devido a uma série de colisões entre as moléculas do meio e o polímero, além de interações entre segmentos adjacentes do mesmo polímero (negligenciado devido à espécie do experimento) e entre polímeros distintos. Estas interações modificam a disposição do polímero em solução fazendo com que as extremidades da molécula de DNA linear se aproximem ou se afastem. Porém esta distância não depende somente da solução, depende também da rigidez do próprio polímero [1,2,5].

Quando o estado de equilíbrio com o meio é atingido, as colisões não são capazes de modificar o valor médio da distância entre as pontas <sup>1</sup> (distância ponta-a-ponta) e as configurações atingem uma saturação. São muitas, porém este número não irá mais aumentar, o que nos leva a um estado de entropia máxima. De acordo com a expressão abaixo:

$$S = k_B \ln \Omega, \quad (2.1)$$

ela fornece a entropia ( $S$ ) em relação ao número de configurações possíveis para o sistema ( $\Omega$ ), com  $k_B$  sendo a constante de Boltzmann. Essa expressão nos mostra que quanto maior o número de configurações maior será a entropia do sistema e, no equilíbrio, este número será máximo.

Como o valor médio da distância ponta-à-ponta da molécula de DNA no equilíbrio termodinâmico não será modificado, caso o intuito seja realizar experimentos de estiramento, compressão e até mesmo torção, forças externas deverão ser inseridas para que estas alterações ocorram. A figura 2.5 mostra um esquema de uma molécula de DNA sendo manipulada indiretamente por meio de microesferas. A microesfera é

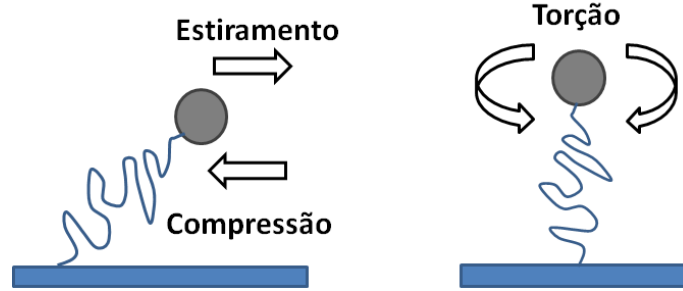
---

<sup>1</sup>A distância ponta-a-ponta pode ser definida como a diferença entre os vetores que definem o início e o fim do polímero, ou seja,  $r_{p-a-p} = \vec{r}_f - \vec{r}_i$ . Como essa quantidade varia devido as flutuações, ela é medida em relação a um valor médio.

## 2.3 Pinças e propriedades do DNA

---

pinçada e dependendo do movimento desta, a molécula será estirada, comprimida ou torcida.



**Figura 2.5:** À esquerda tem-se o esquema de estiramento e compressão de uma molécula de DNA presa a uma microesfera. E, á direita, tem-se o esquema da torção do mesmo sistema.

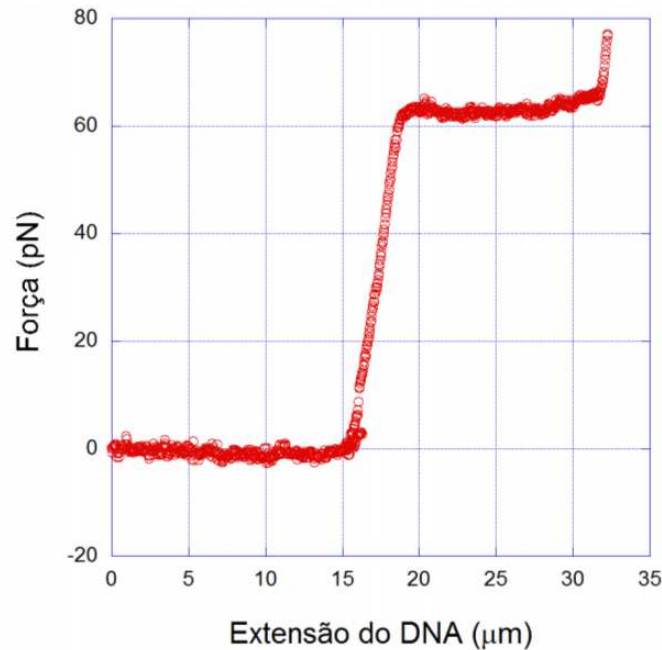
Parte dos experimentos foi realizada em uma pinça óptica, que usualmente é empregada em experimentos de estiramento com forças da ordem de picoNewtons ( $pN = 10^{-12}N$ ). Logo, o esquema utilizado no nosso experimento será o mostrado na esquerda da figura 2.5. Neste tipo de experimento, os resultados são curvas de forças por extensão do DNA, observe a figura 2.6. É possível ainda observar um platô acima de 60pN (regime Entálpico) resultado da quebra das ligações de hidrogênio do DNA [1].

Por fim, o experimento tem o intuito de determinar algumas propriedades mecânicas da molécula de DNA [1,2,5,33]. No nosso caso, estas são o comprimento de contorno  $L_o$  e o comprimento de persistência  $A$  (figura 2.7), usualmente determinados ajustando o modelo Worm-Like Chain às curvas experimentais. O comprimento de contorno  $L_o$  é a distância ponta-à-ponta da molécula quando a mesma encontra-se completamente estirada. Já o comprimento de persistência  $A$  ou comprimento de correlação nos fornece informações sobre a elasticidade da molécula, ou seja, quanto maior o número de dobras do polímero (mais flexível) menor é o valor de  $A$ . A definição de  $A$  é dada por:

$$A = \beta k_f, \quad (2.2)$$

## 2.4 Pinças e propriedades do DNA

---



**Figura 2.6:** Curva de força por extensão de um DNA puro, dados experimentais.

com  $\beta = K_B T^2$  e  $k_f^3$  sendo a rigidez flexural do polímero.

De acordo com a definição,  $A$  é uma característica intrínseca do polímero em solução, no caso o DNA, o que nos mostra que é uma propriedade independente da técnica utilizada na caracterização. Baseando-se em um DNA na conformação  $B$  e conhecendo-se bem as propriedades mecânicas do mesmo, adicionamos ligantes ao meio e as mudanças que aparecerem serão interpretadas como devidas a interação do DNA com o ligante.

## 2.4 Regime Entrópico e Entálpico

Existem dois regimes de forças utilizados em experimentos de estiramento com moléculas de DNAs, cada um deles direcionado para um estudo em especial. Alguns são utilizados para a análise de modos de ligação e outros na descompactação e desnaturação de complexos.

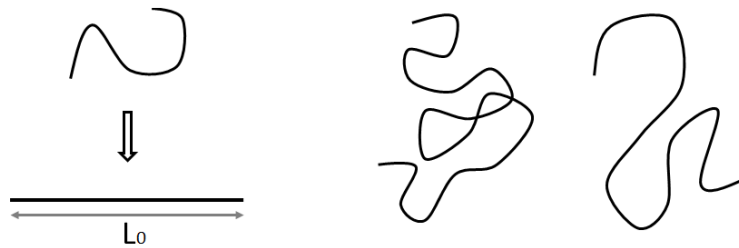
---

<sup>2</sup> $K_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  a temperatura.

<sup>3</sup> $k_f$  está relacionado a estrutura do polímero e a sua distribuição de carga em solução.

## 2.5 Complexos formados com a molécula de DNA

---



**Figura 2.7:** À esquerda, tem-se o comprimento de contorno ( $L_0$ ). E, á direita, tem-se duas configurações que descrevem um comprimento de persistência (A) menor e maior, respectivamente.

O primeiro deles é o regime entrópico, o qual determina uma faixa de forças onde a estrutura química do DNA não é alterada, ou seja, não há quebra de ligações. Estas forças estão entre  $2 - 15pN$  e neste trabalho utilizamos valores máximos dentro desta faixa. Ou seja, este trabalho foi todo desenvolvido dentro do regime entrópico onde as forças não são capazes de danificar o polímero puro. Neste regime, após o polímero ser estirado ele retorna à conformação de equilíbrio original devido a força restauradora entrópica [14].

O segundo é conhecido como regime entálpico e descreve a faixa de forças onde as características intrínsecas do material se alteram, por exemplo, a ruptura das ligações de hidrogênio, figura 2.6. Para um DNA na conformação B em condições fisiológicas este valor é em torno de  $65pN$ . Quando este é alcançado, observa-se um patamar de desnaturação caracterizando algo que seria como uma mudança de fase na estrutura da molécula de DNA. Neste regime, não necessariamente o polímero volta a conformação de equilíbrio original, ou seja, o processo pode ser irreversível [14].

## 2.5 Interação DNA-ligantes

Aos agentes químicos que de alguma forma interagem com a molécula de DNA dá-se a designação ligante. Estes ligantes podem interagir de forma simplesmente eletrostática<sup>4</sup> como é o caso de vários tipos de proteínas, como a Sso7d-C8 (utilizada neste

---

<sup>4</sup>Quando trata-se de interação eletrostática nesta tese estamos falando de atração entre íons e cátions em solução sem trocas e nem compartilhamento de elétrons.

## 2.5 Complexos formados com a molécula de DNA

---

trabalho). Também há a possibilidade de interagirem formando ligações covalentes com as bases. Além disso, determinados compostos aromáticos apresentam a capacidade de se acomodar entre os pares de base deformando a estrutura da sua vizinhança.

Nesta seção introduziremos os principais modos de ligação com a molécula de DNA.

### 2.5.1 Intercalação

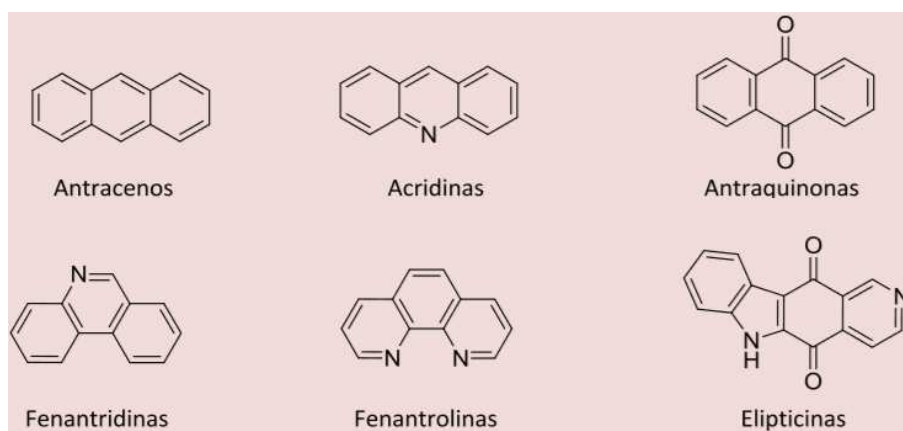
Vários compostos que apresentam anéis aromáticos planares se encaixam entre os pares de base, levando a intercalação. Dentre eles tem-se corantes de eletroforese, os antibióticos antraciclínicos, o psoralen (sem UV), o brometo de etídio, entre outros. A figura 2.8 mostra as estruturas das seis famílias dos intercalantes clássicos, dos quais são originados os demais.

A intercalação é a simples acomodação dos anéis do ligante entre os pares de base, e o que gera a estabilidade desta ligação não covalente são as interações eletrostáticas, hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e principalmente as interações de empilhamento  $\pi$  entre os orbitais aromáticos heterocíclicos dos pares de base e os anéis aromáticos do agente intercalante. Este tipo de interação causa modificações estruturais no complexo final, como um aumento do comprimento efetivo da molécula, além de uma torção e tensão devido ao volume ocupado entre os pares de base por esta nova molécula. [34]

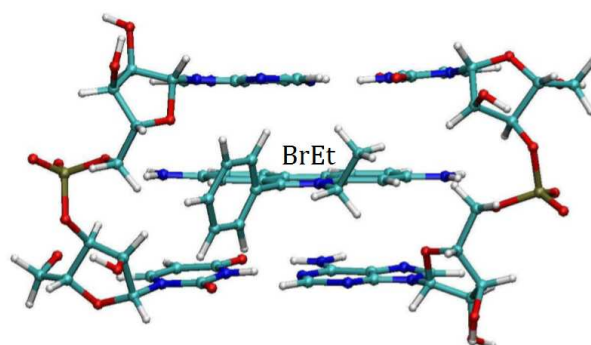
A figura 2.9 esquematiza a intercalação pelo Brometo de Etídio (BrEt), representante da família dos fenantridinas. Este composto é utilizado como corante de eletroforese em gel com o intuito de separar moléculas (DNA) de comprimento distintos, visualizar complexos, além de estudar a competição entre ligantes distintos. Como o BrEt é intercalante e a fisico-química dele é conhecida, pode ser utilizado como competidor em solução com outros intercalantes para estimar sua fisico-química, obtendo, assim, a constante de ligação ( $K_a$ ) e o número de exclusão ( $n_e$ ) dos compostos adicionais.

Ao se intercalar, a molécula de BrEt faz com que a distância entre pares de base aumente 0.34 nm em relação ao puro, além de girar a molécula no sentido de desfazer

## 2.5 Complexos formados com a molécula de DNA



**Figura 2.8:** Esquema estrutural dos intercalantes clássicos [34].



**Figura 2.9:** Esquema da molécula de brometo de etídio (BrEt) intercalada entre pares de base consecutivos de uma molécula de DNA [34].

a helice de  $26^\circ$ .

A doxorubicina e a daunomicina (ou daunorrubicina) são conhecidos como antibióticos antraciclínicos, originados da família das antraquinonas. São fármacos amplamente utilizados em quimioterapias, como em tratamentos de leucemia, sarcomas, mielomas, neuroblastomas e vários tipos de cânceres na região da cabeça, tórax e abdômem. A constante de ligação da doxorubicina com a molécula de DNA é alta, por volta de  $10^8 M^{-1}$ , e existem trabalhos que afirmam que este composto apresenta mais de um modo de ligação [27].

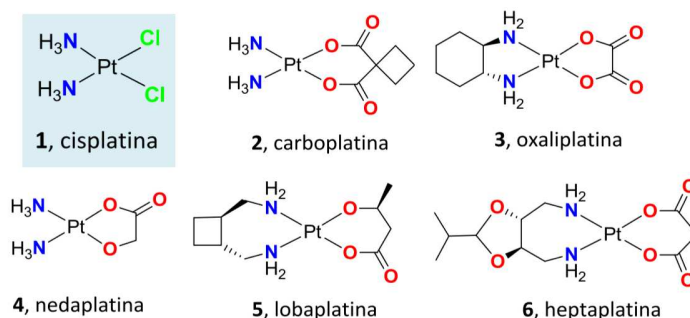
Os psoralens são compostos produzidos por algumas plantas (*Psoralea caryifolia*, L.) como um mecanismo de defesa contra predadores. O psoralen é fotosensível e

## 2.5 Complexos formados com a molécula de DNA

apresenta a propriedade de se ligar covalentemente a molécula de DNA quando exposto a luz ultravioleta do tipo A ( 320-400 nm) não sendo mais possível desfazer a intercalação. Sua utilização é não invasiva sendo aplicado em tratamentos de doenças de pele, como o vitiligo, psoríase, melanomas, entre outras. No tratamento, inicialmente o psoralen é inserido para sensibilizar a área e em seguida raios UVA são ministrados em pulsos para que o câncer seja dizimado ou minimizado. [14]

### 2.5.2 Ligação Covalente

A figura 2.10 mostra a cisplatina (em azul) e outros compostos derivados da platina, os quais interagem covalentemente com a molécula de DNA. Apesar de todos os compostos da figura 2.10 serem aprovados na utilização de quimioterapias, alguns deles possuem comércio restrito à somente alguns países, como a China e o Japão. [35]



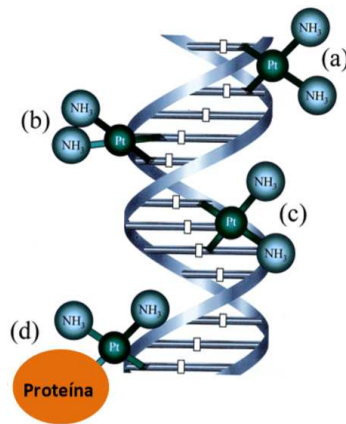
**Figura 2.10:** Alguns complexos de platinas registrados para o uso clínico. [35]

Quando uma interação DNA-composto de platina ocorre, ligações covalentes se formam e a estas ligações dá-se o nome de aductos [35]. Quando somente uma ligação se forma, tem-se um monoadducto e quando duas ligações se formam, um diadducto.

A figura 2.11 mostra as possíveis ligações da cisplatina com o DNA. Como se pode notar, as ligações entre pares de base consecutivos, entre as fitas, entre pares de base não sequenciais, entre uma fita e uma proteína são todas interações possíveis para este tipo de modo de ligação. Este tipo de interação leva a torções na molécula de DNA, induzindo a apoptose (morte celular programada) e necrose da célula [35].

## 2.5 Complexos formados com a molécula de DNA

---



**Figura 2.11:** Tipos de interações possíveis da cisplatina com a molécula de DNA. [35]

O psoralen, vide seção 2.5.1, quando exposto a luz ultravioleta com  $\lambda \sim 320\text{-}400\text{nm}$  (UVA) se liga covalentemente à molécula formando monoadductos e diadductos dependendo da interação. Este tipo de ligação ocorre entre o psoralen e uma base pirimidina após a absorção de um fóton. Caso um outro fóton seja absorvido, uma nova ligação pode ocorrer, porém somente se uma outra base pirimidina estiver próxima. Caso a ligação se dê entre uma fita e a outra, o diadducto formado passa a se chamar ligação-cruzada (cross-link em inglês). A este processo de absorção e formação dos cross-links dá-se o nome de "processo de dois fótons". Além disso, existem trabalhos que indicam que, mesmo após o aducto ser formado com UVA, ao inserir UVB posteriormente ( $\lambda \sim 240\text{-}310\text{nm}$ ) a ligação covalente pode ser desfeita, retornando à intercalação. [14]

### 2.5.3 Condensação do DNA

A molécula de DNA em solução apresenta uma distribuição de carga negativa discreta de duas cargas elementares por distância entre pares de base (0,34nm). Esta distribuição aparece devido à dissociação dos grupos fosfato ( $PO_4^-$ ), o que libera na solução contraíons ( $Na^+, K^+ \dots$ ). Devido à carga negativa da molécula de DNA, imagina-se que esta tenha uma conformação de bastão em solução, devido à repulsão eletrostática entre os grupos fosfato. Porém, a interação da molécula com os contraíons faz com

## 2.5 Complexos formados com a molécula de DNA

---

que esta repulsão diminua. De acordo com o trabalho [36], o polieletrólito em solução deve ter o espaçamento entre as cargas maior do que 1 comprimento de Bjerrum ( $l_b = \frac{e^2}{4\pi\epsilon\epsilon_0 b(k_B T)^2}$ , onde  $e$  é a carga elementar,  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $\epsilon$  é a permissividade elétrica do meio,  $\epsilon_0$  é a permissividade elétrica do vácuo,  $b$  a distância entre as cargas e  $T$  a temperatura absoluta). Caso isso não aconteça, os contraíons se condensarão no DNA até que a densidade de carga seja 1 carga por  $l_b$ . [36]

Devido à carga negativa do DNA em solução, cátions de outras espécies (contraíons) inseridos serão capazes de interagir com o sistema e modificá-lo. As interações mais relevantes ocorrem entre macro-íons e íons multivalentes, como  $Mg^{2+}$  e o  $Ni^{2+}$ .

Em condições fisiológicas, o DNA encontra-se em uma solução tampão com diversos sais, como o  $Na^+$ ,  $K^+$  e  $Cl^-$  [7,9]. Estes íons se distribuem pela solução e os cátions se aproximam da molécula diminuindo a repulsão e aumentando a quantidade de dobras da molécula. O potencial gerado pela interação dos íons com os polieletrólitos é descrito utilizando uma teoria de campo médio, baseada na equação de Poisson-Boltzmann. Neste modelo, trata-se a molécula como sendo um cilindro com densidade de carga homogênea, o solvente como sendo um contínuo caracterizado por  $\epsilon$  e considera-se o sistema em equilíbrio termodinâmico, portanto os íons se distribuem de acordo com a distribuição de Boltzmann. Com base nessas considerações pode-se utilizar a equação de Poisson-Boltzmann para obter o potencial eletrostático. [5,37]

$$\nabla^2 \phi(\vec{r}) = -\frac{\sum_i z_i e \rho_i^0 e^{-\frac{z_i e \phi(\vec{r})}{K_B T}}}{\epsilon}, \quad (2.3)$$

onde  $z_i$  é a valência do íon do tipo  $i$ ,  $e$  é a carga elementar,  $\epsilon$  é a permissividade elétrica do meio,  $\rho_i^0$  é a concentração da espécie  $i$  em solução,  $K_B$  é a constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura absoluta. Para um sistema no qual a concentração dos íons é relativamente baixa e onde a densidade de carga do polieletrólito não seja elevada, pode-se expandir a exponencial e analisar somente os primeiros termos (linearizar a equação de Poisson-Boltzmann). Esta aproximação foi feita no trabalho de Debye-Huckel [37] e fornece uma equação do tipo:

## 2.5 Complexos formados com a molécula de DNA

---

$$\nabla^2\phi(\vec{r}) = k^2\phi(\vec{r}). \quad (2.4)$$

A quantidade  $k^{-1}$  é conhecida como o comprimento de Debye, devido à sua unidade e mede a extensão da nuvem eletrônica ao redor do polieletrólito.

Mesmo sendo uma aproximação, corrobora vários resultados experimentais relacionados à íons monovalentes e condensações. Porém, quanto aos resultados relacionados aos íons multivalentes muitas dúvidas ainda permanecem, pois efeitos inesperados ocorrem. Um exemplo disso é a atração entre objetos carregados com cargas iguais.

Exemplos de agentes condensadores são a *espermina*<sup>4+</sup>, a *espermidina*<sup>3+</sup>, entre outros. Além da condensação de origem eletrostática, tem-se também as interações de depleção de alto peso molecular. Polímeros extensos em quantidades elevadas quando interagindo com a molécula de DNA forçam a compactação, o que pode dar origem a um cristal de DNA. Polímeros como o PEG (polietilenoglicol -> 8000- 20000) são agentes neutros responsáveis pela condensação sem forças eletrostáticas relacionadas. [26]

### 2.5.4 Ligantes de Fenda

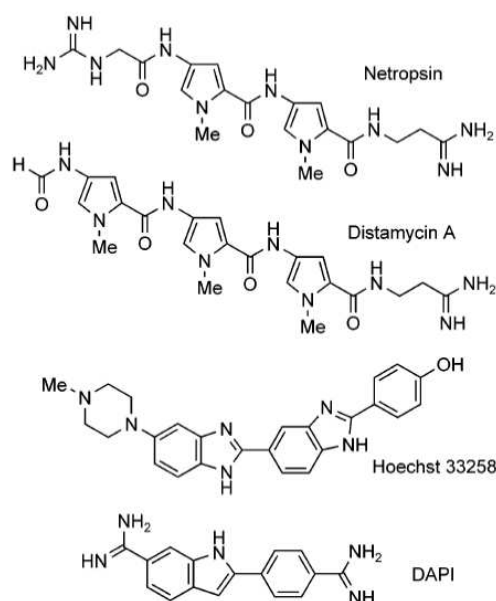
Dentro do grupo de compostos que interagem eletrostaticamente, existem os que preferem a interação com as fendas do DNA, os chamados ligantes de fenda. Usualmente se ligam em sulcos (fendas) com sítios AT na molécula.

A figura 2.12 nos mostra 4 exemplos de ligantes de fenda. A distamisina A e a netropsina são ligantes que interagem também com a fenda menor do DNA. Além disso, estes compostos podem interagir por forças de Van der Waals e com as ligações de hidrogênio. Outros são corantes, como o DAPI. Além dos exemplos da figura 2.12 existem outros corantes como o YO e o YOYO. [15,38]

O HOECHST 33258 é um composto artificial desenvolvido pela Companhia farmacêutica Hoechst. Ele é precursor da família dos bisbenzimidis (2.5.1) e muito utilizado como corante para marcar moléculas de DNA em experimentos de fluorescência. Trabalhos recentes mostraram que além de ser um ligante de fenda menor, este composto apresenta outro modo de ligação. Ele é um intercalante e portanto, tem

## 2.5 Complexos formados com a molécula de DNA

---



**Figura 2.12:** Quatro exemplos de ligantes de fenda [38].

interação com pares CG do DNA. Além disso, a interação com a fenda menor apresenta uma constante de ligação maior do que a intercalação. [15]

Muitos compostos não apresentam exclusivamente um modo de ligação sendo uma combinação de vários. Este é o caso do HOECHST 33258, da doxorubicina, YO, YOYO, entre outros. Cabe aos cientistas estudá-los, desacoplar os modos de ligação e compreendê-los para posteriormente aplicá-los [15].

# Capítulo 3

## Caracterização

As técnicas utilizadas na caracterização dos complexos bem como os modelos matemáticos utilizados para extrair as propriedades mecânicas serão abordados neste capítulo. Primeiramente, a Pinça Óptica (PO) será abordada, seguida da técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM), ambas as técnicas acompanhadas de seus respectivos procedimentos, preparação de amostras e modelos matemáticos.

### 3.1 Pinçamento Óptico (PO)

A técnica de pinçamento óptico é amplamente utilizada em sistemas biológicos, como células, organelas, moléculas de DNA e outros sistemas na escala micrométrica ([39–42], além dos outros trabalhos já citados nos capítulos anteriores). Descobertas recentes mostram que quando a membrana de uma célula sadia é estirada, microtúbulos (ou projeções finais da membrana formados por  $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas) podem ser observados e os mesmos fornecem informações sobre as propriedades da membrana celular [43]. Além disso, inúmeros trabalhos vem sendo realizados na análise de interações DNA-ligantes, indo desde a interação do DNA linear, até sistemas onde agentes compactantes são utilizados, como PEG e BSA ([10,11,26] entre outros).

## 3.1 Pinça Óptica

---

### 3.1.1 Equipamento

Basicamente, a pinça óptica utilizada é composta por um microscópio invertido Nikon Ti-S, uma objetiva com aumento de 100x e abertura numérica de 1.4, um laser de fibra dopado com itérbio ( $\lambda \cong 1064nm$ ), um piezoelétrico (PINano P-545, Physik Instrumente), um computador, câmeras e um caminho óptico (espelhos, cubos ópticos e filtros). O laser é direcionado para o microscópio por uma série de espelhos e cubos, sendo ele focalizado pela objetiva. Além de direcioná-lo, o caminho óptico diminui a intensidade do feixe para a ordem de  $mW$ , faixa que fornece forças da ordem de  $pN$ . No microscópio adaptam-se câmeras para localizar e filmar as microesferas sendo puxadas (as moléculas de DNA são fixadas nas microesferas). As filmagens são tratadas no computador utilizando o software "ImageJ".

### 3.1.2 Funcionamento

O funcionamento da pinça é o resultado entre a competição dos fenômenos de refração e reflexão do laser gaussiano, incidido sobre um objeto dielétrico com índice de refração maior do que o da solução onde está inserido [39].

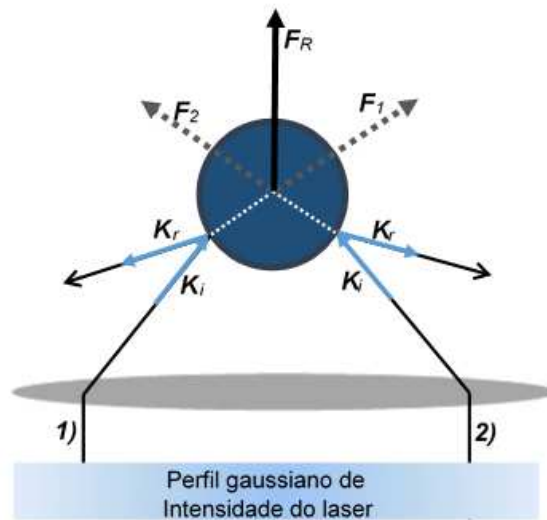
Para começar uma análise qualitativa do fenômeno de pinçamento óptico, estudemos a reflexão do laser. Sabe-se que um feixe de luz incidindo sobre um meio e sendo refletido transfere momento para o mesmo. A variação deste momento gera uma força ( $F_{rad}$ ), a qual depende da pressão de radiação ( $P_{rad}$ ) e da área sobre a qual está sendo insidido ( $S$ ) ( $F_{rad} = P_{rad}S$ ). Esta força, cujo módulo é pequeno, se faz perceptível experimentalmente com lasers focalizados e na manipulação de objetos microscópicos. Para se ter uma idéia da magnitude da força, imagine um experimento onde um feixe de laser incide sobre a superfície de uma microesfera e é completamente refletido. A pressão de radiação desse sistema é  $P_{rad} = 2I/c$ , com  $I$  sendo a intensidade do laser e  $c$  a velocidade da luz no vácuo, e a variação de momento do laser gera uma força dada por:

$$F_{rad} = P_{rad}S = 2\frac{IS}{c} = \frac{2}{c}\frac{\Delta E}{\Delta t} = 2\frac{P_{ot}}{c}, \quad (3.1)$$

### 3.1 Pinça Óptica

sendo  $\Delta E = IS\Delta t$  e  $P_{ot}$  é a potência do laser. Agora, pode-se substituir o valor utilizado da potência nos experimentos de pinça, que é por volta de  $2mW$ , e obter o valor de  $F$ . Quando este cálculo é realizado, obtém-se uma força da ordem de  $pN$ .

Devido à simetria, a microesfera dielétrica (evitar grande absorção) é o sistema mais simples para a análise da interação com feixes. Portanto, este sistema será utilizado para a análise qualitativa da PO. Sendo assim, a figura 3.1 mostra dois feixes de um laser gaussiano sendo refletidos pela superfície da microesfera. Esta reflexão causa uma variação no momento do feixe, o qual é transferido para a microesfera. A resultante das forças a empurra para cima, para longe do foco. Note que nenhuma modificação ocorreria no feixe caso o índice de refração da microesfera fosse igual ao do meio onde esta está inserida.



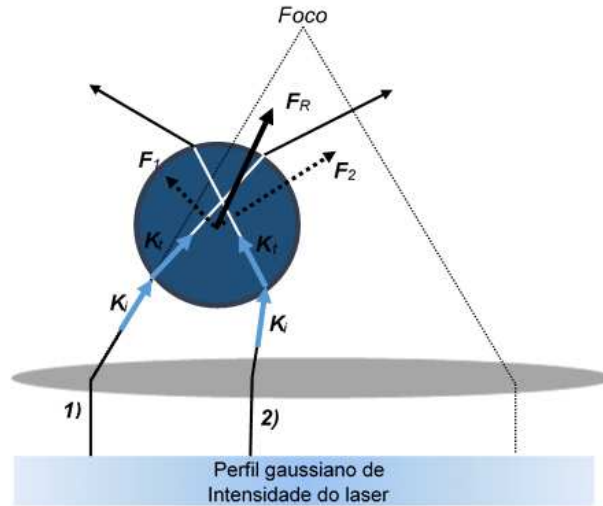
**Figura 3.1:** Esquema de dois feixes sendo refletidos pela superfície de uma microesfera. A força devido a radiação apresenta uma resultante para cima. Na imagem, a objetiva aparece como uma elipse cinza e quanto mais forte a cor no perfil gaussiano maior o valor da intensidade do laser. [14]

Por outro lado, quando há a incidência de radiação sobre um meio dois fenômenos ocorrem: o efeito de um já foi estimado nos parágrafos acima (reflexão) e o outro é a refração. O segundo fenômeno também causa uma mudança no momento do feixe, gerando uma outra força chamada de força de gradiente. Para observar o com-

### 3.1 Pinça Óptica

---

portamento desta, uma análise qualitativa também será realizada continuando com o sistema da figura 3.1.



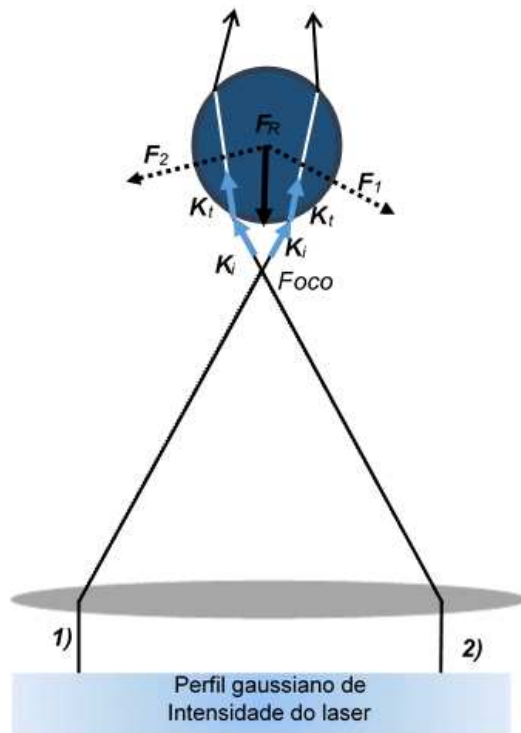
**Figura 3.2:** Esquema de dois feixes sendo refratados por uma microesfera posicionada antes do foco da objetiva e a direita do perfil de intensidade do laser. Na imagem, a objetiva aparece como uma elipse cinza e quanto mais forte a cor no perfil gaussiano maior o valor da intensidade do laser. [14]

A figura 3.2 mostra uma microesfera em uma posição anterior ao foco, no canto esquerdo do perfil de intensidade. Quando o raio (1) interage com a microesfera ele é desviado da sua trajetória original, levando a uma variação no momento do feixe. Devido a isso, o momento da microesfera também varia (conservação de momento), porém com sentido contrário, correspondendo à força  $\vec{F}_1$  (a 2ª lei de Newton). O mesmo acontece com o feixe (2), porém a intensidade da força  $\vec{F}_1$  é menor já que o perfil do laser é gaussiano. Logo, a resultante deste sistema leva a microesfera para o foco do laser.

O mesmo acontece caso a microesfera esteja acima do foco. A figura 3.3 exemplifica esta situação onde dois feixes (1) e (2) sofrem a refração posteriormente ao foco. Observe que a resultante entre eles novamente leva a microesfera para o foco. Outras posições da microesfera em relação ao foco podem ser analisadas, porém todas fornecerão o mesmo resultado: o pinçamento. A competição entre a força devido a pressão de radiação e a força de gradiente fornece o fenômeno de pinçamento óptico.

### 3.1 Pinça Óptica

---



**Figura 3.3:** Esquema de dois feixes sendo refratados por uma microesfera posicionada posteriormente ao foco do laser. Na imagem, a objetiva aparece como uma elipse cinza e quanto mais forte a cor no perfil gaussiano maior o valor da intensidade do laser. [14]

Quanto à posição da microesfera, a força de gradiente sozinha faria com que, no equilíbrio, o centro da microesfera coincidisse com o foco da objetiva, porém a pressão de radiação desloca levemente esta posição. Note que, caso a microesfera não possuísse o índice de refração maior do que o do meio, a força de gradiente não mais a conduziria para o foco e sim para longe do mesmo.

É importante ressaltar que múltiplas reflexões e refrações ocorrem no interior da microesfera, porém nessa análise qualitativa simples observou-se somente a interação entre dois feixes e a interface solução-microesfera.

Toda esta análise foi realizada no campo da óptica geométrica, onde o comprimento de onda ( $\lambda$ ) é muito menor do que o raio da microesfera ( $a$ ). Porém, caso o raio da microesfera fosse muito menor do que o  $\lambda$ , no chamado limite Rayleigh, os resultados fugiriam do obtido para óptica geométrica e assim, não seriam mais válidos. Nesse regime, a microesfera se comporta como um dipolo elétrico induzido e a força é

### 3.1 Pinça Óptica

---

proporcional ao gradiente da intensidade do campo elétrico ( $\propto \vec{\nabla}|E|^2$ ) da onda eletromagnética incidente. Esta força faz com que o dipolo elétrico seja direcionado para a região de maior intensidade do campo elétrico, o foco, levando novamente ao fenômeno de pinçamento. A teoria mais geral que descreve pinçamentos com todos os tamanhos de microesferas é conhecida como MDSA (Mie-Debye Spherical Aberration) e em sua abordagem até mesmo aberrações ópticas são consideradas [44].

Em todos os limites, o fenômeno de pinçamento ocorre e a interação entre o feixe e a microesfera gera um poço de potencial aproximadamente harmônico, dentro do qual a microesfera se comporta como um "oscilador harmônico browniano amortecido". A constante de força da pinça óptica  $K$  descreve a curvatura do poço dentro da faixa na qual este é harmônico. Valores elevados de  $K$  (potências altas do laser) se relacionam a poços mais abruptos e fechados enquanto que valores baixos (potências baixas) se relacionam com poços mais suaves e abertos, ou seja,  $K$ 's elevados pinçam com maior estabilidade as microesferas.

Ao se deslocar a microesfera de sua posição de equilíbrio atua sobre a mesma uma força restauradora que é, dentro da faixa harmônica, dada por  $\vec{F} = -K \Delta\vec{r}$  (Lei de Hooke). No caso dos nossos experimentos, os movimentos foram realizados no eixo  $x$ , de forma que  $F_x = -K \Delta x$ , onde  $\Delta x$  é a variação na posição da microesfera em relação ao fundo do poço (posição de equilíbrio).

Mais informações sobre pinçamento óptico podem ser encontradas nos artigos de revisão [45–48].

#### 3.1.3 Preparação de amostras

Para realizar o experimento de estiramento é necessário que as duas extremidades da molécula de DNA  $\lambda$  (genoma do bacteriófago  $\lambda$  obtido por meio da New England Biolabs) estejam fixas. Para isso, utilizou-se um protocolo onde o DNA foi biotinilado possibilitando que moléculas de estreptavidina se ligassem. A estreptavidina (*Sigma Aldrich*) é uma proteína produzida pela bactéria *Streptomyces avidinii*. Ela possui alta afinidade pela molécula de biotina (vitamina H), uma vitamina utilizada no metabolismo de proteínas e carboidratos. A estreptavidina possui 4 sítios de interação

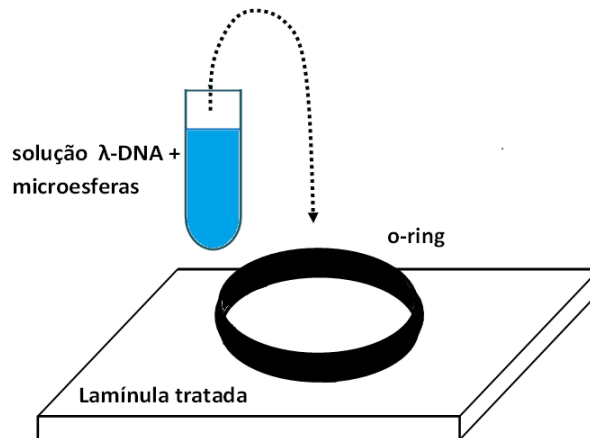
### 3.1 Pinça Óptica

---

idênticos, nos quais biotinas se ligam [49].

Primeiramente, microesferas de poliestireno (diâmetro  $\sim 3\mu m$ ) recobertas com estreptavidina (Bangs Labs) são colocadas em contato com o DNA biotinilado em um banho à  $36.5^\circ C$ , para que uma das extremidades do DNA se fixe nelas. Enquanto isso, um O-ring de borracha é fixado com parafina em uma lamínula comercial coberta com estreptavidina (Xenopore Corp.). O porta amostra é então levado ao microscópio e a solução de DNA e microesferas é inserida no interior do O-ring, como mostra a figura 3.4. Espera-se por volta de 15 minutos para que a ligação entre a extremidade livre do DNA e a superfície da lamínula ocorra e inicia-se o procedimento de busca por DNAs.

A concentração de DNA em pares de base foi de  $2, 4\mu M$  em todos os experimentos de pinça óptica e todas as amostras foram preparadas em soluções tampões salinas de pH neutro (pH=7,4) apresentando íons de fosfato (PBS [NaCl]=150mM).



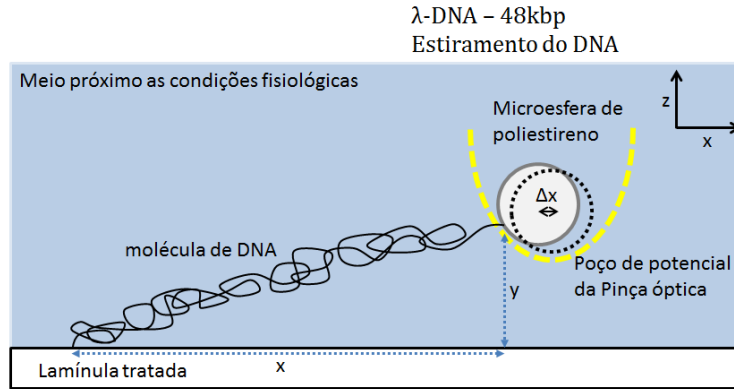
**Figura 3.4:** Preparação do porta-amostra com a amostra.

#### 3.1.4 Procedimento

A figura 3.5 mostra o esquema do experimento de estiramento do DNA utilizado neste trabalho. Em uma solução próxima às condições fisiológicas tem-se moléculas de DNA com as duas extremidades fixas: uma nas microesferas e outra na superfície da lamínula. Na escala micrométrica, as moléculas não podem ser vistas, portanto o DNA

### 3.1 Pinça Óptica

é encontrado de maneira indireta, ou seja, microesferas que escapam da pinça e voltam para a posição de equilíbrio possuem moléculas de DNA.



**Figura 3.5:** Esquema do experimento de estiramento da molécula de DNA.

Quando um DNA é encontrado são realizadas  $\sim 5$  medidas, das quais se retira uma média dos parâmetros obtidos. Em cada medida a molécula é estirada pela pinça ( $F_{max} = 6pN$ ) com uma velocidade bem definida ( $0,1\mu m/s$ ) movimentando o estágio do piezoeletrico. Essa velocidade é baixa o suficiente para que no estiramento estados de equilíbrio infinitesimais sejam percorridos. Os resultados são obtidos por videomicroscopia, a força é extraída por meio da lei de Hooke e o  $x_{DNA}$  determinado sabendo-se a velocidade e o tempo de estiramento. O gráfico 3.6 mostra a curva de força por extensão de uma molécula de  $\lambda$ -DNA puro, onde os pontos correspondem aos dados experimentais e a curva em preto é o ajuste realizado com a equação de Marko e Siggia (vide seção 3.1.5) [50]. Como se observa, para pequenas distensões, a curva praticamente não se altera, porém quando chega-se próximo do  $L_o$  a curva sobe abruptamente.

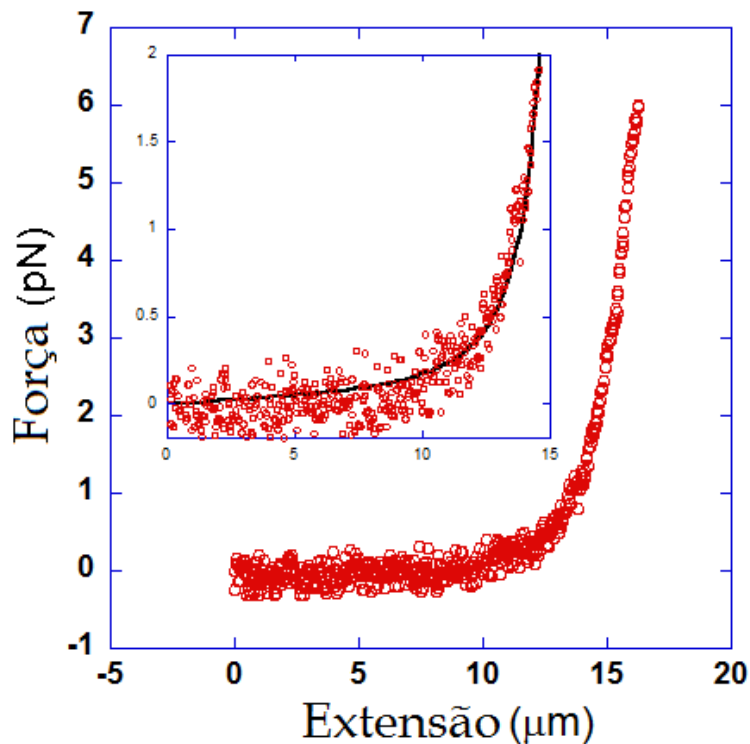
Cada medida corresponde a um experimento de estiramento, ou seja, uma curva de força por extensão, e as propriedades mecânicas são extraídas dos ajustes. Para o  $\lambda$ -DNA puro na conformação B, o comprimento de persistência  $A$  deve estar entre  $40 - 50nm$  e o comprimento de contorno  $L_o$  entre  $14 - 21\mu m$  [1].

O DNA e seus complexos são expostos à forças máximas externas de  $6pN$  indo, no máximo, até  $15pN$  (no limite do regime entrópico). A figura 3.6 mostra toda a

### 3.1 Pinça Óptica

---

curva de estiramento de uma molécula de DNA puro. A força sobre o polímero varia com a extensão, porém a força máxima não se altera. Observe também que o ajuste é somente realizado até  $F = 2pN$ , isso porque o poço de potencial gerado pela interação entre a pinça e a microesfera é aproximadamente harmônico. Logo, para garantir que os valores estejam dentro do regime harmônico, a curva é somente ajustada até poucos  $pN$ , mais precisamente, 40% da constante da pinça ( $K$ ).



**Figura 3.6:** Gráfico de força ( $F(pN)$ ) por extensão ( $\mu m$ ) para o  $\lambda$ -DNA puro [1]. No gráfico interno, temos os dados experimentais sendo ajustados por meio da equação de Marko e Siggia.

Após realizar as medidas com um DNA puro, iniciam-se as trocas de alíquotas. Designa-se como alíquota, uma concentração bem definida do ligante desejado dentro do tampão. Na troca, retira-se grande quantidade da solução presente no interior do O-ring e insere-se a alíquota. Esse processo pode ser repetido várias vezes realizando uma espécie de diálise. Em seguida, a amostra passa pelo tempo de reação ( $\sim 30$  minutos) em repouso durante o qual o DNA base se encontra pinçado. Ao término do

## 3.1 Pinça Óptica

---

tempo de reação, novamente 5 medidas são realizadas e a média é extraída. Outras alíquotas são trocadas e o mesmo processo se repete. Assim, a série de titulações é concluída e obtem-se curvas de propriedades mecânicas por concentrações.

As concentrações dos ligantes utilizados serão especificadas nos resultados e as alíquotas foram preparadas em tampões PBS com ou sem NaCl, dependendo do ligante utilizado. No caso da Sso7d-C8, utilizou-se PBS sem NaCl enquanto que para os intercalantes a concentração de NaCl foi de 150mM.

### 3.1.5 Equação de Marko e Siggia

O modelo mais utilizado atualmente para descrever as propriedades elásticas de polímeros semi-flexíveis (como a molécula de DNA) é o modelo Worm-Like Chain (WLC), o qual se baseia na energia de curvatura generalizada, ou melhor na equação de Kratky-Porod [14]. Sua validade está restrita ao regime entrópico, pois considera-se que as características do polímero não se alteraram durante estiramentos consecutivos. Utilizando o modelo WLC, um polímero sendo tensionado pode ser estudado por meio da equação de Marko e Siggia [5,50], a qual reproduz de maneira satisfatória estiramentos próximos e distantes da conformação de equilíbrio. Ela nos fornece curvas de força por extensão adequadas para realizar ajustes de dados experimentais obtidos por técnicas de pinçamento, observe a figura 3.6.

Os cálculos para estiramentos próximos e longe da conformação de equilíbrio foram brevemente mencionados no apêndice A, cujos resultados são essenciais na dedução da expressão da força por extensão geral.

A equação  $F = -\frac{3k_B T}{2AL} z$  (A.3) fornece dados de força por extensão para pequenos estiramentos, enquanto que a equação  $F = \frac{k_B T}{4A} \left[ \frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \right]$  (A.16) descreve o outro limite, ou seja, longos estiramentos. Todavia, os valores intermediários não são conhecidos. A expressão para estiramentos longe da conformação de equilíbrio não contém o regime de pequenos estiramentos. Para contornar este problema, no artigo de 1995, Marko e Siggia [50] acrescentaram dois termos dentro dos colchetes da expressão para longos estiramentos de forma que estes não sejam relevantes nesse regime. Mas, reproduzam de maneira satisfatória o regime de pequenos estiramentos.

## 3.2 AFM

---

Após a adição dos dois termos obtém-se, finalmente, a expressão generalizada para a força entrópica da molécula de DNA em função da extensão,

$$F \cong \frac{k_B T}{A} \left[ \frac{z}{L} - \frac{1}{4} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \right], \quad (3.2)$$

onde  $k_B$  é a constante de Boltzmann,  $T$  é a temperatura,  $L$  é o comprimento de contorno e  $A$  o comprimento de persistência (já definidos na seção 2.3) e  $z$  é a extensão da molécula de DNA. Note que a expressão acima é uma aproximação, divergindo no ponto  $z = L$ .

Como foi dito anteriormente, essa expressão é válida somente dentro do regime entrópico, não abrangendo modificações entálpicas nos polímeros. Por isso, neste trabalho, sempre que alguma modificação entálpica ocorrer ela estará restrita ao primeiro estiramento. Depois deste, todas as alterações já ocorreram e, portanto, novamente consideraremos o sistema dentro do regime entrópico.

Os dados experimentais obtidos com a técnica de pinçamento óptico deste trabalho foram ajustados utilizando a expressão 3.2.

## 3.2 Microscopia de Força Atômica (AFM)

O AFM possui vários modos de funcionamento, sendo assim útil na análise das mais diversas amostras [51,52]. As amostras podem ser desde filmes finos de materiais condutores e semicondutores até moléculas de RNA e DNA depositados sobre substratos de mica ou silício tratado superficialmente. No entanto, não fornece informações sobre o interior, ou seja, suas imagens descrevem a topografia da superfície do sistema analisado [53,54]. Pode ser utilizado também para experimentos de estiramento de molécula única, porém neste trabalho somente estudou-se as moléculas adsorvidas.

A resolução em  $z$  varia de poucos micrômetros ( $\mu m$ ) até ângstrons, o mesmo vale em  $yx$ . Porém, as janelas de varredura máximas e mínimas em  $yx$  dependem do piezoelétrico utilizado. É uma técnica de varredura e não fornece informações sobre a constituição da amostra.

Este tipo de técnica é utilizada quando deseja-se observar objetos não condutores

## 3.2 AFM

---

nem cristalinos que estão no limite da óptica física (efeitos de difração), não sendo possível utilizar os microscópios ópticos para observá-los.

### 3.2.1 Equipamento

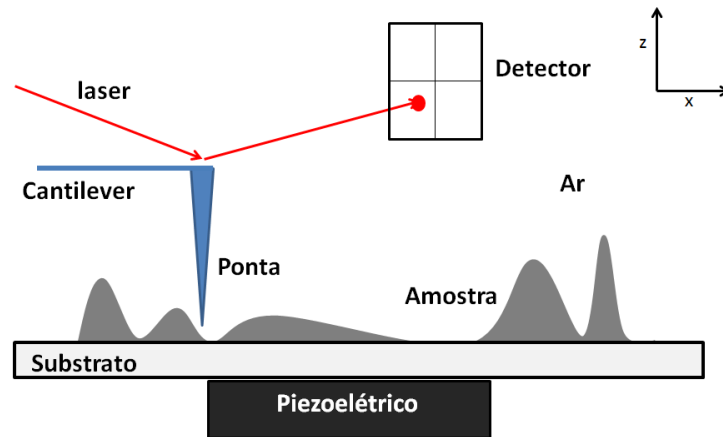
As peças fundamentais deste microscópio (*NTEGRA* Probe NanoLaboratory - NT-MDT) são: o cabeçote, o piezoelétrico, o controlador e o computador. No cabeçote posicionam-se: o chip na extremidade do qual há o cantilever, o laser, que será incidido sobre a extremidade do cantilever e o detector, o qual indica as deflexões do laser. No equipamento utilizado a ponta era fixa, ou seja, a amostra é movida por meio do piezoelétrico enquanto o chip fica estático. O chip utilizado possuía em sua extremidade um cantilever com constante de mola de  $2N/m$ , aproximadamente, e, na extremidade do cantilaver, uma ponta com  $8nm$  de raio. O cantilever foi recoberto com alumínio (*Al*), melhorando, assim, o sinal do detector.

O controlador é constituído por uma série de circuitos elétricos que ajustam e mantêm a ponta a uma determinada distância da amostra ou com uma determinada amplitude de oscilação. Isso depende do modo de varredura utilizado. No caso deste trabalho, o contato intermitente (ou tapping mode) foi utilizado. Neste modo, a ponta oscila próxima a superfície mantendo fixa a amplitude previamente definida.

Além disso, uma câmara e um equipamento para retirar a umidade foram utilizados. Caso as amostras fossem medidas no ar, a alta umidade geraria um efeito de capilaridade na ponta dificultando as medidas, já que impediria a ponta de oscilar.

### 3.2.2 Funcionamento

A longas distâncias, a interação da ponta com a amostra é predominantemente atrativa devido às forças de van der Waals. Porém, quando a ponta aproxima-se o suficiente para que os orbitais eletrônicos interajam, a repulsão entre estes prevalece e ocorre a deflexão do laser de modo a afastar a ponta da amostra [52–54]. A deflexão do laser (incidido na extremidade do cantilever) medida no detector fornece uma imagem da topografia da superfície da amostra. A figura 3.7 exemplifica uma situação de



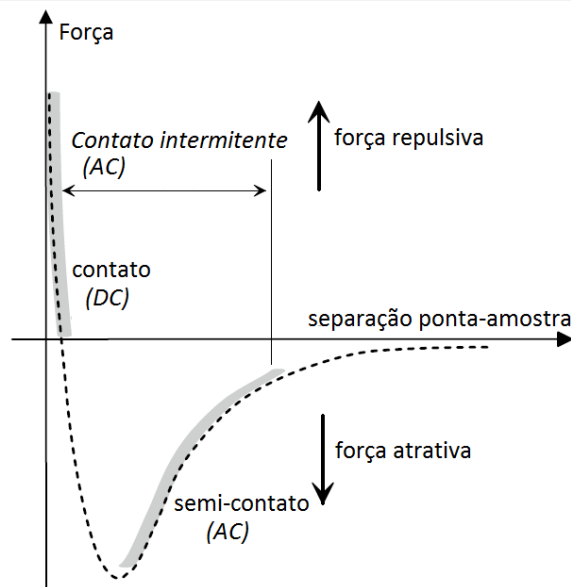
**Figura 3.7:** Esquema de como o AFM realiza as varreduras sobre as amostras.

varredura de uma amostra qualquer. A ponta varre a amostra (o piezoelétrico move a amostra) e mantendo, por exemplo, a distância em relação a amostra constante (modo contato de varredura (DC)), observa-se a deflexão do laser no detector, construindo-se a topografia da superfície.

O gráfico 3.8 mostra a força entre a ponta e a amostra para diferentes distâncias entre elas. Observe que para distâncias grandes tem-se atração e, quando a distância é de poucos ângstroms, a inversão da interação ocorre e tem-se repulsão. O gráfico mostra também alguns regimes de varreduras. O regime contato é realizado a uma distância onde há predominância na repulsão, o regime semi-contato (AC) acontece ainda no regime de atração e o contato intermitente (utilizado neste trabalho) abrange os regimes e semi-contato (AC) e de contato (DC). O último fornece grande resolução em  $z$  e no plano também, além de não danificar a amostra e não deslocar os objetos sobre a superfície.

### 3.2.3 Preparação de amostras

As soluções de deposição são primeiramente preparadas e as reações ocorrem em um intervalo de  $\sim 30$  min, à temperatura  $\sim 20^{\circ}$  C e pressão ambientes. A solução é preparada com tampão Tris ((10 mM) sendo o pH=7.4), o DNA de 3kbp (50 ng) e



**Figura 3.8:** Gráfico da força em relação a distância entre a amostra e a ponta. [53]

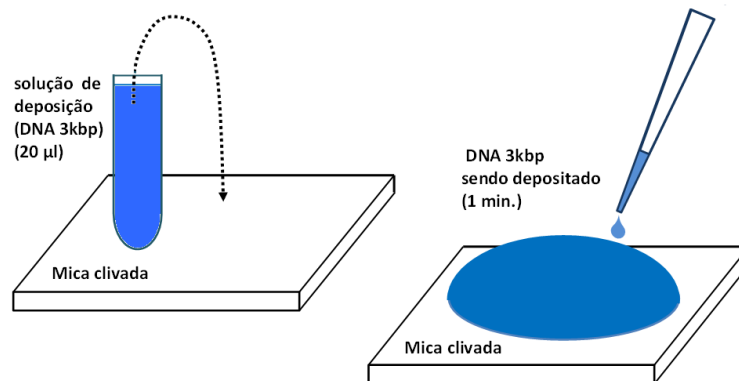
a concentração desejada de Sso7d-C8. A proteína recombinante e o DNA interagem durante o tempo de reação e, utilizando uma pipeta, realiza-se a deposição da solução sobre a superfície da mica clivada, figura 3.9. A mica foi escolhida como substrato para deposição devido à sua rugosidade menor do que um nanômetro ( $\cong 2\text{Angstroms}$ ), possibilitando que o DNA adsorvido ( $\sim 1.2 - 1.6\text{nm}$  de altura) seja observado nas imagens de AFM.

A mica é constituída por camadas cristalinas, sendo o processo de clivagem simples. A clivagem é realizada para se ter uma superfície livre de impurazas e preparada para uma nova deposição. Todavia quando entra em contato com soluções aquosas, os sítos  $OH$  presentes em sua superfície se ionizam e esta adquire uma carga efetiva negativa. Por isso, é necessária a inserção de um cátion que faça a "ponte" entre as moléculas e a superfície. Usualmente utiliza-se o  $Mg^{2+}$ , porém existem trabalhos também com  $Ni^{2+}$  [55]. No caso deste trabalho, devido a natureza da proteína utilizada na deposição (possui cargas positivas e a interação é forte com o domínio ligante Sso7d) não utilizou-se nenhum cátion nos experimentos de deposição com a Sso7d-C8.

O processo de deposição dura por volta de 1 minuto e, ao término desse tempo, mergulha-se a amostra em água destilada e deionizada. Espera-se por volta de 30

## 3.2 AFM

---

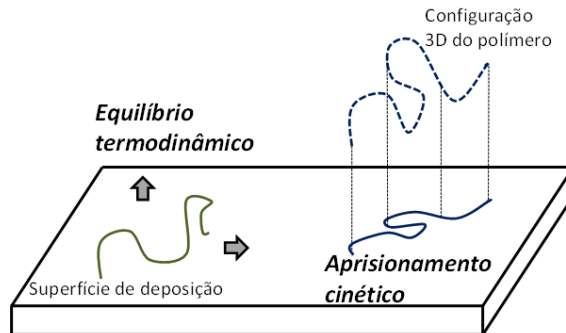


**Figura 3.9:** Esquema de deposição do complexo sobre a superfície da mica clivada. À esquerda, tem-se a solução ainda reagindo enquanto, à direita, o processo de difusão dos complexos já está ocorrendo.

min, retira-se a amostra da água e, utilizando papéis absorventes e um jato fraco de nitrogênio, remove-se o excesso de água e seca-se a superfície. Por fim, a amostra pode ser levada ao AFM obtendo-se, assim, as imagens. Note que cada amostra corresponde à somente um experimento, logo para cada concentração total do ligante uma nova amostra precisa ser produzida. A concentração de DNA em pares de base utilizada em todas as amostra foi de  $3.75\mu M$ , preparadas no tampão Tris(10 mM)-HCl (pH=7.4).

Note que a fixação dos polímeros pode ocorrer de maneira que o polímero entre em equilíbrio termodinâmico com a superfície, indicando que a deposição durou o suficiente para que a conformação mais favorável seja alcançada (nesses experimentos buscamos o equilíbrio termodinâmico do DNA na superfície da mica). Outro caso possível seria a aderência sem que o equilíbrio seja alcançado, ou seja, a conformação final 2D é simplesmente uma projeção da conformação 3D. Neste caso a molécula simplesmente adsorveu, como pode ser observado na figura 3.10 à direita, este cenário corresponde à simplesmente um aprisionamento cinético da molécula na superfície.

Note que para o primeiro caso de deposição, várias moléculas adsorvem na superfície nas conformações de menor energia indicando que as características estruturais da molécula podem ser extraídas das imagens 2D. No segundo caso, as conformações são induzidas pela superfície ou intrínsecas da molécula sendo difícil distinguir as duas possibilidades [56].



**Figura 3.10:** Esquema de deposição de um polímero em uma superfície. À esquerda, considerando que a molécula alcance o equilíbrio termodinâmico com a superfície e à direita, considerando que a molécula simplesmente adsorveu levando uma configuração 3D para outra 2D.

### 3.2.4 Procedimento

Para realizar as medidas, a umidade foi reduzida utilizando-se um dessecador, ficando em torno de 20-30%. Para a realização das medidas e obtenção do comprimento de contorno ( $L_o$ ) e distância ponta-à-ponta ( $R_{ee}$ ) a partir das imagens.

Utilizou-se 512 ou 1024 linhas por quadros com tamanhos por volta de  $5\mu m$  (são janelas quadradas) até  $2\mu m$ , e a velocidade de varredura foi de 2 linhas por segundo. Devido ao contorno das moléculas de DNA ser pequeno (por volta de  $1\mu m$ ) a maior janela utilizada nos experimentos foi de  $10\mu m$ .

Com as imagens em mãos,  $L_o$  e  $R_{ee}$  foram medidos e, utilizando-se a expressão para a distância ponta-à-ponta quadrática média bidimensional (equação 3.3), obteve-se a persistência para cada concentração. De posse destes dados, curvas de propriedades mecânicas pela razão entre as concentrações ( $[ligantes]/[DNA_{bp}]$ ) foram contruídas e analisadas.

### 3.2.5 Worm-Like Chain 2D

Depois que o equilíbrio termodinâmico da molécula com a superfície foi atingido a análise das imagens pode nos fornecer as propriedades mecânicas dos polímeros adsorvidos. Para isto, utilizou-se o modelo Worm-Like Chain modificado para polímeros

## 3.2 AFM

---

2D [56].

$$\langle R_{ee}^2 \rangle_{2D} = 4AL_0 \left[ 1 - \frac{2A}{L_0} \left( 1 - e^{-\frac{L_0}{2A}} \right) \right] \quad (3.3)$$

Esta equação pode ser utilizada para determinar o comprimento de persistência da molécula adsorvida termodinamicamente sabendo-se o comprimento  $L_0$  e a distância ponta-à-ponta ( $\langle R_{ee}^2 \rangle_{2D} = \langle (\vec{r}_f - \vec{r}_0)^2 \rangle^1$ ). Este tipo de informação pode ser obtida utilizando softwares como WSXM, o qual é gratuito. Além disso, pode-se desenvolver programas que determinem estes dados utilizando por exemplo a linguagem Fortran.

O caso do aprisionamento cinético não será utilizado, já que os experimentos foram conduzidos de forma que os polímeros encontrassem a configuração mais favorável e conseqüentemente adsorvessem com a menor energia. Para isso, o tempo de deposição das moléculas de DNA foi longo o suficiente para que, na concentração utilizada, um grande número de moléculas adsorvessem com energia para buscar uma configuração de equilíbrio, de acordo com a referência [56]. Nesta referência, um estudo com moléculas de vários pesos moleculares, comprimentos de contorno, tempos de deposição e diversos tratamentos da superfície foram realizados justamente com o intuito de estudar que tipo de adsorção ocorreu. No caso do DNA 3kbp (utilizado neste trabalho) na concentração da ordem de  $nM$  em pares de base depositado com cerca de  $\sim 2min$ , tem-se que os valores experimentais de  $\langle R_{ee}^2 \rangle$  estão em excelente acordo com a teoria representada pela equação 3.3, o que nos leva a crer que numa solução com moléculas de DNA fita dupla com 3kbp e  $[DNA3kbp] = 3.75\mu M$  depositada com  $\sim 1min$ , tem-se o equilíbrio termodinâmico com a superfície da mica ao longo do processo de adsorção.

---

<sup>1</sup>a quantidade  $\langle (\vec{r}_f - \vec{r}_0)^2 \rangle$  se refere ao valor médio de um vetor que liga o início do polímero até o seu fim.

## Capítulo 4

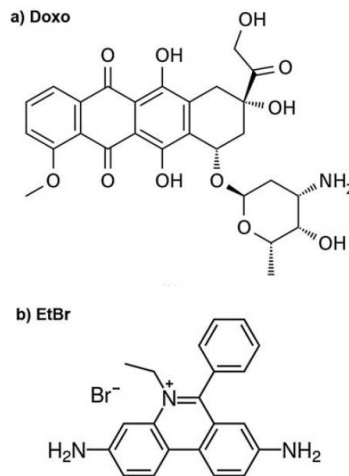
# Mudanças causadas pela $F_{ext,max}$ em complexos com intercalantes

A técnica de pinçamento óptico pode ser utilizada de inúmeras maneiras: analisando glóbulos vermelhos, células, tirando informações sobre complexos formados com moléculas de RNA, DNA, entre outros [57]. Essa utilização pode estar dentro do regime de forças fracas (regime entrópico) o qual não alteraria as propriedades mecânicas das "molas entrópicas" (DNAs, RNAs e seus complexos em solução), ou no regime de forças intensas ou fortes onde há a alteração da estrutura das moléculas. Grandes alterações estruturais ocorrem no regime de forças intensas (regime entálpico), mas e quanto ao regime entrópico? Neste, as curvas de estiramento em função da concentrações de complexos similares deveriam coincidir mesmo com forças distintas. Fazendo uma analogia com uma mola, forças distintas dentro do regime elástico fornecem a mesma constante de mola (o que corresponderia ao comprimento de persistência  $A$  numa mola entrópica).

Interessados em estudar o regime de forças fracas, realizamos experimentos de estiramento de complexos e estudamos principalmente as variações no comprimento de persistência  $A$ .

### 4.1 Doxorrubicina, BrEt e o $\lambda$ -DNA

Os ligantes utilizados na formação dos complexos foram o Brometo de Etídio (BrEt) e a Doxorrubicina (doxo), 4.1. Ambos são intercalantes, portanto produzem um aumento efetivo do comprimento de contorno do complexo  $L_o$  com a concentração e um giro relativo entre os pares de base de forma a desfazer a dupla hélice, vide seção 2.5.1.



**Figura 4.1:** Na letra a) tem-se a estrutura química da molécula de doxorrubicina. Enquanto que na letra b) tem-se a estrutura do brometo de etídio [68].

Os complexos analisados por pinçamento óptico foram formados com o DNA do bacteriófago  $\lambda$  (um vírus que infecta a bactéria *E. Coli*), devido ao seu contorno estar na escala micrométrica ( $16.5\mu m$ ).

### 4.2 Dependência dos complexos com a $F_{ext}$

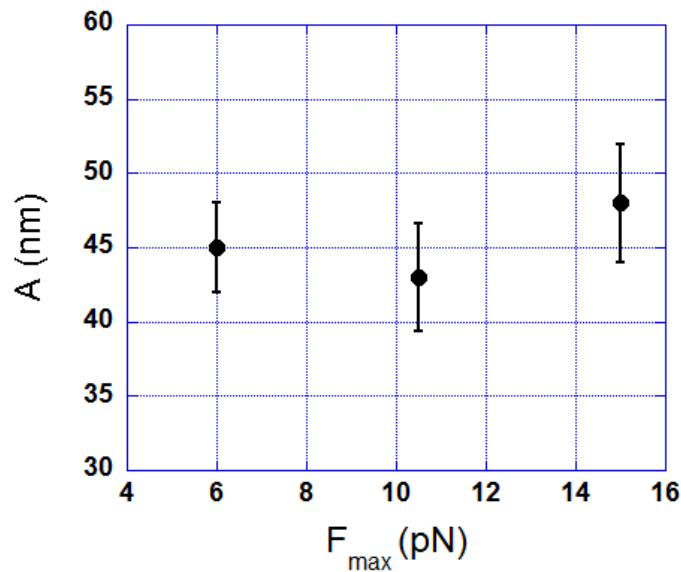
Nesta seção, as propriedades mecânicas ( $A$  e  $L_o$ ) dos polímeros serão abordadas variando-se a força máxima aplicada ( $6pN$ ,  $10.5pN$  e  $15pN$ ) sobre os complexos DNA-intercalantes. Assim, os experimentos foram conduzidos da seguinte forma: como na seção 3.1.4, uma molécula de DNA com as propriedades bem definidas era escolhida e,

## 4.2 Doxorrubicina e Brometo de Etídio

---

com ela, estiramento eram realizados ( $\sim 5-7$  medidas). Caso os parâmetros ( $L_o$  e  $A$ ) do DNA puro estivessem dentro dos valores esperados (na literatura), as alíquotas eram trocadas. Decorrido o tempo de reação, estiramentos ( $\sim 5-7$  medidas para cada  $F_{max}$ ) eram realizados com  $6pN$ ,  $10.5pN$  e  $15pN$ , sequencialmente. Vários experimentos foram realizados com uma mesma alíquota, retirando a média dos valores finais.

Antes da análise da interação com as drogas, é necessário medir qual o comportamento de  $A$  em relação a força máxima para um DNA puro. Para isso, realizou-se o mesmo procedimento acima, porém sem a presença de um ligante. Os resultados deste experimento aparecem na figura 4.2, que mostram que a persistência do DNA puro não se altera (dentro das barras de erro) com o aumento da força máxima. Até mesmo para  $15pN$ , a afirmação anterior é válida (note que a última medida já está no limiar do regime entrópico).

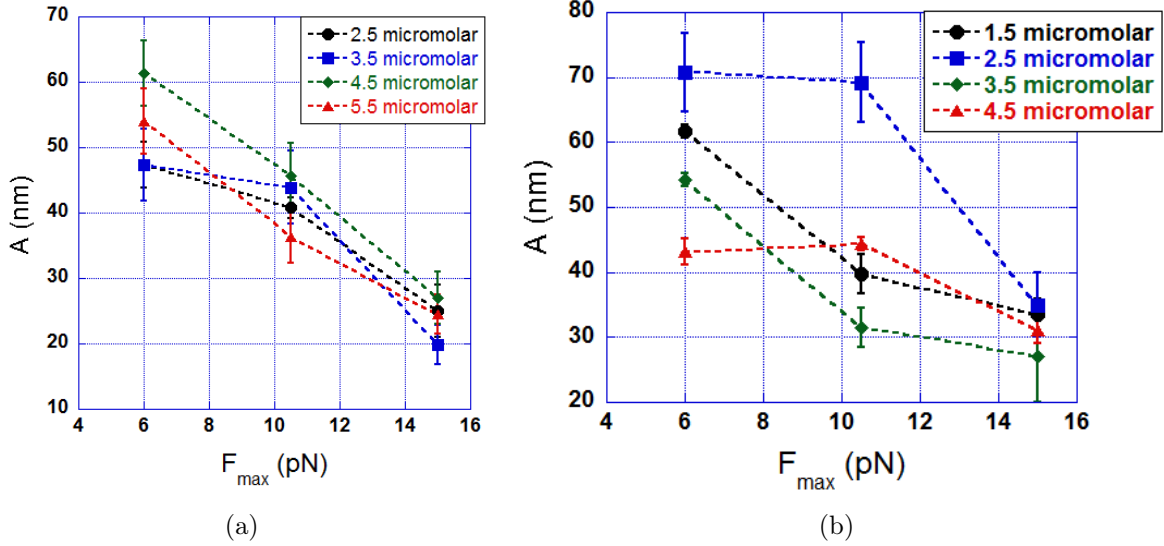


**Figura 4.2:** Variação do comprimento de persistência  $A$  com a força máxima ( $F_{max}$ ) aplicada para a molécula de DNA pura. As barras de erro fornecem o erro padrão das medidas.

Dando continuidade ao trabalho, com os resultados obtidos para o complexo formado com a doxorrubicina nas concentrações  $2.5$ ,  $3.5$ ,  $4.5$  e  $5.5\mu M$  construiu-se o gráfico 4.3(a). As linhas tracejadas foram introduzidas apenas como guia para os olhos. Note que quanto maior  $F_{max}$  menor o comprimento de persistência, ou seja,

## 4.2 Doxorrubicina e Brometo de Etídio

mais flexível o polímero.



**Figura 4.3:** Variação de  $A$  com relação a força máxima aplicada para a) doxorrubicina e b) brometo de etídio. As barras de erro fornecem o erro padrão das medidas.

O experimento análogo para o brometo de etídio foi realizado para as concentrações do ligante de: 1.5, 2.5, 3.5 e 4.5  $\mu M$ , como pode ser observado na figura 4.3(b). Novamente,  $A$  decresce com o aumento da força máxima, assim como no caso da doxorrubicina, mostrando que há uma forte dependência deste parâmetro com relação à força aplicada sobre os complexos DNA-doxorrubicina e DNA-BrEt.

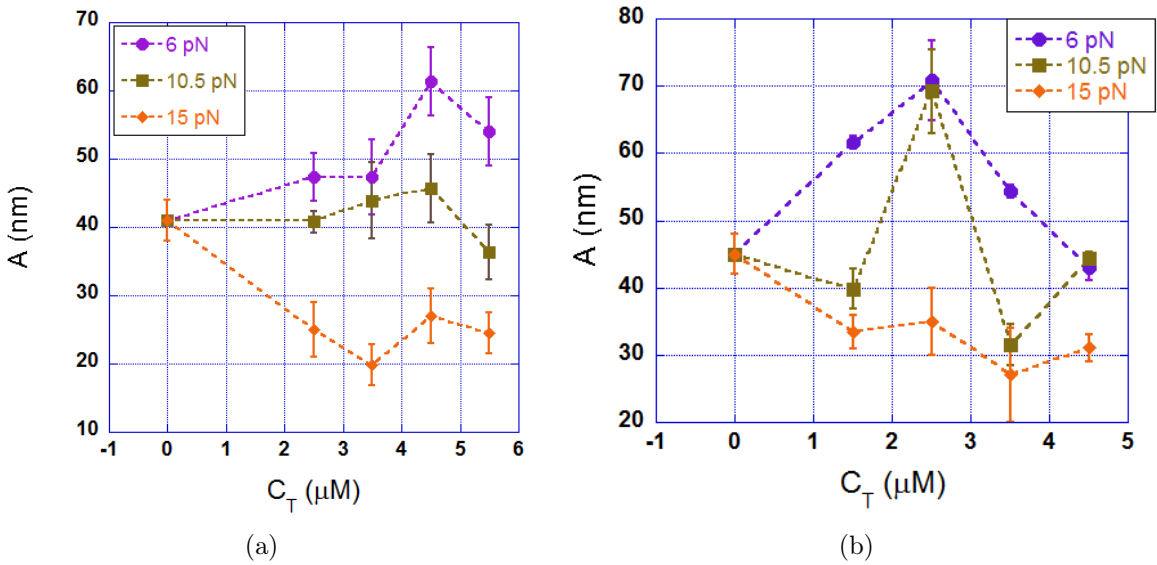
Estes resultados levam a crer que este comportamento é geral para complexos DNA-intercalantes, indicando que a modificação estrutural causada pelo intercalante na dupla-hélice é a origem do efeito, ou seja, o processo de intercalação está alterando a molécula de DNA de forma que ao expor este complexo a forças máximas distintas tem-se um decréscimo de  $A$ .

O comprimento de contorno  $L_o$  para os dois casos não apresentou dependência com a força máxima aplicada, somente com a concentração de ligante. Para a doxorrubicina na concentração de 2.5  $\mu M$ , por exemplo, obtivemos  $L_o = (16.9 \pm 0.5) \mu m$  para 6 pN, para 10.5 pN,  $L_o = (16.9 \pm 0.6) \mu m$  e para 15 pN esse resultado foi de  $L_o = (17.0 \pm 0.4) \mu m$ , correspondendo a um aumento de 3% em relação ao DNA puro. Por outro lado, para a maior concentração de doxorrubicina, 5.5  $\mu M$ ,  $L_o = (18.9 \pm 0.6) \mu m$

## 4.2 Doxorrubicina e Brometo de Etídio

para  $6pN$ ,  $L_o = (18.6 \pm 0.6)\mu M$  para  $10.5pN$  e  $L_o = (19.1 \pm 0.7)\mu M$  para  $15pN$ , correspondendo a um aumento de 14%.

A mesma análise pode ser realizada para o brometo de etídio. Assim, na concentração de  $2.5\mu M$ , por exemplo, obtivemos  $L_o = (18.5 \pm 0.3)\mu m$  para  $6pN$ , para  $10.5pN$ ,  $L_o = (18.8 \pm 0.5)\mu m$  e para  $15pN$  esse resultado foi de  $L_o = (18.6 \pm 0.4)\mu m$ , correspondendo a um aumento de 13% em relação ao DNA puro. Por outro lado, para uma concentração maior,  $4.5\mu M$ ,  $L_o = (20.5 \pm 0.7)\mu M$  para  $6pN$ ,  $L_o = (20.2 \pm 0.6)\mu M$  para  $10.5pN$  e  $L_o = (20.7 \pm 0.7)\mu M$  para  $15pN$ , correspondendo a um aumento de 24%. As



**Figura 4.4:** Variação de  $A$  com relação a concentração total do ligante para a) doxorrubicina e b) brometo de etídio. As barras de erro correspondem ao erro padrão das medidas.

curvas de titulação usualmente são construídas com a propriedade mecânica em função da concentração total do ligante em solução. Por isso os gráficos 4.3(a) e 4.3(b) serão reconstruídos, ficando evidente como que cada  $F_{max}$  altera a grandeza analisada.

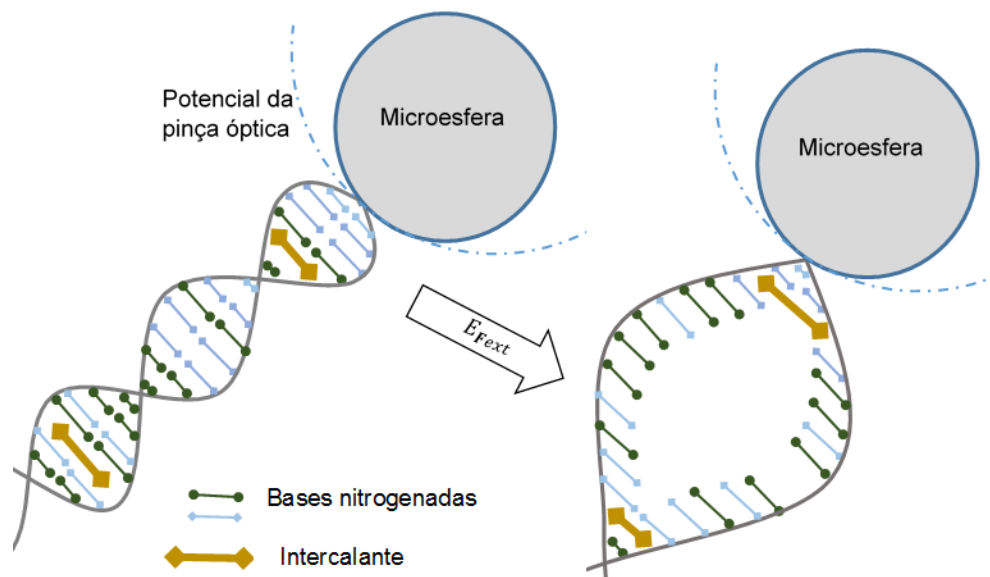
Como pode ser visto em 4.4(a) e 4.4(b), para o menor valor de  $F_{max}$  o comportamento geral das curvas é inicialmente crescente, chegando a um valor máximo e depois caindo, o que está de acordo com vários trabalhos realizados pelo grupo do professor M. S. Rocha, onde são realizados experimentos de estiramento para  $F_{max} < 6pN$  [10–15]. Além deste, outros grupos reportaram o mesmo comportamento de  $A$ , como Tessmer *et al* [28]. Por outro lado, o maior valor de  $F_{max}$  mostra uma queda quase monotônica

## 4.2 Doxorubicina e Brometo de Etídio

de  $A$  em relação a  $C_T$ . Este resultado também é reportado por uma série de grupos como Husale *et al*, Lipfert *et al*, entre outros [22–25]. Por fim, as curvas obtidas para  $10.5pN$  apresentam um comportamento intermediário entre as duas anteriores.

Note a gama de resultados aparentemente incoerentes advindos de técnicas de pinçamento. Isso pode ser explicado observando-se qual a força máxima utilizada, ou seja, para forças no limite do regime entrópico uma queda monotônica em  $A$  é observada mesmo para concentrações baixas do ligante, enquanto que para valores baixos da força ( $6pN$ ), observa-se um comportamento não monotônico. Estes resultados ressaltam a necessidade de um estudo mais aprofundado da variação das propriedades com as forças aplicadas, além de levantar uma questão: qual deve ser a força utilizada em experimentos de estiramento ou torção para que seu efeito nos resultados seja mínimo?

O efeito da queda de persistência dos complexos foi estudado e a melhor maneira encontrada na tentativa de explicar o fenômeno foi considerar algum tipo de desnaturação parcial, como será abordado nos parágrafos seguintes, observe a figura 4.5.



**Figura 4.5:** Esquema da formação das "bolhas" de desnaturação no complexo formado com intercalantes sujeito a forças externas.

Sabe-se que a intercalação gera alterações e tensiona a molécula na qual se liga. Essa ligação aumenta o comprimento de contorno  $L_o$  e desfaz o giro da dupla-hélice

## 4.2 Doxorubicina e Brometo de Etídio

---

por volta de  $20^0 - 30^0$  entre os pares de base. Todas estas modificações tensionam as pontes de hidrogênio de bases complementares que unem as fitas simples, o que pode levar a formação de bolhas de desnaturação mesmo para  $F_{max}$  baixas. A probabilidade da formação de bolhas de desnaturação aumenta com o aumento da  $F_{max}$ . A formação de bolhas desfaz a estrutura secundária do DNA localmente, transformando a região em duas fitas simples. As fitas simples apresentam grande flexibilidade ( $A$  pequeno  $nm$ ) [58], levando a uma persistência efetiva menor.

É evidente que este efeito depende da concentração do intercalante e do regime de forças utilizado nos estiramentos. Assim, caso a concentração do intercalante ou a  $F_{max}$  sejam baixos o suficiente, ainda não aparecendo bolhas de desnaturação, tem-se um  $A$  efetivo crescente com [intercalante] (concentração do intercalante). Considerando os gráficos 4.4(a) e 4.4(b), pode-se observar que para  $6pN$  e concentrações baixas do ligante, a persistência  $A$  ainda apresenta um crescimento. Porém, quando a molécula apresenta uma quantidade razoável de sítios ocupados, a força externa é suficiente para que as ligações entre as bases se rompam e tem-se uma desnaturação parcial, levando a um  $A$  efetivo menor, de acordo com o que foi discutido nos parágrafos anteriores.

Assim, a força máxima  $F_{max}$  altera o comprimento de persistência  $A$  dos complexo DNA-doxorrubicina e DNA-BrEt significativamente, ou seja, as propriedades obtidas por meio de experimentos de estiramento de complexos DNA-intercalantes são fortemente dependentes da força externa máxima aplicada.

Pensando de maneira conformacional, a estabilidade da estrutura secundária da molécula de DNA em solução depende da estrutura da molécula fita simples (estrutura primária), das interações hidrofóbicas, das rotações das ligações químicas, das ligações de hidrogênio e dos empilhamentos  $\pi$  entre os pares de base nitrogenadas (originada pelas interações entre os anéis das bases) [8]. Estudos mostram que o empilhamento  $\pi$  e as interações hidrofóbicas possuem papel de destaque na energia necessária para estabilizar a dupla hélice [61–63]. Logo, a maior diferença entre as configurações DNA fita simples e fita dupla são a energia livre de Gibbs devido ao empilhamento dos pares de base e as energias das pontes de hidrogênio. Matematicamente, tem-se que a energia livre de Gibbs ( $G$ ) necessária para estabilizar a dupla hélice é dada por:

## 4.2 Doxorrubicina e Brometo de Etídio

---

$$\Delta G_{est.duplah,DNA ds} = \Delta G_{DNA fs,est} + \Delta G_{r+t} + \Delta G_{emp.\pi} + \Delta G_{pontesH} + \Delta G_{hidr}, \quad (4.1)$$

com  $\Delta G_{DNA fs,est}$  sendo a energia livre relacionada a molécula de DNA fita simples,  $\Delta G_{r+t}$  a energia relacionada com modificações estruturais,  $\Delta G_{emp.\pi}$  a energia dos empilhamentos dos pares de base,  $\Delta G_{pontesH}$  energia relacionada as pontes de hidrogênio e  $\Delta G_{hidr}$  é a energia devido as interações hidrofóbicas [63]. Quanto mais negativa é  $\Delta G_{est.duplah,DNA ds}$  mais favorável é a formação da estrutura de dupla hélice. Todas essas energias são calculadas como a variação entre dois estados: molécula de DNA fita simples – > molécula de DNA fita dupla.

Quando um intercalante se acomoda entre os pares de base, tanto a energia relacionada a modificações estruturais quanto as interações entre os pares de base no sítio da intercalação são comprometidas. Assim, a energia de estabilização da dupla hélice cai, aproximando a configuração da molécula de DNA fita dupla da fita simples. Isso possibilita que, dependendo de quanto  $\Delta G_{est.duplah(intercal.)}$  (energia de estabilização da dupla hélice após a intercalação) for próximo da  $\Delta G_{DNA fs,est}$  (energia de estabilização das fitas simples), forças externas relativamente baixas sejam suficientes para levar a mudança estrutural local. O que formaria uma bolha de desnaturação.

Considerando um segmento da molécula de DNA com, por exemplo, 12 pares de base ( $\sim 4,8nm$ ) tem-se que a modificação na estabilidade da molécula pode variar de  $\Delta G = 0$  à  $\Delta G = 4(\Delta G_{rot.int} + \Delta G_{emp.\pi.int} + \Delta G_{hidro})$ . Sendo que  $\Delta G = 0$  corresponderia a nenhuma molécula de intercalante ligada e  $\Delta G = 4(\Delta G_{rot.int} + \Delta G_{emp.\pi.int} + \Delta G_{hidro})$  a energia decrescida devido a saturação nas intercalações (obs.: experimentos mostram que no processo de intercalação aproximadamente 3 sítios de ligação da molécula de DNA são ocupados [1,27]).

Suponha que as contribuições das energias de rotação e de empilhamento  $\pi$  sejam praticamente anuladas na intercalação, restariam somente as ligações de hidrogênio para serem vencidas pela força externa. Tendo isso em mente, pode-se estimar a força necessária para que as bolhas sejam geradas. Considerando que a energia envolvida nas

## 4.2 Doxorubicina e Brometo de Etídio

---

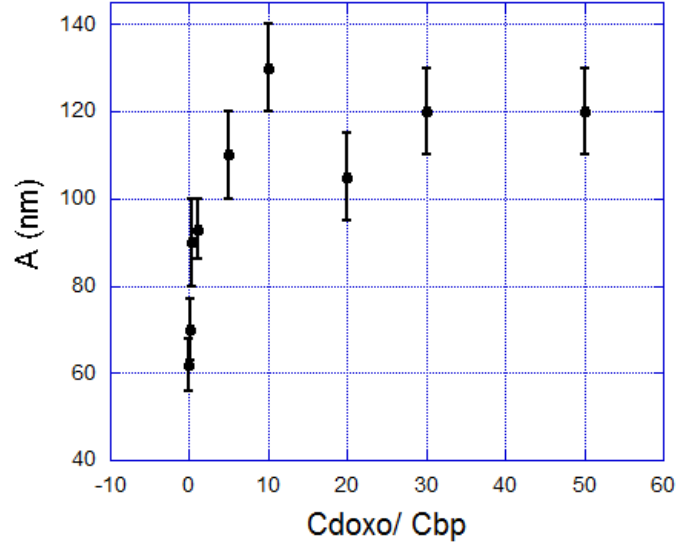
ligações de hidrogênio seja de  $5k_B T$  por ligação ( $T = 298K$ ) [32,59] tem-se que a energia necessária para quebrar as pontes entre pares de base quaisquer é  $\sim (2,5)G_{pontesH} = 12,5k_B T$ . Isso seria equivalente a 1/8 da energia necessária em uma ligação covalente ( $100k_B T$  ou  $500KJ/mol$ ). Com relação a pinça óptica, esse valor corresponderia a uma força externa máxima da pinça de  $\sim 50pN$ . O que é um valor alto, mas precisamos pensar em todas as aproximações realizadas e no fato de que a torção também retira parte da estabilidade das pontes de hidrogênio.

A intercalação é um processo energeticamente favorável, principalmente devido a interações hidrofóbicas, levando a um complexo mais estável quanto a desnaturação total [60]. Um complexo DNA-intercalantes pode ser pensada como uma molécula de DNA com grampos (intercalantes) aumentando sua estabilidade global. Assim, esses "grampos" impediriam que a desnaturação total ocorresse, mas por outro lado, a presença destes gera tensões entre as ligações de hidrogênio já existentes. Logo, teríamos um complexo mais estável globalmente, mas que poderia também se modificar localmente.

Em experimentos onde somente as forças internas ao sistema estão presentes, a queda em  $A$  presente nos gráficos 4.4(a) e 4.4(b) não é observada. Usualmente, neste tipo de experimento, o comprimento de persistência cresce com a concentração do intercalante e estabiliza em um valor acima do esperado para o DNA puro [16–21], ou seja, são curvas monotônicas crescentes (figura 4.6), bem diferentes do observado em experimentos de pinçamento. Além disso, trabalhos de intercalantes com compostos condensadores (PEG e BSA) mostraram que os agentes intercalantes inibem a compactação dos complexos finais [64–67], indicando um aumento na rigidez dos mesmos. Os agentes condensadores trabalham "protegendo" as pontes de hidrogênio, enquanto que o intercalante se acomoda entre os pares de base aumentando a tensão local. Logo, neste tipo de experimento, não ocorre desnaturação parcial, somente um aumento efetivo em  $A$ . Estes resultados consolidam a interpretação da dependência de  $A$  com  $F_{max}$ .

Realizamos também medidas de deposição de AFM, figura 4.6, as quais corroboram muitos dos trabalhos de deposição de intercalantes, levando a comportamentos monotônicos crescentes de  $A$  em relação a  $C_{int}$  (concentração do intercalante).

## 4.2 Doxorrubicina e Brometo de Etídio

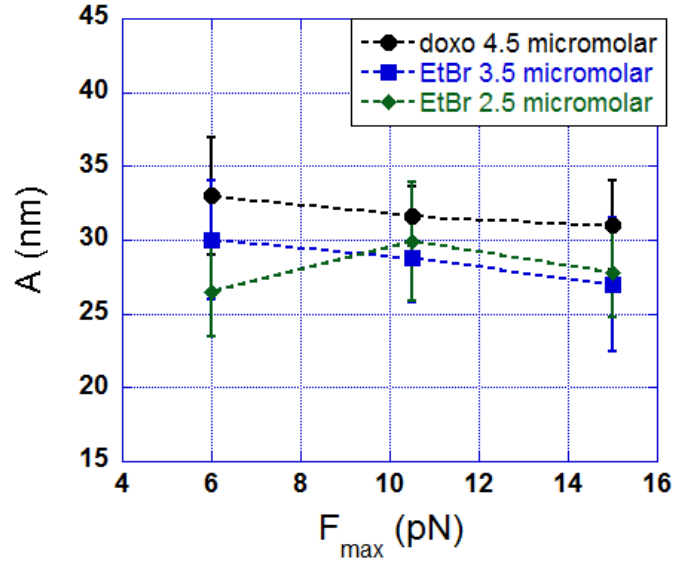


**Figura 4.6:** Dados de persistência de complexos formados com doxorrubicina obtidos via deposição AFM. As barras de erro correspondem ao erro padrão das medidas.

Além dos experimentos acima citados, outra tentativa de evidenciar o papel da  $F_{max}$  foi realizar o processo inverso de estiramento para duas concentrações de brometo de etídio ( $2.5$  e  $3.5\mu M$ ) e uma concentração de doxorrubicina ( $4.5\mu M$ ), ou seja, primeiramente estirou-se o complexo com  $15pN$ , depois com  $10.5pN$  e, por fim, com  $6pN$ , isso tudo depois que a alíquota foi trocada. De fato, pode-se observar que, para concentrações  $< 4,5\mu M$  para a doxorrubicina (figura 4.4(a)) e  $< 2.5\mu M$  para o BrEt (figura 4.4(b)), a atuação da menor força ( $6pN$ ) não é o suficiente para que a desnaturação ocorra. No entanto, quando utiliza-se  $15pN$ , mesmo nestas concentrações, o valor efetivo de  $A$  cai indicando a formação das bolhas de desnaturação. Logo, caso a atuação da força externa não modifique a estrutura do complexo, o valor de  $A$  não dependerá da ordem na qual as forças sejam aplicadas.

Os resultados estão presentes no gráfico 4.7, os quais mostram que após serem estirados com  $15pN$  os complexos apresentam valores de  $A$  iguais para todas as  $F_{max}$  (dentro das barras de erro). Pode-se concluir, portanto, que a estrutura realmente se alterou, sendo que o complexo agora apresenta regiões de fitas simples, as quais provavelmente se originaram com  $15pN$ . Caso isso não ocorresse os valores de  $A$  para  $6pN$  seriam por volta de  $60nm$  para a doxorrubicina enquanto que para o BrEt teríamos

## 4.2 Doxorubicina e Brometo de Etídio



**Figura 4.7:** Variação do comprimento de persistência  $A$  com a força máxima ( $F_{max}$ ) para duas concentrações de brometo de etídio (2.5 e 3.5  $\mu M$ ) e uma concentração de doxorubicina (4.5  $\mu M$ ) onde o processo inverso de estiramento foi realizado. Sendo os complexos primeiramente estirados com 15  $pN$ , depois com 10.5  $pN$  e, por fim, com 6  $pN$ . As barras de erro correspondem ao erro padrão das medidas.

valores de 70  $nm$  para a concentração de  $\sim 2.5 \mu M$ . Observando os dados podemos concluir que esse efeito é irreversível.

A abordagem utilizada na interpretação dos resultados se baseia no fenômeno de desnaturação parcial, o qual indica uma desestruturação local. Como se sabe, modificações estruturais devem analisadas dentro do regime entálpico. Sendo assim, o que justificaria a utilização da equação de Marko e Siggia (restrita para o regime entrópico)?

Cada um dos valores de persistência mencionados nos gráficos foram o resultado da média de vários estiramentos para uma mesma concentração de intercalante e uma mesma força externa. Estes estiramentos realizados com uma concentração alta de intercalante mostraram uma queda abrupta da persistência logo na primeira medida (mesmo para forças baixas), enquanto que o valor se tornou invariante nas demais (dentro da barra de erro). Isto significa que o complexo desnaturou parcialmente muito rápido, provavelmente durante o primeiro estiramento. Assim, qualquer efeito entálpico estaria restrito à primeira medida, e a partir da segunda temos um polímero

## 4.2 Doxorubicina e Brometo de Etídio

---

semiflexível onde o WLC é válido. Em outras palavras, o efeito entálpico existe, mas ocorre e acaba muito rapidamente, provavelmente todo no primeiro estiramento.

Atualmente não há nenhum modelo que trabalhe em baixas forças e ainda seja capaz de trabalhar com esse tipo de efeito, mencionado no parágrafo acima. Portanto, o modelo WLC ainda é a melhor alternativa na análise dos dados experimentais.

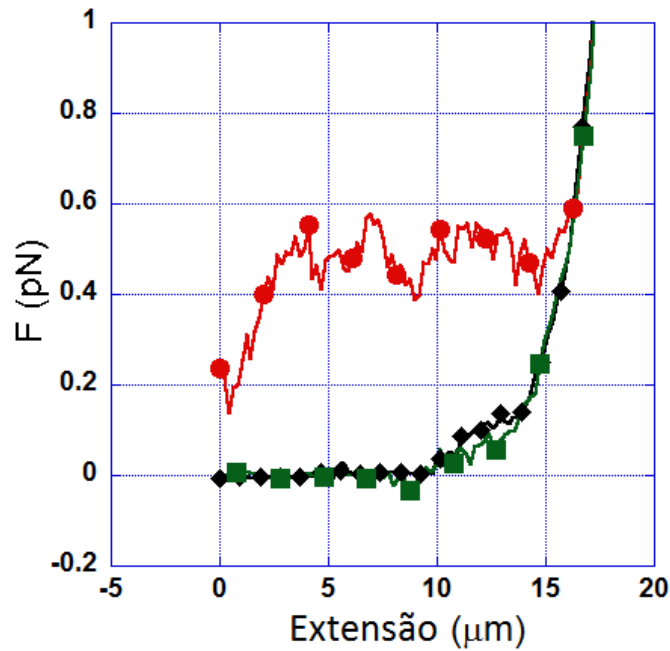
Um outro ponto importante, está relacionado com os resultados apresentados pelo gráfico 4.7. Esses dados nos mostram que a modificação estrutural é irreversível e, se a queda na persistência fosse somente um efeito do modelo utilizado, ela não faria sentido. Assim, os resultados não seriam dentro das barras de erro os mesmos e sim, uma reprodução dos dados utilizando as forças de maneira crescente.

Por fim, um último experimento foi realizado para corroborar a suposição de desnaturação parcial do complexo. A idéia deste experimento é mostrar caso haja alguma modificação estrutural, o que pode ser observado com curvas de histerese. Para isso, inicialmente estiramos o complexo formado com a doxorubicina ( $4.5\mu M$ ) até quase em sua extensão máxima ( $\sim 0.97L_o$ ) e em seguida revertemos a velocidade do piezoelétrico para voltar a posição de equilíbrio com  $6pN$ , como mostra os diamantes pretos e os quadrados verdes na figura 4.8. Estas curvas não apresentam diferenças, ou seja, nenhuma modificação estrutural aconteceu no complexo para  $6pN$ . Ainda pode-se ajustar as curvas, ida e volta para  $6pN$ , com o modelo WLC [50] obtendo-se os valores  $A$  de acordo com 4.4(a).

Na outra parte deste experimento, o complexo foi estirado com  $6pN$  até  $\sim 0.97L_o$  (considerando uma molécula com  $16.5\mu m$ , o estiramento seria até  $\sim 16\mu m$ ) e, nesse momento, a potência do laser foi alterada ( $15pN$ ) levando novamente o complexo para a posição de equilíbrio. Os círculos em vermelho na figura 4.8 mostram a volta do complexo com  $15pN$ , onde evidencia-se a modificação estrutural do complexo já que uma aparente desestruturação ocorreu. Compatível com a ideia da formação das bolhas de desnaturação.

Este mesmo tipo de experimento também foi realizado para moléculas de DNA puro, não sendo vista nenhuma modificação nas curvas de força x extensão, mesmo para os maiores valores de  $F_{max}$ . Esse resultado indica que o efeito está relacionado a

## 4.2 Doxorrubicina e Brometo de Etídio



**Figura 4.8:** Curvas de força por extensão de um complexo formado com doxorrubicina ( $4.5\mu M$ ). Onde os quadrados verdes e os diamantes pretos mostram o estiramento e volta a posição de equilíbrio para  $6pN$ , enquanto que os círculos em vermelho mostram a volta para um DNA que teve a força da pinça alterada de  $6pN$  para  $15pN$  próximo ao seu valor máximo de extensão.

persistência do DNA-intercalante.

É importante ressaltar que este experimento foi realizado com somente um estiramento, pois a modificação estrutural se encontra restrita a primeira medida. Assim, vários experimentos foram realizados com o intuito de estirar somente uma vez um complexo DNA-intercalante de acordo com o procedimento mostrado acima, fornecendo os resultados da figura 4.8. Depois que a modificação ocorre, tem-se um novo polímero semiflexível com novas propriedades mecânicas ( $L_o$  e  $A$ ).

Mesmo considerando a interpretação de que há alteração entálpica, ainda assim existiria uma defasagem entre os resultados obtidos por meio da pinça óptica e pelas deposições em AFM, o que corrobora nossa interpretação da dependência das propriedades mecânicas com a força externa aplicada.

Depois de realizar todos os experimentos com DNA-intercalantes, pode-se afirmar, sem sombra de dúvida, que não somente o regime entálpico de forças pode alterar

## 4.2 Doxorrubicina e Brometo de Etídio

---

as propriedades mecânicas. Isso por que, mesmo dentro do regime entrópico também há o efeito causado por forças máximas distintas, para o caso de complexos formados com intercalantes [68]. Assim, os menores valores de  $F_{max}$  possíveis devem ser utilizados de forma que as propriedades não sejam mascaradas pela força.

# Capítulo 5

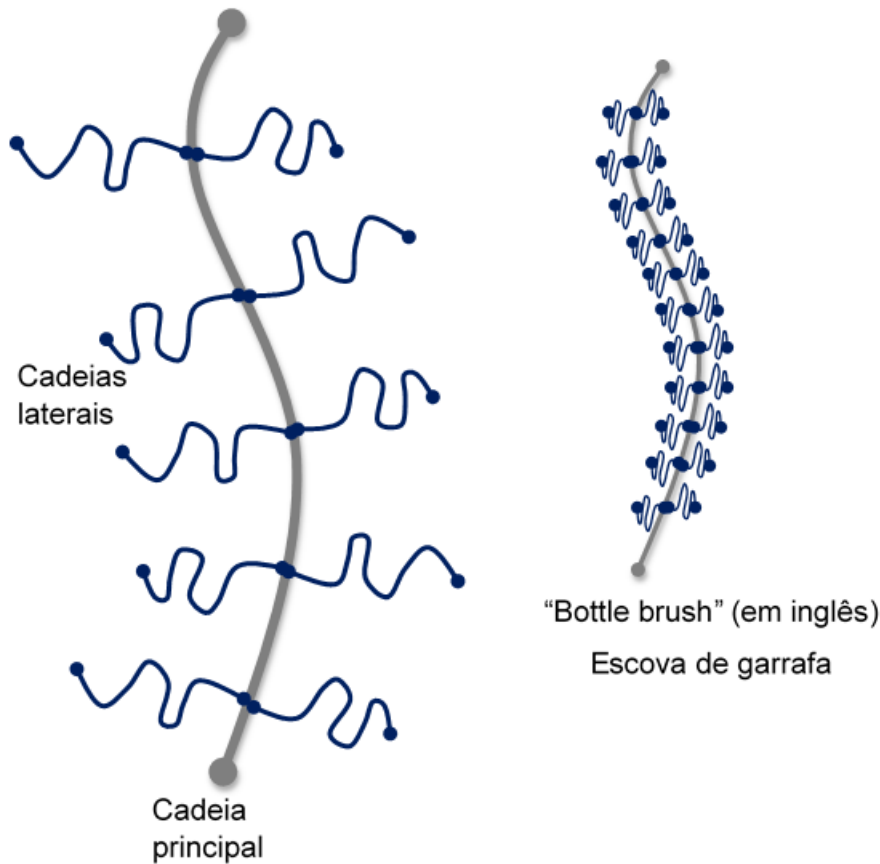
## Experimentos com Bottle Brush

Os polímeros do tipo "bottle brush" apresentam uma cadeia de monômeros principal, da qual emergem cadeias laterais secundárias menores iguais. Logo, essa estrutura é classificada como um polímero ramificado [1,2,33]. A figura 5.1 mostra a estrutura desse tipo de polímero e à esquerda, tem-se um zoom do mesmo.

Nas articulações do corpo humano podemos encontrar exemplos de estrutura tipo bottle brush. A lubricina (Lubricin), agrecana (aggrecan) e ialoronana (Hyaluronan) são responsáveis tanto pela lubrificação, capacidade de suportar o peso e evitar o desgaste das cartilagens. Trabalhos recentes associam a falta de lubricina no líquido sinovial com a osteoartrite [69]. Um outro exemplo de polímero ramificado aparece nos neurofilamentos. As cadeias laterais são carregadas e se a interação dos braços se der de maneira incorreta, pode-se levar a doenças neuro-motoras [70].

Devido à importância destes polímeros, muitos trabalhos visam sintetizar compostos similares a lubricina [71,72]. O objetivo desses estudos é melhorar tanto a durabilidade de próteses quanto o tratamento de doenças como a osteoartrite. Além disso, existem trabalhos que utilizam estruturas "bottle brush" formadas com moléculas de DNA, visando a eficiência na detecção de biomoléculas por fluorescência [72,73].

Neste trabalho deseja-se construir um polímero tipo "bottle brush" e estudar suas propriedades, visando, posteriormente, a síntese de complexos que sejam estruturas individuais (monomoleculares), possivelmente protetoras, com a rigidez e o contorno controlados. Já que a proteína Sso7d-C8 foi sintetizada artificialmente, não existem



**Figura 5.1:** Esquema da estrutura de um polímero tipo "bottle brush", ou seja, ramificado.

muitos trabalhos na literatura abordando suas características [74], o que nos motiva a pesquisar possíveis aplicações.

Neste capítulo os resultados dos experimentos realizados com DNA-Sso7d-C8 utilizando PO e AFM serão apresentados e discutidos com base nos nossos objetivos.

## 5.1 DNA 3kbp e Sso7d-C8

A proteína recombinante Sso7d-C8, utilizada neste experimento, foi sintetizada pelo grupo do professor Renko de Vries [29], pesquisador da universidade de Wageningen. Este é um novo composto artificial altamente assimétrico, produzido com o intuito de melhorar processos como a distribuição de ácidos nucleicos, mapeamento e sequenciamento genético [75–78]. Além de modular a forma, rigidez, extensão e

## 5.2 Sso7d-C8

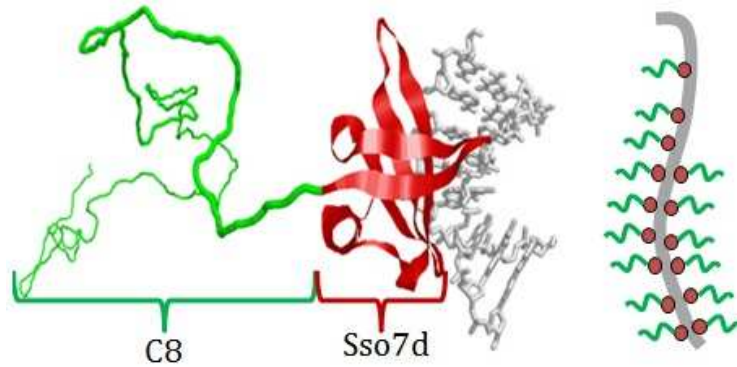
---

proporcionar a proteção de moléculas de DNA únicas cobertas [76,78,79]. Para isso, sequências genéticas foram modificadas (recombinação genética) e utilizando leveduras (*Pichia pastoris*), as proteínas foram produzidas.

A Sso7d (63 aminoácidos ou 7KDa) é uma proteína produzida por uma arqueobactéria (*Sulfolobus solfataricus*) e usualmente são utilizadas no processo de PCR (Polymerase Chain Reaction), sintetização de DNAs e RNAs. Interessante notar que a interação da Sso7d com a molécula de DNA estabiliza o complexo formado em condições extremas de alta temperatura e baixo pH [29]. A interação desta proteína com o DNA é de origem eletrostática e a afinidade com as fendas é grande. As características do complexo DNA-Sso7d já são bem conhecidas [26,80–83].

Com o intuito de estabilizar, proteger, enrigecer e modificar o complexo formado, uma longa cauda hidrofílica negativa formada por 796 aminoácidos (C8) foi inserida na proteína. Em solução ( $pH = 7,4$ ) a cauda apresenta uma carga efetiva de -10 enquanto que a proteína da arqueobactéria apresenta +4. Caso analisemos a carga efetiva do composto teríamos que a interação com o DNA seria repulsiva, porém o agente ligante é a proteína  $Sso7d^{4+}$ . A figura 5.2 mostra o complexo interagindo com a molécula de DNA. A cauda hidrofílica é representada em verde e se encontra voltada para a solução, enquanto que a Sso7d, representada em vermelho, encontra-se ligada à fenda da molécula (representada em cinza). A direita tem-se o complexo formado quando várias das proteínas interagem com uma molécula de DNA linear, este complexo é chamado de "bottle brush". O efeito da interação (DNA-Sso7d-C8) no complexo final modifica sua elasticidade, devido a repulsão eletrostática entre as caudas de aminoácidos, porém, praticamente não altera seu comprimento de contorno  $L_o$ .

O DNA utilizado nos experimentos de pinça óptica é o do fago  $\lambda$  (48,5kbp), já o DNA utilizado na deposição é de 3kbp ( $1\mu m$ ) (Thermo Scientific).



**Figura 5.2:** À esquerda, tem-se a interação de poucas sequencias do DNA com a Sso7d-c8. Enquanto que, à direita, tem-se o complexo final formado por várias ligações [29].

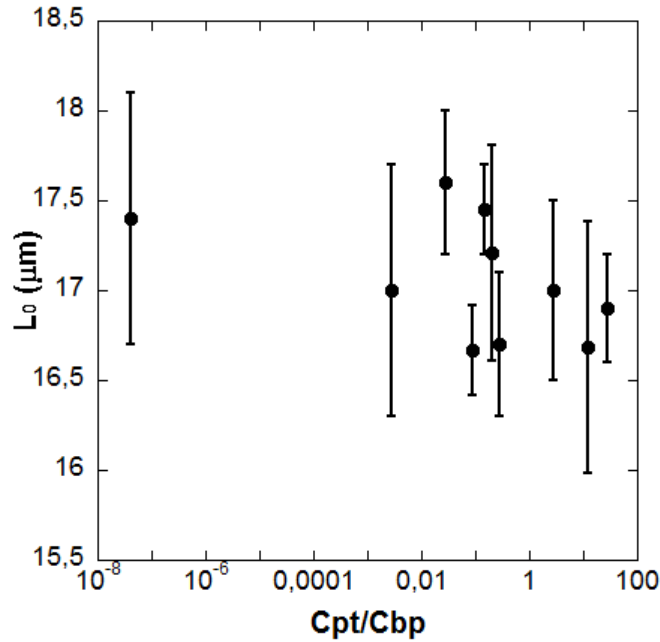
## 5.2 Estudo do bottle brush formado com Sso7d-C8

Iniciou-se o estudo do complexo DNA-Sso7d-C8 via pinçamento óptico, sendo que as concentrações de proteína foram acrescidas e em cada modificação da mesma, os parâmetros mecânicos do complexo ( $A, L_o$ ) foram determinados. Ao final dos experimentos, observou-se uma modificação clara no comprimento de persistência do complexo ( $A$ ), figura 5.3. O mesmo não pode ser dito sobre o comprimento de contorno  $L_o$ , como pode ser visto na figura 5.4.

A figura 5.3 mostra que  $A$  decresceu com o aumento da razão entre as concentrações ( $[Sso7d-C8]/[DNA_{pb}]$ ) chegando, por fim, a uma saturação e a consequente estabilização por volta de  $15nm$ . Portanto, o complexo se tornou mais flexível com o aumento de  $C_{ptn}/C_{pb}$ . Isso, possivelmente, se deve à interação entre segmentos consecutivos do complexo onde há a atração entre os grupos fosfatos e o bloco Sso7d e entre blocos ligados de Sso7d e as caudas C8, aumentando o número de dobras. Além disso, as interações de repulsão e atração, as quais são de curto alcance em soluções [36], são suprimidas devido a atuação da força externa (pinça óptica).

Observe que o valor de  $A$  cai e estabiliza em torno da razão 1 proteína para cada 4 pares de base ( $\sim 0.25 = C_{ptn}/C_{pb}$ ), o que está de acordo com as análises realizadas pelo grupo do professor de Vries [29]. De fato, um dos experimentos de mobilidade

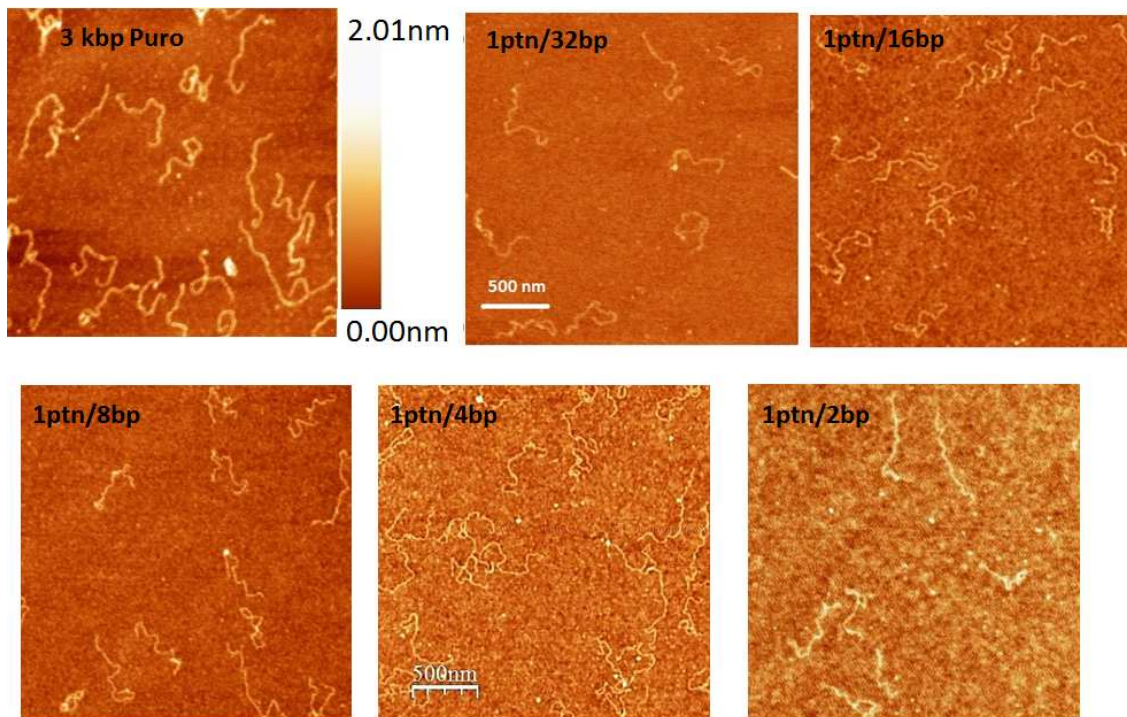




**Figura 5.4:** Variação do comprimento de contorno  $L_o$  em relação a razão entre as concentrações ( $[\text{Sso7d-C8}]/[\text{DNAbp}]$ ) via pinçamento óptico (PO). As barras de erro fornecem o erro padrão das medidas.

Sso7d-C8 com relação ao comprimento de persistência  $A$ . Observe que, primeiramente, ocorre uma pequena queda seguida pelo aumento desta propriedade. Diferentemente do que foi observado no caso da pinça óptica, o comprimento de persistência satura em um valor alto, por volta de 95nm. Esse resultado é semelhante ao obtido em deposições de complexos realizados com moléculas de DNA circulares. Neles os complexos se abriram e se enrigeceram na razão  $N/P = 1.5$ , o que indica um aumento do comprimento de persistência efetivo. Valores maiores de  $Cptn/Cbp$  não foram explorados, pois análises com diferentes experimentos demonstraram que em  $N/P = 1$  a saturação já é alcançada. Além disso, experimentos de espalhamento de luz, realizados pelo mesmo grupo, mostraram novamente que o comportamento qualitativo do complexo DNA-Sso7d-C8 tende a aumentar  $A$  e saturar em um valor maior do que o DNA puro [29].

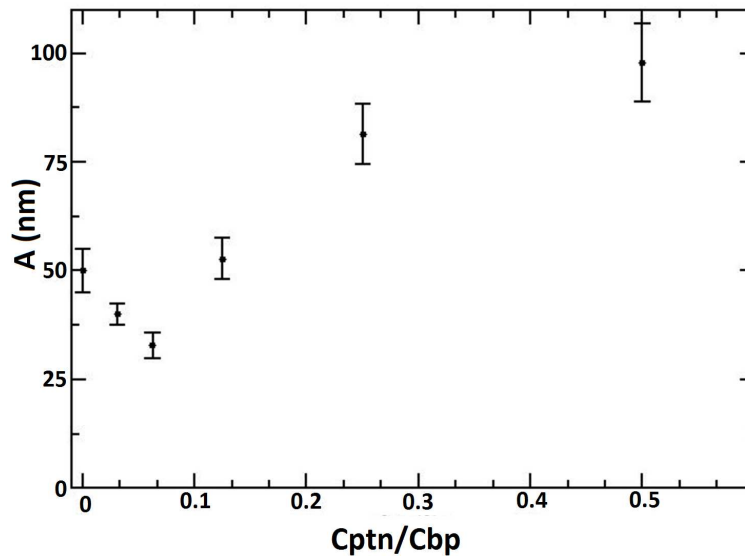
A queda inicial na figura 5.6 pode ser explicada devido à repulsão entre sítios ligados ser menor, já que a quantidade de sítios ligados é menor (o sistema está blindado). A atração entre o grupo Sso7d e os grupos fosfato livres pode fazer com que



**Figura 5.5:** Imagens de AFM de um DNA com 3kbp. A primeira imagem mostra o DNA puro e as demais mostram os complexos formados com a proteína a medida que a razão entre as concentrações aumenta.

o complexo gere mais dobras levando a uma queda no comprimento de persistência. Porém, a partir do momento em que a quantidade de sítios ligados é relevante para que a repulsão entre os grupos C8 se sobressaia, a molécula diminui a quantidade de dobras e conseqüentemente sua flexibilidade. O resultado final obtido são complexos conhecidos como bottle brush, ou melhor, "escovas de garrafa", devido aos grupos C8 serem hidrofílicos e se direcionarem para a solução.

Observe que por volta de 1 proteína para 4 pares de base tem-se o início da saturação do complexo (figura 5.6), bem como o resultado obtido com a pinça óptica. É evidente que quando se fala em 1 proteína por 4 pares de base, refere-se a concentração total da proteína em relação a concentração de DNA em pares de base na solução. Mas, sabe-se que mesmo tendo-se esta concentração em solução existe uma distribuição de moléculas próximas a esta configuração. Assim, nem todas as moléculas estão cobertas com exatamente 1 proteína em cada 4 pares de base.



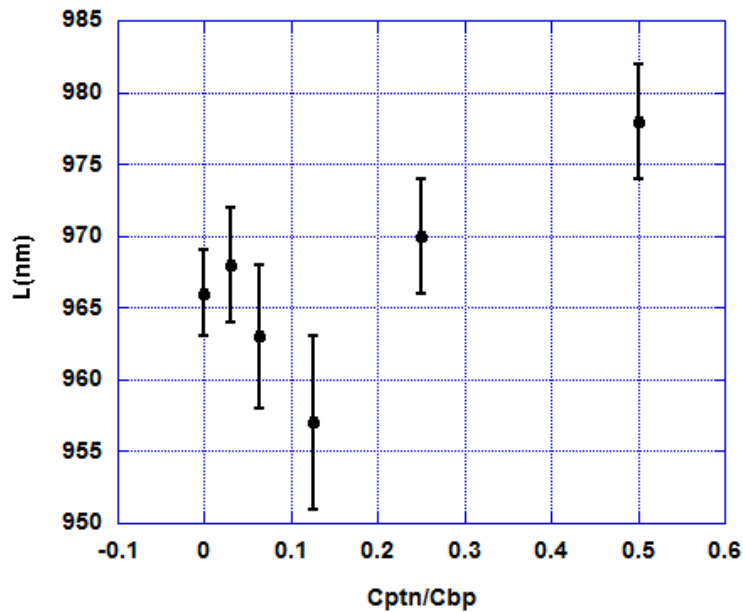
**Figura 5.6:** Variação do comprimento de persistência em relação a razão entre as concentrações ( $Cptn/Cbp$ ) via microscopia de força atômica (AFM). As barras de erro correspondem ao erro padrão das medidas.

Mesmo quando fala-se somente na Sso7d formando complexos com o DNA, experimentos de espalhamento reportam um aumento na persistência  $A$  do complexo com o aumento da concentração de Sso7d. Além disso, a saturação também é 1 proteína para cada 4 pares de base [84], o que era esperado, já que o agente ligante é o domínio Sso7d (proteína natural) da proteína recombinante (Sso7d-C8). Mais do que isso, o valor da persistência na saturação para a proteína recombinante é maior do que o obtido se tratando somente da Sso7d. Isso também poderia ser previsto, já que a repulsão entre as caudas hidrofílicas coloidais levaria a uma persistência efetiva maior considerando a superpopulação da proteína na molécula de ácido desoxirribonucleico.

Outros complexos bottle brush, como a  $C_4K_{12}$ , se comportam de maneira similar. A  $C_4K_{12}$  interage fisicamente com o DNA (interação eletrostática) e o aumento da sua concentração em solução aumenta a persistência efetiva do complexo. Isso em experimentos de AFM e espalhamento de luz [74]. Devido a origem da interação, soluções com forças iônicas menores (Tris 10mM) levam a mais proteínas interagindo, cerca de 75% do DNA é coberto com a proteína. Da mesma forma, a Sso7d-C8 depende da força iônica, por isso utilizamos tampões com baixa força iônica.

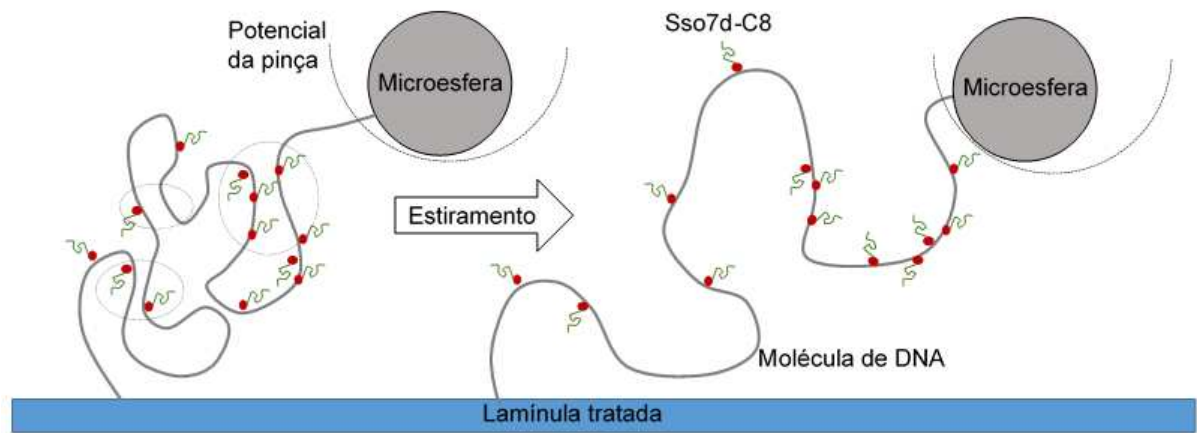
## 5.2 Sso7d-C8

De acordo com a figura 5.7 o comprimento de contorno  $L_o$  se alterou de maneira semelhante ao comprimento de persistência mostrado na figura 5.6. A queda inicial ocorre devido a modificações estruturais relacionadas à ligação da Sso7d com a molécula de DNA [74]. Enquanto que o aumento final se deve a repulsão entre as caudas de aminoácidos. A distribuição de tamanhos é razoavelmente larga o que reflete um erro padrão grande também. [32].



**Figura 5.7:** Variação do comprimento de contorno em relação a razão entre as concentrações ( $[proteína]/[DNA_{bp}]$ ) via microscopia de força atômica (AFM). As barras de erro correspondem ao erro padrão das medidas.

Note ainda a grande diferença de  $A$  em relação as duas técnicas utilizadas. O que não era esperado, pois o comprimento de persistência é definido como uma propriedade do polímero para  $T$  constante. No entanto, para valores da razão entre as concentrações ( $C_{ptn}/C_{bp}$ ) de 0.2, enquanto na PO os valores de  $A$  decrescem, no AFM, os valores crescem. Já que o ligante é o mesmo e as razões são similares, o que poderia desencadear tal incoerência? Existem várias diferenças entre as técnicas, mas a principal seria a força externa gerada devido à pinça óptica. Comprovando o efeito da  $F_{ext}$ , trabalhos de espalhamento e deposição com a proteína mostram um valor de  $A$  maior na saturação, ambos divergindo dos valores obtidos para o pinçamento óptico [29].



**Figura 5.8:** Esquema do processo de estiramento do complexo DNA-Sso7d-C8. Observe a alteração nas interações entre segmentos do complexo com a evolução do estiramento.

Um fato a se considerar seria que as caudas de aminoácidos distribuídas não-homogêniamente pelo polímero fornecem diferentes interações entre segmentos do complexo. Algo não contabilizado na equação de Marko e Siggia [50] onde a correlação entre dobras adjacentes depende somente de propriedades constantes do polímero em solução e de seu comprimento  $s$ . As interações locais podem ser contabilizadas transformando a rigidez flexural  $k_f$  em uma função do comprimento do polímero  $s$ , ou seja, agora a persistência ( $A = A(s)$  ou melhor  $A = A(q) = A(\frac{2\pi \sin \theta}{\lambda})$ ) dependerá das interações entre os segmentos do polímero. A figura 5.8 mostra o esquema de um polímero gerado pela interação entre o DNA e a proteína recombinante Sso7d-C8 sendo estirado pela pinça óptica. Observe que as interações locais entre segmentos se alteram com as modificações configuracionais da molécula, ou seja, tem-se que a persistência dependerá de quais segmentos estão interagindo. Corroborando o que foi dito no parágrafo acima. Note que o complexo em sua posição de equilíbrio apresenta o maior número de configurações possível e esse número segue decrescendo a medida que o polímero é estirado. No momento em que ele está completamente estirado, tem-se a situação de entropia mínima. Essa análise claramente exemplifica a mudança nas interações locais com a configuração para o complexo.

Esse fenômeno não é observado no caso do AFM, já que nessa situação o número

de configurações está livre para variar até que a mais favorável seja encontrada e a adsorção do complexo ocorra. As interações locais prevalecem e tem-se uma distribuição de conformações adsorvidas.

Assim, os experimentos evidenciam que a interação entre a Sso7d-C8 e o DNA causa alterações na elasticidade do complexo, ou seja, em  $A$ , e de maneira similar modifica o comprimento de contorno ( $L_o$ ) para o AFM. Além disso, a aparente contradição entre os resultados da PO e do AFM indica uma dependência dos parâmetros mecânicos do complexo com a força externa aplicada. Já que, como foi dito anteriormente, o estiramento do complexo modifica as interações entre diferentes segmentos do complexo.

# Capítulo 6

## Conclusões e Perspectivas

Complexos específicos formados com intercalantes (Doxorrubicina e Brometo de Etídio) e com a proteína recombinante (SSo7d-C8) foram expostos a forças externas. A análise dos complexos formados por intercalantes foi realizada variando-se a força máxima (dentro do regime entrópico). O estudo do polímero DNA-Sso7d-C8 foi realizado por pinçamento óptico (força máxima  $6pN$ , regime entrópico) e microscopia de força atômica (AFM).

Os resultados mostraram que tanto os complexos formados com intercalantes quanto a estrutura "bottle brush" (resultado da interação DNA-Sso7d-C8) apresentam elasticidade efetiva dependente da força externa. Ou seja, estes polímeros mudam de comportamento quando submetidos à forças distintas. No caso dos intercalantes, a origem do efeito é relativa tanto a concentração do intercalantes quanto a força externa máxima, sendo um trabalho conjunto entre essas duas variáveis. Enquanto que para o complexo DNA-Sso7d-C8 o efeito tem origem na modificação das interações locais desencadeada pelo estiramento do polímero.

Isso mostra que cada experimento fornecerá propriedades físico-química distintas, o que seria um problema no caso de aplicações em tratamento de cânceres. Mas, para a elaboração de dispositivos biológicos sensíveis a forças externas ou até mesmo a estruturas que respondam de forma distinta a variação da força seria um grande avanço.

Analisando o sistema de forma física, podemos associá-lo a mola convencional.

## Conclusões e Perspectivas

---

A constante de força  $A$ , neste caso, varia dentro do regime elástico (regime entrópico). Algo negligenciado em experimentos da área.

As propostas para novos trabalhos incluem a síntese de novos polímeros com elasticidade força-dependente, a análise da dependência da elasticidade de complexos formados com ligantes de fenda (Berenil, DAPI) e que interagem formando ligações covalentes com a molécula de DNA (Cisplatina), bem como estudar a viscosidade dos polímeros tipo bottle brush e sua aplicação em dispositivos nanométricos e micrométricos.

# Apêndice A

## Modelo WLC 3D

Nesta seção a teoria por trás do modelo será brevemente abordada, onde iniciaremos com pequenos estiramentos (próximos a conformação de equilíbrio). Posteriormente passando por estiramentos longe da conformação de equilíbrio.

### A.0.1 Pequenos estiramentos

A força para pequenos estiramentos pode ser aproximada pela Lei de Hooke, onde a extensão  $z$  do polímero pode ser tratada como a "distância ponta-à-ponta" do polímero. Assim, tem-se:

$$F = -Kz = -K\sqrt{\langle R_{ee}^2 \rangle}. \quad (\text{A.1})$$

Considerando o limite flexível ( $L \gg A$ ) e utilizando a expressão para a distância ponta-à-ponta para o modelo Worm-Like Chain calculada no apêndice B, tem-se que :

$$F \cong -K\sqrt{2AL}. \quad (\text{A.2})$$

Agora, utilizando-se o princípio da equipartição da energia para a energia potencial elástica do DNA, que é  $kz^2/2 = 3k_B T/2$ , pode-se determinar a constante de mola e escrever a expressão da força para pequenos estiramentos.

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

## A.0.2 Estiramentos longe da conformação de equilíbrio

Dando sequência ao estudo deste modelo, analisaremos o caso de uma molécula muito estirada. Neste caso, pode-se escrever a energia como o modelo de Kratky-Porod ([85]), todavia o trabalho necessário, realizado pela força para manter o polímero nesta conformação será excluído, assim:

$$E_{WLC} = \frac{k_f}{2} \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - Fz, \quad (\text{A.4})$$

onde a força  $F$  é um multiplicador de Lagrange cujo papel é manter  $z$  constante.

Além disso, tem-se que  $z \sim L$  e o vetor  $\hat{t}(s)$  é praticamente paralelo a curva  $s$ . O que reflete uma componente  $t_z$  maior do que as demais ( $t_x$  e  $t_y$ ), com o vetor  $\hat{t}(s)$  sendo descrito da forma:

$$\hat{t} = t_x \hat{i} + t_y \hat{j} + t_z \hat{k} \quad (\text{A.5})$$

e

$$|\hat{t}|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2 + |t_z|^2 = |t_z|^2 + |t_\perp|^2 = 1. \quad (\text{A.6})$$

Já que  $|t_\perp| \ll 1$ , pode-se realizar uma aproximação em primeira ordem levando a seguinte relação entre  $|t_z|$  e  $|t_\perp|$ , e escrevendo  $z$ , tem-se:

$$z = \int_0^L |t_z| ds \cong \int_0^L \left( 1 - \frac{|t_\perp|^2}{2} \right) ds. \quad (\text{A.7})$$

Agora substituindo a equação A.7 na equação A.4 tem-se a seguinte expressão para a energia:

$$E_{WLC} = \frac{k_B T}{2} \int_0^L \left[ A \left| \frac{\partial t_\perp}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_B T} |t_\perp|^2 \right] ds - FL, \quad (\text{A.8})$$

onde a aproximação  $\frac{\partial t}{\partial s} \cong \frac{\partial t_\perp}{\partial s}$  foi utilizada, já que  $t_z$  é aproximadamente constante ao longo da curva.

Com base na equação A.8, tem-se que para cada modo normal, obtido por meio da transformada de Fourier, há uma energia associada, dada por:

$$E_i = \frac{k_B T}{2} \left( Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right) |\tilde{t}_i(q)|^2. \quad (\text{A.9})$$

Logo, a função partição  $Z$  do sistema será :

$$Z = \int e^{-\frac{E_i}{k_B T}} d|\tilde{t}_i(q)| = \int \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right) |\tilde{t}_i(q)|^2 \right] d|\tilde{t}_i(q)| = \sqrt{\frac{2\pi k_B T}{Aq^2 k_B T + F}} \quad (\text{A.10})$$

Sabendo disso, pode-se agora determinar o valor quadrático médio de  $|\tilde{t}_i(q)|$ , o qual, por definição, é :

$$\langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle = \frac{1}{Z} \int |\tilde{t}_i(q)|^2 \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right) |\tilde{t}_i(q)|^2 \right] d|\tilde{t}_i(q)|, \quad (\text{A.11})$$

a qual possui forma gaussiana e solução conhecida. Logo, pode-se substituir o valor de  $Z$  (equação A.10) na equação acima obtendo o valor quadrático médio de  $|\tilde{t}_i(q)|$  :

$$\langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle = \frac{k_B T}{Aq^2 k_B T + F}. \quad (\text{A.12})$$

Por fim, pode-se determinar o valor médio de  $|\tilde{t}_\perp(q)|^2$  integrando-se o valor médio obtido na equação A.12 sobre todos os modos normais e multiplicando por 2 (duas componentes de  $\hat{t}_\perp$ ). O que fornece:

$$\langle |t_\perp|^2 \rangle = 2 \int \frac{dq}{2\pi} \langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle = \frac{1}{\pi} \int dq \left( \frac{k_B T}{Aq^2 k_B T + F} \right). \quad (\text{A.13})$$

Realizando uma simples mudança de variáveis ( $x^2 = \frac{Ak_B T q^2}{F}$ ), obtem-se uma função arco-tangente. A qual nos limites de integração ( $-\infty$  à  $+\infty$ ) fornece:

$$\langle |t_\perp|^2 \rangle = \sqrt{\frac{k_B T}{FA}} \quad (\text{A.14})$$

Para valores de  $z$  longe da conformação de equilíbrio, tem-se que:

$$\frac{z}{L} \cong |t_z| \cong 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{k_B T}{FA}}. \quad (\text{A.15})$$

Finalmente, pode-se obter a expressão para a força em função da extensão ( $z$ ) para longos estiramentos:

$$F = \frac{k_B T}{4A} \left[ \frac{1}{\left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} \right]. \quad (\text{A.16})$$

## Apêndice B

### Cálculo de $\langle R_{ee}^2 \rangle$ para o modelo

### WLC 3D

Considere uma curva  $s$  cujo início seja marcado pelo vetor  $\vec{r}(0)$  enquanto que no final tem-se  $\vec{r}(L_0)$ . Logo, a distância quadrática média é:

$$\langle \vec{R}_{ee}^2 \rangle = \langle [\vec{r}(L_0) - \vec{r}(0)]^2 \rangle. \quad (\text{B.1})$$

Onde  $\vec{r}(L_0) - \vec{r}(0)$  pode ser facilmente substituída por:

$$\vec{r}(L_0) - \vec{r}(0) = \int_0^{L_0} \hat{t}(s') ds', \quad (\text{B.2})$$

Já que

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

Agora, pode-se utilizar a equação B.1 juntamente com B.2 para expressar o valor de  $\langle R_{ee}^2 \rangle$ :

$$\langle \vec{R}_{ee}^2 \rangle = \left\langle \left[ \int_0^{L_0} \hat{t}(s') ds' \right] \cdot \left[ \int_0^{L_0} \hat{t}(s'') ds'' \right] \right\rangle = \int_0^{L_0} ds'' \int_0^{L_0} ds' \langle \hat{t}(s') \cdot \hat{t}(s'') \rangle \quad (\text{B.4})$$

Porê, sabe-se que  $\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \langle \cos\theta \rangle = e^{-\frac{s}{A}}$ . Substituindo  $\langle \cos\theta \rangle$  em B.4 obtêm-se duas integrais, as quais podem ser facilmente resolvidas fornecendo o

## modelo WLC

---

seguinte valor para a distância ponta-à-ponta quadrática média para o modelo WLD em 3D [1]:

$$\langle R_{ee}^2 \rangle = 2AL_0 - 2A^2 \left[ 1 - e^{-\frac{L_0}{A}} \right] \quad (\text{B.5})$$

Para o limite flexível,  $L_0 \gg A$ , a equação B.5 se reduz imediatamente à:

$$\langle R_{ee}^2 \rangle \cong 2AL_0 \quad (\text{B.6})$$

Porém, no limite rígido ( $L_0 \ll A$ ) a exponencial pode ser expandida até a segunda ordem, onde obtem-se:

$$\langle R_{ee}^2 \rangle \cong L_0^2 \quad (\text{B.7})$$

A equação B.6 foi utilizada no apêndice A desenvolvendo a análise para estiramentos próximos a conformação de equilíbrio. E a equação B.5 foi utilizada na seção 3.2.5 na análise do aprisionamento cinético de uma molécula em uma superfície.

# Apêndice C

## Artigos Publicados e Submetidos.

- Bazoni, R. F.; Lima, C. H. M.; Ramos, E. B. And Rocha, M. S.; "*Force-dependent persistence length of the DNA- intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments*", *Soft matter*, Royal Society of chemistry, (2015),DOI: 10.1039/c5sm00706b.
- Silva, E. F.,Bazoni, R. F., Ramos, E. B., Rocha, M. S.; *DNA-doxorubicin interaction: new insights and peculiarities*, submetido na *Biopolymers* no ano de 2016.

# Referências Bibliográficas

- [1] Rocha, M. Santos "*Interações DNA-ligantes: uma introdução*" (2014), notas de aula.
- [2] Teraoka, I. "*Polymer Solutions: An Introduction to Physical Properties*", A John Wiley and Sons, INC., publication, New York (2002).
- [3] Lokensgard, E. "*Plásticos industriais: teoria e aplicações*", Editora Cengage Learning, Tradução da 5ª Edição Norte-Americana (2013).
- [4] Canevarolo, S. V. "*Ciência dos polímeros*", Editora Artliber, Brasil (2003).
- [5] Daune, M. "*Molecular Biophysics: structures in motion*", OXFORD University Press, London (1999).
- [6] Bates, A. D., Maxweel, A. "*DNA topology*" *Oxford Bioscience*, (2005).
- [7] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Walter, P. "*Biologia Molecular da Célula*", 5ª edição, Editora Artmed, Porto Alegre (1999).
- [8] Cantor, C.R., Schimmel, P.R. "*Biophysical chemistry - part I: The conformation of biological macromolecules*", W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980).
- [9] Kumar, C. S.S.R. "*Biological and Pharmaceutical Nanomaterials*", Nanotechnologies for the life Sciences, volume 2, WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA (2006).

- [10] Rocha, M. S., Ferreira, M. C., and Mesquita, O. N. *J. Chem. Phys.* **127(10)**, Art. No. 105108, (2007).
- [11] Rocha, M. S., Lúcio, A. D., Alexandre, S. S., Nunes, R. W., and Mesquita, O. N. *Appl. Phys. Lett.* **95**, Art. No. 253703, (2009).
- [12] Crisafuli, F. A. P., Ramos, E. B., and Rocha, M. S. *Eur. Biophys. J.* **44(1-2)**, 1-7, (2015).
- [13] Reis, L. A., Ramos, E. B., and Rocha, M. S. *J. Phys. Chem. B* **117(46)**, 14345-14350, (2013).
- [14] Rocha, M. S. "*Tese apresentada ao departamento de física da Universidade Federal de Minas Gerais, Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicação no estudo da interação DNA-fármacos*", (2008).
- [15] Silva, E. F. *Dissertação apresentada ao departamento de física da Universidade Federal de Viçosa, "Estudo da Interação DNA-HOECHST (33258) por pinçamento óptico"*, (2013).
- [16] Quake, S. R., Babcock, H., and Chu, S. *Nature* **388(10)**, 151-154, (1997).
- [17] Berge, T., Jenkins, N. S., Hopkirk, R. B., Waring, M. J., Edwardson, J. M., and Henderson, R. M. *Nuc. Acid. Res.* **30(13)**, 2980-2986, (2002).
- [18] Yoshikawa, K., Matsuzawa, Y., Minagawa, K., Doi, M., and Matsumoto, M. *Bioch. Biophys. Res. Commun.* **188(3)**, 1274-1279, (1992).
- [19] Matsuzawa, Y., and Yoshikawa, K. *Nucleos. Nucleot.*, **13(6-7)**, 1415-1423, (1994).
- [20] Matsuzawa, Y., Minagawa, K., Yoshikawa, K., Matsumoto, M., and Doi, M. (1991) *Nucleic Acids Symp. Ser.* **25**, 131-132, (1991).
- [21] Atwell, G. J., Denny, W. A., and Rocha, M. S. *Eur. Biophys. J.*, **44(1-2)**, 1-7, (2015).

- [22] Husale, S., Grange, W., and Hegner, M. *Single Mol.* **3(2-3)**, 91-96, (2002).
- [23] Lipfert, J., Klijnhout, S., and Dekker, N. H. *Nucl. Acids. Res.* **38(20)**, 7122-7132, (2010).
- [24] Murade, C. U., Subramaniam, V., Otto, C., and Bennink, M. L. *Biophys. J.* **97**, 835-843, (2009).
- [25] Maaloum, M., Mullera, P. and Harlepp, S. *Soft Matter* **9**, 11233, (2013).
- [26] Ramos, J. E. B., Vries, R. de and Neto, J. R. *J. Phys. Chem. B* **109**, 23661-23665, (2005).
- [27] Rocha, M. Santos *Royal Society of Chemistry* DOI:10.1039/c5ib00127g, (2015).
- [28] Tessmer, I., Baumann, C. G., Skinner, G. M., Molloy, J. E., Hoggett, J.G., Tendler, S.J.B., and Allen, S. *J. Mod. optics.* **50(10)**, 1627-1636, (2003).
- [29] Hernandez-Garcia, A., Favretto, M., Maarel, J. V. der; de Wolf, F., de Vries, R.; "Coating, stretching and delivery of single DNA molecules by a highly asymmetric recombinant protein-based polymer that incorporates a Sso7d DNA binding domain", Laboratory of Physical chemistry and Colloid Science, Wageningen University and Research centre, Wageningen, Gelderland, Postcode, the Netherlands, (2014).
- [30] Tuerlinckx, S. M. "Bioquímica básica", *Texto de apoio as disciplinas de bioquímica do CCS e CCR*, URCAMP, Bajé, Rio Grande do Sul (2005).
- [31] Devlin, T. M. "Manual de bioquímica com correlações clínicas", tradução da 6<sup>o</sup> edição americana, Editora BLUCHER, (2007).
- [32] Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surfaces Forces*, ELSEVIER, Third Edition, USA, (2011).
- [33] Cantor, C.R., Schimmel, P.R. "Biophysical chemistry - part III: The behavior of biological macromolecules", W. H. Freeman and Company, San Francisco (1980).

- [34] Wheate, N. J., Brodie, C. R., Collins, J. G., Kemp, S., Aldrich-Wright, J. R. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* **7**, 627, (2007).
- [35] Neves, A. P., Vargas, M. D. *Rev. Virtual Quimica* **3(3)**, 196-209, (2011) .
- [36] Manning, G.S. *Jornal of Chemical Physics* **51**, 924-933, (1969).
- [37] Debye, P. and Huckel, E. *Z. f. Phys.* **24**, 185, (1923).
- [38] Tse, W.C. and Borger, E. D. *Acc. Chem. Res.* **37**, 61-69, (2004).
- [39] Ashkin, A. *Phis. Rev. Lett.* **24 (4)**, 156, (1970).
- [40] Ashkin, A. and Dziedzic, J. M. *Science* **235 (4795)**, 1517-1520, (1987).
- [41] Ashkin, A. *Biophys. J.* **61 (2)**, 569-582, (1992).
- [42] Ashkin, A. *P. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 4853-4860, (1997).
- [43] Ayala, Y. A. *Tese de doutorado apresentada ao departamento de física da UFRJ, "Mecânica e reologia de células."*, orientador: Prof. Nathan Bessa Viana, (2013).
- [44] Mazolli, A., Neto, P. A. M. and Nussenzveig, H. M. *Proc. R. Soc. Lon. A* **459 (2040)**, 3021-3041, (2003).
- [45] Neuman, K. C. and Block, S. M. *Rev. Sci. Instrum.* **75 (9)**, 2787-2809, (2004).
- [46] Molloy, J. E. and Padgett, M. J. *Contemporary physics* **43 (4)**, 241-258 (2002).
- [47] Grier, D. G. *Nature* **424 (6950)**, 810-816, (2003).
- [48] Pacoreta, C. and Régnier, S. *Review of Scientific Instruments* **84**, 081301 (2013), DOI:10.1063/1.4818912.
- [49] Marques, P. R. B. O., *tese de doutorado apresentada a UNESP pelo departamento de Química, "Construção de genossensor amperométrico para diagnóstico de hepatite C baseado em monocamadas auto montadas e detecção não montada"*, Campos de Araraquara, (2009).

- [50] Marko, J. F. and Siggia, E. D. *Macromolecules* **28(26)**, 8759-8770, (1995).
- [51] Kumar, S., Chaudhury, K., Sen, P. and Guha, S.K. *Journal of Nanobiotechnology*, (2005), DOI: 10.1186/1477-3155-3-9.
- [52] Giessibl, F. J. *Review of Modern Physics*, textbf75, (2003).
- [53] Braga, P. C., Ricci, D. *Editors "Atomic Force Microscopy in Biomedical Research" Humana Press*, (2011).
- [54] Alessandrini, A. and Facci, P. *Measurement Science and Technology*, (2005), DOI:10.1088/0957-0233/16/6/R01.
- [55] Rivetti, C.; Guthold, M.; Bustamante, C. *J. M. B.* **264**, (1996).
- [56] Rivetti, C., Guthold, M. and Bustamante, C. *J. M. B.* **28(26)**, 8759-8770, (1995).
- [57] Moffitt, J.R., Chemla, Y.R., Smith, S.B., Bustamante C. *Annu Rev Biochem.*, (2008), DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.043007.090225.
- [58] Williams, M. C., Wenner, J. R., Rouzina, I. and Bloomfield, V. A. *Biophysical Journal*, **80**, 1932-1939, (2001).
- [59] Chaplin, M. "Water's hydrogen bond streng", arxiv:0706.1355v1.
- [60] Chaires, J. B. *Annu. Rev. Biophys.*, DOI:10.1146/annurev.biophys.36.040306.132812 (2008).
- [61] Sugimoto, N., Nakano, S., Yoneyama, M. and Honda, K. *Nucleic Acids Research*, **24(22)**, 4501-4505, (1996).
- [62] Breslauert, K. J., Franks, R., Blockers, H. and Markit, L. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 3746-3750, (1986).
- [63] SantaLucia, J. Jr. and Hicks, D. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, DOI: 10.1146/annurev.biophys.32.110601.141800 (2004).

- [64] Rocha, M. S., Cavalcante, A. G., Silva, R. and Ramos, E. B. *J. Phys. Chem. B.* **118**, 4832-4839, (2014).
- [65] Windom, J. and Baldwin, R. L. *Biopolymers.* **22**, 1621-1632, (1983).
- [66] Yoshikawa, Y., Yoshikawa, K. and Kanbe, T. *Biophys. Chem.* **61**, 93-100, (1996).
- [67] Yoshinaga, Y., Akitaya, T. and Yoshikawa, K. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 264-267, (2001).
- [68] Bazoni, R. F.; Lima, C. H. M.; Ramos, E. B. And Rocha, M. S.; "*Force-dependent persistence length of the DNA- intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments*", *Soft matter*, Royal Society of chemistry, (2015),DOI: 10.1039/c5sm00706b.
- [69] Musumeci G. The role of lubricin in normal and pathological joint tissue: A contemporary review. *OA Anatomy* Feb 01;1(1):2 (2013).
- [70] Beck R., Deek J., Safinya CR., "Structures and interactions in 'bottlebrush' neurofilaments: the role of charged disordered proteins in forming hydrogel networks", *PubMed*, 40(5):1027-31, (2012).
- [71] Banquy,X., Burdy?ska, J., Lee, D. W.,Matyjaszewski, K. and Israelachvili,J., "Bioinspired Bottle-Brush Polymer Exhibits Low Friction and Amontons-like Behavior", *Journal of the American Chemical Society*, DOI:10.1021/ja501770y.
- [72] Verduzco, R., Li, X., Peseka, S.L. and Steinc, G. L., "Structure, function, self-assembly, and applications of bottlebrush copolymers", *Chemical Society Reviews* DOI: 10.1039/C4CS00329B.
- [73] Fouz, M. F., Mukumoto, K.,Averick, S., Molinar, O., McCartney, B.M.,Matyjaszewski, K.,Armitage, B. A., andDas, S. R., "Bright Fluorescent Nanotags from Bottlebrush Polymers with DNA-Tipped Bristles", *ACS Central Science*, DOI: 10.1021/acscentsci.5b00259.

- [74] Storm, I. M., *tese de doutorado apresentada a Wageningen University, "Co-assembly DNA-protein polymer bottlebrushes.*, ISBN: 978-94-6257-746-6, (2016).
- [75] Yeo, L. Y., Chang, H. C., Chan, P.P.Y. and Friend, J. R. *Microfluidic Devices for Bioapplication Small*, **7**, 12-48, (2011).
- [76] LaBean, T. H., and Li, H. Y., *Constructing novel materials with DNA, Nano Today*, **2**, 26-35, (2007)
- [77] Lee, H., Lytton-Jean, A. K. R., Chen, Y., LOve, K. T., Park, A. I., Karagianis, E. D., Sehgal, A., Querbes, W., Zurenko, C. S., Jayareman, M. *et al Nat. Nanotechnol.*, **7**, 389-393, (2012).
- [78] Hernandez-Garcia, A., Werten, M. W. T., Stuart, M. C., de Wolf, F. A. and de Vries, R *Small*, **8**, 3491-3501, (20102).
- [79] Hall, A. R., van Dorp, S., Lemay, S. G. and Dekker, C. *Nano Lett.*, **9**, 4441-4445, (2009).
- [80] Baumann, H., Knapp, S., Karshkoff, A., Ladenstein, R., and Hard, T. *J. Mol. Biol.*, **247**, 840-846, (1995).
- [81] Driessen, R. P. C., Meng, H., Suresh, G., Shahapure, R. Lanzani, G. Priyakumar, U. D., White, M. F., Schiessel, H., van Noort, J. and Dame, R. T. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 196-205, (2013).
- [82] Granata, V., Del Vecchio, P., Barone, G., Shehi, E., Fusi, P., Tortora, P. and Graziano, G. *Int. J. Biol. Macromol.*, **34**, 195-201, (2004).
- [83] Gao, Y. G., Su, S. Y., Robinson, H., Padmanabha, S., Lim, L., McCrary, B. S., Edmonson, S. P., Shriver, J. W. and Wang, A. H. J. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 782-786, (1998).
- [84] Ramos, E. B., Wintraecken, K., de Vries, R. *Biophysical Reviews and Letters*, vol.2, Nos. 3 and 4, 259-265, (2007).

- [85] Landau, L.D. and Lifshitz, E. M. *Theory of Elasticity*. Pergamon Press, Oxford, (1986).