UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE QUÍMICA

Estudos de lesão ao DNA promovida pela autoxidação de S(IV) na presença de complexos de Cu(II)/tetraglicina. Efeito sinérgico de Ni(II), Co(II) e Mn(II).

Ruben Gregorio Moreno Moreno Tese de Doutorado - Química Analítica

Profa. Dra. Nina Coichev

Orientadora

Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros

Co-orientadora

São Paulo, março de 2006



A Deus por ter ficado comigo nos momentos mais difíceis

A meus pais Gregório e Rosa e minha irmã Fany

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Nina Coichev, pela orientação, apoio e pela confiança depositada na realização deste trabalho, meu reconhecimento e minha eterna gratidão.

À Profa. Dra. Marisa Helena Gennari de Medeiros, pelo profissionalismo na orientação deste trabalho.

À Profa. Dra. Ohara Augusto, pelos testes no equipamento de EPR e a Edlaine técnica de laboratório.

A Maria V. Alipázaga, pela grande parceria, constante comunicação e pelo eterno companheirismo.

À Patrícia Dantoni iniciadora dos primeiros ensaios experimentais e pelo apoio no começo do trabalho.

Ao Osmar F. Gomes técnico de laboratório da Profa. Dra. Marisa H. G. Medeiros, pela ajuda e presteza em atender meus pedidos dos momentos em que o equipamento de HPLC parava de funcionar e sobre tudo pela amizade.

Aos professores dos Colégios de alto conceito no Peru *Junior César de los Rios* e *República de Venezuela* no porto belo do *Callao-Perú* que me ensinaram sempre a lutar, da *Universidad de Ingenieria UNI-Perú* e do Instituto de Química da USP que muito contribuíram para minha formação.

Aos meus amigos de São Paulo: Omar, Luz e de Campinas: Gliseida, Maria Caramantin, Karin, Pilar, Rodolfo, Pascual, Percy e José pelo apoio e gratos momentos que descontraíram o estresse normal do dia a dia. Aos colegas de laboratório da Profa. Dra. Nina Coichev: Margareth, Horácio, Luciana, Giselle e Cristina pelo compartilhamento e conversas afiadas que fizeram mais aprazíveis os dias de trabalho ao longo desta jornada.

Aos colegas de laboratório da Profa. Dra. Marisa H. G. Medeiros: Alexandre, Claudia, Livea, Ana Paula Martins, Ana Paula Loureiro e Edson o meu agradecimento pela atenção prestada.

A todos os funcionários do I.Q. Menção especial ao pessoal da seção de pósgraduação pela atenção aos meus pedidos de informação; aos funcionários da seção de atividades auxiliares pela atenção às minhas solicitações de equipamento para as apresentações de seminários; aos funcionários do protocolo pelo envio de correspondência e fax; aos funcionários da secretaria da Analítica em especial a Célia e ao pessoal da Biblioteca e aos porteiros do instituto.

A todos aqueles que de alguma forma ajudaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Agradecimento especial à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida (processo 01/06693-0) e pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À **Pro-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo** pelo apoio na participação de eventos e congressos.

MUITO OBRIGADO A TODOS !!!

SÚMARIO

RESUMO		i
ABSTRACT		ii
GLOSSÁRIO	DE SÍMBOLOS	iii
ABREVIATUF	AS, SÍMBOLOS E DEFINIÇÕES	v
PREFÁCIO		vii
Capítulo I: In	trodução	
l.1	Introdução	2
1.2	Autoxidação de S(IV) catalisada por íons metálicos de transição	3
1.3	Lesão no DNA induzida pela autoxidação de sulfito na presença	
	de íons metálicos de transição	7
1.4	Produtos resultantes da oxidação do DNA	18
1.5	Lesão de DNA por HO [•]	22
I.6	Interação entre alguns complexos peptídicos de íons de cobre(II)	
	e DNA na presença de peróxido de hidrogênio	30
1.7	Referências bibliográficas	34

Capítulo II: Estudos Espectrofotométricos da reação de oxidação de S(IV) na presença de Oxigênio, Cu(II)/tetraglicina e DNA

II.1	Introdução	53

II.2	Parte experimental 5		53
II.2.1	Reagentes		
II.2.2	Procedimento experimental		
II.3	Res	sultados e discussões	59
II.3.1	Aut	oxidação dos Complexos de Cu(II)/tetraglicina induzida por	
	S(I)	√)	59
II.3.2	Est	udos na ausência de DNA	60
	Α.	Estudo da oxidação de Cu(II)/tetraglicina pelo oxigênio na	
		ausência de S(IV).	60
	В.	Estudo da oxidação de Cu(II)/tetraglicina pelo oxigênio na	
		presença de S(IV). Efeito sinérgico de Ni(II).	62
	a.	Influência da concentração de S(IV)	66
	b.	Influência da natureza do tampão	70
	c.	Influência da acidez do meio	72
II.3.3	Est	udos na presença de DNA	77
II.3.3.1	Características espectrais da solução de DNA 77		
II.3.3.2	.2 Estudos espectrofotométricos da interação de DNA com Cu(II),		
	Cu(II)/tetraglicina e S(IV).		80
	a.	Estudo da variação da absorbância em 260 nm (DNA) em	
		função do tempo na presença de Cu(II) e S(IV)	81
	b.	Interação do DNA com Cu(II)	83
	c.	Verificação da interação do DNA com Cu(III)/tetraglicina.	
		Acompanhamento da absorbância na banda de	
		Cu(III)/tetraglicina (em 365 nm)	83
	d.	Verificação da interação do DNA com Cu(III)/tetraglicina.	
		Acompanhamento na banda do DNA (λ = 260 nm)	85
II.3.3.3	Est	udos espectrofotométricos da interação de DNA com	
	Cu(II)/tetraglicina, Cu(III)/tetraglicina e radicais de óxidos de	
	enx	ofre.	87

	A. Verificação da interação do DNA com	
	Cu(II)/Cu(III)/tetraglicina em meio de pH = 7,0	90
	B. Verificação da interação do DNA com Cu(II)/tetraglicina em	
	pH = 9,0	94
II.4	Conclusões	102
II.5	Referências bibliográficas	106

Capítulo III: Uso de dicroísmo circular para o estudo da interação de Cu(II)/tetraglicina com DNA

III.1	Introdução	112
III.2	Parte experimental	112
III.3	Resultados e discussões	113
111.4	Referências bibliográficas	116

Capítulo IV: Uso de Eletroforese em gel de agarose para estudo da lesão no DNA

IV.1	Intr	odução	118
IV.2	Par	te experimental	121
IV.2.1	Procedimento de preparação do DNA plasmidial pUC19.		121
	Α.	Competência bacteriana	121
	В.	Transformação de bactérias competentes	124
	C.	Extração do DNA plasmidial pUC19	125

	a. Preparação da coluna de terra de diatomáceas	125
IV.2.2	Soluções de Cu(II)/tetraglicina, Ni(II)/tetraglicina,	
	Co(II)/tetraglicina e Mn(II)/tetraglicina em pH 7,0 ou 9,0 e	
	soluções de S(IV)	126
IV.2.3	Técnica de Eletroforese em gel de agarose	128
IV.3	Resultados e discussão	129
IV.3.1	O uso de DNA plasmidial pUC19	129
IV.3.2	Uso da técnica de eletroforese para verificação da ocorrência de	
	lesão em DNA plasmidial pUC19	129
	A. Influência do Cu(II) complexado ou não com tetraglicina	133
	B. Influência da ordem de adição dos reagentes. Na presença	
	e ausência de tetraglicina	133
	C. Influência da concentração de S(IV)	134
	D. Verificação da lesão de DNA em solução de Cu(II) e	
	Cu(III)/tetraglicina na ausência de S(IV)	140
	E. Influência do tempo de incubação	142
IV.3.3	Lesão ao DNA na presença de Ni(II)/tetraglicina, S(IV) e oxigênio	
	(ausência de Cu(II))	145
IV.3.4	Lesão ao DNA na presença de Cu(II)/tetraglicina,	
	Ni(II)/tetraglicina (traços), S(IV) e Oxigênio.	149
IV.3.5	Lesão ao DNA na presença de íons Cu(II), Ni(II), Fe(III), Mn(II),	
	S(IV) e Oxigênio	152
IV.3.6	Lesão ao DNA na presença de Cu(II) e S(IV) em pH 7,0 e 9,0 1	
IV.3.7	Lesão ao DNA em pH 7,0 na presença de Cu(II), Co(II), Mn(II)	
	(com e sem tetraglicina), S(IV) e oxigênio.	155
IV.3.8	Influência da concentração de tetraglicina	158
IV.4	Conclusões e discussões	158
IV.5	Referências bibliográficas	161

Capítulo V: Estudo da oxidação de 2'-deoxiguanosina na presença de S(IV), oxigênio e complexos de tetraglicina com Cu(II), Ni(II), Co(II) e Mn(II)

V.1	Introdução	166
V.2	Parte experimental	167
V.2.1	Reagentes	167
V.2.2	Procedimento experimental	171
V.3	Resultados e discussão	173
V.3.1	Efeito sinérgico de Cu(II)/tetraglicina e Ni(II)/tetraglicina	177
	a. Oxidação de 2'-deoxiguanosina (dGuo) na presença de	
	oxigênio, S(IV), Ni(II) e Cu(II). Influência da presença de	
	tetraglicina.	180
	 Influência da concentração de tetraglicina 	184
	c. Influência de S(IV)	186
V.3.2	Efeito sinérgico de Cu(II)/tetraglicina e Co(II)/tetraglicina	188
V.3.3	Efeito sinérgico de Cu(II)/tetraglicina e Mn(II)/tetraglicina	188
V.4	Conclusões	191
V.5	Referências bibliográficas 19	

Capítulo VI: Estudos por Ressonância Paramagnética Eletrônica - EPR para detecção dos radicais de óxidos de enxofre

VI.1	Introdução	202

	VI.2	Parte experimental	206
	VI.2.1	Reagentes	206
	VI.2.2	Procedimento experimental	207
	VI.3	Resultados e discussões	207
	VI.4	Referências bibliográficas	211
Capíti	ulo VII: (Conclusões Gerais	
	VII.1	Conclusões	214

VII.2 Referências bibliográficas 218

CURRICULUM VITAE

220

RESUMO

O presente trabalho apresenta estudos de lesão em biomoléculas (DNA e 2'-deoxiguanosina) induzida por Cu(III)/tetraglicina (Cu(III)/G₄), radicais de óxidos de enxofre (SO₃^{•-}, SO₄^{•-}, SO₅^{•-}), HO[•] e HSO₅⁻⁻, espécies estas geradas durante a autoxidação de S(IV) na presença de Cu(II)/G₄ ou Cu(II) (ausência de tetraglicina) e traços de um segundo íon metálico (Ni(II), Co(II) ou Mn(II)). A formação dos radicais SO₃^{•-} e HO[•] foi detectada pela técnica de ressonância paramagnética eletrônica (EPR).

As técnicas de espectrofotometria e dicroísmo circular foram empregadas para avaliar a formação de Cu(III)/G₄ em diferentes condições experimentais, na presença e ausência de S(IV), e a interação entre os complexos de cobre (II)/(III) e a molécula de DNA. A eficiência da formação de Cu(III) depende da acidez, concentração de S(IV) e dos tampões utilizados.

A lesão no DNA plasmidial pUC19 foi verificada empregando-se a técnica de eletroforese em gel de agarose. A extensão da lesão no DNA depende da acidez, concentração de S(IV), tempo de incubação e da presença de um segundo íon metálico.

Usando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi possível estudar a oxidação de 2'-deoxiguanosina a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina na presença dos oxidantes fortes gerados durante a autoxidação de S(IV) catalisada por Cu(II)/G₄. Um estudo comparativo do efeito de vários íons metálicos evidenciou o sinergismo de Cu(II) e traços de um segundo íon metálico (Ni(II), Co(II) ou Mn(II), complexados ou não com tetraglicina).

i

ABSTRACT

The present work presents studies related to biomolecules damage (DNA and 2'deoxyguanosine) induced by Cu(III)/tetraglycine (Cu(III)/G₄), oxysulfur radicals (SO₃^{•-}, SO₄^{•-}, SO₅^{•-}) and HSO₅⁻, species generated during S(IV) autoxidation in the presence of Cu(II)/G₄ or Cu(II) (absence of tetraglycine) and trace level of a second metal ion (Ni(II), Co(II) or Mn(II)). The formation of SO₃^{•-} and HO[•] radicals was detected by electronic paramagnetic resonance technique (EPR).

Spectrophotometric and circular dichroism techniques were used to evaluate the $Cu(III)/G_4$ formation in different experimental conditions, in the presence and the absence of S(IV), and the interaction of copper (II)/(III) complexes and DNA molecule. The effectiveness of Cu(III) formation depends on the acidity, S(IV) concentration, and buffers used.

The damage on pUC 19 plasmid DNA was verified by agarose gel electrophoresis. The extent on the DNA damage was related to acidity, S(IV) concentration, incubation time and to the presence of a second metal ion.

Using the high performance liquid chromatography technique (HPLC) it was possible to study the oxidation of 2'-deoxyguanosine to 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in the presence of strong oxidants generated during the S(IV) autoxidation catalyzed by Cu(II)/G₄. A comparative study of the effect of several metal ions showed the synergism of Cu(II) and traces of a second metal ion (Ni(II), Co(II) or Mn(II), as tetraglycine complexes or not).

ii

GLOSSÁRIO DE SÍMBOLOS

G₄ = usado como termo geral para o peptídeo tetraglicina.

 $\begin{array}{ccc} O & O & O \\ \parallel & \parallel & \parallel \\ \textbf{G_4} = NH_2CH_2CNH\text{-}CH_2CNH\text{-}CH_2CNH\text{-}CH_2COO^- \end{array}$

$$\label{eq:cull} \begin{split} & [\textbf{Cu}^{II}(\textbf{H}_{\textbf{-x}}\textbf{G}_{4})]^{(1-x)} \ : \ \text{complexo de Cu}(II) \ \text{com } \textbf{G}_{4} \\ & [\textbf{Cu}^{III}(\textbf{H}_{\textbf{-x}}\textbf{G}_{4})]^{(2-x)} \ : \ \text{complexo de Cu}(III) \ \text{com } o \ \textbf{G}_{4} \end{split}$$

(H_{-x}G₄)^{-(X+1)} : refere-se ao ligante com x nitrogênios peptídicos desprotonados coordenados ao íon cobre (II) (Figura na próxima página). Os complexos de Cu(II) com tetraglicina apresenta vários graus de protonação, de acordo com a acidez do meio

[Cu(II)/G ₄] :	Refere-se a soma da concentração de todas as espécies:
ou	$[Cu^{II}(H_{-3}G_4)]^{2-} + [Cu^{II}(H_{-2}G_4)]^{-} + [Cu^{II}(H_{-1}G_4)] + [Cu^{II}(G_4)]^{+}$
Cu(II)/tetraglicina	(a espécie predominante em solução dependerá da acidez do meio).

iii





Abreviaturas, símbolos e definições

HO•	Radical hidroxila
SO ₃ •-	Radical sulfito
SO4 ^{•-}	Radical sulfato
SO ₅ •-	Radical peroxomonosulfato
HSO₅ [−]	Ânion peroxomonosulfato
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ •-	Ânion radical superóxido
8-oxodA	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiadenina
8-oxodC	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxicitosina
8-oxodT	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxitimina
8-oxodG	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanina
8-oxodGuo	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina
dA	2'-desoxiadenina
dC	2'-desoxicitosina
dG	2'-desoxiguanina
dT	2'-desoxitimina
dGuo	2'-desoxiguanosina
Cyclam	1,4,8,11-tetraazociclotetradecano
DNA	Ácido desoxirribonucléico
CT-DNA	DNA do timo de bezerro (Calf Thymus)
EC	Eletroquímico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetraacético
EPR	Resonância Paramagnetica Eletrônica
Fapy	Formamidopiridina
FapyG	2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de Alta Performance
[O ₂]	Concentração de oxigênio
S(IV)	Óxidos de enxofre(IV) = H_2SO_3 , HSO_3^- e SO_3^{2-}
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
Μ	Íon metálico
A	Absorbância
E°	Potencial padrão de redução (em volts)

v

- I Força iônica
- T Temperatura
- λ Comprimento de onda
- ε Absortividade molar

vi

PREFÁCIO

Os estudos realizados são apresentados nos capítulos a seguir. No capítulo I é descrito um levantamento amplo, com apreciação crítica, dos trabalhos reportados na literatura. Para um entendimento melhor do leitor optou-se por apresentar separadamente cada estudo descrevendo a parte experimental, resultados e conclusões parciais. No final as conclusões e discussões são abordadas comparando os resultados com a literatura.

Os capítulos que se seguem descrevem as evidências da interação do complexo de Cu(II)/tetraglicina com DNA e da lesão às biomoléculas (DNA e 2'-deoxiguanosina) empregando-se as técnicas: espectrofotometria, dicroísmo circular, eletroforese em gel de agarose, cromatografia líquida de alto desempenho e EPR (Ressonância Paramagnética Eletrônica).

A numeração de referências, equações, figuras e tabelas também foram realizadas considerando-se cada capítulo independentemente.

vii

I. Introdução

I.1 Introdução

O baixo custo, eficiência e versatilidade fazem com que o dióxido de enxofre seja largamente utilizado com finalidades industriais. S(IV) (SO₃²⁻, HSO₃⁻ e H₂SO₃) é utilizado como antioxidante em indústrias farmacêuticas e alimentícias ^[1]. Sulfito é adicionado ao vinho, em concentrações de até 6 mmol L⁻¹, devido à sua ação anti-séptica e antioxidante. O dióxido de enxofre é adicionado durante a etapa de clarificação do melado da cana de coloração escura e da polpa de celulose em indústrias de celulose e papel. Também tem sido empregado para diminuição da concentração do oxigênio dissolvido em água destinada à geração de vapor e no tratamento de minérios de sulfeto.

Do ponto de vista ambiental, SO₂ é um importante poluente atmosférico, oriundo principalmente da combustão de combustíveis fósseis ^[2]. O dióxido de enxofre, bem como os óxidos de nitrogênio, são os principais precursores da chuva ácida, sendo também responsável pela formação de sulfatos secundários que contribuem para a formação do material particulado na atmosfera.

O aumento da exposição humana ao S(IV) faz com que seus efeitos tóxicos sejam alvo de preocupação crescente por órgãos de controles ligados ao cuidado da saúde humana. Segundo o FDA ("Food and Drug Administration"), uma em cada cem pessoas e 4 a 8% dos pacientes asmáticos são sensíveis a S(IV) ^[3]. A exposição a S(IV), embora segura para a maioria da população, pode provocar em pessoas hipersensíveis dificuldades respiratórias, choque anafilático e urticária ^[4].

No Brasil, a Resolução - RDC nº 34 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), de 9 de março de 2001, estabelece os limites máximos de S(IV) e outros aditivos em alimentos a fim de minimizar os riscos à população. O limite máximo permitido de sulfito total (expresso em SO₂) é: 0,035 g/100 mL, 0,002 g/100g e 0,020 g/100mL para vinhos, açúcar refinado e sucos de frutas (exceto suco de caju, cujo limite máximo é de 0,3 g/100mL), respectivamente.

A literatura descreve possíveis efeitos genéticos adversos do S(IV), atuando como agente mutagênico, comutagênico ou carcinogênico ^[5,6]. O íon sulfito é responsável por alguns dos efeitos nocivos às proteínas e ácidos nucléicos, como deaminação da citosina e adição de bisulfito a timina e uracila ^[6]. Os mecanismos envolvidos na toxicidade do sulfito não estão completamente esclarecidos, mas vários estudos têm sugerido que os radicais de óxidos de enxofre (SO₃^{•-}, SO₄^{•-} ou SO₅^{•-}) oxidam biomoléculas, incluindo: lipídios, proteínas e DNA ^[7-9]. Alguns íons metálicos de transição têm um papel importante na formação desses radicais, uma vez que catalisam a oxidação de sulfito pelo oxigênio ^[10,11].

I.2 Autoxidação de S(IV) catalisada por íons metálicos de transição

A oxidação de S(IV) por O₂, também chamada de autoxidação, é um processo termodinamicamente favorável; no entanto, esta reação é extremamente lenta, sendo que alguns íons metálicos de transição, ou seus complexos, apresentam efeito catalítico.

A autoxidação de S(IV) catalisada por íons metálicos de transição em meio aquoso tem sido tema de um grande número de estudos ^[10-47], a maioria sugere um mecanismo radicalar conforme proposto inicialmente por Backstrom em 1934 ^[21].

Obteve-se um grande avanço na compreensão do efeito catalítico de alguns íons metálicos de transição em estudos envolvendo íons metálicos complexados, nos quais foi possível acompanhar a variação do estado de valência do íon metálico. Estudos envolvendo os sistemas: Fe(III)/tris 1,10-fenantrolina ^[22], Co(II)/Co(III)/tris ^[23,24], Co(II)/Co(III)/NH₃ ^[25], Fe(II)/Fe(III)/EDTA ^[26], Fe(II), Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II) e V(IV) com ftalocianinas ^[27], Mn(III)/CDTA ^[28], Co(II)/Co(III)/N₃^{- [29,30]}, Mn(II)/Mn(III)/Ac^{- [31]}, Mn(II)/Mn(III)/N₃^{- [32]}, Ni(II)/Ni(III)/cyclam ^[33,34], Ni(OH)₂/Ni(OH)₃ ^[35], Cu(II)/Cu(III) ^[36-41] e Ni(II)/Ni(III) ^[34,42] com tetraglicina em meio aquoso, indicam que o mecanismo da autoxidação de S(IV) envolve um ciclo de oxidorredução dos íons metálicos que depende do balanço da concentração de O₂ e S(IV) ^[43,45].

I.2.1 Mecanismo da autoxidação de S(IV) catalisada por íons metálicos de transição

O processo catalítico é iniciado pelo íon metálico no estado de valência 3+, M(III). Se o íon metálico estiver presente na forma bivalente M(II), a geração de M(III) pode ocorrer pela oxidação com o oxigênio dissolvido (esquema I, eq. 1). No caso de Cu(II) complexado com tetraglicina, Anast e Margerum ^[36] sugeriram uma reação de desproporcionamento (eq. 2). Estudos adicionais realizados por Coichev e colaboradores ^[38-42], mostraram um efeito sinérgico com o íon Ni(II). Dependendo da

natureza do íon metálico e do ligante coordenado, pode ocorrer ainda a formação de complexos mistos (eq. 3) ^[15,39,42].

Uma outra possibilidade que deve ser considerada é o íon Fe(III), como iniciador, presente na forma de impureza nos reagentes e na água deionizada (10⁻⁹ a 10⁻⁸ mol L⁻¹) [31,46,47]

No início do processo de autocatálise há a redução de M(III) por S(IV), gerando o radical SO₃^{•-} (eq. 4), que rapidamente reage com o oxigênio para produzir fortes oxidantes como o radical SO₅^{•-} (eq. 5) e o ânion HSO₅⁻ (eq. 7). Estas espécies, por sua vez, oxidam o íon metálico (eqs. 6, 8-10) formando SO₄^{•-} e HO[•]. Após estas reações, seguem etapas de propagação em cadeia nas quais alguns dos produtos finais são $SO_4^{2^-}$, $S_2O_6^{2^-}$ e $S_2O_8^{2^-}$ (eqs. 11-27) ^[21,29].

Esquema I. Mecanismo da autoxidação de S(IV) catalisada por íons metálicos de transição ^[29,32]

Início (na ausência de M(III) adicionado)

$$M(II) + O_2 \longrightarrow M(III) + O_2^{\bullet}$$
[1]

$$2M(II) \longrightarrow M(I) + M(III)$$
 [2]

$$M(II) + SO_3^{2-} \xrightarrow[lento]{} M(II) (SO_3)_x \xrightarrow{+O_2} M(III) (SO_3)_x$$

$$(3)$$

Autocatálise

$$M(III) + SO_3^{2-} \longrightarrow M(II) + SO_3^{\bullet-} lenta$$
[4]

$$SO_3^{\bullet-} + O_2 \longrightarrow SO_5^{\bullet-}$$
 [5]

$$M(II) + SO_5^{\bullet-} \longrightarrow M(III) + SO_5^{2-}$$
[6]

$$SO_5^{2-} + H^+ \implies HSO_5^-$$
 [7]

$$M(II) + HSO_5^{-} \longrightarrow M(III) + SO_4^{2-} + HO^{\bullet}$$
[8]

ou
$$M(II) + HSO_5^- \longrightarrow M(III) + SO_4^{\bullet-} + OH^-$$
 [9]
 $M(II) + SO_5^{\bullet-} \longrightarrow M(III) + SO_4^{\bullet-}$ [10]

$$M(II) + SO_4^{\bullet-} \longrightarrow M(III) + SO_4^{2-}$$
[10]

Propagação da Cadeia

$$SO_5^{\bullet-} + SO_3^{2-} \longrightarrow SO_5^{2-} + SO_3^{\bullet-}$$
 [11]

$$SO_5^{\bullet-} + SO_3^{2-} \longrightarrow SO_4^{2-} + SO_4^{\bullet-}$$
 [12]

$$SO_5^{\bullet-} + HSO_3^- \longrightarrow HSO_5^- + SO_3^{\bullet-}$$
 [13]

$$SO_5^{\bullet-} + SO_5^{\bullet-} \longrightarrow 2 SO_4^{\bullet-} + O_2$$
 [14]

$$SO_4^{\bullet-} + SO_3^{2-} \longrightarrow SO_4^{2-} + SO_3^{\bullet-}$$
 [15]

$$SO_4^{\bullet-} + HSO_3^- \longrightarrow SO_4^{2-} + SO_3^{\bullet-} + H^+$$
 [16]

Formação dos Produtos / Término da Cadeia

$$HSO_5^- + SO_3^{2-} \longrightarrow 2 SO_4^{2-} + H^+$$
 [17]

$$HSO_5^- + HSO_3^- \longrightarrow 2 SO_4^{2-} + 2H^+$$
 [18]

$$SO_3^{\bullet-} + SO_3^{\bullet-} \longrightarrow S_2O_6^{2-}$$
 [19]

$$SO_4^{\bullet-} + SO_4^{\bullet-} \longrightarrow S_2O_8^{2-}$$
 [20]

$$SO_5^{\bullet-} + SO_5^{\bullet-} \longrightarrow S_2O_8^{2-} + O_2$$
 [21]

$$SO_5^{\bullet-} + SO_3^{\bullet-} \longrightarrow S_2O_6^{2-} + O_2$$
 [22]

$$SO_5^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} \longrightarrow SO_5^{2-} + O_2$$
 [23]

$$O_2^{\bullet-} + H^+ \longrightarrow HO_2^{\bullet}$$
 [24]

$$O_2^{\bullet-} + HO_2^{\bullet} \longrightarrow HO_2^- + O_2$$
 [25]

$$HO_2^- + H^+ \longrightarrow H_2O_2$$
 [26]

$$HSO_3^{-}/SO_3^{2-} + H_2O_2 \longrightarrow HSO_4^{-}/SO_4^{2-} + H_2O$$
 [27]

 $M = Co(II)/Co(III)/tris^{[23,24]}, Co(II)/Co(III)/N_3^{-[29,30]}, Mn(II)/Mn(III)/Ac^{-[31]}, Mn(II)/Mn(III)/N_3^{-[32]}, Ni(II)/Ni(III)/cyclam^{[33,34]}, Ni(OH)_2/Ni(OH)_3^{[35]}, Cu(II)/Cu(III)^{[37-41]} e Ni(II)/Ni(III)^{[34,42]} com tetraglicina em meio aquoso.$

I.3 Lesão no DNA induzida pela autoxidação de sulfito na presença de íons metálicos de transição

Alguns estudos mostram que o íon sulfito pode provocar lesão no DNA com baixo rendimento. Diversos estudos *in vitro* ^[6] indicam que os radicais $SO_3^{\bullet-}$ e $SO_4^{\bullet-}$, reagem com ácidos nucléicos produzindo 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo), quebra das fitas do DNA ^[48] e da ligação proteína – DNA.

Segundo alguns autores, a guanina seria um alvo preferencial para sofrer oxidação devido a seu potencial de redução baixo (vide tabela 1) e a sua habilidade para se ligar a íons metálicos de transição capazes de catalisar processos oxidativos ^[49,50].

Tabela 1. Potencial de redução de algumas espécies de interesse no presente trabalho (vs E.N.H.) ^[11,51].

Par redox	<i>E°</i> (V)	РН
SO3 ^{•-} / SO3 ²⁻	0,63 - 0,89	> 7,0
SO ₃ •- / SO ₃ ²⁻	0,84	3,6
SO4 ^{•-} / SO4 ²⁻	2,43 - 3,08	-
SO4 ²⁻ / SO3 ²⁻	- 0,93	-
SO4 ²⁻ / H ₂ SO ₃	0,172	-
SO5 ^{•-} / HSO5 ⁻	1,1	7,0
HSO ₅ ⁻ / HSO ₄ ⁻	1,81 - 1,842	-
HSO5 ⁻ / SO4 ²⁻	1,75	3 – 9
SO5 ²⁻ / SO4 ²⁻	1,22	> 10
HO [•] / H ₂ O	2,31	7
G•+ / G	1,29	7
A•+ / A	1,42	7
C•+ / C	1,60	7
Τ•+ / Τ	1,70	7
8-oxoG ^{•+} / 8-oxoG	0,58	8
8-oxodA ^{•+} / 8-oxodA	0,92	8
Cu ^{III} G ₄ / Cu ^{II} G ₄	0,631	9

Entretanto, os radicais formados na autoxidação de S(IV) podem provocar lesões em outras biomoléculas e estruturas celulares dependendo da reatividade, proximidade de geração com a molécula alvo e presença de antioxidantes. Tais lesões, se não reparadas, podem comprometer o funcionamento da célula.

A seguir são apresentados os estudos específicos de lesão no DNA pelas possíveis espécies formadas (HSO₅⁻, HO[•], SO₃^{•-}, SO₄^{•-} e SO₅^{•-}) na autoxidação de sulfito (esquema I).

O radical sulfito (SO₃^{•-}) pode ser gerado nas células pela oxidação de SO₃²⁻ mediada por enzimas ou por oxidação pelo oxigênio ^[52,53]. Tem sido reportado que metionina é oxidada para seu sulfóxido correspondente, em pH neutro, durante a oxidação aeróbica de SO₃^{•- [54]}. O radical sulfito também provoca a oxidação de βcaroteno, triptofano ^[54,55] e forma compostos de adição à dupla ligação em alcenos ^[56].

Experimentos realizados por Shi e Mao ^[48] mostram que a incubação de solução de sulfito com DNA por 4 horas causa rendimento baixo de produção de lesão, no entanto, na presença de Cr(VI) são observados níveis maiores de quebra da dupla fita do DNA. Segundo esses autores, a oxidação de sulfito na presença de Cr(VI) gera somente o radical SO₃^{•-}, não sendo detectada a formação do radical HO[•]. Desta maneira, foi sugerido que o radical SO₃^{•-} pode ser o responsável pela lesão no DNA ^[48]. No entanto, na presença desses reagentes deve haver a formação de outros radicais capazes de causar a observada quebra da dupla fita do DNA e oxidação da 2'-deoxiguanosina (dGuo).

O mecanismo proposto por Shi e Mao ^[48] para a formação de 8-hidroxi-2'deoxiguanosina (8 OHdGuo) envolvendo radicais SO₃^{•-} está representado nas eqs. 28 - 30. Este mecanismo mostra a formação dos intermediários dGuo⁺⁺ e dGuoHO[•], os quais também podem reagir com água ou outros solventes, como por exemplo álcoois.

$$dGuo + SO_3^{\bullet-} \longrightarrow dGuo^{\bullet+} + SO_3^{2-}$$
[28]

$$dGuo^{\bullet+} + H_2O \longrightarrow dGuoHO^{\bullet} + SO_3^{2-} + H^+$$
[29]

dGuoHO[•] + SO₃^{•-}
$$\longrightarrow$$
 dGuoO (8-OHdGuo) + SO₃²⁻ + H⁺ [30]

Kawanishi *et al.* ^[59] observaram uma modificação específica na dupla hélice do DNA, centrada na guanina, na presença de $CoCl_2$, sulfito (1-2 mmol L⁻¹) e oxigênio. Essa modificação foi atribuída à formação de $SO_4^{\bullet-}$. No entanto, quando o íon metálico empregado foi Cu(II), uma clivagem aleatória maior no DNA foi sugerida a partir da oxidação de DNA por $SO_3^{\bullet-}$.

Alguns autores sugerem que $SO_4^{\bullet-}$, e não o $SO_3^{\bullet-}$, é o responsável pela lesão observada no DNA em meio contendo [NiKGH-CONH₂]⁺ (KGH = lisilglicilhistidina) e sulfito ^[7]. No entanto, outras espécies como peroxomonosulfato (SO_5^{2-}), necessitam também ser consideradas ^[9]. Desta forma foram realizados estudos com [NiCR]²⁺ (CR = 2,12-dimetil-3,7,11,17-tetraazabiciclo[11,3,1]-heptadecano-1(17),2,11,13,15-pentaeno) e [NiKGH-CONH₂]⁺ para verificar a participação de $SO_5^{\bullet-}$, com base nas equações postuladas por Coichev e van Eldik (esquema I, eqs. 4 -10) para as etapas de início e propagação da cadeia ^[29].

Considerando os potenciais de redução, ambos complexos $[Ni^{III}KGH-CONH_2]^{2+}$ (0,9 V vs. E.N.H.) e $[Ni^{III}CR]^{3+}$ (1,3 V vs. E.N.H.) ^[7] podem oxidar SO_3^{2-} a $SO_3^{\bullet-}$ (E°sO₃^{•-}/sO₃²⁻ ~ 0,63 V vs. E.N.H., eq. 4) ^[9]. O SO₃^{•-} formado reage rapidamente com O₂ para formar SO₅^{•-} (eq. 5). Assim, o SO₅^{•-} formado (E[°]sO₅^{•-} / SO₅²⁻ ~ 1,1 V vs. E.N.H.) pode oxidar o complexo [Ni^{II}KGH-CONH₂]⁺ (eq. 6) gerando [Ni^{III}KGH-NH₂]²⁺ e SO₅²⁻. HSO₅⁻ também pode oxidar [Ni^{II}KGH-NH₂]⁺ (eqs. 8 e 9). No entanto, a oxidação do complexo de [Ni^{II}CR]²⁺ por SO₅^{•-} (eq. 6), não é favorável (deduzido a partir dos potenciais de redução), havendo conseqüentemente a reação de dimerização do SO₅^{•-} para produzir SO₄^{•-} e O₂ (eq. 14) ^[8,9]. O radical SO₄^{•-}, que pode também ser formado como na eq. 9, possui um potencial de redução suficientemente alto (2,43 – 3,08 V vs E.N.H.) para oxidar os dois complexos de Ni(II) ^[7].

Muller e colaboradores ^[9], em estudos de lesões no DNA induzidos pela autoxidação de sulfito catalisada por alguns complexos de Ni(II), discutiram a reatividade dos diferentes radicais. O radical $SO_3^{\bullet-}$, produto inicial (eq. 4), seria um agente improvável para lesar o DNA, devido ao tempo de vida curto na presença de oxigênio (eq. 5), além disso, seu potencial de redução ($E^{\circ}SO_3^{\bullet-}/SO_3^{2-} \sim 0,63$ V vs E.N.H.) é baixo para a oxidação de um elétron da guanina, cujo potencial de redução é $E^{\circ}G^{\bullet}/G = 1,14 - 1,24$ V vs E.N.H.

As propriedades do radical SO₅^{•-} não são bem conhecidas, no entanto a sua reatividade alta à reação de dimerização, leva a formação de SO₄^{•-} (eq. 14). Por outro lado, seu potencial de redução baixo ($E^{\circ}SO_{5}^{\bullet-}$ /HSO₅⁻ ~ 1,1 V vs. E.N.H.) comparado com a guanina, e sua reatividade baixa com etanol (k < 10³ M⁻¹ s⁻¹) mostraram que este radical é o agente lesivo ao DNA menos viável ^[9].

SO4⁻⁻ ou HSO5⁻, os oxidantes mais potentes, podem oxidar os quatro nucleosídeos no DNA. No entanto, no caso de Ni(II) complexado com peptídeos

([NiKGH-NH₂]⁺, [NiCR]²⁺) ^[9], foi observado uma alta seletividade na oxidação da guanina, que em comparação com os outros nucleosídeos.

Segundo Burrows e Muller ^[51], a identificação dos radicais (SO₃^{•-}, SO₅^{•-} e HSO₅⁻, gerados a partir da autoxidação de sulfito na presença de íons metálicos de transição) envolvidos na oxidação dos ácidos nucléicos é difícil.

A reação do $SO_5^{\bullet-}$ com nucleosídeos é desconhecida, mas a reação dos complexos de Cu(II) e Ni(II) com HSO_5^- podem produzir SO_4^{2-} e HO[•] (eqs. 8 e 9) ^[36,39], este último um forte oxidante, capaz de lesar diversas biomoléculas.

Na literatura, encontram-se vários estudos de lesão causada no DNA pela autoxidação de sulfito na presença de complexos de Mn(II) ^[59-62], Cr(VI) ^[60,63], Fe(III) ^[8,59,60,64], Co(II) ^[9,59,65], Ni(II) ^[7,49,60,64-68] e Cu(II) ^[49,59,65]. Foi sugerido que ocorre oxidação específica da base da guanina, pela geração de SO₄^{•- [51]}.

Estudos sistemáticos de ligantes macrocíclicos coordenados ao Ni(II), mostraram a importância do tamanho do anel, grau de insaturação, efeito estérico e potencial de oxidorredução, na capacidade de ligação ao DNA afetando a sua reatividade ^[69].

Coichev e colaboradores na presente tese investigaram a lesão oxidativa no DNA na presença de sulfito e complexos de Cu(II)/Cu(III)/tetraglicina; estes estudos combinados com um estudo cinético detalhado e elucidação do mecanismo da reação, contribuíram para evidenciar que uma parte do Cu(III)/tetraglicina formado permanece em solução contendo o DNA ^[70]. Estudos por EPR ^[71] permitiram verificar a formação dos radicais SO₃^{•-} e HO[•] durante a reação estudada. Embora os radicais SO₄^{•-} e SO₅^{•-} não tenham sido detectados, a participação destas espécies, no mecanismo de lesão no DNA, não pode ser descartada. O captador de spin usado (DMPO = 5,5 dimetil-1-

pirrolina-*N*-óxido), presente em excesso suficiente quando a reação foi iniciada, possivelmente deve ter captado todo o radical sulfito assim que este se formou, não permitindo a subseqüente formação dos outros radicais.

I.3.1 Lesão no DNA por HSO₅⁻

Experimentos nos quais a espécie de enxofre foi adicionada na forma de S(VIII), (HSO_5^-, SO_5^{2-}) , um forte oxidante (Tabela 1), na presença de íons complexos também foram realizados.

Foi proposto que na reação de HSO₅⁻ com $[Co(H_2O)_6]^{2+}$ há a formação de SO₄⁻⁻ (eqs. 31 - 36) e na presença de DNA há uma lesão oxidativa na dupla fita do DNA preferencialmente na guanina ^[49,50]. Outros ligantes coordenados ao íon cobalto foram utilizados para verificar a lesão no DNA. Observou-se que a intensidade da lesão obedece a ordem: $[Co(H_2O)_6]Cl_2 >> [Co(NH_3)_5Cl]Cl_2 > [Co(cyclam)Cl_2]Cl > [Co(bipy)_3](ClO_4)_3 > [Co(NH_3)](ClO_4)_3$. As espécies de Co(III) possuem um potencial de redução alto, o qual é crucial na decomposição de HSO₅⁻⁻, sendo o HSO₅⁻⁻ oxidado a radical peroxomonosulfato, SO₅^{•--} [^{50]}. O potencial de redução de SO₅^{•--} / HSO₅⁻⁻ foi estimado em 1,1 V (vs. E.N.H.), enquanto que os complexos de cobalto (III) citados, possuem potenciais de redução (Co^{III}/Co^{II}) << 1,0 V (vs. E.N.H.) ^[50]. Desta maneira foi sugerido que a espécie gerada, SO₄^{•--}, pela reação dos complexos Co(II)/(III) e HSO₅⁻⁻, é a responsável pela oxidação da guanina ^[69].

$$Co^{\parallel} + H_2O \longrightarrow CoOH^+ + H^+$$
 [31]

$$CoOH^+ + HSO_5^- \longrightarrow Co^{III}O^+ + H_2O + SO_4^{\bullet-}$$
 [32]

$$Co^{III}O^+ + 2H^+ \iff Co^{III} + H_2O$$
[33]

$$Co^{III} + HSO_5^- \longrightarrow Co^{II} + H^+ + SO_5^{\bullet-}$$
 [34]

$$2SO_5^{\bullet-} \iff {}^{-}O_3SOOOOSO^{3-}$$
[35]

$$^{-}O_{3}SOOOOSO^{3-} \longrightarrow O_{2} + 2SO_{4}^{\bullet-}$$
 [36]

(Obs: Nas equações 31 – 36, íons de cobalto estão complexados com os ligantes citados no parágrafo anterior)^[50].

A partir da reação de HSO_5^- com o complexo de $[Ni(cyclam)]^{2+}$ (cyclam = 1,4,8,11 - tetraazociclotetradecano) foi proposto um mecanismo que envolve a oxidação direta de $[Ni(cyclam)]^{2+}$ por HSO_5^- , para formar $SO_4^{\bullet-}$ e OH^- , bem como espécies intermediárias na qual o metal central é Ni(III) (eq. 37). O Ni(III) com a configuração eletrônica d⁷ tende a formar complexos com estrutura tetragonal hexacoordenada. Assim, na presença de DNA, os autores sugeriram que o nitrogênio N7 da guanina possivelmente se coordena ao Ni(III) em um mecanismo de esfera interna ^[69].

$$HSO_5^- + [Nicyclam]^{2+} \longrightarrow [Nicyclam]^{3+} + SO_4^{\bullet-} + OH^-$$
[37]

Estudos adicionais de HSO₅⁻ na presença de íon brometo mostraram a ocorrência de uma halogenação das pirimidinas. O interesse nesses estudos refere-se às propriedades bioquímicas e biofísicas que os nucleotídeos halogenados têm mostrado, tais como efeitos inibidores no crescimento de bactérias e tumores ^[72].

Burrows e colaboradores nos estudos da oxidação de DNA, mediados por íons metálicos de transição, mostraram que uma reação específica para citosina pode acontecer utilizando íon brometo e HSO₅⁻, mistura essa que lesa o DNA após

tratamento com piperidina. O mecanismo sugerido para esta reação procede via geração de Br₂ *in situ*, com posterior adição de Br e OH à dupla ligação 5, 6 respectivamente^[73].

O radical sulfato (SO₄⁻), um oxidante extremamente forte ^[49,50,59,65,66,74], é capaz de oxidar guanosina e modificar a dupla hélice do DNA com preferência pela guanina ^[49,64,65]. A constante de velocidade para a reação de SO₄⁻⁻ com dGuo (2,3x10⁹ mol⁻¹ L s⁻¹) é 10 vezes maior que com algum outro deoxinucleosideo ^[65] e aproximadamente 100 vezes maior que a oxidação do açúcar (D-ribose, 3,8x10⁷ mol⁻¹ L s⁻¹). Assim, o radical sulfato formado pela decomposição catalítica de HSO₅⁻⁻ por Co(II) ^[50,59,65], poderia supostamente oxidar predominantemente resíduos guanina no DNA ^[65]. Estes resultados foram comparados com outros estudos nos quais a produção de radicais sulfato foi realizada via fotólise de persulfato (S₂O₈²⁻) ^[74], onde observou-se que a clivagem padrão (seguido por tratamento com piperidina) foi essencialmente igual àquela obtida com o sistema Co(II)/KHSO₅ e com modificação específica na guanina ^[65]. Estes resultados apóiam a idéia de que o radical SO₄^{•-} é produzido a partir da reação de sulfito com oxigênio na presença de Co(II) e causa a alteração na guanina ^[59,65].

Em comparação com radicais hidroxila (que causam clivagem na fita do DNA preferencialmente nas posições guanina e timina) ^[63], os radicais sulfato têm menor tendência para reagir com as duplas ligações da timina ^[75]. Nakayama e colaboradores reportaram que o orbital molecular ocupado de nível de energia maior da guanina, é o mais energético entre as bases dos ácidos nucléicos, sendo portanto oxidada mais facilmente ^[76]. A predominância da alteração da guanina pela reação de Co(II)/KHSO₅

pode ser atribuído ao SO4^{•-} que é agente oxidante efetivo de transferência de elétrons

I.3.2 Lesão no DNA provocada por alguns radicais de óxidos de enxofre em meio alcoólico.

Foram realizados estudos em meio alcoólico, com a finalidade de evidenciar a formação de radicais $SO_4^{\bullet-}$ e também investigar o possível envolvimento de $SO_3^{\bullet-}$ e $SO_5^{\bullet-}$ na lesão no DNA ^[8,9,48,50,59,65].

Foi sugerido que $SO_4^{\bullet-}$ reage facilmente com etanol, enquanto $SO_3^{\bullet-}$ e $SO_5^{\bullet-}$ reagem dez mil vezes mais lentamente ^[8,9,65]. Além disso, o álcool t-butanol reage cerca de mil vezes mais rápido com radical hidroxila do que com os radicais de sulfito ^[8,9,65]. Estudos de Muller e colaboradores revelaram que o radical HO[•] reage com álcoois (etanol e t-butanol), e o radical $SO_4^{\bullet-}$ é seqüestrado somente por etanol e reage 100 vezes mais lentamente com t-butanol ^[8]. Surpreendentemente, a adição de etanol ou t-butanol permitiu um aumento na reatividade do DNA (50% e 7%, respectivamente) ^[8,59].

A adição de 25 mmol L⁻¹ de etanol a uma reação de CoCl₂, HSO₅⁻ e oligodeoxinucleotideos, d(ATATCAGATCTAGACTAT) (tabela 2), leva a uma inibição de cerca de 89% em relação a incubação na ausência de álcool ^[50]. Concentrações maiores de etanol, 50 ou 100 mmol L⁻¹, reduzem em 95% a ocorrência de quebra em fita de DNA. Entretanto, em experimentos análogos utilizando o t-butanol não foi observada inibição da lesão. Outros resultados obtidos com [NiCR]²⁺ e [NiKGH-CONH₂]⁺ estão apresentados na tabela 2.

Reagentes	Álcool	Variação da clivagem ao DNA (%) ^b
Fotólise de K ₂ S ₂ O ₈	25 mmol L ⁻¹ etanol	-80
	50 mmol L ⁻¹ etanol	-84
	100 mmol L ⁻¹ etanol	-90
	25 mmol L ⁻¹ t-butanol	+21
	50 mmol L ⁻¹ t-butanol	+17
	100 mmol L ⁻¹ t-butanol	-08
CoCl₂ ^c + KHSO₅ ^d	25 mmol L ⁻¹ etanol	-89
	50 mmol L ⁻¹ etanol	-97
	100 mmol L ⁻¹ etanol	-95
	25 mmol L ⁻¹ t-butanol	+05
	50 mmol L ⁻¹ t-butanol	+05
	100 mmol L ⁻¹ t-butanol	-01
NiCR ^c + KHSO₅ ^d	25 mmol L ⁻¹ etanol	-12
	50 mmol L ⁻¹ etanol	-24
	100 mmol L ⁻¹ etanol	-48
	25 mmol L ⁻¹ t-butanol	+09
	50 mmol L ⁻¹ t-butanol	+03
	100 mmol L ⁻¹ t-butanol	+03

Tabela 2. Variações na % de quebra da fita de DNA^ª em meio alcoólico ^[9,50]. *

^a Oligodeoxinucleotideo, d(ATATCAGATCTAGACTAT) 3 μ mol L⁻¹. ^b Erro estimado em ± 10%.

[NiCR] e [CoCl2] = 3 μ mol L⁻¹. ^d [KHSO₅] = 50 μ mol L⁻¹.

* variação da clivagem ao DNA = diferença da clivagem com e sem álcool.
Experiências em meio de 25 mmol L⁻¹ de etanol ou t-butanol, com produção fotolítica de radical sulfato, mostraram uma redução de 80% e um aumento de 21%, respectivamente, nas quebras da fita de DNA mediado por radical sulfato ^[50].

Estas observações para a modificação de DNA a partir de $CoCl_2$ e $HSO_5^$ parecem ser consistentes com a produção maior de radical sulfato ($SO_4^{\bullet-}$), do que a dos radicais peroxomonosulfato ($SO_5^{\bullet-}$) e hidroxila (HO^{\bullet}).

No entanto, outros resultados obtidos com NiCR e HSO_5^- foram diferentes ^[50]. Quando 25 mmol L⁻¹ de etanol foi adicionado ao DNA na presença de NiCR e HSO_5^- a diferença na proporção da quebra da fita, na presença de álcool, diminuiu somente em 12%, enquanto a adição de 100 mmol L⁻¹ de etanol resultou em uma redução de 48% ^[50]. Esses dados podem sugerir que enquanto a reação envolvendo CoCl₂ produz uma quantidade alta de radical sulfato, reações empregando NiCR podem envolver um intermediário no qual o complexo de níquel (III) é ligado a SO₄^{•-} produzindo efetivamente um complexo misto com o radical sulfato, o qual pode ser formado desde a sua geração na presença de etanol (eq. 38 e 39).

$$[Co^{II}(H_2O)_5L]^{2+} + HSO_5^{-} \longrightarrow [Co^{III}(H_2O)_4(OH)L]^{2+} + SO_4^{\bullet-} + 2H^{+} [38]$$

$$L = H_2O \text{ ou } G \text{ N7 do } DNA$$

$$[Ni^{II}CR]^{2+} + HSO_5^{-} \longrightarrow [Ni^{III}CR(L)(SO_4)]^{2+} + OH^{-}$$

$$L = G \text{ N7 de } DNA$$

$$[39]$$

I.4 Produtos resultantes da oxidação do DNA

Como foi mencionado anteriormente, dentre as espécies formadas a partir da autoxidação do sulfito (SO₃^{•-}, SO₄^{•-}, SO₅^{•-}, HO[•] e HSO₅⁻), o radical sulfato é a espécie mais reativa devido ao maior potencial de redução, (tabela 1) e apontada como a espécie mais provável de promover lesão no DNA, reagindo com a base de menor potencial de redução, a guanina (vide tabela 1) ^[51]. No entanto um dos seus produtos de oxidação, 8-oxodG, também pode ser oxidado, sendo o seu potencial de redução menor ainda, 0,58 V (vs E.N.H., tabela 1) ^[48,51,64,80].

A maioria dos oxidantes reage com a guanina por mecanismo de um elétron levando à formação do cátion radical G^{•+} que após sofrer hidratação seguida de oxidação por um elétron forma a 8-oxodG (figura 1, composto A). Por outro lado, o cátion radical da guanina desprotonado (G-H)[•] não sofre hidratação, entretanto adições de O₂ no radical centrado no C₅ leva a uma seqüência de reações que conduz à formação de imidazolona (figura 1, composto E) e oxazolona (figura 1, composto F) ^[51,81].

Estudos sugerem que os níveis bases de 8-oxodGuo em células humanas é de 0,3 - 4,2 8-oxodGuo por 10^6 G⁸². Portanto, a química relacionada a 8-oxodG é de interesse particular. 8-oxodG, ou a sua forma tautomérica, 7,8-dihidro-8-hidroxoguanina, podem ser formadas até por 4 reações diferentes (figura 2). Assim, C₈ parece ser susceptível à adição de radical HO[•] como é indicado na figura 2 (reação 1) ^[51].



Figura 1. Produtos secundários formados a partir do cátion radical guanina. (A) 8-oxodG; (M) forma ressonante de (G-H)[•]; (E) Imidazolona e (F) Oxazolona ^[51]. dR: desoxirribose.



Figura 2. Mecanismos de reação para a formação da 8-oxodG a partir da guanina. **(A)** 8-oxodG (7,8-dihidro-8-hidroxoguanina); **(N)** 8-hidroperoxiguanina; **(P)** intermediário de guanina e complexo de Rutênio (IV) ^[51]. R: ribose.

Finalmente, uma outra reação de oxidação da guanina seria possível a partir de espécies oxo metálicas capazes da transferência de átomos de oxigênio (figura 2, reação 4)^[51].

I.5 Lesão no DNA por HO[•]

Tem sido demonstrado que o produto principal da oxidação da dGuo por HO[•] em solução aquosa aerada é o 2,2-diamino-4-[(2-deoxi-β-D-eritro-pentofuranosil) amino]-5 (2H)-oxazolona (dZ) juntamente com o seu precursor lábil o 2-amino-5-[(2-deoxi-β-D-eritro-pentofuranosil) amino]-4H-Imidazo-4-ona (figura 3).

O radical HO[•] produzido pela autoxidação de S(IV) também deve ser considerado como um possível agente de lesão no DNA, conforme mecanismo apresentado no esquema I. Por exemplo, segundo Shi *et al.* ^[48] a autoxidação de SO₃^{2–} gera não só radicais SO₃^{•–} como também HO[•], sendo ambos detectados por EPR. Esses radicais causam oxidação da dGuo gerando 8-oxodGuo e quebras da dupla fita do DNA.

I.5.1 Reação de Purinas com HO[•]

Informações importantes sobre a formação de lesões oxidativas na guanina têm sido obtidos de diversos estudos sobre os efeitos do HO[•] em dGuo, oligonucleotídos e DNA isolado ^[83].



Figura 3. Produto principal da oxidação da dGuo por HO[•] em solução aquosa aerada. dZ: 2, 2-diamino-4-[(2-deoxi-β-D-eritro-pentofuranosil) amino]-5(2H)-oxazolona ^[81]. dR: desoxirribose; dIZ: nucleosídeo Imidazolona.

O radical HO[•] interage com a guanina pela adição preferencialmente nas posições C(8) e C(4) do anel para formar radicais 1 e 5 respectivamente (figura 4 e 5)^[84].

Com dGuo, as gerações dos radicais 1 e 5 (figuras 4 e 5) são 17% e 50-60%, respectivamente. Considerando que o radical 1 tem propriedades redutoras, e o radical 5 tem propriedades oxidantes, a adição de HO[•] a C(5) da guanina é um processo menos provável ^[85]. Na ausência de oxigênio, no radical 1 ocorre abertura do anel do radical com uma constante de velocidade de 2,0 x 10^{-5} s⁻¹ gerando o radical 2 (figura 4). Na presença de agentes redutores, o radical 2 é convertido no nucleosídeo 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyG, figura 4). Na presença de oxigênio ou agentes oxidantes, o radical 1 é convertido no produto persistente, 8-oxodGuo figura 4), usado como marcador biológico de estresse oxidativo ^[86,87]. O radical 5 sofre uma reação de desidratação com uma constante de velocidade de 6,0x10³ s⁻¹ em pH 7 para dar o radical oxidado 6, ou 7 dependendo do pH (figura 5) com um valor de pK_a de 3,9 para a dGuo ^[84,86]. O radical 6, em pH neutro, reage lentamente com o oxigênio ^[86] (k < 10^6 mol⁻¹ L s⁻¹) para produzir a oxazolona (figura 5) [87]. No entanto, no DNA, o radical guanina oxidado tem caráter iônico parcial num pH neutro devido à transferência parcial de um próton pela sua base complementar, citosina ^[85].



Figura 4. Produtos formados a partir da reação do radical HO[•] com a guanina. **(1)** e **(2)** radicais de guanina; **(3)** FapyG (2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina) **(4)** 8-oxodGuo (8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina) ^[85]. dR: desoxirribose.



Figura 5. Produtos formados a partir da reação do radical HO[•] com a guanina. **(5)**, **(6)** e **(7)** radicais da guanina; **(1)** radical intermediário; **(4)** 8-oxodGuo (8-oxo-7,8-dihidro-2'- deoxiguanosina) e **(8)** produto oxazolona ^[85]. dR: desoxirribose.

Outro caminho de reação para o radical 7 (figura 5) é a hidratação $(k \sim 17 \text{ s}^{-1})$ para gerar radical 1 ^[88], que em presença de oxidantes é convertido, entre outros produtos, a 8-oxodG (4). Em DNA, a 8-oxodG é o produto principal obtido a partir da oxidação de DNA ^[89]. O radical HO[•] também interage com adenina por adição preferencialmente na posição C(4) e C(8) do anel para dar os radicais 9 e 12, respectivamente (figuras 6 e 7) ^[84].

Com adenosina, as gerações dos radicais 9 e 12 (figuras 6 e 7) são 30-35% e 37%, respectivamente relativos ao radical HO[•]. O radical 12 sofre uma reação de anel aberto na ausência de oxigênio para gerar o radical 13 (figura 7) ^[90]. Este último radical, na presença de agentes redutores, é convertido ao produto estável Fapy A (14) (figura 7). Na presença de oxigênio ou agentes oxidantes, o radical 12 é convertido finalmente a 8-oxodA, produto 15 (figura 7).

O radical 9 sofre uma reação de desidratação com uma constante de velocidade de 2×10^4 s⁻¹ para gerar o radical oxidado 10 (figura 6), que tem um pK_a < 1 ^[84]. Portanto, o radical 10 não deveria ter caráter catiônico em DNA a pH neutro, não sendo esperado que se hidrate, produzindo finalmente 8-oxodA (15). O radical 10 reage com agentes redutores para regenerar adenina ^[85]. Se a guanina se encontra na cadeia adjacente ao radical 10, após uma rápida transferência de elétrons intramolecular, resulta a produção do radical oxidado de guanina (11) (figura 6). Esta reação foi revelada unicamente em oligonucleotídeos ^[91]. A reação é termodinamicamente favorável sendo os potenciais de redução de radicais oxidados de guanosina (radical 6 / guanina) e adenosina (radical 10 / adenina) iguais a 1,29 e 1,42 V (vs. E.N.H.), respectivamente (tabela 1, página 8) ^[92].



Figura 6. Produtos formados a partir da reação do radical HO[•] com adenina. **(9)** e **(10)** radicais da adenina; **(11)** radical oxidado da guanina ^[85]. dR: desoxirribose.



Figura 7. Produtos formados a partir da reação do radical HO[•] com adenina. **(12)** e **(13)** radicais da adenina; **(14)** FapyA; **(15)** 8-oxodA ^[85]. dR: desoxirribose.

I.5.2 Reação de Pirimidinas com HO[•]

Com pirimidinas, o radical HO[•] interage com as duplas ligações C(5) = C(6) para produzir principalmente dois radicais que são facilmente diferenciados por suas propriedades redox. O radical 5-hidroxi-6-il, que corresponde a mais do que 70% do produto gerado a partir de HO[•], é reduzido se o radical 6-hidroxi-6-il é oxidado ^[84,85]. Com timina, um radical produzido em menor rendimento é formado pela abstração do átomo H do seu grupo -CH₃. Na ausência de oxigênio, esses radicais pirimidinas interagem por adição com oxigênio para produzir os adutos radicais peroxos correspondentes ^[85]. Os adutos peroxos surgem a partir de C(5)-HO[•]. Os adutos podem sofrer uma reação de abstração do átomo de hidrogênio do açúcar das vizinhanças (k ~ 1 s⁻¹). Se a abstração acontece no C(4)' deste açúcar vizinho, uma quebra da cadeia é produzida ^[84].

I.6 Interação entre alguns complexos peptídicos de íons de cobre(II) e DNA na presenca de peróxido de hidrogênio ^[93]

Uma interação entre complexos peptídicos de íons de cobre(II) e DNA foi observada a partir de dados espectrofotométricos. Em soluções contendo complexos de Cu(II) e DNA foram observados hipercromismo (aumento da absortividade molar), hipocromismo (diminuição da absortividade molar) ou batocromismo (deslocamento para a região do vermelho do comprimento de onda de absorção máxima) no DNA ^[93]. Esses efeitos foram atribuídos ao fato de que complexos de cobre(II) podem ligar-se ao

DNA dupla fita de diferentes modos, ligação através de hidrogênio, por forças de Van der Waals ou coordenação entre os íons de cobre(II) dos complexos e as bases nitrogenadas do DNA ^[93].

Nos estudos de complexos de Cu(II), em meio contendo peróxido de hidrogênio e DNA (eqs. 40 - 43), a estrutura geométrica dos complexos que interagem com o DNA é uma propriedade muito importante que indicará indiretamente a extensão do a lesão no DNA ^[93,94]. Desta forma uma ligação forte entre o complexo de cobre (II) e DNA dupla fita garante uma proximidade maior dos radicais a serem formados e conseqüentemente com isto a probabilidade de lesar mais acentuadamente a biomolécula. Entretanto, é importante ressaltar que a capacidade de lesar a dupla fita do DNA também dependerá da eficiência da formação de radicais livres ^[93]. Assim, a extensão da ligação é somente um indicativo do que poderia influenciar na magnitude da lesão, mas não é uma característica definitiva. Por exemplo, os complexos $[Cu(Im)_4CI]CI \in [Cu(IDB)(NO_3)_2]$ (figura 8A e 8B) (ambos com estrutura piramidal de base guadrada), se ligam fortemente ao DNA em comparação ao complexo [Cu(HTCD)]I₂ (estrutura guadrada plana) (figura 8C), sendo a lesão no DNA maior na presença deste último complexo e H₂O₂. Portanto, o modo de ligação do complexo [Cu(HTCD)]I₂, permite uma proximidade maior dos íons de cobre ao centro da molécula de DNA ^[93].

Desta forma foi sugerida a formação de uma ligação covalente ou não covalente de DNA – Cu(II)/ligante antes da formação dos radicais livres (HO[•]) ^[93]. Com base nesta idéia foi sugerido um mecanismo de lesão no DNA dupla fita a partir da formação do radical HO[•] (reação de Fenton ou Haber Weiss, eqs. 40 - 43) indicando uma interação

inicial do complexo de cobre(II) com o DNA. Posteriormente, o Cu(II) ligado ao DNA é reduzido a Cu(I) por um redutor, e na presença de H₂O₂ há formação de radicais hidroxila muito próximos ao DNA. Finalmente estes radicais reagem rapidamente com a desoxirribose adjacente do DNA ocasionando a quebra da fita ^[93].

Reação de Fenton.

$CuL^{2+} + e^{-} \longrightarrow CuL^{+}$	[40]
$CuL^{1+} + H_2O_2 \longrightarrow CuL^{2+} + OH^- + HO^{\bullet}$	[41]
Mecanismo de Haber-Weiss	
$CuL^{1+} + O_2 \longrightarrow CuL^{2+} + O_2^{-}$	[42]
$O_2^- + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + HO^{\bullet}$	[43]

Complexos indicados na figura 8.

Finalmente da apreciação da literatura apresentada no presente capítulo, conclui-se que as lesões no DNA promovidas pela autoxidação de sulfito, na presença de íons metálicos de transição, claramente envolvem radicais de óxidos de enxofre (SO₃^{•-}, SO₄^{•-}, SO₅^{•-}) e outras espécies (HSO₅⁻, HO[•]) formadas durante este processo oxidativo. Os estudos aqui apresentados também indicaram que existem condições críticas (pH, concentração dos reagentes, natureza do íon metálico, ligante e concentração de oxigênio) a serem consideradas na etapa inicial da reação e na intensidade de lesão no DNA ^[95]. A identificação das espécies envolvidas nem sempre pode ser realizada com segurança, no entanto estudos cinéticos combinados com equilíbrios de formação de íons complexos podem contribuir para um melhor entendimento da lesão oxidativa no DNA.



Figura 8. Complexos de cobre: (A) $[Cu(Im)_4CI]CI;$ (B) $[Cu(IDB)(NO_3)_2]$ e (C) $[Cu(HTCD)]I_2^{[93]}$.

I.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. TAYLOR, S. L.; HIGLEY, N. A. e BUSH, R. K.

Sulfites in Foods: Uses, Analytical Methods, Residues, Fate, Exposure Assessment, Metabolism, Toxicity, and Hypersensitivity.

Adv. Food Res., 1986, 30, 1-75.

- ERMAKOV, A. N.; POSKREBYSHEV, G. A. e PURMAL, A. P. Sulfite Oxidation: The State-of-the-art of the Problem. Kinet. Catal., 1997, 38, 295-308.
- 3. PAPAZIAN, R.

Sulfites: Safe for most, dangerous for some FDA Consumer Magazine, 1996, 30-10, 35-43.

- 4. American Academy of Allergy and Immunology Committee on Adverse Reactions to Foods and National Institute of Allergy and Infectious Diseases. 1984, Adverse Reactions to Foods, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, 1984, Publication No. 84-2442, US. Government Printing Office, Wahington, DC, USA.
- 5. STAMMATI, A.; ZANETTI, S.; PIZZOFERRATO, L.; QUATRUCCI, E. e TRANQUILLI, G. B.

In Vitro Model for the Evaluation of Toxicity and Antinutritional Effects of Sulfites. Food. Addit. Contam., 1992, 9, 551.

6. SHAPIRO, R.

Genetic Effects of Bisulfite (Sulfur-Dioxide).

Mutat. Res., 1977, 39, 149-175.

7. LEPENTSIOTIS, V.; DOMAGALA, J.; GRGIC, I.; VAN ELDIK, R.; MULLER, J. G.e BURROWS, C. J.

Mechanistic Information on the Redox Cycling of Nickel(II/III) Complexes in the Presence of Sulfur Oxides and Oxygen. Correlation with DNA Damage Experiments.

Inorg. Chem., 1999, 38, 3500-3505.

8. MULLER, J. G. e BURROWS, C. J.

Metallodrug Complexes that Mediate DNA and Lipid Damage via Sulfite Autoxidation: Copper(II) Famotidine and Iron(III) bis(salicylglycine). Inorg. Chim. Acta, 1998, 276, 314-319.

- MULLER, J. G.; HICKERSON, R. P.; PEREZ, R. J. e BURROWS, C. J.
 DNA Damage from Sulfite Autoxidation Catalyzed by a Nickel(II) Peptide.
 J. Amer. Chem. Soc. 1997, 119, 1501-1506.
- 10. COICHEV, N. e VAN ELDIK, R.

Metal-Catalyzed Atmospheric Oxidation Reactions - A Challenge to Coordination Chemists.

New J. Chem., 1994, 18, 123-131.

11. BRANDT, C. e VAN ELDIK, R.

Transition Metal-Catalyzed Oxidation of Sulfur (IV) Oxides. Atmospheric – Relevant Processes and Mechanisms.

Chem. Rev., 1995, 95, 119-190.

12. PEZZA, H. R.; FERNANDES, C. F.; SUÁREZ-IHA. M. E. V. e COICHEV, N.

Cinética e Mecanismo da Reação de Autoxidação de S(IV) Catalisada por Íons Metálicos de Transição.

Química Nova, 1999, 22(4), 529-540.

13. CHEN, T. I. e BARRON, C. H.

Some Aspects of Homogeneous Kinetics of Sulfite Oxidation

Ind. Eng. Chem. Fundam., 1972, 11, 466-469.

14. DUCA, A.; MATEI, F. e IONESCU, G.

A New Indicator Reaction for Kinetic Determination of Traces of Cobalt.

Talanta, 1980, 27, 917-919.

15. HOBSON, D. B.; RICHARDSON, P. J.; HEWITT, E. A. e SMITH, I.

Kinetics and Mechanism of the Cobalt-Catalyzed Reaction of Oxygen and Sulfite at Very Low Concentrations.

J. Chem. Soc. Faraday Trans., 1986, 82, 869-881.

16. BRINBLECONBE, P. e SPEDDING, D. J.

Catalytic-Oxidation of Micromolar Aqueous Sulfur-Dioxide. 1. Oxidation in Dilute-Solutions Containing Iron(III).

Atmos. Environ., 1974, 8, 937-945.

17. SATO, T.; GOTO, T.; OKABE, T. e LAWSON, F.

The Oxidation of Iron(II) Sulfate with Sulfur Dioxide and Oxygen Mixtures.

Bull. Chem. Soc. Jpn., 1984, 57, 2082-2086.

18. BRANDT, C. e VAN ELDIK, R.

The Formation of Dithionate During the Iron(III)-Catalysed Autoxidation of Sulfur(IV)-Oxides.

Atmos. Environ., 1997, 31, 4247-4249.

19. HUSS, A.; LIM, P. K. e ECKERT, C. A.

Oxidation of Aqueous Sulfur Dioxide. 2. High-Pressure Studies and Proposed Reaction-Mechanisms.

J. Phys. Chem., 1982, 86, 4229-4233.

- IBUSUKI, T. e BARNES, H. M.
 Manganese(II) Catalysed Sulfur-Dioxide Oxidation in Aqueous-Solution at Environmental Concentrations Atmos. Environ., 1984, 18, 145-151.
- 21. BACKSTROM, H. J.

Der Kettenmchanismus bei der autoxydation von natriumsulfitlosungen.

Z. Phys. Chem., 1934, 25B, 122-138.

22. CARLYLE, D. W.

Electron Transfer between Sulfur(IV) and Tris(1,10-phenanthroline)iron(III) Ion in Aqueous Solution.

J. Am. Chem. Soc., 1972, 94, 4525-4529.

23. LEITE, H. M. S.; COICHEV, N. e NEVES, E. A.

The Sulfite Accelerated Autoxidation of Co(II) in the Presence of Tris(hidroxymethyl)aminomethane.

Anal. Lett. 1996, 29, 2587-2590.

 CARVALHO, L. B.; CRIVELENTE, V. C. T.; ALIPÁZAGA, M. V. e COICHEV, N. The Autoxidation of Co(II)/2-amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanodiol in the Presence of Mn(II) and S(IV).

Inorg. Reac. Mechan. 2004, 5, 101-108.

25. VAN ELDIK, R. e HARRIS, G. M.

Kinetics and Mechanism of the Formation, Acid-Catalyzed Decomposition and Intramolecular Redox Reactions of Oxygen-Bonded (Sulfito)pentaamminecobalt(III) Ions in Aqueous Solution. Inorg. Chem., 1980, 19, 880-886.

26. DELLERT-RITTER, M. e VAN ELDIK, R.

Kinetics and Mechanism of the Complex Formation of Ethylenediaminetetraacetateiron(III) with Sulfur(IV) Oxides in Aqueous Solution. Dalton Trans., 1992, 1037-1044.

 BOYCE, S. D.; HOFFMANN, M. R.; HONG, P. A. e MOBERLY, L. M.
 Catalysis of the Autoxidation of Aquated Sulfur Dioxide by Homogeneous Metal-Phthalocyanine Complexes. Environ. Sci. Technol., 1983, 17, 602-611.

28. BOBBA, V. M.; GIRAUDI, G. e MENTASI, E.

The Kinetics and Mechanism of Reduction of trans-cyclohexane-1,2-diamine-NNN'N'-tetraacetatomanganate(III) by Sulphite, Transition Met. Chem., 1988, 13, 256-260.

29. COICHEV, N. e VAN ELDIK, R.

Kinetics and Mechanism of the Sulfite-induced Autoxidation of Cobalt(II) in Aqueous Azide Medium Inorg. Chem., 1991, 30, 2375-2380.

30. NEVES, E. A.; COICHEV, N.; GEBERT, J. e KLOCKOW, D.

Autoxidation of Cobalt(II) in Azide Containing Medium in Presence of Sulfur (IV) an Interpretative Study.

Fresenius Z. Anal. Chem. 1989, 335, 386-389.

31. LIMA S.; BONIFACIO R. L.; AZZELLINI G. C. e COICHEV N.

Ruthenium(II) tris(bipyridyl) ion as a luminescent probe for oxygen uptake on the catalyzed oxidation of HSO₃.

Talanta, 2002, 56, 547–556.

32. COICHEV, N. e VAN ELDIK, R.

A Mechanistic Study of the Sulfite-induced Autoxidation of Mn(II) in Aqueous Azide Medium.

Inorg. Chim. Acta, 1991, 185, 69-73.

33. PEZZA, H. R. e COICHEV, N.

Kinetics and Mechanism of the Induced Redox Reaction of $[Ni(cyclam)]^{2+}$ Promoted by SO₅ Center.

J. Coord. Chem., 1999, 47, 107-119.

34. PEZZA, H. R.; BONIFÁCIO, R. L. e COICHEV, N.

Oxidation of Ni(II)/cyclam and Tetraglycine Complexes by Dissolved Oxygen in the Presence of S(IV). Synergistic Effects on Mn(III) and Co(III). J. Chem. Res-M. 1999, 1520-1540.

35. MOYA, H. D.; NEVES, E. A. e COICHEV, N.

A Further Demonstration of Sulfite-induced Redox Cycling of Metal Ions Initiated by Shaking.

J. Chem. Educ., 1999, 76, 930-932.

36. ANAST, J. M. e MARGERUM, D. W.

Trivalent Copper Catalysis of the Autoxidation of Sulfite. Kinetics and the Mechanism of the Copper (III/II) Tetraglycine Reactions with Sulfite. Inorg. Chem., 1981, 20, 2319-2326.

37. YOSHIDA, D.; MOYA, H. D.; BONIFÁCIO, R. L. e COICHEV, N.

Kinetics of Copper(III)/(II) Tetraglycine Reactions with Sulfite. Analytical Potentialities.

Spectroscopic Letters, 1998, 31, 1495.

38. ALIPÁZAGA M. V. e COICHEV, N.

Synergistic Effect of Some Transition Metal Ions on the Sulfite Induced Autoxidation of Cu(II)/tetraglycine Complex. Analytical Applications. Anal. Lett., 2003, 36, 2255-2275.

39. ALIPÁZAGA, M. V.; MORENO, R. G. M. e COICHEV, N.

Synergistic Effect of Ni(II) and Co(II) lons on the Sulfite-Induced Autoxidation of Cu(II)/tetraglycine.

Dalton Trans., 2004, 13, 2036-2040.

40. ALIPÁZAGA, M. V.; BONIFÁCIO, R. L.; KOSMINSKY, L.; BERTOTTI, M. e COICHEV, N.

Sulfite Induced Autoxidation of Cu(II)/ tetra/ penta/ hexaglycine Complexes. Spectrophotometric and Rotating Ring-disk Glassy Carbon Electrode Studies with Analytical Potentialities.

J. Braz. Chem. Soc., 2003, 14, 713 - 721.

41. ALIPÁZAGA, M. V.; KOSMINSKY, L.; BERTOTTI, M. e COICHEV, N.

S(IV) Induced Autoxidation of Cu(II)/tetraglycine Complexes in the Presence of Aldehydes: Mechanistic Considerations and Analytical Applications.

Talanta 2002, 57, 375.

42. ALIPÁZAGA, M. V. e COICHEV, N.

Sulfite Induced Autoxidation of Ni(II) and Co(II) tetraglycine Complexes. Spectrophotometric and Rotating Ring-Disk Voltammetric Studies. Dalton Trans., 2004, 2, 267-272. 43. REDDY, K. B.; COICHEV, N. e VAN ELDIK, R.

Redox Cycling of Iron in Atmospheric Water - The Important Role of Sulfite. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1991, 481-483.

44. VAN ELDIK, R.; COICHEV, N.; BAL REDDY, K. e GERHARD, A.

Metal Ion Catalyzed Autoxidation of Sulfur(IV)-Oxides: Redox Cycling of Metal Ions Induced by Sulfite.

Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 1992, 96, 478-481.

45. COICHEV, N.; VAN ELDIK, R. e FRANZ, D. A.

A Fascinating Demonstration of Sulfite-Induced Redox Cycling of Metal-Ions Initiated by Shaking.

J. Chem. Educ. 1994, 71, 767-769.

46. FRONAEUS, S.; BERGLUND, J. e ELDING, L. I.

Iron-Manganese Redox Processes and Synergism in the Mechanism for Manganese-Catalyzed Autoxidation of Hydrogen Sulfite. Inorg. Chem., 1998, 37, 4939-4944.

47. FRONAEUS, S.; BERGLUND, J. e ELDING, L. I.

Kinetics and Mechanism for Manganese Catalyzed Oxidation of Sulfur (IV) by Oxygen in Aqueous Solution.

Inorg. Chem., 1993, 32, 4527-4538.

48. SHI, X. e MAO, Y.

8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA damage induced by sulfur trioxide anion radicals.

Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1994, 205(1), 141-147.

49. BURROWS, C. J.; PEREZ, R. J.; MULLER, J. G. e ROKITA, S. E.

Oxidative DNA damage mediated by metal-peptide complexes.

Pure & Appl. Chem., 70(2), 275-278, 1998.

- 50. MULLER, J. G.; ZHENG, P.; ROKITA, S. E. e BURROWS, C. J.
 DNA and RNA Modification Promoted by [Co(H₂O)₆]Cl₂ and KHSO₅. Guanine Selectivity, Temperature Dependence, and Mechanism.
 J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 2320-2325.
- 51. BURROWS, C. J. e MULLER, J. G.
 Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission.
 Chem. Rev., 1998, 98, 1109-1151.
- MOTTLEY, C.; MASON, R. P.; CHIGNELL, C. F.; SIVARAJAH, K. e ELING, T. E. The Formation of Sulfur Trioxide Radical Anion during the Prostaglandin Hydroperoxidase-catalyzed Oxidation of Bisulfite (Hydrated Sulfur Dioxide).
 J. Biol. Chem., 1982, 257, 5050-5055.
- 53. SUN, X.; SHI, X. e DALAL, N. S.
 Xanthine oxidase/hydrogen peroxide generates sulfur trioxide anion radical (SO₃^{•-}) from sulfite (SO₃²⁻).
 FEBS. Lett., 1992, 303, 213-216.
- 54. YANG, S. F.

Sulfoxide Formation from Methionine or Its Sulfide Analogs during Aerobic Oxidation of Sulfite.

Biochem., 1970, 9, 5008-5014.

- 55. PEISER, G. D. e YANG, S. F.
 Sulfite-Mediated Destruction of β-Carotene.
 J. Agric. Fd. Chem., 1979, 27, 446-449.
- 56. SOUTHERLAND, W. M.; AKOGVERAM, C. O.; TOGHROL, F.; SLOAN, L. e SCHERRER, R.

Interaction of bisulfite with unsaturated fatty acids.

J. Toxicol. Environ. Health., 1982, 10(3), 479-491.

57. LIZADA, M. C. C. e YANG, S. F.

Sulfite-Induced Lipid Peroxidation.

Lipids, 1981, 16, 189-194.

58. KAPUSS, H.

Oxidative stress in chemical toxicity.

Arch. Toxicol., 1987, 60, 144-149.

59. KAWANISHI, S.; YAMAMOTO, K. e INOUE, S.

Site-Specific DNA Damage Induced by Sulfite in the Presence of Cobalt(II) Ion-Role of Sulfate Radical.

Biochem. Pharmacol., 1989, 38(20), 3491-3496.

60. SHI, X.

Generation of $SO_3^{\bullet-}$ and OH Radicals in SO_3^{2-} Reactions with Inorganic Environmental Pollutants and Its Implications to SO_3^{2-} Toxicity. J. Inorg. Biochem., 1994, 56, 155-165.

61. WIETZERBIN, J.; MULLER, J. G.; JAMETON, R. A.; PRATVIEL, G.; BERNADOU, J.; MEUNIER, B. e BURROWS, C. J.

Hydroxylation, Epoxidation, and DNA Cleavage Reactions Mediated by the Biomimetic Mn-TMPyP/O₂/Sulfite Oxidation System.

Inorg. Chem., 1999, 38, 4123-4127.

- 62. HAYATSU, H. e MILLER, R. C.
 The cleavage of DNA by the oxygen-dependent reaction of bisulfite.
 Biochem. Biophis. Res. Commun., 1972, 46, 120-124.
- 63. INOUE, S. e KAWANASHI, S.

Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide.

Cancer Res., 1987, 47, 6522-6527.

64. HICKERSON, R. P.; PRAT, F.; MULLER, J. G.; FOOTE, C. S. e BURROWS, C. J.

Sequence and Stacking Dependence of 8-Oxoguanine Oxidation: Comparison of One-Electron vs Singlet Oxygen Mechanisms.

J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 9423-9428.

65. MCLACHLAN, G. A.; MULLER, J. G.; ROKITA, S. E. e BURROWS, C. J.

Metal-mediated oxidation of guanines in DNA and RNA: a comparison of cobalt(II), nickel(II) and copper(II) complexes.

Inorg. Chim. Acta, 1996, 251, 193-199.

66. HICKERSON, R. P.; WATKINS-SIMS, C. D. ; BURROWS, C. J.; ATKINS, J. F.; GESTELAND, R. F. e FELDEN, B.

A Nickel Complex Cleaves Uridine in Folded RNA Structures: Application to E. coli tmRNA and Related Engineered Molecules.

J. Mol. Biol., 1998, 279, 577-587.

67. ZHENG, P.; BURROWS, C. J.; e ROKITA, S. E.

Nickel- and Cobalt-Dependent Reagents Identify Structural Features of RNA That Área Not Detected by Dimethyl Sulfate or RNase T1. Biochemistry, 1998, 37, 2207-2214.

68. GILL, G.; RICHTER-RUSLI, A. A.; GHOSH, M.; BURROWS, C. J. e ROKITA, S. E.

Nickel-Dependent Oxidative Cross-Linking of a Protein.

Chem. Res. Toxicol., 1997, 10, 302-309.

69. STUART, N. J.; GOERGES, A. L. e ZALESKI, J. M.

Characterization of the Ni(III) Intermediates in the Reaction of (1,4,8,11 - Tetraazacyclotetradecane)nickel(II) Perchlorate with KHSO₅ : Implications to the Mechanism of Oxidative DNA Modification.

Inorg. Chem., 2000, 39, 5976-5984.

70. MORENO, R. G. M.; ALIPAZAGA, M. V.; MEDEIROS, M. H. G. e COICHEV, N.

DNA damage induced by sulfite autoxidation catalyzed by copper(II) tetraglycine complex.

Dalton Trans., 2005, 6, 1101-1107.

71. MORENO, R. G. M., ALIPÁZAGA, M. V., GOMES, O. F., MEDEIROS, M. H. G., AUGUSTO, O. e COICHEV, N.

Complementary studies on DNA damage and 2'-deoxyguanosine oxidation induced by S(IV) autoxidation catalyzed by copper(II) tetraglycine complexes. Synergistic effect.

Dalton Trans. 2005, submetido para publicação.

72. ROSS, A. S. e BURROWS, C. J.

Bromination of Pyrimidines using Bromide and Monoperoxsulfate: A competition Study between Cytidine, Uridine and Thymidine.

Tetrahedron Lett., 1997, 38(16), 2805-2808.

73. ROSS, A. S. e BURROWS, C. J.

Cytosine-specific chemical probing of DNA using bromide and monoperoxysulfate.

Nucleic Ac. Res., 1996, 24(24), 5062-5063.

74. SCHULTZE- FROHLINDE, D. e HILDEBRANDT, K.

Free radicals in Synthesis and Biology. NATO ASI Series, in F. Minisci, eds. Kluwer, Dordrecht, 1989.

75. VON, C. S.; HAGEN, U.; SCHÖN-BOPP, A. e SHULTE-FROHLINDE, D.

Radiation-induced strands breaks in DNA: chemical and enzymatic analysis of end groups and mechanistic aspects.

Advances in Radiation Biology, (Eds. Lett JT and Adler H), Vol. 9, pp. 109-142. Academic Press, New York, 1981.

76. NAKAYAMA, T.; KODAMA, M. e NAGATA, C.

Free radical formation in DNA by lipid peroxidation. Agric. Biol. Chem., 1984, 48, 571-572.

77. MINISCI, F.; CITTERIO, A. e GIORDANO, C.

Electron-transfer processes: peroxydisulfate, a useful and versatile reagent in organic chemistry.

Acc. Chem. Res., 1983, 16, 27-32.

78. O'NEILL, P. e DAVIES, S. E.

Pulse radiolytic study of the interaction of $SO_4^{-\bullet}$ with deoxynucleosides. Possible implications for direct energy deposition.

Int. J. Radiat. Biol., 1987, 52, 577-587.

79. NETA, P.; HUIE, R, E. e ROSS, A. B.

Rate constants for reactions of inorganic radicals in aqueous solution.

J. Phys. Chem Ref. Data, 1988, 17, 1027-1284.

 HICKERSON, R. P.; CHEPANOSKE, C. L.; WILLIAMS, S. D.; DAVID, S. S. e BURROWS, C. J.
 Mechanism-Based DNA-Protein Cross-Linking of MutY via Oxidation

of 8-Oxoguanosine.

J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 9901-9902.

- CADET, J.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D. e RAVANAT, J. L.
 Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features Mut. Res., 2003, 531, 5-23.
- COLLINS, A. R.; CADET, J.; MOLLER, L.; POULSEN, H. E. e VIÑA, J.
 Arch. Biochem. Biophys. 2004, 423, 57-65.
- MARTINEZ, G. R.; LOUREIRO, A. P. M.; MARQUES, A. S.; MIYAMOTO, S.;
 YAMAGUCHI, L. F.; ONUKI, J.; ALMEIDA, E. A.; GARCIA, C. C. M.; BARBOSA,
 L. F.; MEDEIROS, M. H. G. e DI MASCIO, P.

Mut. Res. 2003, 544, 115.

84. O'NEILL, P. e FIELDEN, E. M.

Primary free radical processes in DNA.

Adv. Radiat. Biol., 1993, 17, 53-120.

CHATGILIALOGLU, C. e O'NEIILL, P.
 Free radicals associated with DNA damage.

Exp. Geront., 2001, 36, 1459-1471.

86. CANDEIAS, L. P. e STEENKEN, S.

Reaction of HO[•] with guanine derivatives in aqueous solution: formation of two different redox-active OH-adduct radicals and their unimolecular transformation reactions. Properties of G(-H).

- Chem. Eur. J., 2000, 6, 475-484.
- 87. DOUKI, T.; SPINELLI, S.; RAVANAT, J. L. e CADET, J.

Hydroxyl radical-induced degradation of 2'-deoxyguanosine under reducing conditions.

J. Chem. Soc. Perkin Trans., 1999, 2, 1875-1880.

- MELVIN, T.; BOTCHWAY, S. W.; PARKER, A. W. e O'NEILL, P.
 Induction of strand breaks in single-stranded polynucleotides and DNA by photoionization: one electron oxidized nucleobase radicals as precursors.
 J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 10031-10036.
- 89. MELVIN, T.; CUNNIFFE, S. M. T.; O'NEILL, P.; PARKER, A. e ROLDAN-ARJONA, T.

Guanine is the target for direct ionisation damage in DNA, as detected using excision enzymes.

Nucl. Acids. Res., 1998, 26(21), 4935-4942.

90. VIERA, A. J. S. C. e STEENKEN, S.

Pattern of OH radical reaction with adenine and its nucleosides and nucleotides. Characterization of two typed o iomeric OH adduct and their unimolecular transformation reactions.

J. Am. Chem. Soc. 1990, 112, 6986-6994.

91. BAMATRAF, M. M. M.; O'NEILL, P. e RAO, B. S. M.

OH radical-induced charge migration in oligodeoxynucleotides.

J. Phys. Chem. B. 2000, 104, 636-642.

92. STEENKEN, S. e JOVANOVIC, S. V.

How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution.

J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 617-618.

93. LIU, C.; ZHOU, J.; LI, Q.; WANG, L.; LIAO, Z. e XU, H.

DNA damage by copper(II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities.

J. Inorg. Biochem., 1999, 75, 233-240.

- 94. LIU, J.; ZHANG, T.; LU, T.; QU, L.; ZHOU, H.; ZHANG, Q. e JI, L.
 DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes.
 J. Inorg. Biochem., 2002, 91, 269.
- 95. ALIPÁZAGA, M. V.; MORENO, R. G. M.; LINARES, E.; MEDEIROS, M. H. G. e COICHEV, N.

Oxidative DNA Damage Induced by autoxidation of Microquantities of S(IV) in the presence of Ni(II).Gly-Gly-His.

Dalton Trans. 2005, 23, 3738-3744.

 II. Estudos espectrofotométricos da reação de oxidação de S(IV) na presença de Oxigênio, Cu(II)/tetraglicina e DNA

II.1 Introdução

A oxidação de S(IV) (H_2SO_3 , HSO_3^- e SO_3^{2-}) na presença de oxigênio, Cu(II)/G₄ e traços de Ni(II), ocorre rapidamente e se completa em aproximadamente 5 s em meio de pH = 9,0 ^[96].

O mecanismo proposto, esquematizado no capítulo I, (esquema I, página 5), supõe a formação de espécies oxidantes tais como: $SO_4^{\bullet-}$, $SO_3^{\bullet-}$, $SO_5^{\bullet-}$, HSO_5^- e OH[•], com oxidação do íon metálico e consumo de oxigênio.

Essa reação pôde ser estudada acompanhando-se a variação do estado de oxidação do íon metálico, pela medição da absorbância em 365 nm, referente ao complexo de Cu(III). (vide figura 2, página 61).

Em condições experimentais nas quais as concentrações de oxigênio e Cu(II)/G₄ são mantidas em excesso com relação ao S(IV), (por exemplo figura 5, página 69), a formação de Cu(III)/G₄ pôde ser acompanhada. O presente capítulo apresenta dados espectrofotométricos do acompanhamento da formação de Cu(III)/G₄ na presença e ausência de DNA. O objetivo desses estudos foi verificar evidências de interação do íon complexo com o DNA, com possível lesão oxidativa à biomolécula.

II.2 PARTE EXPERIMENTAL
II.2.1 Reagentes

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de pureza analítica (Merck, Aldrich e Sigma) e água deionizada pelo sistema Nanopure – Ultrapure Water System da Barnstead, 18 mol L⁻¹ Ω cm⁻¹.

A. Solução do complexo de Cu(II)/tetraglicina (Solução A)

Uma vez que o complexo de Cu(II)/tetraglicina é oxidado lentamente pelo oxigênio dissolvido ^[97], foram preparadas soluções imediatamente antes do seu uso. A solução deste complexo foi preparada dissolvendo-se 0,0062 g de tetraglicina e 0,125 mL de Cu(ClO₄)₂ 0,20 mol L⁻¹ em 5,0 mL de água deionizada (o pH 7,00 foi ajustado com microlitros de solução NaOH 0,10 mol L⁻¹ ou HClO₄ 0,10 mol L⁻¹). A solução final continha [Cu(II)/G₄] 5,0x10⁻³ mol L⁻¹. Esta solução estoque foi diluída com água deionizada (na relação 2 : 5) e ajustada no pH 7,0. A concentração final da solução foi [Cu(II)/G₄] 2,0x10⁻³ mol L⁻¹.

Para verificação do efeito da acidez e natureza do tampão nas reações estudadas no presente trabalho, essa solução foi preparada em meio tamponado $H_2PO_4^{-7}/HPO_4^{-2-}$ (0,10 mol L⁻¹), H_2CO_3/HCO_3^{--} (0,10 mol L⁻¹) e borato (0,10 mol L⁻¹).

B. Solução de S(IV) 0,010 mol L⁻¹ (Solução B)

A solução de S(IV) 0,010 mol L⁻¹ foi preparada diariamente dissolvendo-se 0,097 g de Na₂S₂O₅ em 100,0 mL de água deionizada isenta de oxigênio (pelo borbulhamento de nitrogênio). Em solução aquosa, um mol de S₂O₅²⁻ gera dois mols de HSO₃⁻ (equação 1). A padronização dessa solução foi feita iodometricamente ^[98].

$$S_2O_5^{2-} + H_2O \longrightarrow 2HSO_3^{-}$$
 [1]

Para preparar as soluções diluídas de S(IV) volumes pequenos da solução estoque foram adicionados a água saturada com ar.

C. Solução de DNA

A solução de DNA foi preparada dissolvendo-se 0,0034 g de sal dissódica *Calf Thymus* DNA (CT-DNA, Sigma) em 50 mL de H₂O deionizada. Essa solução contem 6.8×10^{-5} g mL⁻¹ DNA.

Esta solução foi estocada a 4 °C e usada por até no máximo após 4 dias de preparo. Alíquotas dessa solução foram adicionadas à mistura contendo Cu(II)/tetraglicina e S(IV). As concentrações das soluções finais, logo após a mistura, são apresentadas nas legendas das figuras.

D. Soluções utilizadas nos testes de estudos cinéticos em tempos curtos.

Nesses testes a mistura dos reagentes foi realizada com o acessório do "stopped flow", conforme descrito no próximo item II.1.2.

Solução de Cu(II)/tetraglicina em meio não tamponado

A solução deste complexo foi preparada dissolvendo-se 0,0062 g de tetraglicina em 5,0 mL de água deionizada seguida da adição de 0,125 mL de $Cu(CIO_4)_2$ 0,2 mol L⁻¹, de modo a obter uma solução de [$Cu(II)/G_4$] 5,0x10⁻³ mol L⁻¹. Esta solução foi diluída na relação 2 : 5 com água deionizada (sendo que o pH_{final} = 9,0 ou 7,0 da solução foi ajustado com microlitros de solução de NaOH 0,10 mol L⁻¹ ou HCIO₄ 0,10 mol L⁻¹). A concentração final da solução de [$Cu(II)/G_4$] foi 2,0x10⁻³ mol L⁻¹.

Solução de Cu(II)/tetraglicina em tampão borato 0,10 mol L⁻¹

Foi preparada dissolvendo-se 0,0062 g de tetraglicina em 5,0 mL de solução de tampão borato 0,10 mol L⁻¹ (de pH = 9,0) seguida da adição de 0,125 mL de Cu(ClO₄)₂ 0,20 mol L⁻¹, obtendo-se uma solução de [Cu(II)/G₄] 5,0x10⁻³ mol L⁻¹. A seguir foi feito a diluição desta solução na relação 2 : 5 em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 9,0). A concentração final da solução de [Cu(II)/G₄] foi 2,0x10⁻³ mol L⁻¹.

II.2.2 Procedimento Experimental

A formação do complexo de Cu(III) foi acompanhada por medição de absorbância em 365 nm após a mistura de 1,0 mL de solução 2,0x10⁻³ mol L⁻¹

Cu(II)/tetraglicina (solução A), em meio tamponado ou não, com 1,0 mL de solução de S(IV) (solução B). Na legenda das figuras está representada a concentração da solução final após a mistura (1:1).

A absorbância foi registrada em 365 nm em intervalos regulares de tempo com espectrofotômetro HP 8453 diode-array.

Para avaliar a formação rápida do complexo Cu(III)/G₄, foi empregado o acessório de stopped flow, Pro-K 2000 Stopped-Flow Mixing Accessory (Applied Photophysics) acoplado a um espectrofotômetro HP-8452A diode-array (vide figura 1).

O esquema do aparelho de parada súbita "stopped flow" empregado está representado na figura 1. Nesse sistema a seringa A foi preenchida com a solução de $Cu(II)/G_4$ (2,0x10⁻³ mol L⁻¹ em tampão borato) e a seringa B com a solução de S(IV) 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ (ambas seringas com volumes iguais). Um dispositivo, que funciona sob pressão de ar comprimido (4 atm), empurra as soluções fazendo com que elas se misturem rapidamente no compartimento de mistura, chegando imediatamente até a cela. Quando o fluxo é parado subitamente, logo após a mistura, um "trigger" é acionado dando início à aquisição de dados de absorbância em função do tempo, com um computador acoplado em série. Nestes testes a formação do complexo de Cu(III)/G₄ foi acompanhada pela medição da absorbância em 365 nm após a mistura da solução A (Cu(II)/G₄ em meio tamponado ou não) com a solução B (S(IV)).



Figura 1. Diagrama esquemático do acessório de parada súbita ("stopped flow"), empregado para mistura dos reagentes nos estudos espectrofotométricos.

Com o objetivo de avaliar o efeito da ordem de adição dos reagentes, a solução de DNA foi adicionada em alguns testes à solução A ou à solução B antes da mistura. As concentrações das soluções logo após a mistura estão apresentadas nas legendas das figuras.

Em todos os testes foram empregadas soluções saturadas com ar, onde a concentração de oxigênio pode ser considerada como 2,5x10⁻⁴ mol L^{-1 [99]}. Os espectros UV-visível foram obtidos utilizando água como branco na maioria das vezes.

Para as medições do pH foi usado um pH metro Metrohm modelo 713 equipado com eletrodo de vidro Metrohm (com eletrólito interno NaCl 3,0 mol L⁻¹).

II.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

II.3.1 Autoxidação dos complexos de Cu(II)/tetraglicina induzida por S(IV)

A seguir serão apresentados os estudos para verificação de formação de Cu(III) quando a uma solução saturada com ar de Cu(II)/G₄ foram adicionados íons de S(IV). Esses ensaios foram realizados inicialmente na ausência de DNA. Uma investigação posterior, na presença de DNA, foi realizada para a verificação de variações nos picos de máxima absorção referente ao DNA (260 nm, ε = 6600 mol⁻¹ L cm⁻¹) ^[100] e ao Cu(III)/tetraglicina (250 nm, ε = 9000 mol⁻¹ L cm⁻¹ e 365 nm, ε = 7200 mol⁻¹ L cm⁻¹) [101,106,111]

II.3.2 Estudos na ausência de DNA

A. Estudo da oxidação de Cu(II)/G₄ pelo oxigênio na ausência de S(IV).

Foram feitos estudos na ausência de S(IV) para avaliação do processo de oxidação espontânea do complexo Cu(II)/G₄ pelo oxigênio.

Monitorando a formação de Cu(III), a partir de uma solução de Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ em pH 7,00 e na ausência de tampão, foi observado um período de indução (t = 9720 segundos), a partir do qual a absorbância em 365 nm aumenta com formação de Cu(III). Após atingir um valor máximo ocorre diminuição da absorbância devido à decomposição desse complexo (figura 2C).

Cabe ressaltar que na presença de S(IV) (figura 2B) o período de indução se reduz drasticamente (de horas a segundos) devido à geração dos radicais livres de óxidos de enxofre que favorecem a formação de Cu(III)/G₄ (eqs. 2-8, página 63), conforme abordado na introdução (capítulo I, página 4).

Uma observação importante a salientar é que as condições experimentais representadas na figura 2A não são adequadas para o acompanhamento da formação de Cu(III) em 365 nm, embora esta esteja ocorrendo, a concentração de Cu(III) formado é pequena pois a concentração de Cu(II)/G₄ é 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹. Essa formação é



Figura 2. Autoxidação do complexo $Cu(II)/G_4$ em uma solução saturada com ar. (A) $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ $Cu(II)/G_4$ + $1,0x10^{-6}$ mol L⁻¹ $Ni(II)/G_4$ + $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ S(IV); (B) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ $Cu(II)/G_4$ + $1,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ $Ni(II)/G_4$ + $5,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ S(IV); (C) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ $Cu(II)/G_4$; pH = 7,0. (T = 25,0° C). Branco: água.

facilmente verificada empregando-se concentração maior de Cu(II)/G₄ (1,0x10⁻³ mol L⁻¹, figura 2B).

B. Estudo da oxidação de Cu(II)/G₄ pelo oxigênio na presença de S(IV). Efeito sinérgico de Ni(II).

Segundo os estudos de Rybka *et al.* ^[111] a adição de S(IV) a uma solução de Cu(II)/G₄ na presença de oxigênio resulta na aceleração da formação do complexo de Cu(III). Estudos recentes, realizados por nosso grupo de pesquisa ^[102,103], verificaram que tal "aceleração induzida por S(IV)" é insignificante na ausência de um segundo íon metálico, no caso de Ni(II). No entanto na presença de quantidades muito pequenas de Ni(II) há uma aceleração marcante da autoxidação de Cu(II)/G₄ induzida por S(IV). Cabe mencionar que concentrações tão baixas de Ni(II) como 10⁻⁶ mol L⁻¹ (presente muitas vezes como impureza dos reagentes), já é suficiente para acelerar consideravelmente a reação.

A figura 3 mostra as mudanças de absorbância em 365 nm durante a autooxidação de Cu(II)/G₄ induzida por S(IV) em pH = 9,0. Na ausência de Ni(II) ([Ni(II)] = Zero) (figura 3a) a reação ocorre ineficiente e lentamente. A introdução de Ni(II) em concentrações baixas afetam significativamente a cinética: a formação de Cu(III)/G₄ é fortemente acelerada e o período de indução diminui gradualmente com o aumento da concentração de Ni(II) na faixa de $(0,1-5,0)x10^{-5}$ mol L⁻¹. A eficiência da reação, verificada pelo aumento no valor da absorbância limite, também é melhor na presença desse íon metálico. Cabe mencionar que, nas condições experimentais da figura 3, na presença de S(IV), o período de indução diminui drasticamente de 4 horas (na ausência de S(IV)) a menos de 3 segundos. Desta maneira, Ni(II) mostrou efeito sinérgico positivo na autoxidação de Cu(II)/G₄ induzida por S(IV).

A atividade catalítica e o sinergismo positivo de Ni(II) (vide esquema I a seguir) é explicado pela oxidação mais rápida de Ni(II)/tetraglicina pelo oxigênio dissolvido em comparação à oxidação de Cu(II)/tetraglicina. O mecanismo proposto ^[104] envolve a formação dos complexos de Ni(III) e Cu(III)/tetraglicina e espécies fortemente oxidantes como SO₃^{•-}, SO₅^{•-}, SO₄^{•-}, HSO₅⁻ e OH[•]. Essas espécies podem participar em menor ou maior grau na lesão ao DNA em um processo de oxidorredução.

Esquema I [102,103,105]

Mecanismo da autoxidação de Cu(II)G₄ induzido por S(IV). Efeito sinérgico de um segundo íon metálico $M(II)/G_4$. ^[102,103,105]

Inicio na ausência de M(II) adicionado (M(II) = Ni, Co ou Mn).

 $2Cu^{II}G_4 \longrightarrow Cu^{III}G_4 + Cu^{I}G_4 \qquad [2]$ $2Cu^{II}G_4 + O_2 + 4H^+ \longrightarrow 2Cu^{III}G_4 + 2H_20 \quad (\text{lento, referência 106}) \quad [3]$

Inicio na presença de M(II) adicionado

$$2M^{II}G_4 + O_2 + 2H^+ \longrightarrow 2M^{III}G_4 + H_2O_2$$
 (mais rápida que eq. 3) [4]

$$M^{III}G_4 + SO_3^{2-} \longrightarrow M^{II}G_4 + SO_3^{\bullet-}$$
[5]

$$Cu^{III}G_4 + SO_3^{2-} \longrightarrow Cu^{II}G_4 + SO_3^{\bullet-}$$
 [6]

Autocatalise

$$SO_3^{-\cdot} + O_2 \longrightarrow SO_5^{\bullet-}$$
 [7]

$$Cu^{II}G_4 + SO_5^{\bullet-} \longrightarrow Cu^{III}G_4 + SO_5^{2-}$$
 [8]

$$SO_5^{2^-} + H^+ \longrightarrow HSO_5^- pK = 9.4$$
 [9]

$$Cu^{II}G_4 + HSO_5^{-} \longrightarrow Cu^{III}G_4 + SO_4^{\bullet-} + OH^{-}$$
[10]

$$Cu^{II}G_4 + HSO_5^{-} \longrightarrow Cu^{III}G_4 + SO_4^{2-} + OH^{\bullet}$$
[11]

$$Cu^{II}G_4 + SO_4^{\bullet-} \longrightarrow Cu^{III}G_4 + SO_4^{2-}$$
 [12]

Mais detalhes ver referência 107.

Guanosina na presença de Ni(II) e Cu(II)/tetraglicina, oxigênio e S(IV) é oxidada. Estes estudos estão reportados no capitulo V.

A formação de Cu(III)/G₄ foi estudada variando-se alguns parâmetros como: influência da concentração de [S(IV)], natureza do tampão, acidez do meio e presença do ligante tetraglicina.



Figura 3. Efeito sinérgico de Ni(II) na autoxidação de Cu(II)/G₄ induzida por S(IV). [Cu(II)/G₄] = $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; [tampão borato] = 0,05 mol L⁻¹ (pH = 9,0); [S(IV)] = $5,0x10^{-5}$ mol L⁻¹; T = 25,0 °C. Soluções saturadas com ar. [Ni(II)]: (A). = Zero, (B). = $1,0x10^{-6}$, (C). = $3,0x10^{-6}$, (D). = $6,0x10^{-6}$, (E). = $1,0x10^{-5}$ e (F). = $2,0x10^{-5}$ mol L⁻¹. Branco: água.

Nos estudos relatados a seguir a solução de Cu(II)/G₄ sempre continha Ni(II) em baixas concentrações, presente como impureza do reagente Cu(ClO₄)₂ utilizado para preparar a solução do complexo de Cu(II).

a). Influência da concentração de S(IV)

A oxidação de Cu(II)/G₄ induzida por S(IV) em soluções saturadas com ar foi estudada acompanhando a formação do complexo de Cu(III)/G₄ por medidas de absorbância em 365 nm.

Na figura 4 pode ser observado uma etapa rápida com formação de Cu(III)/G₄ com participação do íon S(IV), em seguida observa-se um aumento lento de absorbância atribuído à reação espontânea de Cu(II)/G₄ com oxigênio (eqs. 13 e 14).

Observa-se também que a velocidade de formação de Cu(III) aumenta com a concentração de S(IV). A partir de 10000 segundos a absorbância diminui devido a decomposição do complexo de Cu(III).

Em meio neutro e básico (pH 6-8), a reação da decomposição é complexa devido a ocorrência de catálise pelos produtos da reação (eqs. 15-16) ^[111]. Tem sido proposto que em solução neutra (condição da figura 4) a forma predominante de complexo de Cu(II) ($[Cu^{II}(H_{-2}G_4)]^-$), catalisa a decomposição de $[Cu^{III}(H_{-3}G_4)]^-$ para formar $[Cu^{III}(H_{-2}G_4)]$, $[Cu^{II}(H_{-3}G_4)]^{2-}$ e outros produtos de decomposição do ligante (eqs. 15-16) ^[111].



Figura 4. Variação da absorbância em 365 nm em função do tempo após adição de [S(IV)] à solução do complexo Cu(II)/G₄. [Cu(II)/G₄] = $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; [Ni(II)] = $1,0x10^{-5}$ mol L⁻¹; pH = 7,0; Soluções saturadas com ar. (T = 25,0 °C). Branco: água.

[S(IV)]: _____ = 0

$$---= 2,0 \times 10^{-5} \text{ mol } \text{L}^{-1}$$

$$---= 4,0 \times 10^{-5} \text{ mol } \text{L}^{-1}$$

$$---= 6,0 \times 10^{-5} \text{ mol } \text{L}^{-1}$$

$$---= 8,0 \times 10^{-5} \text{ mol } \text{L}^{-1}$$

$$---= 10.0 \times 10^{-5} \text{ mol } \text{L}^{-1}$$

$$4[Cu^{II}(H_{-2}G_4)]^{2-} + O_2 + 4H^+ \longrightarrow 4[Cu^{III}(H_{-3}G_4)]^- + 2H_2O$$
[13]

$$2[Cu^{II}(H_{-2}G_4)]^- + O_2 \longrightarrow 2[Cu^{III}(H_{-3}G_4)]^- + H_2O_2$$
[14]

$$[Cu^{III}(H_{-3}G_4)]^- + [Cu^{II}(H_{-2}G_4)]^- \longrightarrow [Cu^{II}(H_{-3}G_4)]^{2-} + [Cu^{III}(H_{-2}G_4)]$$
[15]

$$[Cu^{III}(H_{-2}G_4)] \longrightarrow \text{produtos redox}$$
 [16]

Outros estudos realizados em tampão borato ^[96], em pH = 9,0 mostraram que após a mistura de Cu(II)/G₄ (contendo Ni(II)) com S(IV), a reação é muito mais rápida, ê após 1 s já há indicio da formação de Cu(III) como observado nas figuras 3 e 5. Essa formação de Cu(III)/G₄ é muito rápida na presença de S(IV) e Ni(II), com um período de indução, indicando um processo de autocatálise (isto é a formação de um produto, no caso Cu(III), que catalisa a reação).

A formação de Cu(III)/G₄ também é significativamente mais rápida com o aumento da concentração de S(IV) com diminuição do período de indução como se observa na figura 5. Períodos de indução similares e processo autocatalítico tem sido reportados na autoxidação de Ni(II)/G₄ ^[108], Ni(II)/(cyclam) ^[108,109], Co(II)/N₃^{- [103,107]} e Mn(II)/N₃^{- [110]} induzida por S(IV). Observa-se também que a absorbância aumenta proporcionalmente com a concentração de S(IV) adicionado.



Figura 5. Efeito de S(IV) na autoxidação de Cu(II)/G₄ induzida por S(IV).

 $[Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}; [Ni(II)] = 1,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1}; [tampão borato] = 0,05 \text{ mol } L^{-1} (pH = 9,0);$ T = 25,0 °C. Soluções saturadas com ar. [S(IV)]: **(A)**. Zero, **(B)**. 2,0x10⁻⁵ mol L^{-1} , **(C)**. 4,0x10⁻⁵ mol L^{-1} , **(D)**. 6,0x10⁻⁵ mol L^{-1} , **(E)**. 8,0x10⁻⁵ mol L^{-1} e **(F)**. 10,0x10⁻⁵ mol L^{-1} . Branco: água ^[96]. A queda da absorbância, logo após a etapa de rápida formação de Cu(III), é atribuída a decomposição de Cu(III)/G₄, podendo envolver a oxidação do ligante ^[111].

b). Influência da natureza do tampão.

Inicialmente optou-se por fazer estudos em meio de pH, próximos as condições fisiológicas. Para comparação, foram realizados estudos em meio de pH = 7,0 não tamponado e ajustado com soluções de NaOH, de tampões $H_2PO_4^{-}/HPO_4^{2-}$, H_2CO_3/HCO_3^{-} e de $H_3BO_3/H_2BO_3^{-}$.

Os tampões fosfato (H₃PO₄, pK₁=2,12; pK₂ = 7,21; pK₃=12,30) e carbonato (H₂CO₃, pK₁ = 6,37; pK₂ = 10,33) possuem boa capacidade tamponante no pH = 7,0 mas o tampão borato (H₃BO₃, pK = 9,24) não. A figura 6 revela que a formação de Cu(III)/G₄ é mais favorecida no meio borato que no tampão carbonato, já no tampão fosfato o estudo não pode ser feito devido à formação de um precipitado provavelmente Cu₃(PO₄)₂.

Os dados obtidos em meio borato são comparáveis a aqueles obtidos em solução aquosa não tamponada, na qual a acidez do meio foi ajustada em pH = 7,0 com solução de NaOH. No entanto em meio de carbonato observa-se diferença apreciável tanto na etapa rápida quanto na etapa lenta da reação (comparar as figuras 6A e 6B).



Figura 6. Variação da absorbância com o tempo após adição de $[SO_3^{2^-}] = 5,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1}$ à solução do complexo Cu(II)/G₄ no pH 7 em meio contendo: **(A).** borato; **(B).** carbonato. [Cu(II)G₄] = 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ ; tampões = 0,05 mol L⁻¹. Soluções saturadas com ar. (T = 25,0° C). Branco: água.

O ânion do tampão (CO_3^{2-} , PO_4^{3-} ou $H_2BO_3^{-}$) influência na concentração de Cu(III) formado, o que pode ser explicado pelo deslocamento da tetraglicina coordenada ao Cu(II) ou Cu(III) pelo anion. Sendo que essa velocidade de troca é muito pequena para o íon $H_2BO_3^{-}$ ^[112].

c). Influência da acidez do meio.

A geração de Cu(III)/G₄ pela reação de oxidação dos respectivos complexos de Cu(II), induzida por S(IV), apresenta uma dependência complexa do pH. Inicialmente ocorre uma etapa muito rápida com formação de Cu(III), em alguns casos seguido por aumento lento da absorbância e posterior decomposição.

A dependência do pH deve-se à presença das espécies $[Cu^{II}(H_{-x}G_4)]^{(1-x)}$ como resultado do grau variável de protonação dos complexos $Cu(II)/G_4$. Na equação 17 é apresentado o equilíbrio de protonação onde estão representadas todas as espécies possíveis de serem formadas em meio de acidez diferente ^[113].

$$\begin{array}{rcl} 2[Cu^{II}(H_{-3}G_4)]^{2^{-}} &+& SO_3^{2^{-}} &+& O_2 &+& H_2O & \underline{\quad \ \ Cu^{(III)}} \\ & & \uparrow \downarrow \ \ +H & & 2[Cu^{III}(H_{-3}G_4)]^{-} &+& SO_4^{2^{-}} &+& 2OH^{-} & [17] \\ & & [Cu^{II}(H_{-2}G_4)]^{-} \\ & & \uparrow \downarrow \ \ +H^{+} & & \\ & & [Cu^{II}(H_{-1}G_4)] & \stackrel{+}{\rightleftharpoons} & [Cu^{II}(G_4)]^{+} & \stackrel{+}{\rightleftharpoons} & Cu^{2+} &+& HG_4 \end{array}$$

A tabela 1 apresenta os valores de pK das espécies predominantes em meios de acidez diferente.

A acidez do meio é um parâmetro muito importante, uma vez que várias espécies de Cu(II)/G₄ (figura 7a) estão envolvidas, as quais apresentam reatividade diferente com a variação do pH. Assim, a geração de Cu(III)/G₄, pela reação de autoxidação de Cu(II)/G₄ induzida por S(IV), apresentou dependência com o pH. Outra consideração a fazer com relação à acidez do meio é o deslocamento do equilíbrio HSO_3^{-7}/SO_3^{2-} (pK₂ = 7,2). Com a diminuição da acidez do meio há um aumento da concentração da espécie SO_3^{2-} (figura 7b), o qual, como já verificado em estudos prévios ^[101], reage mais rapidamente.

A figura 8 mostra as mudanças de absorbância em 365 nm em meios de valores diferentes de pH, logo após a adição de S(IV). Inicialmente ocorre uma etapa muito rápida com formação de Cu(III)G₄, apresentando períodos de indução cada vez mais curtos conforme o pH aumenta. A eficiência da geração de Cu(III) também é significativamente maior com o aumento do pH.

Foram realizados estudos empregando-se os ligantes tetraglicina (G₄), pentaglicina (G₅) e hexaglicina (G₆) em meio de pH = 7,0 ajustado com NaOH, tampão $H_2PO_4^{-}/HPO_4^{-}$, H_2CO_3/HCO_3^{-} e $H_3BO_3/H_2BO_3^{-}$ (pH = 7 ajustado com HClO₄). **Tabela 1**. Propriedades dos complexos de $Cu(II)/Cu(III)/G_4^{[114, 115]}$.

Complexo de Cu(II)/Cu(III)/G₄	E° vs E.N.H. (V) ^{a[114]}	ε ₃₆₅ (mol⁻¹ L cm⁻¹) ^[114] Cu(III)/G₄	pK^ь Cu ^{ll} (H₋₁G₄) ^[116]	pK ⁰ [Cu ^{ll} (H₋₂G₄)] [−]	pK ^d [Cu ^{III} (H ₋₃ G₄)] ^{−[117]}
	0,631	7120 ± 200	6,8	9,14 ^[116]	12,1 ± 0,2

^a Valores de E^o para $[Cu^{III}(H_{-3}G_4)]^- + e^- \longrightarrow [Cu^{II}(H_{-3}G_4)]^{2-}$, obtido por voltametria cíclica usando eletrodo de pasta de carbono.

^{b, c} Constantes de ionização para a perda do segundo e terceiro hidrogênios peptídicos respectivamente.

^d Constante de ionização para a perda do hidrogênio da amina coordenada ao cobre(III).



Figura 7. **(a)** Diagrama de distribuição das espécies complexas de $Cu(II)/G_4$ referente ao equilíbrio ácido-base do ligante. **(b)** Diagrama de distribuição das espécies de S(IV). Curvas obtidas com constantes da literatura (tabela 1).



Figura 8. Efeito da acidez do meio na autoxidação de Cu(II)/G₄ induzida por S(IV) em (A). pH = 7,0; (B). pH = 8,0 e (C). pH = 9,0. $[Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}; [Ni(II)] = 1,0x10^{-6} \text{ mol } L^{-1}; [H_3BO_3/H_2BO_3^-] = 0,05 \text{ mol } L^{-1}; [S(IV)] = 5,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1}; T = 25,0 \text{ °C}.$ Soluções saturadas com ar. Branco: água.

Neste meio de acidez observou-se que o maior sinal de absorbância foi obtido empregando a pentaglicina mostrando uma eficiência maior na formação do complexo peptídico de Cu(III) (figura 9n). Nestas mesmas condições foi observado também, que a decomposição de Cu(III)/G₄ não é, tão acentuada mostrando um ligeiro patamar após ter atingido a absorbância máxima. No caso da hexaglicina o resultado melhor encontrado é com o tampão fosfato (figura 9p). Observa-se também que a decomposição deste complexo é mais pronunciada.

A partir dos resultados até aqui obtidos optou-se por trabalhar em pH = 7,0 na ausência de tampão, para geração do complexo Cu(III)/G₄.

II.3.3 Estudos na presença de DNA

II.3.3.1Características espectrais da solução de DNA.

O DNA empregado apresenta um máximo de absorção em 260 nm (ε = 6600 mol⁻¹ L cm⁻¹)^[100] (figura 10). A concentração utilizada nos testes de eletroforese em gel de agarose (descrito no capítulo IV) foi 1,0x10⁻⁵ g mL⁻¹ de DNA (figura 10A). Nesta concentração a absorbância da solução de DNA é muito pequena, portanto nos estudos espectrofotométricos optou-se por trabalhar com uma concentração maior (3,4x10⁻⁵ g mL⁻¹, figura 10B) de modo que as interações do complexo de Cu(II)/Cu(III)/G₄ e S(IV) com o DNA fossem observadas mais facilmente.



Figura 9. Variação da absorbância com o tempo após adição de $[S(IV)] = 5,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1}$ à solução do complexo (m). = $[Cu(II)/G_4]$; (n). = $[Cu(II)/G_5]$ e (p). = $[Cu(II)/G_6]$ no pH 7,0 em: (A). borato; (B). carbonato; (C). fosfato. $[Cu(II)/G_n] = 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$; $[tampão] = 0,05 \text{ mol } L^{-1}$. Soluções saturadas com ar e contendo $[Ni] = 1,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1}$. (T = 25,0° C). Branco: água.



Figura 10. Espectro da solução de DNA (Calf Thymus). **(A).** [DNA] = $1,0x10^{-5}$ g mL⁻¹; **(B).** [DNA] = $3,4x10^{-5}$ g mL⁻¹. Branco: água.

II.3.3.2Estudos espectrofotométricos da interação de DNA com Cu(II), Cu(II)/G₄ e S(IV).

A reação de oxidação de Cu(II)/G₄ por oxigênio acelerada por S(IV) produz Cu(III) (acompanhado espectrofotometricamente) e possivelmente os radicais $SO_3^{\bullet-}$, $SO_4^{\bullet-}$, $SO_5^{\bullet-}$, HSO_5^{-} e OH[•]. Estas espécies podem reagir com o DNA em um processo de oxidorredução.

Os ensaios a seguir foram conduzidos de maneira a buscar evidências, por meio de medidas espectrofotométricas, da reação com o DNA.

- DNA e Cu(II) (não complexado com G₄)
- DNA e S(IV)
- DNA, Cu(II) (não complexado com G₄) e S(IV)
- DNA e Cu(III)/G₄
- DNA, Cu(II)/G₄ e S(IV)

Assim, foram investigadas a ocorrência ou não de variações espectrais na banda com máximo de absorção em 260 nm (DNA e Cu(III)/G₄) e em 365 nm (Cu(III)/G₄).

Como em λ < 320 nm, Cu(II)/G₄ e Cu(III)/G₄ também absorvem, nos experimentos nos quais houve interesse em observar variações da banda 260 nm (DNA), foi empregada como solução de referência ("branco") a solução de Cu(II)/G₄ (pH = 7, solução A).

a). Estudo da variação da absorbância em 260 nm (DNA) em função do tempo na presença de Cu(II) e S(IV).

O acompanhamento da absorbância em 260 nm (pico máximo de DNA) de uma solução de DNA 3,4x10⁻⁵ g mL⁻¹ em função do tempo (6 horas) revelou que o sinal permanece estável por 20000 s (figura 11).

Na presença de S(IV) também não foi observada variação na absorbância do DNA, embora exista na literatura informação que confirma uma reação de deaminação por parte do S(IV) após 4 horas^[118,119].

Na presença de Cu(II) não complexado foi observado um aumento de absorbância (hipercromismo), logo após 600 segundos. Este fato interessante mostra que existe uma interação entre DNA e Cu(II) com uma possível formação de um complexo estável (Cu(II)/DNA) ao longo do tempo estudado.



Figura 11. Variação da absorbância em 260 nm em função do tempo após adição de [S(IV)] e Cu(II) à solução de DNA. Condições: [DNA] = $3,4x10^{-5}$ g mL⁻¹; [S(IV)] = $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; [Cu(II)] = $1,0x10^{-4}$ mol L^{-1;} [Ni(II)] = $1,0x10^{-7}$ mol L⁻¹. Soluções saturadas com ar. (T = 25,0 °C). Branco: água.

----= DNA----= DNA + S(IV)----= DNA + Cu(II)

Estes dados preliminares, nos levaram a efetuar investigações sobre as interações de Cu(II), Cu(III) e S(IV) com o DNA a partir de variações espectrais tanto na banda referente ao DNA (260 nm) como na banda de Cu(III)/ G_4 (365 nm).

Esses estudos estão apresentados a seguir.

b). Interação do DNA com Cu(II).

A interação do DNA com Cu(II) foi monitorada na presença e na ausência de S(IV) (figura 12) em pH 7,0. Comparando o espectro de absorção do DNA (figura 12) com o espectro obtido após a mistura do DNA e Cu(II) se observou um acréscimo na absorbância em 260 nm, evidenciando uma possível interação de DNA e Cu(II).

Na presença de S(IV) (adicionado após 10 minutos) à mistura DNA e Cu(II)) observou-se que o sinal de absorbância permaneceu invariável (figura 12). Essa observação nos levou a pensar em um estudo comparativo nas mesmas condições com Cu(II) complexado com tetraglicina e na presença de S(IV), apresentado a seguir.

c). Verificação da interação do DNA com Cu(III)/G₄. Acompanhamento da absorbância na banda de Cu(III)/G₄ (em 365 nm).

Como é possível ocorrer uma reação de oxidação do DNA por Cu(III)/G₄, estudos foram realizados adicionando-se a uma solução de Cu(II)/G₄ (pH = 7,0), após 5 horas de preparo, uma alíquota de solução de DNA.



Figura 12. Espectros das soluções de DNA antes e depois da adição de Cu(II) (ausência de tetraglicina) e S(IV).

------ = Espectro da solução de DNA.

--- = Espectro da solução obtido logo após adição de DNA à solução de Cu(II).

— • = Espectro obtido logo após adição de S(IV) à mistura DNA e Cu(II). A adição de S(IV) foi feita 10 minutos após a mistura entre DNA e Cu(II).

 $[DNA] = 3,4x10^{-5} \text{ g mL}^{-1}; [Cu(II)] = 1,0x10^{-4} \text{ mol } L^{-1} \text{ (contendo } [Ni(II)] = 1,0x10^{-7} \text{ mol } L^{-1} \text{) em}$ pH 7,0; $[S(IV)] = 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$. Branco: água. A solução de Cu(II)/G₄ (pH = 7,0) é oxidada lentamente pelo oxigênio dissolvido com formação de Cu(III)/G₄ (figura 13A).

O acompanhamento da formação de Cu(III)/G₄ com o tempo foi feito em 365 nm (figura 2C). Após decorrido 5 horas da oxidação espontânea de Cu(II)/tetraglicina; formou-se quantidade considerável de Cu(III)/G₄ (figura 13A). Quando DNA foi adicionado observou-se um decréscimo pequeno na absorbância (hipocromismo) em 365 nm (figura 13B), indicando que parte de Cu(III)/G₄ foi consumido.

Como a diminuição da concentração de Cu(III)/G₄ foi pequena a ocorrência da interação com o DNA, não pôde ser conclusiva a partir destes experimentos.

Portanto, optou-se pelo monitoramento do espectro na banda do DNA (260 nm) apresentado a seguir.

d). Verificação da interação do DNA com Cu(III)/G₄. Acompanhamento na banda do DNA (λ = 260 nm).

Neste caso também a finalidade foi verificar a interação do DNA com Cu(III)/G₄ gerado a partir da autoxidação de Cu(II)/G₄ em pH 7,0 após 5 horas com o monitoramento na banda do DNA.



Figura 13. (A). Espectro da solução de Cu(II)/ G_4 , contendo Cu(III)/ G_4 gerado após 5 horas (na ausência de S(IV)).

(B). Após adição de DNA à solução anterior (A).

 $[Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}; pH = 7,0. [DNA] = 3,4x10^{-5} \text{ g m}L^{-1}.$ Branco: água.

Na figura 14A observa-se que após a adição de DNA à solução contendo Cu(III) foi observada um decréscimo considerável da absorbância em 260 nm.

Na região de 260 nm absorvem DNA (figura 10), $Cu(III)/G_4$ (figura 15c) e $Cu(II)/G_4$ (figura 15b). Cabe ressaltar a importância do emprego como "branco" da solução de $Cu(II)/G_4$ após 5 horas de preparo, branco utilizado para eliminar a contribuição de $Cu(II)/G_4$ e $Cu(III)/G_4$ no valor da absorbância.

Assim a variação da absorbância indica uma variação na concentração do DNA devido à reação com Cu(III)/G₄, com evidência de lesão ao DNA quando misturado com o complexo (figura 14B).

Dando continuidade a estes estudos foi feito a verificação da interação de DNA com os radicais livres e Cu(III)/G₄ gerados a partir da autoxidação de S(IV) na presença de complexos de Cu(II)/tetraglicina no meio da acidez fixada, apresentados a seguir.

II.3.3.3Estudos espectrofotométricos da interação de DNA com Cu(II)/G₄, Cu(III)/G₄ e radicais de óxidos de enxôfre.

Os testes apresentados neste item avaliam a interação de DNA com Cu(II)/G₄, Cu(III)/G₄ e radicais de óxidos de enxofre nos estágios iniciais da reação mediante o uso da técnica de espectrofotometria acompanhando-se os instantes iniciais após a mistura dos reagentes.



Figura 14. (A). Espectro de DNA registrado em relação a um branco de Cu(II)/G₄. Condições: $[DNA] = 3,4x10^{-5} \text{ g mL}^{-1}; [Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-3} \text{ mol L}^{-1}.$

(B). Espectro obtido após adição de Cu(III)/G₄ formado à solução de DNA em **(A).** Cu(III)/G₄ gerado na ausência de S(IV) a partir de $[Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ após 5 horas de autoxidação em pH 7,0. Branco: solução de Cu(II)/G₄ 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ contendo Cu(III)/G₄ (após 5 horas de preparo, figura 2C).



Figura 15. Espectro de absorção de **(a).** $[G_4] = 0,25x10^{-5} \text{ mol } L^{-1}$; **(b).** $[Cu^{II}(H_{-3}G_4)]^{2^-} = 2,5x10^{-4}$ mol L⁻¹; e **(c).** após a adição de S(IV) = 1,0x10^{-4} mol L⁻¹ à solução **(b)**; tampão borato 0,01 mol L⁻¹; pH = 9,2. Solução saturada com ar. (T = 25,0° C).
A fim de estabelecer a interação de Cu(II)/tetraglicina com o DNA foram feitos estudos em meios de acidez diferentes, investigando-se as variações espectrais na banda com máximo de absorção em 260 nm (DNA, Cu(II)/G₄ e Cu(III)/G₄) e em 365 nm (Cu(III)/G₄). Como em λ < 320 nm, Cu(II)/G₄ também absorve, nos experimentos em que houve interesse de observar variações na banda, em torno de 260 nm (DNA), foi empregado como "branco" a solução de Cu(II)/G₄ (solução de referência, solução A).

A. Verificação da interação do DNA com Cu(II)/Cu(III)/G₄ em meio de pH = 7,0

Acompanhamento na banda de absorção de Cu(III)/G₄ (λ = 365 nm)

A figura 16 mostra a variação da absorbância em 365 nm como resultado da formação de Cu(III)/G₄ variando-se a ordem de adição dos reagentes. Na ausência de DNA (figura 16A), após a mistura de Cu(II)/G₄ com S(IV), observa-se a formação relativamente rápida de Cu(III). No entanto, na presença de DNA, as figuras 16B e 16C mostram que a formação de Cu(III)/G₄ é mais lenta e menor. A menor formação de Cu(III) pode ser provavelmente atribuída ao consumo parcial de Cu(III) e radicais gerados na lesão ao DNA. Desta maneira verifica-se que há uma interação entre o DNA e o complexo de Cu(II)/G₄, Cu(III)/G₄ e/ou os radicais livres de óxidos de enxôfre.

Acompanhamento da banda de absorção do DNA (λ = 260 nm)



Figura 16. Variação da absorbância em função do tempo após adição de **(A)**. S(IV) à solução de Cu(II)/G₄, **(B)**. S(IV) à solução de Cu(II)/G₄/DNA e **(C)**. S(IV)/DNA à solução de Cu(II)/G₄. Condições: $[Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$; $[Ni(II)] = 1,0x10^{-6} \text{ mol } L^{-1}$; pH = 7,0; $[S(IV)] = 5,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1}$; $[DNA] = 3,4x10^{-5} \text{ g mL}^{-1}$; T = 25,0 °C. Soluções saturadas com ar. Branco: água.

Acompanhando-se a variação espectral do DNA, em 260 nm, foi verificado que a ordem de mistura dos reagentes é um fator importante na interação dos produtos com essa biomolécula como será mostrado a seguir.

Na figura 17B observa-se que, após a adição de S(IV) a uma solução contendo Cu(II)/G₄ e DNA, a absorbância inicial é menor quando comparada ao valor de absorbância do DNA isolado (figura 17A). Além disso, a absorbância inicial continuou diminuindo ligeiramente até 10 s, após esse período de indução houve aumento de absorbância devido a formação de Cu(III)/G₄. Estas observações indicam claramente que durante o tempo em que Cu(II)/G₄ e DNA permaneceram em contato (antes da adição de S(IV)) houve uma interação entre essas duas espécies com possível formação de um complexo misto (Cu(II)/G₄/DNA). A pequena queda da absorbância até 10 s (figura 17B) pode ser uma evidência de que o DNA interage com Cu(III) e/ou radicais livres (SO₃^{•-}, SO₄^{•-}, SO₅^{•-}, OH[•] e HSO₅⁻⁻) que se formaram ao adicionar S(IV) à solução. O posterior aumento da absorbância na figura 17B é devido à contínua formação de Cu(III)/G₄, que também absorve em 260 nm. Qualquer interação com o DNA não pode ser avaliada precisamente por medidas de absorbância nesse comprimento de onda, no qual DNA e Cu(III)/G₄ absorvem.

Quando uma mistura de S(IV)/DNA foi adicionada a uma solução contendo Cu(II)/G₄ (figura 17C) observou-se que a absorbância inicial foi relativamente maior que a apresentada pelo DNA isolado (figura 17A). Neste caso também foi observada uma diminuição pequena da absorbância até 10 s. Estes fatos podem evidenciar a provável



Figura 17. Variação da absorbância em função do tempo após adição de **(B)**. S(IV) à solução de Cu(II)/G₄/DNA e **(C)**. S(IV)/DNA à solução de Cu(II)/G₄. Condições: $[Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; $[Ni(II)] = 1,0x10^{-6}$ mol L⁻¹; pH = 7,0; $[S(IV)] = 5,0x10^{-5}$ mol L⁻¹; $[DNA] = 3,4x10^{-5}$ g mL⁻¹; T = 25,0 °C. Soluções saturadas com ar. Branco: Solução de Cu(II)/G₄. **(A)**. Variação da absorbância em função do tempo de uma solução contendo só DNA.

formação muito rápida de um complexo entre Cu(II)/G₄ e DNA. Em ambos os casos observou-se um período de indução de 10 segundos, sendo este um processo autocatalítico.

Nestes testes foi observado o deslocamento da banda espectral do DNA (após a mistura dos reagentes) para comprimentos de onda menores que 260 nm, possivelmente devido à interação do complexo de cobre (II) com o DNA como relatado na literatura em estudos de lesão ao DNA por complexos macrocíclicos de Cu(II)^[120,121].

A conclusão mais importante é que Cu(III)/G₄ coexiste com o DNA em solução. O ligante tetraglicina permite avaliar essa ocorrência, pois forma complexo estável com Cu(III) com picos de absorbância característicos.

B. Verificação da interação do DNA com Cu(II)/G₄ em pH = 9,0

Os testes apresentados neste item foram realizados em pH = 9,0, em meio de tampão borato (H₃BO₃/H₂BO₃⁻) e sem tampão (o pH neste caso foi ajustado com microlitros da solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹). Em meio de pH = 9,0 a geração de Cu(III)/G₄ é mais efetiva do que em pH = 7,0, conforme descrito no item II.3.2 (página 60).

Acompanhamento na banda de absorção de Cu(III)/G₄ (λ = 365 nm).

Em meio de tampão borato, ensaios experimentais mostraram que a

variação da absorbância em 365 nm, devido à formação de Cu(III)/G₄, é ligeiramente mais lenta quando S(IV) é adicionado à mistura Cu(II)/G₄/DNA. No entanto, após 20 s a concentração de Cu(III) formado foi a mesma nos dois casos, indicando que a ordem de adição dos reagentes não interfere na concentração de Cu(III).

Nos primeiros segundos da reação a formação de Cu(III)/G₄ parece não ter grande influência da presença do DNA em meio não tamponado (pH = 9,0) e as curvas de absorbância versus tempo foram muito parecidas. Portanto conclusões efetivas não puderam ser obtidas a partir destas observações. A análise das mudanças de absorbância em 260 nm foi mais conclusiva como se verá a seguir.

Acompanhamento na banda de absorção do DNA (λ = 260 nm)

As mudanças de absorbância em 260 nm, após a mistura de Cu(II)/G₄/DNA + S(IV) (figura 18B) ou Cu(II)/G₄ + S(IV)/DNA (figura 18C) em meio de tampão borato (pH = 9,0) mostraram que a absorbância inicial (valor aproximado 0,4) em 260 nm devido ao DNA foi a mesma, DNA isolado ou na presença dos complexos de Cu(II)/G₄.

A análise dos espectros durante o tempo em que as soluções foram monitoradas mostrou que não houve deslocamento da banda de absorção do DNA (figura 20a), não sendo possível a partir desses dados, concluir sobre alguma interação com o DNA. O aumento posterior da absorbância se deve somente a formação de Cu(III)/G₄, que também absorve em 260 nm (vide figura 15, página 89).



Figura 18. Variação da absorbância em função do tempo após adição de **(B)**. [S(IV)] à solução de Cu(II)/G₄/DNA e **(C)**. S(IV)/DNA à solução de Cu(II)/G₄. Condições: $[Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; $[Ni(II)] = 1,0x10^{-6}$ mol L⁻¹; $[H_3BO_3/H_2BO_3^{-1}] = 0,05$ mol L⁻¹ (pH = 9,0); $[S(IV)] = 5,0x10^{-5}$ mol L⁻¹; $[DNA] = 3,4x10^{-5}$ g mL⁻¹; T = 25,0 °C. Soluções saturadas com ar. Branco: solução de Cu(II)/G₄. **(A)**. Variação da absorbância em função do tempo de uma solução contendo só DNA.

Quando as mesmas ordens de mistura dos reagentes foram realizadas em meio não tamponado em pH = 9,0 (figura 19), foi observado um fato similar aquele observado na figura 17 (pH = 7,0). A absorbância inicial, após adição de S(IV) a uma solução contendo Cu(II)/G₄/DNA é menor que a apresentada pelo DNA isolado; fato que não ocorre quando o meio é tamponado com tampão borato. Isso pode ser atribuído ao deslocamento da banda do DNA (figura 20b) quando o experimento foi realizado em meio não tamponado. Neste mesmo pH = 9,0 e na ausência de tampão foi observado que com a adição de S(IV)/DNA à solução de Cu(II)/G₄ houve um valor maior da absorbância que aquela observada em estudos de pH = 7,0.

Continuando com o estudo da ordem de mistura dos reagentes. Efetuou-se a mistura DNA + Cu(II)/G₄, e após 10 minutos foi adicionado S(IV). Imediatamente após o espectro (figura 21C) foi registrado. Observa-se nesse caso que a reação envolvendo a formação de radicais livres ($SO_3^{\bullet,}$, $SO_4^{\bullet,}$, $SO_5^{\bullet,}$, HSO_5^{-} e OH[•]) e Cu(III)G₄ ocorre imediatamente (100 s) após a adição de S(IV), os quais reagem com DNA o que pode ser observado pelo maior decréscimo de absorbância em 260 nm.

Um detalhe interessante que foi apurado na literatura, e também foi observado na figura 21, é o deslocamento da banda espectral do DNA (em todos os casos após a mistura), devido à interação do complexo peptídico de cobre (II) com o DNA, provocando um efeito batocromico (deslocamento da banda espectral para comprimentos de ondas maiores) o que indica que existe uma interação efetiva entre Cu(II)/G₄ e o DNA^[120,121].



Figura 19. Variação da absorbância em função do tempo após adição de **(B).** [S(IV)] à solução de Cu(II)/G₄/DNA e **(C).** S(IV)/DNA à solução de Cu(II)/G₄. Condições: $[Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; $[Ni(II)] = 1,0x10^{-6}$ mol L⁻¹; pH = 9,0 (meio não tamponado); $[S(IV)] = 5,0x10^{-5}$ mol L⁻¹; $[DNA] = 3,4x10^{-5}$ g mL⁻¹; T = 25,0 °C. Soluções saturadas com ar. Branco: Cu(II)/G₄. **(A).** Variação da absorbância em função do tempo de uma solução contendo só DNA.







Figura 20. Espectros obtidos após adição de [S(IV)] à solução de Cu(II)/G₄/DNA em **(a)**. Meio de tampão borato 0,05 mol L⁻¹ (pH = 9,0) e **(b)**. Em meio não tamponado (pH = 9,0). Condições: $[Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}; [Ni(II)] = 1,0x10^{-6} \text{ mol } L^{-1}; [S(IV)] = 5,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1}; [DNA] = 3,4x10^{-5} \text{ g mL}^{-1}; T = 25,0 °C$. Soluções saturadas com ar. Branco: solução de Cu(II)/G₄. **A**, **A**': espectro obtido logo após adição de S(IV) à solução de Cu(II)/G₄/DNA; **B**, **B**': espectro obtido após 20 s da adição de S(IV) à solução de Cu(II)/G₄/DNA.



Figura 21. Verificação da variação espectral em função da ordem de adição dos reagentes.
(A). Espectro da solução de DNA. (B). Espectro obtido após adição de DNA à mistura Cu(II)/G₄ + S(IV) (após 10 minutos da mistura). (C). Espectro obtido após adição de S(IV) à mistura Cu(II)/G₄ + DNA (após 10 minutos da mistura).

 $[DNA] = 3,4x10^{-5} \text{ g mL}^{-1}; [Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ no pH 7}; [S(IV)] = 5,0x10^{-5} \text{ mol L}^{-1}.$ Branco: $[Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-3} \text{ mol L}^{-1}.$

Este efeito não acontece com o íon metálico livre (ausência de G₄) (figura 12, página 84) como foi visto anteriormente, no entanto na presença de tetraglicina foi detectado um aumento na absorção máxima do DNA, o que indicou que houve uma interação com o íon metálico.

Na apreciação de variações espectrais dependendo da acidez do meio, é importante considerar o equilíbrio ácido-base de $[Cu^{II}(H_{-2}G_4)]^{-/}[Cu^{II}(H_{-3}G_4)]^{2-}$ (pK₃ = 9,1, ver figura 7, página 75), uma vez que essas duas espécies apresentam reatividade diferente. Os potenciais de redução das espécies $[Cu^{III}(H_{-2}G_4)]$ e $[Cu^{III}(H_{-3}G_4)]^{-}$ são 1,1 V ^[122] e 0,66 V ^[114] (vs E.N.H.) respectivamente.

Na presença de S(IV) e oxigênio, a espécie $[Cu^{II}(H_{-3}G_4)]^{2-}$ é mais reativa gerando $[Cu^{III}(H_{-3}G_4)]^{-}$ e radicais livres devido a seu potencial de redução mais baixo, sendo que a eficiência da reação aumenta com o pH do meio ^[96]. Durante a reação de oxidação de $[Cu^{II}(H_{-3}G_4)]^{2-}$ (na presença de oxigênio e S(IV)) são produzidos radicais de enxofre, fortes oxidantes, que permitem também a oxidação da espécie $[Cu^{II}(H_{-2}G_4)]^{-}$.

Comparando-se os potencias de redução das espécies de Cu(II), conclui-se que $[Cu^{III}(H_{-2}G_4)]$ (E^o cu^{III}(H₋₂G₄)/Cu^{II} = 1,1 V vs E.N.H.) e os radicais livres formados poderiam oxidar a biomolécula de DNA, pela base mais facilmente oxidável, a guanina (E^o = 1,29 V vs E.N.H.)^[123].

Entretanto, outros estudos encontrados na literatura revelaram que a guanina pode apresentar potencial de redução menor quando se encontra como parte da estrutura do DNA devido a fatores estéricos ^[123]. Estudos usando a técnica de eletroforese em gel de agarose confirmam esta hipótese como será abordado no capítulo IV.

Estas especulações concordam com as observações em meio de pH = 7,0 e 9,0 (não tamponado). Em pH = 7,0 onde Cu(II)/G₄ está presente em aproximadamente 60% como [Cu^{II}(H₋₂G₄)]⁻ (figura 7a), observou-se uma interação com o DNA na forma de uma pequena queda da absorbância do DNA (nos primeiros 10 s) quando S(IV) foi adicionado à mistura de Cu(II)/G₄/DNA (figura 17B) ou S(IV)/DNA foi adicionada à solução de Cu(II)/G₄ (figura 17C). No entanto, a interação com o DNA é maior quando a reação ocorre em meio não tamponado de pH = 9 (figura 19); nesta condição pode haver um aumento da acidez do meio deslocando o equilíbrio ácido-base das espécies $[Cu^{II}(H_{-2}G_4)]^{-}[Cu^{II}(H_{-3}G_4)]^{2-}$ para a predominância da espécie $[Cu^{II}(H_{-2}G_4)]^{-}$ (ver figura 7) a qual é a espécie menos reativa.

A absorbância inicial em 260 nm (referente ao DNA) diminui em maior extensão nos dois tipos de ordem de mistura, principalmente quando solução contendo Cu(II)/G₄/DNA foi adicionada à solução de S(IV) (comparar figuras 17B e 19B).

II.4 CONCLUSÕES

Os estudos espectrofotométricos que foram realizados para acompanhar a formação de Cu(III) (λ = 365 nm), em um período curto de tempo, logo após a mistura

da solução de Cu(II)/G₄ com S(IV) permitiram obter algumas conclusões. Desta maneira as figuras 22A e 22B mostraram que a formação de Cu(III)/G₄ é mais rápida e mais eficiente em pH = 9,0 (meio de borato) que no pH = 7,0. As mesmas experiências, a pH = 9,0 e pH = 7,0 (na presença e ausência de tampão) foram repetidas na presença de DNA (figuras 22C, 22D e 22E). Em pH = 7,0 e na presença de DNA a formação de Cu(III) é mais lenta (figura 22C), também em pH = 9,0, mostrando que o tampão borato (figura 22E) pode ter alguma influência já que a reação é mais lenta que em meio não tamponado (figura 22D).

As variações na absorbância em 260 nm (soma de DNA e Cu(III)/G₄) seguiu o mesmo perfil com período de indução mais longo (aproximadamente 10 s) na presença de DNA (pH = 7,0) (comparar as figuras 22C e 23D). As figuras 23B e 23C referem-se a experimentos com ordem diferente de adição de reagentes, quando Cu(II)/G₄ é inicialmente misturado com DNA (figura 23B) o valor inicial da absorbância é menor mostrando um hipercromismo, isto não acontece em meio de tampão borato (figura 23C) mostrando que a possível interação de Cu(II)/G₄ com DNA, é menor em meio tamponado com borato.



Figura 22. Variação da absorbância a 365 nm após adição de SIV à solução de: **(A).** Cu(II)/G₄, $[H_3BO_3/H_2BO_3^{-1}] = 0,05 \text{ mol } L^{-1} (pH = 9,0);$ **(B).** Cu(II)/G₄ (medio não tamponado, pH = 7,0); **(C).** Cu(II)/G₄/DNA (meio não tamponado, pH = 7,0); **(D).** Cu(II)/G₄/DNA (meio não tamponado, pH = 9,0); **(E).** Cu(II)/G₄/DNA, $[H_3BO_3/H_2BO_3^{-1}] = 0,05 \text{ mol } L^{-1} (pH = 9,0).$ [Cu(II)/G₄] = 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹ Ni(II)); [S(IV)] = 5,0x10⁻⁵ mol L⁻¹; [DNA] = 3,4x10⁻⁵ g mL⁻¹; T = 25,0 °C. Branco para A, B e C: Cu(II)/G₄; Branco para D e E: H₂O.



Figura 23. Variação da absorbância a 260 nm após adição de **(B).** S(IV) à solução de Cu(II)/G₄/DNA, (meio não tamponado, pH = 9,0); **(C).** S(IV)/DNA à solução de Cu(II)/G₄, $[H_3BO_3/H_2BO_3^{-1}] = 0,05$ mol L⁻¹ (pH = 9,0); **(D).** S(IV)/DNA à solução de Cu(II)/G₄ (meio não tamponado, pH = 7,0). **(A).** Variação da absorbância a 260 nm da solução de DNA. [Cu(II)/G₄] = 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹ Ni(II)); [S(IV)] = 5,0x10⁻⁵ mol L⁻¹; [DNA] = 3,4x10⁻⁵ g mL⁻¹; T = 25,0 °C. Branco: Cu(II)/G₄.

II.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

96. ALIPÁZAGA, M. V.

"Autoxidação dos complexos de Cu(II), Ni(II) e Co(II)/tetraglicina induzida por S(IV)"; São Paulo (2003). [Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP].

97. HARRIS, G. M.; VAN ELDIK, R.

Kinetics and Mechanism of the Formation, Acid-Catalyzed Decomposition, and Intramolecular Redox Reaction of Oxygen-Bonded (Sulfito) Pentaamminecobalt(III) Ions in Aqueous-Solution. Inorg. Chem., 19, 880-886, 1980.

98. LAITINEN, H. A.

Chemical Analysis.

New York, Ed. Mc Graw Hill, 1960, p. 410.

99. SASSO, M. G.; QUINA, F.H. e BECHARA, E. J. H.

Ruthenium(II) Tris(Bipyridyl) Ion as a Luminescent Probe for Oxygen-Uptake.

Anal. Biochem., 156, 239-243, 1986.

100. WOLTMAN, S. J.; ALWARD, M. R. e WEBER, S. G.

Rotating Ring-Disk Electrode Study of Copper(II) Complexes of the Model Peptides Triglycine, Tetraglycine, and Pentaglycine. Anal. Chem., 67, 541-551, 1995.

101. ANAST, J. M. e MARGERUM, D. W.

Trivalent Copper Catalysis of the Autoxidation of Sulfite. Kinetics and the Mechanism of the Copper (III/II) Tetraglycine Reactions with Sulfite.

Inorg. Chem., 1981, 20, 2319-2326.

102. ALIPÁZAGA M. V. e COICHEV, N.

Synergistic Effect of Some Transition Metal Ions on the Sulfite Induced Autoxidation of Cu(II)/tetraglycine Complex. Analytical Applications.

Anal. Lett., 2003, 36, 2255-2275.

103. ALIPÁZAGA, M. V.; MORENO, R. G. M. e COICHEV, N.

Synergistic Effect of Ni(II) and Co(II) lons on the Sulfite-Induced Autoxidation of Cu(II)/tetraglycine.

Dalton Trans., 2004, 13, 2036-2040.

104. NEVES, E. A.; COICHEV, N.; GEBERT, J. e KLOCKOW, D.

Autoxidation of Cobalt(II) in Azide Containing Medium in Presence of Sulfur (IV) - an Interpretative Study.

Fresenius Z. Anal. Chem. 1989, 335, 386-389.

105. ALIPÁZAGA M. V.; LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. e COICHEV, N.

Sulfite Induced Autoxidation of Ni(II) and Co(II) tetraglycine Complexes. Spectrophotometric and Rotating Ring-Disk Voltammetric Studies.

Dalton Trans., 2004, 2, 267-272.

106. KURTZ, J. L.; BURCE, G. L. e MARGERUM, D. W.

Trivalent Copper Catalysis of the Autoxidation of Copper(II) Tetraglycine.

Inor. Chem., 17(9), 2454-2460, 1978.

107. COICHEV, N. e VAN ELDIK, R.

Kinetics and Mechanism of the Sulfite-induced Autoxidation of Cobalt(II) in Aqueous Azide Medium

Inorg. Chem., 1991, 30, 2375-2380.

108. PEZZA, H. R.; BONIFÁCIO, R. L. e COICHEV, N.

Oxidation of Ni(II)/cyclam and Tetraglycine Complexes by Dissolved Oxygen in the Presence of S(IV). Synergistic Effects on Mn(III) and Co(III).

J. Chem. Res-M. 1999, 1520-1540.

109. PEZZA, H. R. e COICHEV, N.

Kinetics and Mechanism of the Induced Redox Reaction of $[Ni(cyclam)]^{2+}$ Promoted by SO₅ Center.

J. Coord. Chem., 1999, 47, 107-119.

110. COICHEV, N. e VAN ELDIK, R.

A Mechanistic Study of the Sulfite-induced Autoxidation of Mn(II) in Aqueous Azide Medium.

Inorg. Chim. Acta, 1991, 185, 69-73.

111. RYBKA, J. S.; KURTZ. J. L.; NEUBECKER, T. A. e MARGERUM, D. W.

Reactions of Copper(III) Tetraglycine.

Inorg. Chem., 19, 2791-2796, 1980.

112. MARGERUM, D. W. e DUCKES, G. R.

Metal Íons in Biological Sistems. Vol. 1, Chapter 5. New York, Ed. Helmut Sigel (Marcel Dekker Inc.), 1964, p. 157.

113. MARGERUM, D. W.; CHELLAPA, K. L.; BOSSU, F. P. e BURCE, G. L.

Characterization of a Readily Accessible Copper(III)-Peptide Complex.

J. Am. Chem. Soc., 97(23), 6894-6896, 1975.

114. MARGERUM, D. W.; CHELLAPA, K. L. e BOSSU F. P.

Ligand Effects on the Thermodynamic Stabilization of Copper(III)-Peptide Complexes.

J. Am. Chem. Soc., 99(7), 2195-2202, 1977.

- 115. NEUBECKER, T. A.; KIRKSEY JR, S. T.; CHELLAPA, K. L. e MARGERUM, D.W.
 Amine Deprotonation in Copper(III)-Peptide Complexes.
 Inorg. Chem., 18(2), 444-448, 1979.
- SMITH, R. M. e MARTELL, A. E.
 NIST Critical Selected Stability Constants of Metal Complexes Database (version 3.0), 1997.
- 117. KIRKSEY Jr., S. T. e MARGERUM, D. W.

Oxidative decarboxylation of glyoxylate ion by a deprotonated-amine copper(III)peptide complex.

Inorg. Chem., 18(4), 966-970, 1979.

118. SHAPIRO, R.

Genetic Effects of Bisulfite (Sulfur-Dioxide).

Mutat. Res., 1977, 39(2), 149-175.

119. SHI, X. e MAO, Y.

8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA damage induced by sulfur trioxide anion radicals.

Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1994, 205(1), 141-147.

120. LIU, C.; ZHOU, J.; LI, Q.; WANG, L.; LIAO, Z. e XU, H.

DNA damage by copper(II) complexes: coordination-structural dependence of reactivities.

J. Inorg. Biochem., 1999, 75, 233-240.

121. LIU, J.; ZHANG, T.; LU, T.; QU, L.; ZHOU, H.; ZHANG, Q. e JI, L.

DNA-binding and cleavage studies of macrocyclic copper(II) complexes.

J. Inorg. Biochem. 2002, 91, 269.

122. LOWINSOHN, D.

"Estabilização de Cu(III) em meio contendo peptídeos: estudos eletroquímicos e aplicações analíticas"; São Paulo (2003). [Tese de Mestrado, Instituto de Química, USP].

123. BURROWS, C. J. e MULLER, J. G.

Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission.

Chem. Rev., 1998, 98, 1109-1151.

III. Uso de dicroísmo circular para o estudo da

interação de Cu(II)/tetraglicina com DNA

III.1 Introdução

Macromoléculas biológicas, tais como proteínas, carboidratos e ácidos nucléicos, são compostos de muitas unidades opticamente ativas que exibem sinal de dicroísmo circular. Moléculas opticamente ativas interagem com a radiação polarizada ocorrendo desvio da radiação circularmente polarizada incidente. A técnica de dicroísmo circular detecta essa alteração através da medida da diferença da absorção da radiação circularmente polarizada (à direita e à esquerda) após esta passar por uma amostra [124]

O dicroísmo circular (CD) é particularmente útil para o estudo de moléculas quirais, macromoléculas, sejam elas ou não de origem biológicos, tais como proteínas, carboidratos, dendrímeros e outros, compostos esses, que possuem unidades opticamente ativas, e apresentam sinal na espectroscopia de dicroismo circular.

O CD pode ser utilizado para detectar:

- Mudanças conformacionais de macromoléculas;
- Composição de misturas quirais;
- Interação dessas macromoléculas com outras moléculas menores, especialmente aquirais.

III.2 PARTE EXPERIMENTAL

Medições de dicroísmo circular foram realizados a temperatura ambiente usando um espectropolarímetro modelo JASCO J-720 e células de 0,5 cm de caminho óptico. As soluções dos complexos de Cu(II)/tetraglicina foram preparadas imediatamente antes do ensaio, em pH 7,0, como descrito no item II.1 (capítulo II, página 53).

A solução de CT - DNA foi preparada dissolvendo-se 0,0034 g de sal dissódico *Calf Thymus* DNA (Sigma) em 50 mL de H₂O deionizada. Esta solução foi estocada a 4 °C e usada no máximo após 4 dias de preparada. As concentrações das soluções de CT - DNA na ausência e presença de Cu(II)/G₄, logo após a mistura são apresentadas na legenda da figura 1. Os resultados foram apresentados como variação na absortividade molar ($\Delta \varepsilon$, mol dm⁻³ cm⁻¹) ^[125].

III.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o objetivo de verificar algumas mudanças na conformação molecular do CT - DNA na presença do complexo de Cu(II)/tetraglicina foram registrados os seguintes espectros (figura 1).

- 1. Solução contendo apenas CT DNA
- **2.** Cu(II) + CT DNA
- **3.** Cu(II)/G₄ + CT DNA

Como o complexo de Cu(II)/G₄ e DNA absorvem intensamente em 260 nm, para a obtenção dos espectros em solução contendo Cu(II)/G₄ + CT - DNA, a solução de referência empregada foi de Cu(II)/G₄ na mesma concentração (figura 1A e 1C). A figura 1 apresenta os espectros das três soluções ^[126]. A adição de Cu(II)/G₄ a uma solução contendo CT - DNA induziu uma mudança no espectro de dicroísmo circular (figura 1C). As intensidades da banda positiva do CT - DNA aumentou com um deslocamento para comprimentos de onda maiores, sendo que a banda negativa foi mais afetada que a positiva. Essas mudanças sugerem que alguma interação de Cu(II)/G₄ com CT - DNA, induz algum tipo de mudança estrutural na molécula de DNA.

Entretanto, a introdução de solução de Cu(II) como Cu(ClO₄)₂ (não complexado com G₄) induziu apenas uma mudança pequena no espectro (figura 1B).



Figura 1. Espectro CD UV. **A).** Solução de CT - DNA; **B).** Solução de CT - DNA + Cu(II); **C).** Solução de CT - DNA + Cu(II)/G₄. Meio não tamponado, pH = 7.0; $[Cu(II)/G_4] = 1.0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

(contendo 1,0 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ Ni(II)); [CT-DNA] = 3,4 x 10⁻⁶ g mL⁻¹; T = 25,0 °C. Solução de Referência para A e C: Cu(II)/G₄; Solução de Referência para B: H₂O.

III.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

124. ALISON R.

Circular dichroism and linear dichroism

- Oxford; New York : Oxford University Press, 1997
- 125. CZARNECKI J. J. e MARGERUM, D. W.
 Circular Dichroism of Copper and Nickel Tetra- and Pentapeptides Complexes.
 Inorg. Chem., 16, 1997-2003, 1997.
- 126. MORENO, R. G. M.; ALIPAZAGA, M. V.; MEDEIROS, M. H. G. e COICHEV, N.

DNA damage induced by sulfite autoxidation catalyzed by copper(II)/tetraglycine complexes.

Dalton Trans., 6, 1101-1107, 2005.

IV. Uso de eletroforese em gel de agarose para estudo da lesão no DNA

IV.1 Introdução

Eletroforese é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, em um campo elétrico ^[127]. Este é um método importante para a separação de moléculas biológicas pois usualmente não afeta a estrutura nativa e é altamente sensível a pequenas variações na carga e massa. As primeiras referências para separações por eletroforese apareceram no começo do século passado. Arne Tiselius foi o pioneiro a empregar essa técnica para purificação de biomoléculas por eletroforese ^[128].

O movimento da molécula num campo elétrico é uma função da carga q e o coeficiente de fricção f. A velocidade v de uma molécula cargada no campo elétrico é uma função da força do campo E, como mostra a equação 1^[128].

$$v = \frac{E q}{f}$$
[1]

A razão da velocidade pela força do campo é definida como mobilidade μ , e igual à carga (q) dividido pelo coeficiente de fricção (f), equação 2^[128].

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{f}$$
[2]

O coeficiente de fricção é uma medida da dimensão hidrodinâmica de uma molécula. Assim, aumentando o tamanho molecular aumenta o coeficiente de fricção.

As moléculas pequenas tais como aminoácidos, possuem formas esféricas em solução, e suas formas não são representativas pelo tamanho sem ter importância na definição do coeficiente de fricção. No entanto as moléculas grandes, tais como ácidos nucléicos e proteínas possuem formas distintas, e sua geometria pode variar amplamente. Assim, para essas moléculas é relevante o tamanho e a forma na definição do coeficiente de fricção. Portanto, a mobilidade de uma molécula é uma função do tamanho, forma e carga ^[127].

A maioria das moléculas grandes possuem grupos aniônicos e catiônicos como parte de sua estrutura. Uma vez que a constante de dissociação do ácido (k_a) desses grupos defere amplamente, a carga líquida em tais moléculas dependerá do pH, o que influenciará também na mobilidade da molécula. A força iônica determina o potencial electrocinético que reduz a carga líquida para a carga efetiva e tem sido encontrado que a mobilidade da partícula carregada é aproximadamente inversamente proporcional à raiz quadrada da força iônica. Assim, forças iônicas baixas e altas permitem velocidades altas e menores de separação, respectivamente. Na prática as zonas determinantes de separação são feitas com soluções tampões de força iônica baixo. Infelizmente, as forças iônicas altas dos tampões levam a condutividades superiores e portanto uma quantidade grande de calor é gerada. Incrementos de temperatura causam um aumento na velocidade de difusão dos íons e também um acréscimo na mobilidade iônica ao redor de 2-4 por cento por cada grau Celsius incrementado de temperatura. Ao mesmo tempo a viscosidade do meio diminui com os incrementos da temperatura. Assim, a resistência elétrica diminui e num potencial constante a corrente provocaria futuros incrementos de calor. A escolha da capacidade tamponante então pode ser visto como crucial desde que se saiba a quantidade de potencia elétrica que será aplicada ao sistema. Potencia elétrica alta aplicada tem como resultado um excessivo calor gerado que pode permitir uma velocidade não aceitável de evaporação do solvente desde o meio, e em sistemas de solução livre podem resultar em correntes de convecção e mistura de zonas separadas. Em alguns casos mais sensíveis o calor pode ainda desnaturar proteínas ou provocar a perda da atividade enzimática. Desta forma, potenciais baixos aplicados podem acabar com os problemas de aquecimento mas pode também permitir separações pobres como resultado do incremento da quantidade de difusão que acontece se o tempo de corrida é também longo^[129].

O aquecimento portanto causa variações na corrente e voltagem, e para minimizar essas flutuações é necessário levar a cabo a eletroforese com fontes de potência que possam ser reguladas para produzir uma corrente e voltagem constante. Portanto é claro que os resultados da eletroforese seriam os melhores se os experimentos fossem realizados à temperatura constante, e para isto poderiam ser utilizadas jaquetas ou em alguns casos ser realizadas em ambientes com temperaturas baixas^[129].

Os conceitos básicos da eletroforese são muito simples, mas o progresso da partícula carregada ou íon através do meio é influenciado por um número maior de fatores que aqueles mencionados anteriormente^[129].

Os géis de agarose são formados pela suspensão de agarose seco em tampão aquoso, aquecido até que a solução clara seja obtida, com o esfriamento da solução a temperatura ambiente. Agarose, a fração neutra do polissacarídeo, é composta de um polímero linear, com estrutura básica mostrada na figura 1^[128].

A concentração de agarose varia desde 0,5 a 8,0% w/v. O gel de agarose de trabalho tem tamanho de poros grandes, que são estabilizados pelas ligações de

hidrogênio. O tamanho do poro é controlado pela concentração inicial de agarose: tamanhos de poros grandes são formados a partir de concentrações baixas e tamanhos de poros pequenos são formados por concentrações altas. Os tamanhos do poro grande de géis de concentrações baixas fazem possível a separação de muitas moléculas grandes tais como DNA, lipoproteínas, imunoglobulinas e enzimas complexas ^[128].

IV.2 PARTE EXPERIMENTAL

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de pureza analítica (Merck, Aldrich e Sigma) e água deionizada pelo sistema Nanopure – Ultrapure Water System da Barnstead, 18 mol L⁻¹ Ω cm⁻¹.

IV.2.1 Procedimento de preparação do DNA plasmidial pUC19.

A. Competência bacteriana

a) Os meios de cultura empregados foram:

LB: 20 g LB (Lennox L Broth Base),1 litro de água bidestilada

SOB: 2% bactotriptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mmol L⁻¹ NaCl , 2,5 mmol L⁻¹

KCl, 10 mmol L⁻¹ MgCl₂, 10 mmol L⁻¹ MgSO₄, pH 6,8

SOC: meio SOB acrescido de 20 mmol L⁻¹ de glicose



A

B

Figura 1. Estrutura básica do polímero linear de agarose.

(A) D - galactose

(B) 3,6 - anhidro, L - galactose

Os meios de cultura foram esterilizados por autoclavagem a 121ºC por 15 min.

b) Soluções:

RFI: 30 mmol L⁻¹ acetato de potássio, 50 mmol L⁻¹ MnCl₂, 100 mmol L⁻¹ KCl, 10 mmol L⁻¹ CaCl₂. 2. H₂O, 15% glicerol, pH final 5,8 RFII: 10 mmol L⁻¹ Na-MOPS (pH 7,0), 75 mmol L⁻¹ CaCl₂, 10 mmol L⁻¹ KCl, 15% glicerol, pH final 6,8

Bactérias *E.coli*, cepa HB101, provenientes de estoque em glicerol a -80°C, foram estriadas em placa de Petri com meio LB contendo 15 g/l de ágar e incubadas a 37°C por 20 h. Em seguida uma colônia é inoculada em 2 mL de meio SOB, mantendose a cultura a 37°C por 2 h sob agitação constante de 200 rpm.

Alíquotas de 500 μ l da cultura foram inoculadas em 100 mL de meio SOB e incubadas novamente a 37°C sob agitação de 200 rpm até atingir uma densidade ótica (DO) entre 0,6 e 0,8 a um comprimento de onda de 600 nm. (±3 h). Em seguida foi adicionado 0,5 mL de MgCl₂ 1,0 mol L⁻¹, mantem-se as bactérias no gelo por 15 min e procede-se a centrifugação a 8570 g por 15 min a 4°C. O sobrenadante é descartado e o precipitado ressuspenso em 10,0 mL de solução RFI, mantendo-se os tubos no gelo por 15 min. A seguir, centrifuga-se novamente a 8570 g por 15 min a 4°C e o sobrenadante é novamente descartado.

As bactérias foram então ressuspensas em 2,0 mL da solução RFII (previamente mantida no gelo), distribuídas em alíquotas em microtubos resfriados rapidamente em nitrogênio líquido e estocadas a -80°C.

B. Transformação de bactérias competentes

As bactérias competentes foram descongeladas no gelo e distribuídas em alíquotas de 50,0 µL. A cada alíquota foi adicionado 5,0 ng de DNA plasmidial pUC19 (1,0 ng/µl) incubando-se as bactérias durante 30 min a 4°C. A seguir as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 37°C por exatamente 2 min. e transferidas imediatamente para o gelo. Após 5 min, foram adicionados 450 µl de meio SOC à cada alíquota, incubando-as a 37°C durante 1 h sob agitação constante de 200 rpm^[130].

Em seguida, as bactérias (200 μ L) foram colocadas em placas de Petri com meio LB contendo 15 g/L de ágar e 100 μ g/mL de ampicilina e incubadas pernoite a 37ºC.

C. Extração do DNA plasmidial pUC19

As bactérias foram transformadas com o plasmídio pUC19 que foram extraídos utilizando-se uma coluna de terra de diatomáceas como descrito a seguir, adaptado de Hansen^[131].

Bactérias E.coli HB101, transformadas com o plasmídio pUC19, foram crescidas em 3,0 mL de meio LB contendo 60 µg/mL de ampicilina por 16 horas a 37°C sob agitação constante de 200 rpm. As bactérias foram coletadas centrifugando-se a amostra por 2 min a 29300 g. A seguir ressuspende-se as bactérias em 500 µl de Tris-HCI 50,0 mmol L⁻¹, pH 8,0, contendo 10 mmol L⁻¹ de EDTA e 100 µg/mL de RNase A e adiciona-se 500 µl de uma solução contendo 0.2 mol L⁻¹ de NaOH / 1% de SDS misturando-se vagarosamente. A suspensão foi incubada a temperatura ambiente. Após 5 min, foram adicionados 500,0 μ L de acetato de sódio 4,0 mol L⁻¹, pH 4,8 e a amostra é centrifugada a temperatura ambiente por 10 min a 10509 g. O sobrenadante foi coletado e misturado com o mesmo volume de guanidina 6.0 mol L⁻¹. Essa mistura foi aplicada na coluna de terra de diatomáceas previamente preparada e submetida à pressão reduzida com o auxílio de uma bomba de vácuo para que o DNA se ligue à coluna. A seguir, a coluna foi lavada com 80% de isopropanol que foi posteriormente retirado, centrifugando-se a amostra a 17761 g, 4 min. Cingüenta microlitros de tampão Tris-HCl 10,0 mmol L⁻¹, pH 8,5 foi adicionado à coluna e após 10 min a temperatura ambiente, o DNA foi eluído da coluna centrifugando-se a 17761 g, 5 min. Esse último passo foi repetido mais 2 vezes utilizando-se volume de tampão de 25.0 µL.

a) Preparação da coluna de terra de diatomáceas

Primeiramente procede-se a lavagem da terra de diatomáceas. Cinqüenta miligramas de terra de diatomáceas foram ressuspendidos em 1,0 mL de água. Após 3 h, a água contendo a suspensão coloidal gelatinosa formada, foi cuidadosamente
descartada, deixando a terra sedimentada intacta. Tal procedimento foi repetido pelo menos três vezes.

A seguir, um microtubo de 0,65 mL com a extremidade furada serve de suporte para a coluna. Uma bolinha de vidro de cerca de 3 mm foi colocada no fundo do microtubo para impedir a saída abrupta da suspensão de terra de diatomáceas (600,0 μL). Com o auxílio de uma bomba de vácuo a pressão no fundo do microtubo foi reduzida, de modo que a fase líquida da suspensão de terra possa ser retirada do tubo e uma coluna de terra de diatomáceas foi formada no fundo do tubo. Sem que a coluna seque totalmente, foi aplicada a solução de guanidina misturada com o sobrenadante contendo DNA conforme descrito acima.

Alguns experimentos foram realizados com DNA plasmidial pUC19 adquirido da empresa Sinapse Biotecnology S. A.

IV.2.2 Soluções de Cu(II)/tetraglicina, Ni(II)/tetraglicina, Co(II)/tetraglicina e Mn(II)/tetraglicina em pH 7,0 ou 9,0 e soluções de S(IV)

A. Solução do complexo de Cu(II)/tetraglicina

Uma vez que o complexo de Cu(II)/tetraglicina é oxidado lentamente pelo oxigênio dissolvido ^[132], foram preparadas soluções imediatamente antes do seu uso. A solução deste complexo foi preparada dissolvendo-se 0,0062 g de tetraglicina e

0,125 mL de Cu(ClO₄)₂ 0,20 mol L⁻¹ em 5,0 mL de água deionizada (sendo que o pH 7,0 ou 9,0 foi ajustado com micro litros de solução NaOH 0,10 mol L⁻¹ ou HClO₄ 0,10 mol L⁻¹). A solução resultante continha [Cu(II)/G₄] 5,0x10⁻³ mol L⁻¹. Esta solução estoque foi diluída com água deionizada (na relação 1 : 10) e ajustada no pH 7,0 ou 9,0. A concentração final da solução foi [Cu(II)/G₄] 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ (esta solução continha 5,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ de Ni(II) proveniente do reagente utilizado de Cu(ClO₄)₂ (Aldrich)).

Para evitar a presença de traços de níquel em alguns estudos outra solução do complexo de Cu(II)/G₄ foi preparada a partir de solução de Cu(II) na qual fios de Cu^o (99,99%) tratados com ácido nítrico concentrado bidestilado foram empregados. A análise dessa solução por ICP OES não detectou a presença de Ni(II).

Solução de Cu(II)/tetraglicina em tampão borato 0,10 mol L⁻¹

Foi preparada dissolvendo-se 0,0062 g de tetraglicina em 5,0 mL de solução de tampão borato 0,10 mol L⁻¹ (de pH = 9,0) seguida da adição de 0,125 mL de Cu(ClO₄)₂ 0,20 mol L⁻¹, obtendo-se uma solução de [Cu(II)/G₄] 5,0x10⁻³ mol L⁻¹. A seguir foi feita a diluição desta solução na relação 1:10 em tampão borato 0,1 mol L⁻¹ (pH = 9,0). A concentração final da solução de [Cu(II)/G₄] foi 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹.

Solução do complexo de Ni(II)/tetraglicina 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹

Foi preparada dissolvendo 0,0012 g de tetraglicina em 10,0 mL de água deionizada seguida pela adição de 0,025 mL de solução de $Ni(ClO_4)_2$ 0,2 mol L⁻¹.

Solução do complexo de Co(II)/tetraglicina 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹

Foi obtida dissolvendo 0,0025 g de tetraglicina em 20,0 mL de água deionizada seguida pela adição de 0,0104 mL de solução de $Co(ClO_4)_2$ 0,965 mol L⁻¹.

Solução do complexo de Mn(II)/tetraglicina 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹

A solução de Mn(II)/tetraglicina foi preparada dissolvendo 0,0025 g de tetraglicina em 20,0 mL de água deionizada seguida pela adição de 0,0054 mL de solução de Mn(ClO₄)₂ 1,8366 mol L⁻¹.

B. Solução de sulfito 0,010 mol L⁻¹ (Solução B)

A solução de sulfito 0,010 mol L⁻¹ foi preparada diariamente dissolvendo-se 0,097 g de Na₂S₂O₅ em 100,0 mL de água deionizada isenta de oxigênio (pelo borbulhamento de nitrogênio). Em solução aquosa, um mol de S₂O₅²⁻ gera dois mols de HSO₃⁻ (equação 1). A padronização dessa solução foi feita iodometricamente ^[133].

 $S_2O_5^{2-} + H_2O \longrightarrow 2HSO_3^{-}$ [3]

Para preparar as soluções diluídas de sulfito volumes pequenos de solução estoque foram adicionados em água saturada com ar.

IV.2.3 Técnica de Eletroforese em gel de agarose

A separação das diferentes formas do plasmídio pUC19, enovelada (SC - "supercoiled" - forma nativa), circular aberta (OC - "open circular"- resultante da quebra de uma das fitas do DNA) e linear (L - "linear" - resultante da quebra de ambas as fitas do DNA) (vide figura 2, página 131) foi realizada empregando um gel de eletroforese, utilizando 0,8% de agarose / 1,8 µmol L⁻¹ de brometo de etídio em uma cuba de eletroforese horizontal a 30 mA por 2 h em tampão Tris - borato 90 mmol L⁻¹ / EDTA 2 mmol L⁻¹ a pH 8,0. O DNA foi misturado com 5,0 µL de uma solução contendo 15% de Ficoll tipo 400 / 0,25% de azul de bromofenol e aplicado no gel. As soluções empregadas para o estudo da lesão no DNA estão descritas no item IV.3.2.

Após a eletroforese, as bandas do DNA foram visualizadas por fluorescência em luz UV em densitômetro ImageMaster VDS (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). As bandas foram quantificadas para determinação da extensão do dano.

IV.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.3.1 O uso de DNA plasmidial pUC19

Este tipo de DNA plasmidial foi utilizado para os testes de lesão, por serem moléculas circulares pequenas (de 1 a 200 Kb pares de bases nitrogenadas), distintas do DNA cromossômico, e com capacidade de replicar-se. Apresenta-se em três formas diferentes: a forma nativa ou enovelada (SC - "supercoiled" - forma nativa, figura 2A), forma circular aberto (OC - "open circular"- resultante da quebra de uma das fitas do

DNA, figura 2B) e a forma linear ((L - "linear" - resultante da quebra de ambas as fitas do DNA, figura 2C). Empregando-se a técnica de eletroforese em gel de agarose é possível separar estas três formas do DNA plasmidial pUC19 a partir da velocidade de migração diferente de cada uma dessas formas do plasmídio. Desta maneira as moléculas DNA, carregadas negativamente, migram em direção ao pólo positivo quando é submetidas a um campo elétrico (vide figura 3, página 132).

A forma enovelada (SC – "supercoiled") migra mais rapidamente que a menos compacta circular aberta (OC – "open circular") e qualquer outra forma linear (L - "linear") geralmente migra em posição intermediária entre o supertorcido e a circular aberta (figura 3). Assim a velocidade de migração no gel de agarose é: SC > L > OC.

IV.3.2 Uso da técnica de eletroforese para verificação da ocorrência de lesão em DNA plasmidial pUC19

100 nanogramas de DNA plasmídio pUC19 foram adicionados a uma solução contendo Cu(II)/tetraglicina, Ni(II) (a nível de traços), oxigênio e S(IV) em pH 7. Diversas ordens de adições de reagentes foram consideradas, uma vez que a reação de oxidação de S(IV), com geração de radicais é relativamente rápida (10 a 600 segundos) ^[142]. A ordem de adição dos reagentes está indicada na legenda da figura e a temperatura foi mantida a 25 °C.

A seguir serão apresentados os ensaios para verificar os vários parâmetros que podem influenciar na intensidade da lesão na molécula de DNA.



Figura 2. Formas do DNA plasmidial. (A) forma enovelada ((SC - "supercoiled" - forma nativa);
(B) forma circular aberto (OC - "open circular"- resultante da quebra de uma das fitas do DNA);
(C) forma linear ((L - "linear" - resultante da quebra de ambas as fitas do DNA).



Figura 3. Esquema da separação das formas de DNA plasmidial por eletroforese em gel de agarose. Velocidade de migração SC > L > OC.

A. Influência do Cu(II) complexado ou não com tetraglicina

Alguns experimentos de controle foram realizados. Na figura 4 observa-se nas linhas de 1 a 5, que a quebra das fitas do DNA não ocorre quando foram adicionados isoladamente: S(IV) (linha 2); $Cu(CIO_4)_2$ (linha 3); G_4 (linha 4) e $Cu(II)/G_4$ (linha 5).

No entanto, foi observado que a lesão ao DNA ocorre quando S(IV) está presente juntamente com Cu(II) ou Cu(II)/G₄ (linha 6 e 7 da figura 4), sendo que as porcentagens das formas formadas são comparativamente iguais (tabela 1), indicando que a lesão ao DNA pode ser conseqüência da reação dos radicais formados (eqs. 1-27 do esquema I, capítulo I, página 5) ou pelo Cu(III)/G₄.

Nos experimentos empregando Cu(II) não complexado à tetraglicina pode ser possível a ocorrência de um complexo com DNA que permite a geração dos radicais livres conforme um mecanismo similar ao esquema I (capítulo II, página 63).

B. Influência da ordem de adição dos reagentes. Na presença e ausência de tetraglicina

Foram avaliadas as seguintes ordens de adição de reagentes:

a). DNA + Cu(II)/G₄ + S(IV);
b). DNA + S(IV) + Cu(II)/G₄;
c). DNA + S(IV) + Cu(II)
e d). DNA + Cu(II) + S(IV), (vide figura 5).

Desta maneira foi observado que quando o S(IV) foi adicionado por último (linhas 2 e 5 da figura 5) a lesão ao DNA foi maior tanto na presença como na ausência de tetraglicina, como é verificado na tabela 2, indicando que estando o DNA inicialmente na presença de Cu(II) (complexado ou não), com a adição de S(IV) a lesão é mais efetiva. No entanto, quando a ordem de adição foi DNA + S(IV) + Cu(II)/G₄ também houve uma lesão mas de intensidade menor.

C. Influência da concentração de S(IV)

Este estudo foi realizado variando-se as concentrações de S(IV). A ordem de adição dos reagentes empregada foi: DNA + Cu(II)/G₄ + S(IV).

Empregando-se essa técnica, observou-se que a lesão pode ser detectada em concentrações de $S(IV) \ge 5,0x10^{-6} \text{ mol } L^{-1}$ (figuras 6 e 7) e atinge um valor máximo em $[S(IV)] = 5,0x10^{-4} \text{ mol } L^{-1}$ ocorrendo decréscimo para concentrações maiores (figura 8).

Com a oxidação de S(IV) e Cu(II), ocorre simultaneamente o consumo de O₂ (equação 3, esquema I, capítulo II, página 63) ^[134]. O presente estudo foi realizado com soluções saturadas de ar ($[O_2] = 2,5x10^{-4}$ mol L⁻¹) ^[135].

O ciclo de reações de oxidorredução proposto no esquema I (capítulo II, página 5), com variação no estado de valência do íon metálico, depende do balanço das



Figura 4. Lesão ao DNA plasmidial pUC19. Linha 1: DNA; linha 2: DNA + 1 mmol L⁻¹ S(IV); linha 3: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(ClO₄)₂; linha 4: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ G₄; linha 5: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄; linha 6: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(ClO₄)₂ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 7: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV). [pUC19] = 5,0x10⁻⁶ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C; [Cu^{II}G₄] = 0,1 mmol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ Ni(II)); [Cu(II)] = 0,1 mmol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ Ni(II)).

Tabela 1: Porcentagem das formas encontradas na figura 4.

Fragmentos	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7
OC	-	-	-	-	-	55,3	55,6
SC	100	100	100	100	100	44,7	44,4



Figura 5. Lesão ao DNA plasmidial pUC19. Linha 1: DNA; Linha 2: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ $Cu(II)/G_4 + 1,0$ mmol L⁻¹ S(IV); Linha 3: DNA + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV) + 0,1 mmol L⁻¹ $Cu(II)/G_4$; Linha 4: DNA + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV) + 0,1 mmol L⁻¹ $Cu(CIO_4)_2$; Linha 5: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ $Cu(CIO_4)_2 + 1,0$ mmol L⁻¹ S(IV). [pUC19] = 5,0x10⁻⁶ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C; [Cu^{II}G_4] = 0,1 mmol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ Ni(II)); [Cu(II)] = 0,1 mmol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ Ni(II));

Tabela 2. Porcentagem das formas encontradas da figura 5.

Fragmentos	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5
OC	-	60,5	56,9	43,3	62,4
SC	100	39,5	43,1	56,7	37,6



Figura 6. Lesão ao DNA plasmidial pUC19. Linha 1: DNA sozinho; Linha 2: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(ClO₄)₂; Linha 3: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄; Linha 4: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 1 µmol L⁻¹ S(IV); Linha 5: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 2,5 µmol L⁻¹ S(IV); Linha 6: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 5 µmol L⁻¹ S(IV); Linha 7: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 7,5 µmol L⁻¹ S(IV); Linha 8: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 10 µmol L⁻¹ S(IV). [pUC19] = 5,0x10⁻⁶ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C; [Cu^{II}G₄] = 0,1 mmol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ Ni(II)); [Cu(II)] = 0,1 mmol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ Ni(II)).

Tabela 3. Porcentagem das formas encontradas na figura 6.

Fragmentos	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8
OC	-	-	-	-	-	13,5	13,1	16,3
SC	100	100	100	100	100	86,5	86,9	83,7



Figura 7. Lesão ao DNA plasmidial pUC19. Linha 9: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 25 μ mol L⁻¹ S(IV); Linha 10: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 50 μ mol L⁻¹ S(IV); Linha 11: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 75 μ mol L⁻¹ S(IV);Linha 12: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,1 mmol L⁻¹ S(IV); Linha 13: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,25 mmol L⁻¹ S(IV); Linha 14: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,5 mmol L⁻¹ S(IV); Linha 15: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,75 mmol L⁻¹ S(IV); Linha 16: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 1 mmol L⁻¹ S(IV). [pUC19] = 5,0x10⁻⁶ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C; [Cu^{II}G₄] = 0,1 mmol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ Ni(II)).

 Tabela 4. Porcentagem das formas encontradas na figura 7.

Fragmentos	Linha 9	Linha 10	Linha 11	Linha 12	Linha 13	Linha 14	Linha 15	Linha 16
OC	38	45	50,3	59,2	82,4	94,4	90,2	76,5
SC	62	55	49.7	40.8	17.6	5.6	9.8	23.5



Figura 8. Quantificação das formas obtidas a partir da reação do DNA plasmidial pUC19 com 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ e S(IV) a diferentes concentrações. [pUC19] = $5,0x10^{-6}$ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C; [Cu^{II}G₄] = 0,1 mmol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ Ni(II)); [Cu(II)] = 0,1 mmol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ Ni(II)).

(A) OC - "open circular" (forma circular aberta resultante da quebra de uma das fitas do DNA).

(B) SC – "supercoliled" (forma nativa do DNA).

concentrações de O_2 e S(IV). Dessa maneira em meio de [S(IV)] > [O₂] a reação é menos eficiente, pois o O_2 é o reagente limitante.

D. Verificação da lesão de DNA em solução de Cu(II) e Cu(III)/G₄ na ausência de S(IV)

A geração de Cu(III)/G₄, para este estudo, foi obtida a partir de uma solução de $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ Cu(II)/G₄ (contendo $1,0x10^{-7}$ mol L⁻¹ Ni(II)) na ausência de S(IV). Estes ensaios foram realizados com a finalidade de verificar a lesão ao DNA única e exclusivamente pelo complexo de Cu(III)/G₄ formado. Assim empregou-se uma solução de Cu(II)/G₄ após 5 horas de preparo, havendo portanto tempo suficiente para a oxidação do complexo de cobre (II) pela reação com oxigênio (equação 3, esquema I, capítulo II, página 63). Foi verificado uma lesão ao DNA pelo Cu(III) formado durante este tempo ([Cu(III)/G₄] = 6,0x10⁻⁵ mol L⁻¹) como é mostrado na figura 9, linha 5.

No entanto a ocorrência da quebra ao DNA foi menor quando comparada com os experimentos realizados na presença de S(IV) tanto com $Cu(II)/G_4$ e $Cu(CIO_4)_2$ (vide linhas 3, 4 da figura 9 e tabela 5).



Figura 9. Lesão ao DNA plasmidial pUC19. Linha 1: DNA; Linha 2: DNA + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); Linha 3: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(ClO₄)₂ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); Linha 4: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); Linha 5: DNA + 0,06 mmol L⁻¹ Cu(III)/G₄. [pUC19] = $5,0x10^{-6}$ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C; [Cu^{II}G₄] = 0,1 mmol L⁻¹ Ni(II)); [Cu(II)] = 0,1 mmol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ Ni(II));

Tabela 5. Porcentagem das formas encontradas na figura 9.

Fragmentos	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5
OC	-	-	55,2	56,4	27,8
SC	100	100	44,8	43,6	72,2

E. Influência do tempo de incubação

Foram realizados testes para verificar o efeito do tempo de incubação, após a mistura DNA + Cu(II)/G₄ + S(IV) (0,05 a 1 mmol L⁻¹). O tempo de incubação adotado foi de 60 minutos. Desta forma foi observado, a partir dos resultados encontrados nas figuras 10 (sem incubação, imediatamente após a mistura dos reagentes) e 11 (com incubação) que com tempo de incubação a lesão do DNA é um pouco mais pronunciada somente para concentrações maiores de S(IV) (1,0 mmol L⁻¹). Essa diferença pode estar dentro do erro experimental.

Assim na figura 12 é mostrado o fragmento OC – "open circular" (resultante da quebra de uma das fitas do DNA) para diferentes concentrações de S(IV) (antes e após a incubação), resultando uma quantidade um pouco maior de fragmento formado com o aumento da concentração de S(IV).

Em concentrações maiores de S(IV) (1,0 mmol L⁻¹), estando a solução resultante, durante o período de incubação, ainda exposta ao ar há uma realimentação do oxigênio dissolvido (consumido durante a reação), possibilitando assim a continuidade do ciclo de reações (eqs. 1-27 do esquema I, capítulo I, página 5).

Alguns estudos encontrados na literatura mostram tempos de incubação de até 24 horas para verificar a lesão ao DNA na presença de S(IV) e Cromo (VI)^[136,137].



Figura 10. Lesão ao DNA plasmidial pUC19 variando-se a concentração de S(IV). Linha 1: DNA; Linha 2: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(ClO₄)₂; Linha 3: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄; Linha 4: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,5 mmol L⁻¹ S(IV); Linha 5: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 50 µmol L⁻¹ S(IV); Linha 6: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 1 mmol L⁻¹ S(IV); Linha 7: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 100 µmol L⁻¹ S(IV). [pUC19] = 5,0x10⁻⁶ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C; [Cu^{II}G₄] = 0,1 mmol L⁻¹ Ni(II)). As amostras não foram incubadas.

Tabela 6. Porcentagem das formas encontradas na figura 10.

Fragmentos	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7
OC	3,95	16,82	13,23	89,58	44,49	67,27	48,75
SC	96,05	83,18	86,77	10,42	55,61	32,73	51,25



Figura 11. Lesão ao DNA plasmidial pUC19 variando-se a concentração de S(IV). Linha 1: DNA; Linha 2: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(ClO₄)₂; Linha 3: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄; Linha 4: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,5 mmol L⁻¹ S(IV); Linha 5: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 50 µmol L⁻¹ S(IV); Linha 6: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); Linha 7: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 100 µmol L⁻¹ S(IV). [pUC19] = 5,0x10⁻⁶ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C; [Cu^{II}G₄] = 0,1 mmol L⁻¹ Ni(II)); [Cu(II)] = 0,1 mmol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ Ni(II)); [Cu(II)] = 0,1 mmol L⁻¹ (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ Ni(II)). As amostras foram incubadas por 60 minutos.

 Tabela 7. Porcentagem das formas encontradas na figura 11.

Fragmentos	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7
OC	6,4	11,7	9,3	88,1	41,9	72,9	49,6
SC	93,6	88,3	90,7	11,9	58,1	27,1	50,4

IV.3.3 Lesão ao DNA na presença de Ni(II)/G₄, S(IV) e oxigênio (ausência de Cu(II))

Sabe-se que Ni(II) é um agente carcinogênico, sendo a degradação de ácidos nucléicos promovida por esse íon metálico de especial interesse em bioquímica. Alguns compostos de coordenação do Ni(II) na presença de um oxidante, podem originar a lesão no DNA. Na literatura há poucos estudos relatando a lesão ao DNA na presença de complexos de Ni(II). Muller *et al.* ^[138] verificaram a oxidação específica da guanina na presença do complexo [NiCR]²⁺ (CR = 2,12 – dimetil – 3,7,11,17 – tetraazabiciclo [11.3.1] heptadeca – 1(17),2,11,13,15 – pentano) e do oxidante KHSO₅.

O estudo usando o complexo [NiKGH-CONH₂]⁺ na presença de O₂ e Na₂SO₃ ^[138], também resultou na modificação do DNA em um sitio específico; constituindo a primeira observação de lesão ao DNA por um complexo de Ni(II) na presença de oxigênio e S(IV) (um redutor).

Com o intuito de verificar se Ni(II)/G₄, na presença de oxigênio e S(IV), é capaz de induzir a lesão ao DNA foram realizados alguns testes, relatados a seguir.

Influência do tempo de incubação.

Verificou-se que o tempo de incubação favorece muito pouco a lesão ao DNA na presença de Cu(II)/G₄ e S(IV) (figura 12). Nos estudos a seguir foram avaliadas a influência da incubação na intensidade de quebra ao DNA na presença de Ni(II)/G₄, S(IV) e oxigênio.



Figura 12. Quantificação da forma OC (forma "open circular") obtido a partir da reação do DNA plasmidial pUC19 com $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ Cu(II)/G₄; $1,0x10^{-7}$ mol L⁻¹ Ni(II) e S(IV) a diferentes concentrações.



- = Formas obtidas sem incubação.
- = Formas obtidas com incubação de 60 minutos.

Na figura 13 as linhas 1, 2 e 3 mostram os experimentos iniciais de controle de lesão ao DNA; DNA + G₄ e DNA + S(IV) respectivamente, que servem como referência para descartar alguma possível quebra do DNA quando esses reagentes foram utilizados individualmente. As figuras 13a (sem incubação) e 13b (com incubação) mostram que com Ni(II) e Ni(II)/G₄ na ausência de S(IV) não foi observado lesão ao DNA (linhas 4 e 5) nas condições experimentais estudadas (pH = 7,0, meio não tamponado). Na presença de S(IV) (linhas 6, 7 e 8 da figura 13a) a ocorrência de lesão à molécula do DNA não foi perceptível. No entanto na figura 13b a incubação favorece ligeiramente a lesão ao DNA, pois observa-se uma fração pequena da forma "open circular". Estudos mais detalhados permitiriam avaliar melhor a lesão de DNA na presença do Ni(II)/G₄, S(IV) e oxigênio.

Influência da concentração de Ni(II)/G₄ e S(IV)

A figura 14 mostra que a lesão do DNA não foi observada, empregando-se essa técnica, em meio de Ni(II)/G₄ (na faixa de $(0,01 - 1,0)x10^{-4}$ mol L⁻¹) e S(IV) (na faixa de $(0,1-1,0)x10^{-3}$ mol L⁻¹), mesmo com incubação.



Figura 13. Separações das formas do DNA plasmidial pUC19 (a) sem incubação e (b) após 24 h de incubação. linha 1: DNA; linha 2: DNA + 0,1mmol L⁻¹ G₄; linha 3: DNA + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 4: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Ni(II); linha 5: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄; linha 6: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Ni(II) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 7: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 8: DNA + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV) + 0,1 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄. [pUC19] = $5,0x10^{-6}$ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C.

IV.3.4 Lesão ao DNA na presença de Cu(II)/G₄, Ni(II)/G₄ (traços), S(IV) e Oxigênio.

Os estudos espectrofotométricos anteriormente realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que na ausência de Ni(II) a formação de Cu(III)/G₄ é muito lenta e ineficiente, enquanto que na presença desse íon metálico a formação de Cu(III) é muito rápida e eficiente ^[139-145]. Portanto optou-se por realizar estudos na presença de Ni(II)/G₄ (em concentrações baixas) e Cu(II)/G₄ para avaliar a lesão ao DNA.

Nos experimentos realizados mantendo-se constante a concentração de $Cu(II)/G_4^{(*)}$ (1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹) e S(IV) (1,0x10⁻³ mol L⁻¹), e variando a concentração de Ni(II)/G₄, na faixa de (0,01 - 5,0)x10⁻⁴ mol L⁻¹, não foi verificada influência no grau de lesão ao DNA, como observado na figura 15.

No entanto a lesão é maior na presença de Cu(II)/G₄ e Ni(II)/G₄, quando comparada àquela somente na presença de Cu(II)/G₄, como será discutido ao avaliar a figura 18. O grau de lesão observado em concentrações de Ni(II)/G₄ maiores que $1,0x10^{-6}$ mol L⁻¹ (linhas 3-8, figura 15) é comparativamente igual ao observado na presença de Cu(II)/G₄^(*) (linha 2, figura 15), nas condições experimentais nas quais foram realizados estes testes (pH = 7,0). A técnica de HPLC, por ser mais sensível que a técnica de eletroforese em gel de agarose, permitiu avaliar melhor a influência da presença de Ni(II)/G₄ na oxidação da guanosina como será abordado no capitulo V.

^(*) A solução de Cu(II)/G₄ 1,0x10⁻⁴ M usada nestes testes contém Ni(II) 1,0x10⁻⁷ M, presente como impureza do reagente Cu(ClO₄)₂ apartir do qual a solução de Cu(II)/G₄ foi preparada.



Figura 14. Separações das formas do DNA plasmidial pUC19 (a) sem incubação e (b) após 24 h de incubação. linha 1: DNA; linha 2: DNA + 1,0 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄; linha 3: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 4: DNA + 0,01 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 5: DNA + 0,001 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 6: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 0,1 mmol L⁻¹ S(IV); linha 7: DNA + 0,01 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 0,1 mmol L⁻¹ S(IV); linha 8: DNA + 0,001 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 0,1 mmol L⁻¹ S(IV); linha 8: DNA + 0,001 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 0,1 mmol L⁻¹ S(IV). [pUC19] = $5,0x10^{-6}$ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C.



Figura 15. Separações das formas do DNA plasmidial pUC19. linha 1: DNA; linha 2: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 3: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,001 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 4: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,005 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 5: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,01 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 6: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,05 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 6: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,05 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 7: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,1 mmol L⁻¹ S(IV); linha 8: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,5 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 8: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,5 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 8: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,5 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 8: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 0,5 mmol L⁻¹ Ni(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV). [pUC19] = 5,0x10⁻⁶ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C.

IV.3.5 Lesão ao DNA na presença de íons Cu(II), Ni(II), Fe(III), Mn(II), S(IV) e oxigênio.

A fim de avaliar e comparar a influência de alguns íons metálicos de transição na lesão ao DNA, foi realizado um teste com Cu(II), Ni(II), Fe(III) e Mn(II) $(1,0x10^{-4} \text{ mol L}^{-1})$ isoladamente em meio não complexante (em pH = 7,0). Esse estudo (figura 16) mostra claramente que só na presença de Cu(II) e S(IV) foi observado a quebra do DNA (linha 2), possivelmente devido à interação desse íon metálico com a molécula de DNA (formação de um complexo, como mencionado nos estudos espectrofotométricos).

IV.3.6 Lesão ao DNA na presença de Cu(II) e S(IV) em pH 7,0 e 9,0

Os estudos realizados em meios de diferente acidez (pH = 7,0 e 9,0), corroboram os resultados obtidos nos estudos espectrofotométricos. Na presença de Cu(II)/G₄ (traços de Ni(II)) e S(IV), em meio não tamponado de pH =7,0 (linha 2) e 9,0 (linhas 3 e 4 da figura 17), verifica-se a quebra do DNA havendo o aparecimento dos fragmentos da forma "open circular". Em meio tamponado de pH = 9,0 (linhas 5 e 6) não foram observados tais fragmentos, indicando que não houve quebra do DNA, indicando influência do tampão borato. Sabe-se que borato forma complexos com alguns acucares ^[146].

Nestes testes também foi comprovado que na presença de S(IV), Mn(II) (0,1 mmol L⁻¹), em meio de tetraglicina e pH = 7,0, não ocorre lesão ao DNA como mostrado na figura 17 (linhas 7 e 8).



Figura 16. Separações das formas do DNA plasmidial pUC19. linha 1: DNA; linha 2: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 3: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Ni(II) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 4: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Fe(III) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 5: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Mn(II) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV). [pUC19] = 5,0x10⁻⁶ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C.



Figura 17. Separações das formas do DNA plasmidial pUC19. linha 1: DNA; linha 2: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV) (pH = 7,0, sem tampão); linha 3 e 4: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV) (pH = 9,0, sem tampão); linha 5 e 6: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV) (pH = 9,0, tampão borato); linha 7 e 8: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Mn(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV) (pH = 7,0, sem tampão). [pUC19] = $5,0x10^{-6}$ g mL⁻¹; T = 25,0 °C.

IV.3.7 Lesão ao DNA em pH 7,0 na presença de Cu(II), Co(II), Mn(II) (com e sem tetraglicina), S(IV) e oxigênio.

Nestes estudos também foi avaliada a influência de alguns íons metálicos de transição (na presença e ausência de tetraglicina) na lesão ao DNA em pH = 7,0. Foi verificada a influência da pureza da solução do íon Cu(II), quanto à presença de Ni(II), na lesão ao DNA.

A figura 18 (linhas 2 e 3) mostra que quando uma solução de Cu(II)/G₄, livre de Ni(II)^(*), é usada nos testes, o grau de lesão ao DNA é menor que quando usada uma solução de Cu(II)/G₄ contendo Ni(II) $1,0x10^{-6}$ mol L⁻¹. A tabela 7 mostra claramente esta observação, as porcentagens dos fragmentos da forma "open circular" formados são relativamente maiores quando traços de Ni(II) estão presentes na solução de Cu(II)/G₄. Este fato é muito interessante, pois mostra que Ni(II), devido ao efeito sinérgico (na oxidação de Cu(II)/G₄), realmente influência na lesão ao DNA.

Na presença de Co(II) e Mn(II), complexados ou não com tetraglicina, não foi observado a quebra do DNA (linhas 5 - 8 da figura 18). Porém, após um período de incubação de 30 min, foi observada uma ligeira quebra do DNA na presença desses íons metálicos, a qual foi um pouco mais intensa no caso de Co(II)/G₄ (linha 5 da figura 19).

^(*) A solução de Cu(II)/G₄ livre de Ni(II) foi preparada a partir de fios de Cu^o (99,99%) e ácido nítrico bidestilado. A análise dessa solução por ICP OES não detectou Ni(II), mostrando que a solução de Cu(II) preparada não contém Ni(II).



Figura 18. Separações das formas do DNA plasmidial pUC19. linha 1: DNA; linha 2: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ (ausência de Ni(II)) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 3: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ (contendo Ni(II) 1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 4: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II) (contendo Ni(II) 1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 5: DNA + 0,01 mmol L⁻¹ Co(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 6: DNA + 0,01 mmol L⁻¹ Co(II) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV) ; linha 7: DNA + 0,001 mmol L⁻¹ Mn(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 8: DNA + 0,001 mmol L⁻¹ Mn(II) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 8: DNA + 0,001 mmol L⁻¹ Mn(II) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV). [pUC19] = 5,0x10⁻⁶ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C.

Tabela 7: Porcentagem das formas encontradas na figura 18.

Fragmentos	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8
OC	-	21	32,1	37,5	-	-	-	-
SC	100	79	67,9	62,5	100	100	100	100



Figura 19. Separações das formas do DNA plasmidial pUC19 com incubação de 30 min. linha 1: DNA; linha 2: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ (ausência de Ni(II))+ 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 3: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ (contendo Ni(II) 1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 4: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II) (contendo Ni(II) 1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 5: DNA + 0,01 mmol L⁻¹ Co(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 6: DNA + 0,01 mmol L⁻¹ Co(II) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV) ; linha 7: DNA + 0,001 mmol L⁻¹ Mn(II)/G₄ + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 8: DNA + 0,001 mmol L⁻¹ Mn(II) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV). [pUC19] = 5,0x10⁻⁶ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C.

 Tabela 8: Porcentagem das formas encontradas na figura 19.

Fragmentos	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7	Linha 8
OC	-	37,5	34,5	41,8	31	27,9	20,6	24,4
SC	100	62,5	65,5	58,2	69	72,1	79,4	75,6

Assim verifica-se que o tempo de incubação (figura 19) é um parâmetro importante a ser considerado neste tipo de estudos, uma vez que favorece uma lesão maior ao DNA; talvez um tempo maior de incubação permitiria apreciar melhor essa lesão.

IV.3.8 Influência da concentração de tetraglicina

Foi observado que a lesão ao DNA independe da concentração de tetraglicina (linhas 2 - 7 da figura 20), e as porcentagens dos fragmentos formados são comparativamente iguais (tabela 9). No entanto no caso em que [G₄]_{excesso} = 100% se observa que uma porcentagem um pouco maior de OC é formada, indicando que o excesso de tetraglicina de alguma maneira influência na formação de Cu(III), e conseqüentemente no grau de lesão ao DNA. Estudos utilizando-se a técnica de HPLC permitiram avaliar melhor a influência da concentração de tetraglicina como descrito no capítulo V.

IV.4 CONCLUSÕES

Verificou-se a lesão ao DNA pelo sistema Cu(II)/G₄/Ni(II)/G₄/S(IV)/O₂ pela obtenção dos fragmentos encontrados. A presença de Ni(II) (a nível de traços), na solução de Cu(II)/G₄ (em presença de S(IV), influência no grau de lesão ao DNA (figura 18), possivelmente devido ao efeito sinérgico desses dois íons metálicos na catálise da oxidação de S(IV). Desta maneira foi observado uma lesão maior do DNA quando Cu(II)/G₄ (1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹) está presente juntamente com traços de Ni(II)/G₄.



Figura 20. Separações das formas de DNA plasmidial pUC19. linha 1: DNA; linha 2: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ (G₄ = Zero % excesso) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 3: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ (G₄ = 20 % excesso) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 4: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ (G₄ = 40 % excesso) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 5: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ (G₄ = 60 % excesso) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 6: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ (G₄ = 80 % excesso) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV); linha 7: DNA + 0,1 mmol L⁻¹ Cu(II)/G₄ (G₄ = 100 % excesso) + 1,0 mmol L⁻¹ S(IV). [pUC19] = 5,0x10⁻⁶ g mL⁻¹; pH = 7,0; T = 25,0 °C.

 Tabela 9: Porcentagem das formas encontradas na figura 20.

Fragmentos	Linha 1	Linha 2	Linha 3	Linha 4	Linha 5	Linha 6	Linha 7
OC	-	30,6	32,1	34,4	30,9	32,5	36,6
SC	100	69,4	67,9	65,6	69,1	67,5	63,4

- Ni(II) e Ni(II)/G₄ (na ausência ou presença de S(IV)) não induziram lesão ao
 DNA nas condições experimentais estudadas (pH = 7,0, meio não tamponado).
- Foi verificado que as lesões ao DNA a partir do sistema Cu(II)/G₄/Ni(II)/G₄/S(IV)/O₂ ocorreram igualmente empregando-se o complexo de Cu(II)/G₄ ou Cu(II) (na ausência de tetraglicina).
- As lesões ao DNA foram mais acentuadas quando foi adicionado o S(IV) por último à mistura Cu(II)/G₄, Ni(II)/G₄ e DNA. Mostrando que a ordem de adição dos reagentes é importante.
- Quando foram empregados as concentrações de Cu(II)/G₄ = 1,0 mmol L⁻¹ (contendo Ni = 1,0 μmol L⁻¹) e S(IV) = 5,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ não foi observado lesão ao DNA. No entanto a lesão ocorreu quando as condições experimentais foram Cu(II)/G₄ = 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ (contendo Ni = 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹) e S(IV) (5,0x10⁻⁶ - 1,0x10⁻³ mol L⁻¹), sendo que a concentração de Cu(II)/G₄ também é muito importante.
- Foi observado que quanto maior o tempo de incubação a lesão é um pouco maior em concentrações de S(IV) ≥ 1 mmol L⁻¹ (figura 12), estando dentro do erro experimental.

Constatou-se que Mn(II) e Co(II), em meio de tetraglicina, induzem em pequena extensão a lesão ao DNA, somente após um tempo de incubação. O efeito de Co(II) foi maior que de Mn(II) (figura 19).

IV.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

127. TAVARES, M. F. M.

Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos.

Química Nova, 19(2), 173-181, 1996.

128. ROBYT, J. F. e WHITE, B. J.

Biochemical techniques – Theory and Practice.

Waveland Press, Inc. 1990, p 129-155.

129. ANDREWS, A. T.

Electroforese – Theory, Techniques and Biochemical and Clinical Applications.

Oxford, 2nd Edition, University Press – 1988, p 1-4, 148-149.

130. HANAHAN, D.

Studies on transformation of E. coli with plasmids.

J. Mol. Biol., 166, 557-580, 1983.

131. HANSEN, N. J. V.; KRISTENSEN, P.; LYKEE, J.; MORTENSEN, K. K. e CLARK,B. F. C.

A Fast, Economical and Efficient Method for DNA Purification by Use of a Homemade Bead Column.
Biochem. Mol. Biol. Int., 35, 461-465, 1995.

132. HARRIS, G. M. e VAN ELDIK, R.

Kinetics and Mechanism of the Formation, Acid-Catalyzed Decomposition, and Intramolecular Redox Reaction of Oxygen-Bonded (Sulfito) Pentaamminecobalt(III) Ions in Aqueous-Solution.

Inorg. Chem., 19, 880-886, 1980.

133. LAITINEN, H. A.

Chemical Analysis.

New York, Ed. Mc Graw Hill, 1960, p. 410.

134. KURTZ, J. L.; BURCE, G. L. e MARGERUM, D. W.

Trivalent Copper Catalysis of the Autoxidation of Copper(II) Tetraglycine.

Inor. Chem., 17(9), 2454-2460, 1978.

135. SASSO, M. G.; QUINA, F.H. e BECHARA, E. J. H.

Ruthenium(II) Tris(Bipyridyl) Ion as a Luminescent Probe for Oxygen-Uptake.

Anal. Biochem., 156, 239-243, 1986.

136. SHI, X.

Generation of $SO_3^{\bullet-}$ and OH Radicals in SO_3^{2-} Reactions with Inorganic Environmental Pollutants and Its Implications to SO_3^{2-} Toxicity.

J. Inorg. Biochem., 1994, 56, 155-165.

137. INOUE, S. e KAWANASHI, S.

Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide.

Cancer Res., 1987, 47, 6522-6527.

138. MULLER, J. G.; HICKERSON, R. P.; PEREZ, R. J. e BURROWS, C. J.

DNA Damage from Sulfite Autoxidation Catalyzed by a Nickel(II) Peptide.

J. Amer. Chem. Soc. 1997, 119(7), 1501-1506.

139. ALIPÁZAGA M. V. e COICHEV, N.

Synergistic Effect of Some Transition Metal Ions on the Sulfite Induced Autoxidation of Cu(II)/tetraglycine Complex. Analytical Applications.

Anal. Lett., 2003, 36, 2255-2275.

140. ALIPÁZAGA, M. V.; MORENO, R. G. M. e COICHEV, N.

Synergistic Effect of Ni(II) and Co(II) lons on the Sulfite-Induced Autoxidation of Cu(II)/tetraglycine.

Dalton Trans., 2004, 13, 2036-2040.

141. ALIPÁZAGA, M. V.; BONIFÁCIO, R. L.; KOSMINSKY, L.; BERTOTTI, M. e COICHEV, N.

Sulfite Induced Autoxidation of Cu(II)/ tetra/ penta/ hexaglycine Complexes. Spectrophotometric and Rotating Ring-disk Glassy Carbon Electrode Studies with Analytical Potentialities.

J. Braz. Chem. Soc., 2003, 14, 713 - 721.

142. ALIPÁZAGA, M. V.

"Autoxidação dos complexos de Cu(II), Ni(II) e Co(II)/tetraglicina induzida por S(IV)"; São Paulo (2003). [Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP].

- 143. ALIPÁZAGA, M. V.; KOSMINSKY, L.; BERTOTTI, M. e COICHEV, N.
 S(IV) Induced Autoxidation of Cu(II)/tetraglycine Complexes in the Presence of Aldehydes: Mechanistic Considerations and Analytical Applications.
 Talanta 2002, 57, 375.
- 144. ALIPÁZAGA M. V.; LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. e COICHEV, N.
 Sulfite Induced Autoxidation of Ni(II) and Co(II) tetraglycine Complexes.
 Spectrophotometric and Rotating Ring-Disk Voltammetric Studies.
 Dalton Trans., 2004, 2, 267-272.
- 145. ALIPÁZAGA, M. V.; MORENO, R. G. M.; LINARES, E.; MEDEIROS, M. H. G. e COICHEV, N.

Oxidative DNA Damage Induced by autoxidation of Microquantities of S(IV) in the presence of Ni(II).Gly-Gly-His.

Dalton Trans. 2005, 23, 3738-3744.

146. MORENO, R. G. M.; ALIPAZAGA, M. V.; MEDEIROS, M. H. G. e COICHEV, N. DNA damage induced by sulfite autoxidation catalyzed by copper(II) tetraglycine complex.

Dalton Trans., 2005, 6, 1101-1107.

 V. Estudo da oxidação de 2'-deoxiguanosina na presença de S(IV), Oxigênio e complexos de tetraglicina com Cu(II), Ni(II), Co(II) e Mn(II).

V.1 Introdução

Da apreciação dos potenciais de redução dos nucleosídeos (tabela 1, capítulo 1, página 8), pode-se concluir que a oxidação do DNA acontece preferencialmente pela guanina devido a seu potencial de redução baixo e a sua propriedade de se ligar a metais de transição capazes de catalisar processos oxidativos ^[147, 148].

Observando os potenciais de redução dos radicais de óxidos de enxofre (tabela 1, capítulo 1, página 8): $SO_3^{\bullet-}$ (radical sulfito), $SO_4^{\bullet-}$ (radical sulfato), $SO_5^{\bullet-}$ (radical peroxomonosulfato), SO_5^{2-} (anion peroxomonosulfato), verifica-se que estas espécies são fortes oxidantes. Portanto, pode-se concluir que a guanina (dG) pode ser oxidada a 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanina (8-oxodGuo).

O potencial de redução da guanina é 1,29, no entanto a guanina na molécula de DNA tem seu potencial menor sendo mais facilmente oxidada do que quando isolada ^[149]. Portanto, além dos radicais de óxidos de enxofre, o complexo de Cu(III)/G₄, $(E^{o}Cu(III)/Cu(II) = 1,1 V vs N.H.E.)$ formado como um dos produtos da reação, também poderia oxidar a base guanina no DNA.

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos por eletroforese em gel de agarose, referentes à lesão ao DNA, optou-se por estudos complementares da oxidação da 2'-deoxiguanosina (dGuo) na presença de Cu(II), traços de íons metálicos de transição (como Ni(II), Co(II) ou Mn(II)), S(IV) e oxigênio (esquema I, capítulo II, página 63).

A dGuo, uma nucleobase (base isolada) tem sido usada para verificação da confirmação de agentes oxidantes na lesão ao DNA.

Assim sendo, neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos com a técnica de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) mediante a quantificação de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo), produto da oxidação da dGuo, na presença de Cu(II)/G₄, traços de íons metálicos de transição (como Ni(II), Co(II) ou Mn(II) complexados ou não com tetraglicina), S(IV) e O₂. Com esta técnica, duas espécies podem ser determinadas, a base dGuo (por detecção espectrofotométrica em 254 nm) e a espécie oxidada 8-oxodGuo (esquema I, página 168).

V.2 PARTE EXPERIMENTAL

V.2.1 Reagentes

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de pureza analítica (Merck, Aldrich ou Sigma) e água deionizada pelo sistema Nanopure – Ultrapure Water System da Barnstead, 18 mol L⁻¹ Ω cm⁻¹.

Esquema I. Reação de oxidação da 2'-deoxiguanosina (dGuo).



 $\lambda = 254 \text{ nm}$

A solução de sulfito 0,01 mol L^{-1} foi preparada diariamente dissolvendo-se 0,0969 g de Na₂S₂O₅ em 100,0 mL de água deionizada isenta de oxigênio (previamente borbulhada com nitrogênio).

A. Solução de S(IV) 5,0x10⁻³ mol L⁻¹

Foi preparada diluindo a solução estoque (1,0x10⁻² mol L⁻¹) em água deionizada na proporção 1 : 2.

Nestes testes também foram empregadas soluções de Cu(II)/G₄ 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, Ni(II)/G₄ 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, Co(II)/G₄ 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ e Mn(II)/G₄ 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ cujo preparo foi como se indica a seguir.

B. Solução de Cu(II)/G₄ 0,2 mol L⁻¹

A solução estoque do íon metálico de Cu(II) 0,2 mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo o sal Cu(ClO₄)₂ (Sigma) em água deionizada. Esta solução também contem Ni(II) 2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ como impureza. A solução de Cu(II)/tetratraglicina 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo 0,0012 g de tetraglicina em 10,0 mL de água deionizada seguida pela adição de 0,025 mL de solução 0,2 mol L⁻¹ Cu(ClO₄)₂ (também contendo Ni(II) 2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹). Esta solução foi preparada minutos antes dos experimentos.

C. Solução de Ni(II)/ G_4 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹

Foi preparada dissolvendo 0,0012 g de tetraglicina em 10,0 mL de água deionizada seguida pela adição de 0,025 mL de solução de Ni(ClO₄)₂ 0,2 mol L^{-1} .

D. Solução de Co(II)/G₄ 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹

Foi obtida dissolvendo 0,0025 g de tetraglicina em 20,0 mL de água deionizada seguida pela adição de 0,0104 mL de solução de $Co(ClO_4)_2$ 0,965 mol L⁻¹.

E. Solução de Mn(II)/G₄ 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹

A solução de Mn(II)/tetraglicina foi preparada dissolvendo 0,0025 g de tetraglicina em 20,0 mL de água deionizada seguida pela adição de 0,0054 mL de solução de Mn(ClO₄)₂ 1,8366 mol L⁻¹.

F. Solução de 2' – deoxiguanosina (dGuo)

A solução de dGuo 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo 0,0014 g de 2'deoxiguanosina (de massa molecular 280 g mol⁻¹, reagente SIGMA) em 5,0 mL de água deionizada. Por diluição da solução dGuo 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ foram preparadas soluções padrões de 5,0x10⁻⁵ mol L⁻¹, 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, 2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ e 4,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, diluindo-se 5,0 μ L, 10,0 μ L, 20,0 μ L e 40,0 μ L respectivamente em 100 μ L de água deionizada com a finalidade de construir uma curva analítica de área do pico vs concentração.

G. Solução estoque de 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo) $1,0x10^{-6}$ mol L⁻¹

A concentração do reagente 8-oxodGuo foi determinada a partir de medidas de absorbâncias e levando em conta o valor da absortividade molar (ϵ = 12900 mol⁻¹ L cm⁻¹)^[150].

Para a construção da curva analítica foram preparadas soluções de 5×10^{-8} mol L⁻¹, 15,0x10⁻⁸ mol L⁻¹, 30,0x10⁻⁸ mol L⁻¹, 50x10⁻⁸ mol L⁻¹ e 60x10⁻⁸ mol L⁻¹. Diluindo- se 5,0 µL, 15,0 µL, 30,0 µL, 50,0 µL e 60,0 µL (da solução estoque, 1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹) respectivamente em 100,0 µL de água deionizada.

V.2.2 Procedimento Experimental

Os experimentos foram realizados usando-se um Cromatógrafo HPLC Shimadzu (Tóquio - Japão) com detector amperométrico digital Antec Decade (Antec, Leiden, Holanda), em potencial aplicado de +600 mV, medido a partir de um eletrodo auxiliar de aço inox e um eletrodo de trabalho de carbono vítreo vs Ag/AgCl, e um detector espectrofotométrico modelo SPD-10AV/VP, as medidas foram realizadas em $\lambda = 254$ nm.

Empregou-se também uma coluna de fase reversa C18 (Spherex, 250 x 4,6 mm DI, tamanho da partícula: 5 μ m, Phenomenex). A fase móvel foi constituída de KH₂PO₄ 50 mmol L⁻¹, pH 5,5 contendo 10% de metanol e bombeado a

um fluxo de 1 mL/min usando uma bomba modelo LC-10AD/VP. Para processar e calcular a área dos picos foi utilizado o software Shimadzu Class-VP versão 1.0.

Nestes testes, a mistura dos reagentes foi feita em um frasco eppendorfe de 1,5 mL. Desta maneira 20,0 μ L de água deionizada foi colocado inicialmente no frasco seguida pela adição dos seguintes reagentes: 10,0 μ L da solução de dGuo 4,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, 10,0 μ L de Cu(II)/G₄ 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ (ou Ni(II)/G₄, Co(II)/G₄, Mn(II)/G₄, complexos de íons metálicos na presença ou ausência de G₄) e 10,0 μ L de S(IV) 5,0x10⁻³ mol L⁻¹. O volume da solução final foi de 50,0 μ L. Sendo a ordem de adição dos reagentes muito importante como foi reportado anteriormente (vide capítulo II).

Assim, para o estudo do efeito sinérgico entre Cu(II)/G₄ e Co(II)/G₄ a mistura dos reagentes foi feita da seguinte maneira: 10,0 μ L de água deionizada, 10,0 μ L da solução de dGuo 4,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, 10,0 μ L de Cu(II)/G₄ 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, 10,0 μ L de Co(II)/G₄ 5,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ e 10,0 μ L de S(IV) 5,0x10⁻³ mol L⁻¹ num volume final de 50,0 μ L.

No estudo do efeito sinérgico entre Cu(II)/G₄ e Mn(II)/G₄ a mistura dos reagentes foi feita adicionando-se: 10,0 μ L de água deionizada, 10,0 μ L da solução de dGuo 4,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, 10,0 μ L de Cu(II)/G₄ 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, 10,0 μ L de Mn(II)/G₄ 5,0x10⁻⁶ mol L⁻¹ e 10,0 μ L de S(IV) 5,0x10⁻³ mol L⁻¹. O volume final foi de 50,0 μ L.

Para o estudo do efeito sinérgico entre Cu(II)/G₄ e Ni(II)/G₄ a solução utilizada do complexo de Cu(II)/G₄ continha níquel em concentração 1000 vezes menor de tal forma que uma concentração final de Cu(II)/G₄ 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ deveria de conter de Ni(II)/G₄ 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹. Desta forma a mistura dos reagentes no estudo do efeito sinérgico

entre Cu(II) e Ni(II) foi realizada da seguinte forma: adicionou-se 20 μ L de água deionizada, 10,0 μ L da solução de dGuo 4,0x10⁻⁴ mol L⁻¹, 10,0 μ L de Cu(II)/G₄ 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ (contendo Ni(II) 5,0x10⁻⁷ mol L⁻¹) e 10,0 μ L de S(IV) 5,0x10⁻³ mol L⁻¹. O volume final foi de 50,0 μ L.

Em todos os casos as concentrações das soluções logo após a mistura estão apresentadas nas legendas das figuras. Após 2 minutos de iniciada a reação, 20,0 μL da mistura reacional foi injetada no cromatógrafo a fim de quantificar o produto da oxidação da dGuo: a 8-oxodGuo. Cada teste foi realizado em triplicata.

A quantidade de dGuo que não reagiu foi determinada com o detector UV em 254 nm, enquanto que a 8-oxodGuo formada foi determinada com o detector amperométrico polarizado em +600 mV.

As soluções estoque de dGuo 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ e 8-oxodGuo 1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹ empregadas nos testes foram sempre mantidas em banho de gelo a fim de evitar a sua decomposição.

Em todos os testes foram empregadas soluções saturadas com ar, onde a concentração de oxigênio pode ser considerada como $2,5x10^{-4}$ mol L⁻¹. A temperatura de trabalho foi 25 °C e o pH das soluções foi ajustado em torno de 7,0 pela adição de microlitros de NaOH 0,1 mol L⁻¹ ou HCIO₄ 0,1 mol L⁻¹.

V.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dGuo, núcleobase mais facilmente oxidável do DNA, é oxidada a 8-oxodGuo $(E^{o}_{8-OxodG/G^{*+}} = 0,58 \text{ V})^{[151]}$ na presença de Cu(II)/G₄, traços de íon metálico (como

Ni(II)/ G_4 , Co(II)/ G_4 ou Mn(II)/ G_4), S(IV) e oxigênio, havendo formação de Cu(III)/ G_4 e radicais óxidos de S(IV), os quais podem oxidar a dGuo. O esquema I (capítulo II, página 63) representa as reações envolvidas.

Quando as seguintes soluções: (1). dGuo 0,08 mmol L⁻¹; (2). dGuo 0,08 mmol L⁻¹ e Cu(II) 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹; (3). dGuo 0,08 mmol L⁻¹ e S(IV) 1,0x10⁻³ mol L⁻¹; e (4). dGuo 0,08 mmol L⁻¹ e G₄ 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ foram injetadas na coluna cromatográfica não foi detectada a formação do produto 8-oxodGuo, mostrando que a dGuo nessas condições não foi oxidada.

Na presença de sulfito, a dGuo somente é oxidada quando os íons metálicos Cu(II), Ni(II), Co(II) ou Mn(II) estão presentes, conforme serão descritos nos itens seguintes.

Com a finalidade de quantificar a dGuo e 8-oxodGuo foram obtidas previamente curvas analíticas para ambas espécies. A curva analítica da dGuo foi obtida a partir da injeção de 20,0 µL na coluna cromatográfica das soluções padrões de 5,0x10⁻⁵ mol L⁻¹, 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ e 2,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ obtendo-se a curva analítica apresentada na figura 1. A curva analítica da 8-oxodGuo foi obtida também pela injeção na coluna cromatográfica de 20,0 µL das soluções padrões de 5,0x10⁻⁸ mol L⁻¹, 15,0x10⁻⁸ mol L⁻¹, 30,0x10⁻⁸ mol L⁻¹, 50,0x10⁻⁸ mol L⁻¹ e 60,0x10⁻⁸ mol L⁻¹, obtendo-se a curva analítica foram obtidas diariamente, momentos antes dos estudos.







Figura 2. Curva Analítica para quantificação da 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodGuo). Equação da reta: Area = 94.858,20 m_{B-oxodGuo} (pmol) - 41,23 ($r^2 = 0,9999$).

V.3.1 Efeito sinérgico de Cu(II)/G₄ e Ni(II)/G₄

A técnica cromatográfica permitiu avaliar a oxidação da dGuo na presença de oxigênio, S(IV), Ni(II)/G₄ ou Cu(II)/G₄ na mistura Cu(II)/G₄ e Ni(II)/G₄.

Quando S(IV) foi adicionado a uma solução contendo dGuo e Ni(II)/ G_4 (0,1 mmol L⁻¹) foi observado uma formação muito pequena de 8-oxodGuo, como se observa no cromatograma da figura 3A.

A figura 3B apresenta o cromatograma obtido após adição de S(IV) à mistura dGuo e Cu(II)/G₄ (1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹): verifica -se que na presença desse complexo ocorre a oxidação da dGuo em maior extensão. No entanto, quando o mesmo experimento foi realizado na presença de S(IV), Cu(II)/G₄ (1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹) e traços de Ni(II) (1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹) a oxidação da dGuo foi mais intensa (área do pico foi maior) como mostra a figura 3C e portanto com maior formação do produto 8-oxodGuo. Como apresentado na tabela 1 na presença de Cu(II)/G₄ e Ni(II)/G₄ a concentração do produto oxidado é quase 50% maior do que na presença de Cu(II)/G₄ apenas, evidenciando assim o efeito sinérgico de Ni(II) na aceleração da oxidação de Cu(II)/G₄ (na presença de Ni(II), S(IV) e O₂) conforme encontrado anteriormente nos resultados espectrofotométricos.



Figura 3. Efeito sinérgico entre Cu(II) e Ni(II) na formação do produto 8-oxodGuo. Cromatogramas obtidos para: **(A)**. dGuo $8,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ + Ni(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; **(B)**. dGuo $8,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; **(C)**. dGuo $8,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-7}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-7}$ mol

Tabela 1. Valores de concentração encontrados na formação do produto 8-oxodGuo no efeito sinérgico entre Cu(II) e Ni(II). (**A**) dGuo $8,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ + Ni(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; (**B**). dGuo $8,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; (**C**). dGuo $8,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-7}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + Ni(II)/G₄ $1,0x10^{-7}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹. pH = 7,0; T = 25 °C. Soluções saturadas com ar. Conforme dados reportados na figura 3.

Áreas* Desvio padrão das áreas Conc. média 8-oxodGu		Conc. média 8-oxodGuo /µmol L ⁻¹		
А	46429	2150	0,02	
В	432289	25361	0,23	
С	913874	49364	0,48	

* média de 3 experimentos

a). Oxidação de 2'-deoxiguanosina (dGuo) na presença de oxigênio, S(IV), Ni(II) e Cu(II). Influência da presença de tetraglicina.

As figuras 4 e 5 apresentam cromatogramas referentes à detecção de 8-oxodGuo, produzido da reação de S(IV) 1,0x10⁻³ mol L⁻¹, Cu(II) 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ complexado ou não (contendo 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ de Ni(II)) e dGuo 8,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ em pH 7,0. Os picos A e B (figura 4) foram obtidos quando S(IV) e Cu(II) (na presença de traços de Ni(II)), complexado ou não com G₄, foram adicionados à solução de dGuo respectivamente. Neste caso, observa-se que quando Cu(II) e Ni(II) estão complexados à G₄ a reação de oxidação é mais efetiva. Assim, comparando-se os cromatogramas das figuras 4A e 4B, observa-se o efeito sinérgico do Ni(II) e Cu(II).

A figura 5 refere-se ao mesmo experimento acompanhando-se a diminuição da concentração de dGuo. Na presença de Cu(II)/tetraglicina, Ni(II) e S(IV), houve um consumo maior de dGuo (menor área de pico figura 5C).

Estudos por eletroforese em gel de agarose (apresentados no capitulo IV, página 133) mostraram que a lesão ao DNA foi quase a mesma empregando-se Cu(II) complexado ou não. A técnica cromatográfica por ser mais sensível permitiu avaliar melhor o efeito da tetraglicina como complexante de Cu(II) nestes estudos.



Figura 4. Cromatogramas obtidos por detecção amperométrica de 8-oxodGuo.

 $[Cu(II)] = [Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-4} \text{ mol } L^{-1}; [Ni(II)] = 1,0x10^{-7} \text{ mol } L^{-1}; pH = 7,0; [S(IV)] = 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}; [dGuo] = 8,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1}; T = 25 \text{ °C}.$ Soluções saturadas com ar.

- $\textbf{A.} \qquad dGuo + Cu(II)/G_4 + Ni(II)/G_4 + S(IV)$
- **B.** dGuo + Cu(II) + Ni(II) + S(IV)
- **C.** dGuo + Cu(II)/G₄ + S(IV)



Figura 5. Cromatogramas obtidos por detecção espectrofotométrica da dGuo.

 $[Cu(II)] = [Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-4} \text{ mol } L^{-1}; [Ni(II)] = 1,0x10^{-7} \text{ mol } L^{-1}; pH = 7,0; [S(IV)] = 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}; [dGuo] = 8,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1}; T = 25 \text{ °C}.$ Soluções saturadas com ar. (mesmas condições da figura 4).

- A. dGuo
- **B.** dGuo + Cu(II) + Ni(II) + S(IV)
- **C.** dGuo + Cu(II)/ G_4 + Ni(II)/ G_4 + S(IV)

Como observado nos cromatogramas das figuras 4 e 5, empregando-se o íon metálico complexado, o produto da oxidação (8-oxodGuo) foi aproximadamente 30 % maior do que na ausência de G₄.

Baseando-se nesses resultados pode-se efetuar algumas considerações sobre a oxidação da dGuo, levando em consideração os potenciais de redução das espécies envolvidas.

Avaliando os potencias de redução na presença de Cu(II) não complexado, a oxidação de dGuo ($E^{o}_{8-oxodGuo/dGuo} = 1,29 V$) ^[151] pelo Cu(II) ($E^{o}_{Cu(II)/Cu(I)} = 0,153 V$) ^[151], não é termodinamicamente favorável. De modo que quando uma amostra contendo a mistura dGuo + Cu(II) (na ausência de S(IV) e G₄) foi introduzida na coluna, não houve formação de (8-oxodGuo). No entanto, na presença de Cu(II) (contendo traços de Ni(II)), S(IV) e oxigênio, a dGuo é oxidada (figuras 4 e 5). Vários estudos reportados na literatura ^[149] indicam a formação de radicais de óxidos de enxofre quando a oxidação de S(IV) pelo oxigênio acontece na presença de íons metálicos de transição (Cu(II), Ni(II), Mn(II), Fe(II) e Co(II)) não complexados. No entanto a dGuo é um agente complexante, e pode complexar com o Cu(II) alterando o seu potencial de redução.

O potencial de redução do complexo $[Cu^{III}(H_{-2}G_4)] (E^o[Cu^{III}(H_{-2}G_4)]/[Cu^{II}(H_{-2}G_4)]^- = 1,1 V)$ em pH = 7,0 ^[152], também não é suficientemente alto para que a oxidação da dGuo seja favorável. Assim, a oxidação da dGuo na presença de Cu(II)/G₄ (contendo traços de Ni(II)), S(IV) e oxigênio ocorre devido a radicais gerados durante a oxidação de S(IV) catalisada por Cu(II)/G₄. A eficiência da formação dos radicais de óxidos de enxofre e Cu(III)/G₄ é maior que no caso da catálise de oxidação de S(IV) por Cu(II) não complexado. Esta hipótese em princípio explicaria a maior oxidação da dGuo observada na presença de Cu(II)/G₄ (contendo traços de Ni(II), figura 4).

No entanto os experimentos referentes à lesão de DNA, por eletroforese em gel de agarose revelaram que a porcentagem de "quebra" de DNA (capítulo IV, página 133) independe da presença da tetraglicina, ou seja, quando Cu(II)/Ni(II) foram adicionados, complexados ou não à G₄, ao DNA e S(IV) a porcentagem da quebra foi a mesma.

b). Influência da concentração de tetraglicina

A técnica cromatográfica permitiu mais uma vez obter um resultado mais esclarecedor do que aquele obtido pela eletroforese em gel de agarose (vide item IV.3.8, capítulo IV, página 158). O excesso de tetraglicina parece ter influência na extensão da oxidação da dGuo como observado na figura 6. A quantidade de 8-oxodGuo formada é significativamente menor com o aumento da concentração de tetraglicina em excesso.

O excesso de tetraglicina favorece a decomposição do complexo de Cu(III) ^[153], sendo que essa decomposição envolve a oxidação do ligante tetraglicina. Outra possibilidade para explicar o resultado apresentado na figura 6 é que o excesso de tetraglicina favorece a estabilidade de Cu(II)/G₄ fazendo com que a formação de um possível complexo entre Cu(II) e o dGuo seja menos provável.



Figura 6. Efeito do excesso da tetraglicina na oxidação da dGuo. Área do pico de 8-oxodGuo. $[Cu(II)/G_4] = 1,0x10^{-4} \text{ mol } L^{-1}; [Ni(II)] = 1,0x10^{-7} \text{ mol } L^{-1}; pH = 7,0; [S(IV)] = 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}; [dGuo] = 8,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1}; T = 25 \text{ °C}.$ Soluções saturadas com ar.

Nos estudos espectrofotométricos constatou-se que Cu(II), complexado ou não, pode interagir com o DNA formando possivelmente um complexo relativamente estável, observado a partir do deslocamento da banda do DNA (figura 12, capítulo II, página 84).

c). Influência de S(IV)

A concentração do S(IV) adicionada inicialmente também influência na quantidade de 8-oxodGuo formada. Assim, a figura 7 mostra que a produção de 8-oxodGuo é maior com o aumento da concentração de S(IV) na faixa de $0,2 - 0,5x10^{-3}$ mol L⁻¹. Em concentração de S(IV) maiores que $0,5x10^{-3}$ mol L⁻¹ a quantidade de 8-oxodGuo formada diminui e atinge um valor de concentração constante.

Como visto anteriormente (capítulos II e IV), nos resultados referentes a estudos espectrofotométricos e por eletroforese em gel de agarose, foi verificado que existe um balanço entre a concentração de S(IV) e oxigênio dissolvido na solução $(2,5x10^{-4} \text{ mol } \text{L}^{-1})$ que controla a formação de Cu(III). Assim em soluções contendo S(IV), em concentrações maiores que 0,5 mmol L^{-1} (em excesso com relação ao O_2 inicial 0,2 mmol L^{-1}), a formação de Cu(III)/G₄ ocorre com consumo de S(IV) e oxigênio. Restando ainda S(IV) em solução pode acontecer a redução do Cu(III) formado (equação 1) e a cadeia de reações que se segue com a formação dos radicais de óxido de enxofre (vide esquema I, capítulo II, página 63), não ocorre diminuindo assim a eficiência da oxidação de dGuo.

 $2Cu(III)/G_4 + HSO_3^- + H_2O \longrightarrow 2Cu(II)/G_4 + SO_4^{2-} + 3H^+$ [1]





V.3.2 Efeito sinérgico de Cu(II)/G₄ e Co(II)/G₄

Quando S(IV) foi adicionado a uma solução contendo dGuo e Co(II)/ G_4 (1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹) foi observado uma formação muito pequena de 8-oxodGuo como se observa no cromatograma da figura 8A.

No entanto quando S(IV) foi adicionado à mistura dGuo e Cu(II)/G₄ $(1,0x10^{-4} \text{ mol } L^{-1})$ (figura 8B) foi observado que ocorre a oxidação da dGuo em maior extensão. Quando o mesmo experimento foi realizado na presença de S(IV), Cu(II)/G₄ $(1,0x10^{-4} \text{ mol } L^{-1})$ e traços de Co(II) $(1,0x10^{-7} \text{ mol } L^{-1})$ a quantidade de 8-oxodGuo foi praticamente igual à obtida na presença de S(IV) e Cu(II)/G₄ (comparar figuras 8B, 8C e tabela 2). Verificando-se desta maneira que o efeito sinérgico entre Co(II) e Cu(II)/G₄ não é muito efetivo na oxidação de dGuo quanto aquele produzido por Ni(II)/G₄ (figura 3).

V.3.3 Efeito sinérgico de Cu(II)/G₄ e Mn(II)/G₄

O efeito sinérgico de Cu(II)/G₄ e Mn(II)/G₄ também foi observado, nesse caso empregou-se uma concentração de manganês 10 vezes maior (1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹) que a de Ni(II) (1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹) e Co(II) (1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹)^[153].



Figura 8. Efeito sinérgico entre Cu(II) e Co(II) na formação do produto 8-oxodGuo. **(A)**. dGuo 8,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ + Co(II)/G₄ 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ + S(IV) 1,0x10⁻³ mol L⁻¹; **(B)**. dGuo 8,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ + S(IV) 1,0x10⁻³ mol L⁻¹; **(C)**. dGuo 8,0x10⁻⁵ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ + Co(II)/G₄ 1,0x10⁻⁷ mol L⁻¹ + S(IV) 1,0x10⁻³ mol L⁻¹. pH = 7,0; T = 25 °C. Soluções saturadas com ar.

Tabela 2. Valores de concentração encontrados na formação do produto 8-oxodGuo no efeito sinérgico entre Cu(II) e Co(II). **(A).** dGuo $8,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ + Co(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; **(B).** dGuo $8,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; **(C).** dGuo $8,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-7}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + Co(II)/G₄ $1,0x10^{-7}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-7}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + Co(II)/G₄ $1,0x10^{-7}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹. pH = 7,0; T = 25 °C. Soluções saturadas com ar. Conforme dados reportados na figura 8.

	Áreas*	Desvio padrão das áreas	Conc. média 8-oxodGuo /µmol L ⁻¹
Α	22719	1797	0,01
В	424184	20737	0,22
С	488486	23064	0,26

* média de 3 experimentos

Desta maneira foi observado que o pico referente a formação da 8-oxodGuo obtido a partir da mistura dGuo, S(IV), Cu(II)/G₄ (1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹), Mn(II)/G₄ (1,0x10⁻⁶ mol L⁻¹) foi muito maior (figura 9C) que no caso da mistura dGuo, S(IV) e Cu(II)/G₄ (figura 9B) (tabela 3).

No caso em que a solução de S(IV) foi adicionada a uma solução contendo dGuo e $Mn(II)/G_4$ (1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹) foi observado pouca formação de 8-oxodGuo, figura 9A.

A tabela 4, apresenta os dados obtidos, permitindo uma comparação dos efeitos sinérgicos de Ni(II), Co(II) e Mn(II), presentes em concentrações pequenas na oxidação de Cu(II)/G₄ na presença de S(IV) e O₂.

V.4 CONCLUSÕES E DISCUSSÕES

Verificou-se que há uma formação maior de 8-oxodGuo na presença de $Cu(II)/G_4$, $Ni(II)/G_4$, SO_3^{2-} e O_2 comparado com o mesmo experimento realizado na ausência do ligante tetraglicina (figura 4).

O aumento da concentração de S(IV) até 0,5 mmol L⁻¹ (na presença de Cu(II)/G₄, Ni(II)/G₄ e O₂) favorece a formação da 8-oxodGuo indicando que o balanço entre a concentração de S(IV) e oxigênio deve ser considerado neste tipo de estudo. Concentrações de S(IV) maiores que 5,0 mmol L⁻¹ levam a redução de Cu(III) (figura 7).



Figura 9. Efeito sinérgico entre Cu(II) e Mn(II) na formação do produto 8-oxodGuo. (**A**). dGuo $8,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1} + \text{Mn}(II)/\text{G}_4 1,0x10^{-4} \text{ mol } L^{-1} + \text{S}(IV) 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$; (**B**). dGuo $8,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1} + \text{Cu}(II)/\text{G}_4 1,0x10^{-4} \text{ mol } L^{-1} + \text{S}(IV) 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$; (**C**). dGuo $8,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1} + \text{Cu}(II)/\text{G}_4 1,0x10^{-4} \text{ mol } L^{-1} + \text{S}(IV) 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$; (**C**). dGuo $8,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1} + \text{Cu}(II)/\text{G}_4 1,0x10^{-4} \text{ mol } L^{-1} + \text{S}(IV) 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$. pH = 7,0; T = 25 °C. Soluções saturadas com ar.

Tabela 3. Valores de concentração encontrados na formação do produto 8-oxodGuo no efeito sinérgico entre Cu(II) e Mn(II). (**A**). dGuo $8,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ + Mn(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; (**B**). dGuo $8,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; (**C**). dGuo $8,0x10^{-5}$ mol L⁻¹ + Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-6}$ mol L⁻¹ + S(IV) $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹. pH = 7,0; T = 25 °C. Soluções saturadas com ar. Conforme dados reportados na figura 9.

	Áreas*	Desvio padrão das áreas	Conc. média 8-oxodG /µmol L ⁻¹
Α	41447	1547	0,02
В	355038	17384	0,19
С	964830	33574	0,51

* média de 3 experimentos

Tabela 4. Efeito de diferentes complexos de íons metálicos com tetraglicina na formação da 8-oxodGuo. $[dGuo] = 8,0x10^{-5} \text{ mol } L^{-1}$; $S(IV) = 1,0x10^{-3} \text{ mol } L^{-1}$; pH = 7,0; T = 25 °C. Soluções saturadas com ar.

Reagentes	Concentração /µ mol L⁻¹	Desvio Padrão
1,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ G ₄	n. d.	-
1,0x10 ⁻³ mol L ⁻¹ SO ₃ ²⁻ (ausência de metal)	n. d.	-
1,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ Cu(II)/G ₄ (ausência de S(IV))	n. d.	-
1,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ Cu(II)/G ₄	0,21	0,02
1,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ Ni(II)/G ₄	0,024	0,001
1,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ Co(II)/G ₄	0,012	0,001
1,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ Mn(II)/G ₄	0,022	0,001
1,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ Cu(II)/G ₄ / 1,0x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ Ni(II)/G ₄	0,48	0,03
1,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ Cu(II)/G ₄ / 1,0x10 ⁻⁷ mol L ⁻¹ Co(II)/G ₄	0,26	0,01
1,0x10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ Cu(II)/G ₄ / 1,0x10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ Mn(II)/G ₄	0,51	0,02

n. d.: não detectado

Comparando os efeitos de diferentes íons metálicos, a formação da 8-oxodGuo é mais eficiente na presença de Cu(II)/G₄, S(IV) e oxigênio, do que em condições similares com complexos de Ni(II), Co(II) e Mn(II) (tabela 4).

Os efeitos sinérgicos de Cu(II)/G₄ traços de íons metálicos de transição estudados obedecem à seguinte ordem: Ni(II) > Mn(II) > Co(II). A formação de 8-oxodGuo foi maior quando a mistura continha dGuo + Cu(II)/G₄ (e traços de Ni(II) e Mn(II)) e S(IV).

O efeito sinérgico desses íons na formação de Cu(III) foi discutido com base nos resultados obtidos pela técnica espectrofotométrica (capítulo II). No esquema I (capítulo II, página 63) o efeito sinérgico positivo de Ni(II), Co(II) ou Mn(II) pode ser explicado através da rápida oxidação inicial de M(II) pelo oxigênio (eq. 3) formando M(III), que reage com SO_3^{2-} para formar SO_3^{--} (eq. 4). Na presença de oxigênio é formado SO_5^{--} (eq. 6). A cadeia de propagação das reações é seguida pela oxidação de Cu(II) (em maior excesso).

Os resultados obtidos por Shi e Mao ^[157], após incubação (40 minutos) à temperatura e pressão ambiente em meio contendo 3,0 mmol L⁻¹ S(IV) (em tampão fosfato, pH 7,4) e 1,0 mmol L⁻¹ dGuo mostrou pouca formação de 8-OxodGuo. Esses autores reportaram que SO₃^{•-} foi responsável pela oxidação de dGuo. Entretanto, como também discutido por Jameton *et al.* ^[158], considerando o potencial de redução deste radical essa reação é pouco provável.

No presente estudo a oxidação de dGuo, na presença de traços de Cu(II)/G₄, Ni(II)/G₄, Co(II)/G₄, Mn(II)/G₄, S(IV) e O₂, pode ocorrer por vários radicais de óxidos de enxofre.

V.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BURROWS, C. J.; PEREZ, R. J.; MULLER, J. G. e ROKITA, S. E.
 Oxidative DNA damage mediated by metal-peptide complexes.
 Pure & Appl. Chem., 70(2), 275-278, 1998.
- MULLER, J. G.; ZHENG, P.; ROKITA, S. E. e BURROWS, C. J.
 DNA and RNA Modification Promoted by [Co(H₂O)₆]Cl₂ and KHSO₅. Guanine Selectivity, Temperature Dependence, and Mechanism.
 J. Am. Chem. Soc., 1996, 118, 2320-2325.
- BRANDT, C. e VAN ELDIK, R.
 Transition Metal-Catalyzed Oxidation of Sulfur (IV) Oxides. Atmospheric –
 Relevant Processes and Mechanisms.

Chem. Rev., 1995, 95(1), 119-190.

150. HENLE, E. S.; LUO, Y.; GASSMANN, W. e LINN, S.

Oxidative damage to DNA constituents by iron-mediated Fenton reactions - The deoxyguanosine family.

J. Biol. Chem. 1996, 271(35), 21177-21186.

151. BURROWS, C. J. e MULLER, J. G.

Oxidative Nucleobase Modifications Leading to Strand Scission.

Chem. Rev., 1998, 98, 1109-1151.

152. LOWINSOHN, D.

"Estabilização de Cu(III) em meio contendo peptídeos: estudos eletroquímicos e aplicações analíticas"; São Paulo (2003). [Tese de Mestrado, Instituto de Química, USP].

153. ALIPÁZAGA, M. V.

"Autoxidação dos complexos de Cu(II), Ni(II) e Co(II)/tetraglicina induzida por S(IV)"; São Paulo (2003). [Tese de Doutorado, Instituto de Química, USP].

154. ALIPÁZAGA M. V. e COICHEV, N.

Synergistic Effect of Some Transition Metal Ions on the Sulfite Induced Autoxidation of Cu(II)/tetraglycine Complex. Analytical Applications. Anal. Lett., 2003, 36, 2255-2275.

155. ALIPÁZAGA, M. V.; LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. e COICHEV, N.

Sulfite Induced Autoxidation of Ni(II) and Co(II) tetraglycine Complexes. Spectrophotometric and Rotating Ring-Disk Voltammetric Studies. Dalton Trans., 2004, 2, 267-272.

156. ALIPÁZAGA, M. V.; MORENO, R. G. M. e COICHEV, N.

Synergistic Effect of Ni(II) and Co(II) lons on the Sulfite-Induced Autoxidation of Cu(II)/tetraglycine.

Dalton Trans., 2004, 13, 2036-2040.
157. SHI, X. e MAO, Y.

8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine formation and DNA damage induced by sulfur trioxide anion radicals.

Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1994, 205(1), 141-147.

158. JAMETON, R. A.; MULLER, J. G. e BURROWS, C. J.

Oxidative DNA Damage from Sultite Autoxidation Catalyzed by Manganese(III). C. R. Chimie 2002, 5(5), 461-466.

159. MARGERUM, D. W.; CHELLAPA, K. L. e BOSSU F. P.

Ligand Effects on the Thermodynamic Stabilization of Copper(III)-Peptide Complexes.

J. Am. Chem. Soc., 99(7), 2195-2202, 1977.

160. ALIPÁZAGA, M. V.; KOSMINSKY, L.; BERTOTTI, M. e COICHEV, N.

S(IV) Induced Autoxidation of Cu(II)/tetraglycine Complexes in the Presence of Aldehydes: Mechanistic Considerations and Analytical Applications.

Talanta 2002, 57, 375-381.

161. STEENKEN, S. e JOVANOVIC, S. V.

How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution.

J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 617-618.

162. STUART, N. J.; GOERGES, A. L. e ZALESKI, J. M.

Characterization of the Ni(III) Intermediates in the Reaction of (1,4,8,11 – Tetraazacyclotetradecane)nickel(II) Perchlorate with KHSO₅ : Implications to the Mechanism of Oxidative DNA Modification.

Inorg. Chem., 2000, 39, 5976-5984.

- 163. MULLER, J. G.; CHEN, X.; DADIZ, A. C.; ROKITA, S. E. e BURROWS, C. J. Ligand Effects Associated with the Intrinsic Selectivity of DNA Oxidation Promoted by Nickel(II) Macrocyclic Complexes J. Am. Chem. Soc., 1992, 114(16), 6407-6411.
- 164. LEPENTSIOTIS, V.; DOMAGALA, J.; GRGIC, I.; VAN ELDIK, R.; MULLER, J. G.e BURROWS, C. J.

Mechanistic Information on the Redox Cycling of Nickel(II/III) Complexes in the Presence of Sulfur Oxides and Oxygen. Correlation with DNA Damage Experiments.

Inorg. Chem., 1999, 38, 3500-3505.

165. MULLER, J. G. e BURROWS, C. J.

Metallodrug Complexes that Mediate DNA and Lipid Damage via Sulfite Autoxidation: Copper(II) Famotidine and Iron(III) bis(salicylglycine). Inorg. Chim. Acta, 1998, 275-276, 314-319.

166. ANAST, J. M. e MARGERUM, D. W.

Trivalent Copper Catalysis of the Autoxidation of Sulfite. Kinetics and the Mechanism of the Copper (III/II) Tetraglycine Reactions with Sulfite. Inorg. Chem., 1981, 20, 2319-2326. 167. PEZZA, H. R.; BONIFÁCIO, R. L. e COICHEV, N.

Oxidation of Ni(II)/cyclam and Tetraglycine Complexes by Dissolved Oxygen in the Presence of S(IV). Synergistic Effects on Mn(III) and Co(III). J. Chem. Res-M. 1999, 1520-1540.

168. PEZZA, H. R. e COICHEV, N.

Kinetics and Mechanism of the Induced Redox Reaction of $[Ni(cyclam)]^{2+}$ Promoted by SO₅ Center.

J. Coord. Chem., 1999, 47, 107-119.

169. ALIPÁZAGA, M. V.; BONIFÁCIO, R. L.; KOSMINSKY, L.; BERTOTTI, M. e COICHEV, N.

Sulfite Induced Autoxidation of Cu(II)/ tetra/ penta/ hexaglycine Complexes. Spectrophotometric and Rotating Ring-disk Glassy Carbon Electrode Studies with Analytical Potentialities.

J. Braz. Chem. Soc., 2003, 14, 713 - 721.

VI. Estudos por Ressonância Paramagnética Eletrônica
- EPR para detecção dos radicais de óxidos de enxôfre.

VI.1 Introdução

Ressonância paramagnética eletrônica (EPR), também conhecida como ressonância eletrônica do spin (ESR), é o nome dado ao processo de absorção ressonante de radiação de microondas por íons ou moléculas paramagnéticas, com pelo menos um elétron desemparelhado, e na presença de um campo magnético estático. EPR tem uma ampla aplicação em química, física, biologia e medicina. Os espectrômetros de EPR mais comumente usados estão na faixa de 9-10 GHz (banda X). No entanto, avanços em eletrônica têm facilitado o desenvolvimento de espectrômetros trabalhando em freqüências de alguns centos de MHz a alguns centos de GHz.

A espectroscopia EPR combinada com técnicas tais como "spin trapping" (captura de radicais), pode ser usada para detectar e acompanhar reações envolvendo radicais livres.

"Spin trapping" é uma técnica versátil para detectar espécies radicalares transientes (R[•]). Esta técnica tem numerosas aplicações em química e bioquímica, podendo ser usada para determinar a eficiência de vários antioxidantes para tipos específicos de radicais livres, ou a presença desses radicais sob condições experimentais variadas. O método é baseado na reação de um captador de spin ("spin trap") com espécies radicalares transientes. Esta reação gera uma espécie

paramagnética mais estável chamada de "radical aduto", que pode ser detectada e identificada por espectroscopia EPR.

O elétron está associado a dois estados de spin $\pm 1/2$, bem como o próton aos dois estados de spin nuclear, I = $\pm 1/2$. Em cada caso na ausência de um campo magnético, os dois estados de spin têm energias iguais. Se for aplicada uma radiação eletromagnética adequada, ela será adsorvida ocorrendo mudança no estado de energia do elétron devido ao desdobramento dos níveis de energia correspondentes ao momento de spin, em presença de um campo magnético. A absorção de energia gera um espectro que normalmente é registrado na forma de primeira derivada. Uma absorção espectroscópica é obtida usualmente na região de microondas, no intervalo de 10^{12} a 10^{10} Hz. Este método é bastante sensível e pode em condições favoráveis, detectar concentrações de radicais livres da ordem de 10^{-6} mol L⁻¹, permitindo ainda a observação de espécies transientes que não podem ser detectadas por outros processos.

A condição para a transição espectroscópica é dada pela equação 1:

$$hv = g \beta H$$
[1]

onde, *h* é a constante universal de Planck, *v* a freqüência da radiação, *g* o fator giromagnético, β é a constante de magnéton de Bohr e *H* o campo magnético estático.

Para interpretar os espectros EPR utilizam-se dois parâmetros. O fator *g* corresponde à absorção espectral de uma série magnética nas quais as linhas estão centradas e usualmente é 2,0023 para elétrons livres. A variação é muito pequena para radicais livres, íons dos metais de transição e outras espécies que contém elétrons desemparelhados mas não apresentam outros tipos de interação. O segundo parâmetro é o desdobramento hiperfino, que descreve a interação do elétron com núcleos magnéticos vizinhos. A constante magnética surge devido à mudança da força do campo magnético sofrido pelo elétron, resultante da influência magnética de núcleos nas proximidades. A complexidade do espectro EPR depende do número e do tipo de núcleos vizinhos. A unidade comumente usada para expressar o campo magnético em espectroscopia EPR é Gauss (G) ou Tesla (T), onde 10^{-4} T = 1G ou 1 mT = 10G.

A maior limitação para a detecção e identificação direta de radicais livres é a baixa concentração dessas espécies e o seu tempo de vida, em geral muito curto. Para obter espécies mais estáveis utiliza-se o método de captador de elétrons. Neste método, radicais livres com vida curta são quimicamente convertidos em radicais adutos mais estáveis. Esta é uma técnica indireta e, portanto, não detecta o radical primário [170]

Os captadores mais usados pertencem em geral à função nitróxido, e formam adutos radicalares cujo elétron desemparelhado ocupa um orbital π^* entre o nitrogênio e o oxigênio, geralmente representado por um híbrido, indicado na figura 1, sendo a deslocalização eletrônica responsável pela estabilidade desses radicais:



Figura 1. Radical nitróxido

O espectro EPR de nitróxidos é caracterizado por um desdobramento hiperfino largo devido ao nitrogênio (a_N), que é o resultado da interação do elétron livre com o momento magnético nuclear do nitrogênio (I = 1).

Os captadores também podem ser do tipo nitrona, representado na figura 2, como por exemplo o fenil-terc-butil nitrona (PBN) e o 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO), adequados para detectar radicais RO[•] (t-BuO[•], EtO[•], MeO[•], HO[•]).



Figura 2. Captador de spin fenil-terc-butil nitrona (PBN)

Entretanto, para obter um resultado significativo, o captador deve apresentar as seguintes características: ser inerte com todos os reagentes do sistema, exceto com o radical livre; a reação do captador de spin com o radical deve ser rápida para que sejam minimizados os efeitos de reações competitivas; ter vida mais longa que as dos radicais

livres iniciais, para que possam ser facilmente detectados e, finalmente, os parâmetros EPR dos captadores devem ser sensíveis à natureza dos radicais a serem capturados.

VI.2 PARTE EXPERIMENTAL

VI.2.1 Reagentes

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de pureza analítica (Merck, Aldrich ou Sigma) e água deionizada pelo sistema Nanopure - Ultrapure Water System da Barnstead, 18 mol L⁻¹ Ω cm⁻¹.

A. Solução de S(IV) 2,0x10⁻³ mol L⁻¹

A solução de sulfito 0,01 mol L^{-1} foi preparada diariamente dissolvendo-se 0,0969 g de Na₂S₂O₅ em 100,0 mL de água deionizada isenta de oxigênio (previamente borbulhada com nitrogênio).

Uma solução de S(IV) 2,0x10⁻³ mol L⁻¹ foi preparada diluindo a solução estoque $(1,0x10^{-2} \text{ mol L}^{-1})$ em água deionizada na proporção 1: 5.

B. Solução de Cu(II)/G₄ 0,02 mol L⁻¹

A solução estoque do íon metálico de Cu(II) 0,2 mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo o sal Cu(ClO₄)₂ (Sigma) em água deionizada. Esta solução também contem Ni(II) $2,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ como impureza. A solução de Cu(II)/tetratraglicina $2,0x10^{-2}$ mol L⁻¹ foi preparada dissolvendo 0,0537 g de tetraglicina em 10,0 mL de água deionizada seguida pela adição de 1,1 mL de solução 0,2 mol L⁻¹ Cu(ClO₄)₂ (também contendo Ni(II) $2,0x10^{-4}$ mol L⁻¹). Esta solução foi preparada minutos antes dos experimentos.

VI.2.2 Procedimento Experimental

A geração dos radicais livres de óxidos de enxôfre durante a reação dos complexos de M(II) com S(IV) foi monitorada e os espectros foram registrados em um espectrômetro EPR da Bruker, modelo ER-200, operando na banda X (v = 9,33 GHz) e modulado em 100 KHz. O captador de spin (spin trap) usado para detectar os radicais de óxidos de enxofre foi o 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO)^[171].

Os desdobramentos hiperfinos foram medidos diretamente da separação de campo magnético usando o programa Bruker WinEPR System versão 2,11.

Imediatamente após a adição de Cu(II)/G₄ a uma solução saturada com ar contendo DMPO (100 mmol L⁻¹) e S(IV) (pH = 7,0), 100 μ L da mistura reacional foram transferidas para uma cela de quartzo achatada para o registro do espectro EPR a temperatura ambiente. Os reagentes foram misturados em um volume total de 200 μ L. As concentrações finais, após a mistura estão indicadas na legenda da figura 4.

VI.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para verificar a formação de radicais de óxidos de enxofre durante a autoxidação de S(IV) alguns testes foram realizados usando a técnica de EPR. Neste caso, o captador de spin usado, DMPO, na presença do radical sulfito, forma o radical aduto DMPO/SO₃^{•-} como mostrado na figura 3.



Figura 3. Spin trapping do radical transiente SO₃⁻⁻ por DMPO ^[172].

Uma solução contendo apenas S(IV) 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ gerou um sinal pequeno do espectro do spin aduto (figura 4A); este sinal provavelmente é devido à catálise da autoxidação de S(IV) por ions metálicos de transição (especialmente Fe(III)) em níveis de traços, presentes como impurezas provenientes dos reagentes.

O espectro obtido de uma solução de Cu(II)/G₄ 1,0x10⁻³ mol L⁻¹ (figura 4B) mostrou um quarteto 1: 2: 2: 1 com os seguintes desdobramentos hiperfinos: $a_N = a_H =$ 14,9 G, onde a_N e a_H representam as constantes dos desdobramentos hiperfinos do nitrogênio nitroxil e do hidrogênio- α respectivamente. Baseado no formato do espectro e nos valores dos desdobramentos hiperfinos, este espectro EPR foi atribuído ao aduto DMPO/HO[•], fornecendo evidencias da geração de HO[•] a partir da oxidação do complexo de Cu(II)/G₄ pelo oxigênio dissolvido (eq. 3, esquema I, capítulo II, página 63).

O espectro obtido pela mistura de S(IV) $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ e Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹ (figura 4C) revela os desdobramentos hiperfinos de $a_N = 14,6$ e $a_H = 16,0$ G. O formato do espectro e os valores dos desdobramentos hiperfinos encontrados estão em boa concordância com os reportados previamente para o aduto DMPO/SO₃^{•-} ($a_N = 14,7$ G e $a_H = 15,9$ G) ^[172]. Desta forma, foi verificada a formação do radical SO₃^{•-} como resultado da autoxidação de S(IV) catalizada pelo complexo de Cu(II)/G₄.

A figura 4, D-F, mostra que o sinal do aduto DMPO/SO₃^{•-} diminui lentamente com o tempo, não sendo mais observado após 12 minutos. No entanto, o aduto DMPO/HO[•] é observado em um tempo mais longo com uma intensidade relativamente alta. Este fato indica que não somente SO₃^{•-} mas também o radical HO[•] é formado na reação estudada.

Os resultados obtidos estão em completa concordância com o mecanismo proposto (esquema I, capítulo II, página 63), que envolve a formação inicial do radical SO₃^{•-} (eqs. 5 e 6, esquema I, capítulo II, página 63) seguida por uma cadeia de reações de oxidorredução (eqs. 7-12, esquema I, capítulo II, página 63).



Figura 4. Espectros EPR do radical aduto DMPO, registrados 50 s após ínicio da reação de uma solução (pH = 7,4) contendo DMPO 0,1 mol L⁻¹ e os seguintes reagentes: **(A).** S(IV) $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹; **(B).** Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹; **(C).** S(IV) $1,0x10^{-4}$ mol L⁻¹ e Cu(II)/G₄ $1,0x10^{-3}$ mol L⁻¹. **(D)**, **(E)** e **(F)** igual que em **(C).** após 6, 12 e 18 min, respectivamente. Os parâmetros do espectrômetro de EPR foram: potência, 20mW; amplitude de modulação, 1,0 G; tempo constante, 163,8 ms; velocidade de varredura, 0.596G/s e ganho, 2,5x10⁵.

Não é surpresa que outros radicais, como SO₄^{•-}, SO₅^{•-} ou HO[•] não tenham sido observados por EPR, uma vez que o DMPO foi mantido em excesso suficiente quando a reação foi iniciada, de modo que todo o radical SO₃^{•-} foi captado assim que se formou. Neste caso o ciclo de oxidorredução foi interrompido pela formação do aduto DMPO/SO₃^{•-}. No entanto, na ausência de um captador de spin, o radical sulfito pode reagir rapidamente com O₂, como mostrado na eq. 7 (esquema I, capítulo II, página 63), para gerar SO₅^{•-}. As reações subseqüentes podem gerar SO₄^{•-} e HO[•]. A lesão ao DNA, observada durante a autoxidação de S(IV) na presença de Cu(II)/G₄, não pode ser causada pelo radical SO₃^{•-}, devido ao seu potencial de redução baixo (E^oSO₃^{•-}/SO₃²⁻ = 0,76 vs E.N.H.) ^[174], e sua reatividade alta pelo O₂. Portanto a lesão no DNA deve ocorrer devido à presença de outros radicais fortemente oxidantes capazes de lesar o DNA. Conforme discutido no capítulo VII a seguir.

VI.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

170. TORDO, P.

Electron Paramagnetic Resonance, 1998, 16, 116.

171. SHI, X.

Generation of SO_3^{-} and OH Radicals in SO_3^{2-} Reactions with Inorganic Environmental Pollutants and Its Implications to SO_3^{2-} Toxicity.

J. Inorg. Biochem., 1994, 56, 155-165.

172. MOTTLEY, C. e MASON, R. P.

Sulfate Anion Free-Radical Formation by the Peroxidation of (Bi)Sulfite and its Reaction with Hydroxyl Radical Scavengers. Arch. Biochem. Biophys., 1988, 267, 681-689.

- 173. MULLER, J. G.; CHEN, X.; DADIZ, A. C.; ROKITA, S. E. e BURROWS, C. J.
 Ligand Effects Associated with the Intrinsic Selectivity of DNA Oxidation
 Promoted by Nickel(II) Macrocyclic Complexes.
 J. Am. Chem. Soc., 1992, 114 (16), 6407-6411.
- 174. BRANDT, C. e VAN ELDIK, R.

Transition Metal-Catalyzed Oxidation of Sulfur (IV) Oxides. Atmospheric – Relevant Processes and Mechanisms.

Chem. Rev., 1995, 95, 119-190.

VII. Conclusões e discussões

VII.1 Conclusões e discussões

Após cada capítulo conclusões e discussões parciais foram relatadas. A seguir uma abordagem mais geral é discutida.

 Na oxidação de S(IV) na presença de oxigênio e complexos de Cu((II), Ni(II) e Co(II) com tetraglicina ocorre simultaneamente o consumo de oxigênio e a formação dos complexos com íons metálicos no estado de valência 3+. O processo autocatalítico envolve a formação de radicais livres de óxidos de enxofre, HSO₅⁻ e HO[•].

A formação de Cu(III)/G₄ pôde ser acompanhada pela absorbância em 260 nm (soma de Cu(III)/G₄, Cu(II)/G₄ e DNA) e 365 nm (Cu(III)/G₄). A banda de absorção ao redor de 260 nm é afetada pela interação entre DNA e Cu(II)/Cu(III)/G₄ resultando em hipercromismo e é deslocada para comprimentos de onda maiores. A partir dos dados espectrofotométricos verificou-se que Cu(III)/G₄ permanece estável em solução na presença de DNA.

Os complexos de Cu(II)/G₄ e Cu(III)/G₄, de estrutura quadrado planar, podem se ligar à dupla hélice de DNA de modos diferentes, dependendo da acidez do meio, uma vez que a carga do complexo varia.

 Evidências adicionais da interação de CT - DNA e Cu(II)/G₄ foram obtidas por medição de espectros UV de dicroísmo circular, com variação na banda do DNA.

- 3. Pela técnica de EPR, empregando-se DMPO em grande excesso com relação a S(IV), foi possível detectar a formação do radical SO₃^{•-} em uma solução saturada com ar contendo Cu(II)/G₄ e S(IV). Na ausência de S(IV), Cu(II)/G₄ é lentamente oxidado pelo oxigênio, nessas condições foi possível obter evidências de formação do radical HO[•]. Os demais radicais não foram detectados uma vez que o "captador de radicais" DMPO foi usado em grande excesso com relação a S(IV), sendo o radical SO₃^{•-} inicialmente formado consumido e a cadeia de reações interrompida.
- 4. Por eletroforese em gel de agarose verificou-se que a porcentagem de quebra da fita de DNA aumenta com a concentração de S(IV) até 0,5x10⁻³ mol L⁻¹ na presença de Cu(II)/G₄ 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ e traços de Ni(II). Em concentrações maiores de S(IV) a porcentagem da forma circular aberta diminui, fato esse que pode ser explicado pela concentração baixa de oxigênio ainda presente em solução.

 $Cu(III)/G_4$ na ausência de S(IV) induziu uma pequena lesão no DNA.

Os resultados demonstraram que a perda da forma nativa ou enovelada não é controlada pela tetraglicina coordenada ao Cu(II), o que pode ser atribuído à proximidade de Cu(II) ou Cu(II)/G₄ aos anéis da ribose do DNA.

Os danos ao DNA em meios não tamponados (pH 7,0 e 9,0) foram aproximadamente os mesmos. Entretanto em meio tamponado com borato (pH 9,0) nenhum dano foi observado, embora a reação de autoxidação de S(IV) com formação de Cu(III)/G₄ tenha ocorrida. A interferência do ânion borato pode ser explicada pela formação de complexos com açúcares pelo grupo OH.

Em excesso de Cu(II)/G₄ (1,0x10⁻³ mol L⁻¹), S(IV) (5,0x10⁻⁵ mol L⁻¹) e DNA (5,0X10⁻⁶ g mL⁻¹) nenhuma quebra na fita de DNA foi verificada, uma vez que o complexo de Cu(II)/G₄ em excesso é preferencialmente oxidado a Cu(III) pelos radicais formados.

5. A oxidação da 2'-deoxiguanosina foi estudada em uma mistura contendo Cu(II), Ni(II), Co(II) ou Mn(II) (complexado ou não com G₄) e S(IV). Comparando o efeito dos íons metálicos diferentes (na mesma concentração 1,0x10⁻⁴ mol L⁻¹) a formação de 8-oxodGuo é mais eficiente na presença de Cu(II)/G₄ do que na presença de Ni(II)/G₄, Co(II)/G₄ ou Mn(II)/G₄, e aumenta com a concentração de S(IV).

O acréscimo na formação de 8-oxodGuo foi observado quando traços de Ni(II) ou Mn(II) foram adicionados à solução de Cu(II) e S(IV), evidenciando o efeito sinérgico desses íons metálicos.

6. A maioria dos estudos reportados na literatura referentes à lesão no DNA por Cu(II) utilizaram KHSO₅, um oxidante forte. Conforme verificado no presente trabalho esse oxidante sozinho foi capaz de induzir lesão no DNA. O único estudo realizado na presença de S(IV) envolve o uso de cobre(II)/famotidina (uma droga anti-ulcera)^[175] como um catalisador; algumas especulações são feitas em relação às espécies responsáveis pela lesão no DNA, sem confirmações precisas. No presente estudo envolvendo o sistema Cu(II)/G₄/S(IV)/O₂, foi verificada pela primeira vez a formação dos radicais livres SO₃^{•-} em reações deste tipo, sugerindo que espécies fortemente oxidantes como SO5^{•-}, SO4^{•-}, HO[•] e HSO5⁻ podem ser formadas, as quais causariam a lesão no DNA observada. Nossos resultados também permitiram avaliar o efeito sinérgico de dois íons metálicos de transição na lesão no DNA.

As espécies fortemente oxidantes, formadas no ciclo de oxidorredução de Cu(II)/Cu(III)/G₄ (eqs. 7-12, esquema I, pág. 63), podem oxidar qualquer um dos quatro nucleosídeos do DNA. No entanto, a guanina é a mais susceptível de sofrer oxidação, apresentando $E^{o}(Guo \cdot /Guo) = 1,29$ V vs E.N.H. ^[176]. Por outro lado, considerando que o potencial de redução da guanina na molécula do DNA pode ser menor ^[176], [Cu^{III}(H₂G₄)] (E° = 1,1 V vs. E.N.H.) ^[177] também é uma espécie provável para oxidar a guanina. Isto foi verificado em estudos por eletroforese em gel de agarose, onde o complexo de Cu(III)/G₄ (gerado por oxidação espontânea após 5 horas de preparo) induziu lesão no DNA na ausência de S(IV) (formando 28% da forma OC). Já na presença de S(IV), Cu(II) e oxigênio, Cu(III) não sería a única espécie responsável pela observada maior lesão ao DNA, os radicais livres de óxidos de enxôfre também estão envolvidos.

O radical SO₃^{•-} (E^oSO₃^{•-}/SO₃²⁻ = 0,76 vs E.N.H.) ^[178], inicialmente formado (eqs. 4 e 5, esquema I, página 63) é uma espécie pouco provável de oxidar a guanina devido ao seu potencial baixo de redução. No entanto, o ânion HSO_5^{-} (E^oHSO₅^{-/}/SO₄²⁻ = 1,75 vs E.N.H.) ^[178] e os radicais SO₄^{•-} radical (E^oSO₄^{•-}/SO₄²⁻ = 2,43 – 3,08 vs E.N.H.) e (E^oHO^{-/}/HO[•] = 2,31 vs E.N.H.) podem facilmente oxidar não só a guanina mas também aos outros nucleosídeos.

A identificação exata das espécies responsáveis pela lesão no DNA, induzida pela autoxidação de S(IV) catalisada por íons complexos metálicos, até agora não foi possível. No entanto ficou claro que a natureza do íon metálico, concentração dos reagentes (íon metálico, S(IV) e oxigênio), acidez do meio, natureza do tampão e tempo de incubação influenciam na porcentagem de quebra da fita de DNA.

VII.2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

175. MULLER, J. G. e BURROWS, C. J.

Metallodrug Complexes that Mediate DNA and Lipid Damage via Sulfite Autoxidation: Copper(II) Famotidine and Iron(III) bis(salicylglycine). Inorg. Chim. Acta, 1998, 276, 314-319.

176. STEENKEN, S. e JOVANOVIC, S. V.

How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution.

J. Am. Chem. Soc., 1997, 119, 617-618.

177. MARGERUM, D. W.; CHELLAPA, K. L. e BOSSU F. P.

Ligand Effects on the Thermodynamic Stabilization of Copper(III)-Peptide Complexes.

J. Am. Chem. Soc., 99(7), 2195-2202, 1977.

178. BRANDT, C. e VAN ELDIK, R.

Transition Metal-Catalyzed Oxidation of Sulfur (IV) Oxides. Atmospheric – Relevant Processes and Mechanisms.

Chem. Rev., 1995, 95, 119-190.

Curriculum Vitae

RUBEN GREGORIO MORENO MORENO

Local e data de nascimento

Callao, Lima, 09 de agosto de 1972

FORMAÇÃO ACADÉMICA

- □ 1983 Colégio Junior César de los Rios, Callao/Lima Peru.
- □ 1989 Colégio Republica de Venezuela, Callao/Lima Peru.
- 1998 Bacharelado em Química, pela Faculdade de Ciências da Universidad de Ingenieria, UNI - Perú.
- 2001 Mestrado em Ciência, Área de Química Analítica, pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Orientadora Profa. Dra. Elisabeth de Oliveira – Dissertação de mestrado: Determinação de mercúrio em amostras ambientais por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite com superfície modificada).
- 2005 Doutorado em Ciência, Área de Química Analítica, pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo (Orientadora Profa. Dra. Nina Coichev Tese de Doutorado: Estudos de lesão ao DNA promovido pela autoxidação de S(IV) na presença de complexos de Cu(II)/tetraglicina. Efeito sinérgico de Ni(II), Co(II) e Mn(II).).

PUBLICAÇÕES

RESUMOS EM CONGRESSOS, REUNIÕES E SIMPÓSIOS INTERNACIONAIS

- Moreno, R. G. M.; Pedrotti, J. J.; Oliveira, E. e Oliveira, P. V. Tubo de grafite modificado eletroquimicamente para determinação de mercúrio em água e sedimentos por espectrometria de absorção atômica com aplicação eletrotérmica. Sixth Rio Symposium on Atomic Spectrometry, Dezembro/2000, Concepción - Pucón, Chile, (apresentação oral).
- Moreno, R. G. M.; Pedrotti, J. J.; Oliveira, E. e Oliveira, P. V. *Estudo de modificadores químicos permanentes para a determinação de mercúrio por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica*. 10º Encontro Científico Internacional 2000 ECI 2000, Janeiro/2000, Lima, Perú, (apresentação oral).
- Moreno, R. G. M.; Pedrotti, J. J.; Oliveira, E. e Oliveira, P. V. Graphite Tube Permanent Modification by Electrodeposition for Gas Trapping in Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry. Seventh Rio Symposium on Atomic Spectrometry de 7 a 12 de abril do 2002, realizado em Praia Mole – Florianópolis – SC – Brazil (apresentação de painel).
- Moreno R. G. M.; Alipázaga, M. V.; Medeiros, M. H. G. e Coichev, N. 8-oxy-7,8dihydro-2'-deoxyguanosine formation by the S(IV) induced autoxidation of Cu(II), Ni(II) Co(II) and Mn(II) tetraglycine complexes. XII Brazilian Meeting on Inorganic Chemistry. II Joint Brazilian / Italian Meeting on Inorganic Chemistry. São Carlos –SP, 2004, p. 110 (apresentação de painel).

5. Moreno R. G. M.; Alipázaga, M. V.; Medeiros, M. H. G. e Coichev, N. Estudo do efeito sinérgico na lesão a 2'-deoxiguanosina a partir da formação de Cu(III)/tetraglicina e radicais de enxofre. XXVI Congresso Latino-americano de Química e 27a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química SBQ e WORKSHOP em Química Ambiental realizado de 28 de maio a 02 de junho de 2004 em Salvador – Bahia (apresentação de painel).

RESUMOS EM CONGRESSOS, REUNIÕES E SIMPÓSIOS NACIONAIS

- Fili, S. P.; Correia, P. R. M.; Porfírio, D. M.; Cesário, J. M.; Moreno, R. G. M.; Oliveira, E. e Oliveira, P. V. *Determinação de nutrientes em suco de laranja pela técnica de Emissão Atômica de Plasma de Argônio Induzido.* 10^o Encontro Nacional em Química Analítica - ENQA, agosto - setembro/1999, Santa Maria, RS, (apresentação de painel).
- Moreno, R. G. M.; Oliveira, E.; Pedrotti, J. J. e Oliveira, P. V. Modificador Permanente de paládio eletrodepositado sob fluxo contínuo em forno de grafite para determinação de mercúrio por espectrometria de Absorção Atômica. 23^a Reunião Anual - Sociedade Brasileira de Química, Maio/2000, Poços de Caldas, MG (apresentação de painel).
- Moreno, R. G. M.; Alipázaga, M. V.; Medeiros, M. H. G. e Coichev, N. Lesão ao DNA pelo complexo de Cu(III)/tetraglicina. 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), realizada de 26 a 29 de maio de 2003 em Poços de Caldas, MG (apresentação de painel).

- Moreno, R. G. M.; Alipázaga, M. V.; Medeiros, M. H. G. e Coichev, N. *Estudo da lesão ao DNA promovida pela autoxidação de sulfito na presença de complexos de Cu(II)/tetraglicina*. XII Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA). São Luiz Maranhão, 2003, p. 46. (apresentação de painel).
- Alipázaga, M. V.; Moreno, R. G. M. e Coichev, N. Determinação de sulfito em vinhos e sucos por detecção espectrofotométrica do complexo Cu(III)/tetraglicina.
 XII Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA). São Luiz Maranhão, 2003, p. 12. (apresentação de painel).
- Alipázaga, M. V.; Moreno, R. G. M.; Medeiros, M. H. G. e Coichev, N. *Quantificação da oxidação de 2'-deoxiguanosina E Lesão ao DNA na presença de Sulfito e Ni(II).Gly-Gly-His.* XIII Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA) e 1º Congresso Ibero-Americano de Química Analítica. Niterói - Rio de Janeiro, 2005. (apresentação de painel).

Artigos Submetidos e publicados

 Moreno, R. G. M., Alipázaga, M. V., Gomes, O. F., Medeiros, M. H. G., Augusto, O., e Coichev, N. (2005) Complementary studies on DNA damage and 2'deoxyguanosine oxidation induced by S(IV) autoxidation catalyzed by copper(II) tetraglycine complexes. Synergistic effect. *Dalton Trans.*, submetido.

- Moreno, R. G. M., Alipázaga, M. V., Medeiros, M. H. G. e Coichev, N. (2005) Lesões em DNA induzidas pela autoxidação de S(IV) na presença de íons metálicos de transição. *Química Nova.*, aceito.
- Alipázaga, M. V., Moreno, R. G. M., Linares, E., Medeiros, M. H. G. e Coichev, N. (2005) Oxidative DNA Damage Induced by autoxidation of Microquantities of S(IV) in the presence of Ni(II).Gly-Gly-His. *Dalton Trans.*, 23, 3738-3744.
- Carvalho, L. B.; Alipázaga, M. V.; Moreno, R. G. M.; Coichev, N. (2005) Further studies on the synergistic effect of Ni(II) and Co(II) ions on the sulfite induced autoxidation of Cu(II) penta and hexaglycine complexes. *J. Coord. Chem.*, submetido.
- Moreno, R. G. M., Alipázaga, M. V., Medeiros, M. H. G. e Coichev, N. (2005) DNA Damage Induced by sulfite autoxidation catalyzed by copper(II)tetraglycine complexes. *Dalton Trans.*, 6, 1101-1107.
- Alipazága, M. V., Moreno, R. G. M. e Coichev, N. (2004) Positive Synergistic Effect of Ni(II) and Co(II) Ions on the Sulfite-Induced Autoxidation of Cu(II)/tetraglycine. *Dalton Trans.*, 13, 2036-2040.
- Moreno, R. G. M., Oliveira, E., Oliveira, P. V. e Pedrotti, J. J. (2001) Uma célula eletroquímica em fluxo para modificação permanente de tubo de grafite empregado em absorção atômica. *Química Nova*, 24(3), 404-407.

Moreno, R. G. M., Oliveira, E., Pedrotti, J. J., Oliveira, P. V. (2002) An electrochemical flow-cell for permanent modification of graphite tube with palladium for mercury determination by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta B*, 57(4), 769-778.