

RENATO CÉSAR CAETANO

“ SOBRE O MODELO DE INTERAÇÃO
DA ACTINOMICINA E
DAUNOMICINA COM DNA ”



1910001265



RENATO CÉSAR CAETANO

**“SOBRE O MODELO DE INTERAÇÃO
DA ACTINOMICINA E
DA UNOMICINA COM DNA”**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo



São José do Rio Preto
2003



RENATO CÉSAR CAETANO

**“SOBRE O MODELO DE INTERAÇÃO
DA ACTINOMICINA E
DAUNOMICINA COM DNA”**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto, para a obtenção do título de Doutor em Biofísica Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo



São José do Rio Preto
2003

1.1265/04



7577.23
C128s

20901003

RENATO CÉSAR CAETANO

“SOBRE O MODELO DE INTERAÇÃO
DA ACTINOMICINA E
DAUNOMICINA COM DNA”

Caetano, Renato César.

Sobre o modelo de interação da actinomicina e daunomicina com
DNA / Renato César Caetano – São José do Rio Preto : [s.n.], 2003
164 p. : il. ; 30 cm.

Orientador: Márcio Francisco Colombo

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista. Instituto de
Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biofísica. 2. Ácido desoxirribonucleico. 3. Actinomicina D. 4.
Daunomicina. 5. Interação droga – DNA. 6. Estresse osmótico. I.
Colombo, Márcio Francisco. II. Universidade Estadual Paulista.
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 577.3



17/03/04

São José do Rio Preto
2003



RENATO CÉSAR CAETANO

**“ SOBRE O MODELO DE INTERAÇÃO
DA ACTINOMICINA E DA UNOMICINA
COM DNA”**

Tese Para Obtenção do Grau de Doutor

Comissão Julgadora

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo

2º Examinador: Prof. Dr. Roberto da Silva

3º Examinador: Prof. Dr. João Ruggiero Neto

4º Examinador: Prof. Dr. Hiroshi Aoyama

5º Examinador: Prof. Dr. Milton Roque Bugs

*Dedico este trabalho ao meu filho,
João Pedro.*



Agradecimentos

Gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo pela rigorosa e criteriosa orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Ruggiero Neto, gostaria de agradecer pela sua prestativa e inestimável colaboração no acompanhamento da obtenção dos dados experimentais e na discussão dos mesmos.

Ao Prof. Dr. Jorge Chahine, gostaria de agradecer pelo excelente convívio e grande amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fossey, gostaria de agradecer pela sugestões levantadas para o aprimoramento do trabalho.

Nestes 12 anos de Departamento de Física, expresso aqui os meus agradecimentos aos demais professores pelo singular, excelente e alegre convívio.

A Ilya D. Rose, Douglas e aos técnicos de laboratório Paulinho e Barbosa pela presteza e grande amizade.

A seção de Pós-Graduação pela atenção dedicada aos alunos.

Aos amigos do laboratório pelas críticas construtivas, pelas sugestões, presteza e companheirismo e aos demais alunos do Departamento.

Ao Alexandre "Mac", companheiro de sala e amigo.

A Fernanda, minha esposa, pelo seu companheirismo e compreensão.

A Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de estudo a qual possibilitou a minha dedicação exclusiva a este trabalho.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) por estes 14 anos de ambiente acadêmico e científico.

**Dedico este trabalho ao meu filho,
João Pedro.**

Agradecimentos

Gostaria de expressar os meus mais sinceros agradecimentos ao Prof. Dr. Márcio Francisco Colombo pela rigorosa e criteriosa orientação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. João Ruggiero Neto, gostaria de agradecer pela sua prestativa e inestimável colaboração no acompanhamento da obtenção dos dados experimentais e na discussão dos mesmos.

Ao Prof. Dr. Jorge Chahine, gostaria de agradecer pelo excelente convívio e grande amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fossey, gostaria de agradecer pela sugestões levantadas para o aprimoramento do trabalho.

Nestes 12 anos de Departamento de Física, expresso aqui os meus agradecimentos aos demais professores pelo singular, excelente e alegre convívio.

À Ilva, D. Rose, Douglas e aos técnicos de laboratório Paulinho e Barbosa pela presteza e grande amizade.

À seção de Pos-Graduação pela atenção dedicada aos alunos.

Aos amigos do laboratório pelas críticas construtivas , pelas sugestões , presteza e companheirismo e aos demais alunos do Departamento.

Ao Alexandre “Mac”, companheiro de sala e amigo.

À Fernanda, minha esposa, pelo seu companheirismo e compreensão.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa de estudo a qual possibilitou a minha dedicação exclusiva a este trabalho

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) por estes 14 anos de ambiente acadêmico e científico memoráveis.

RESUMO

Neste trabalho investigamos o papel da água na interação da actinomicina D e daunomicina com DNA variando a atividade de água da solução, através da adição de sacarose à solução, pelo método de estresse osmótico. Constantes de ligação no equilíbrio químico foram obtidas, através dos ajustes das isotermas, com o modelo de ligação de ligantes de Scatchard e McGhee & von-Hippel. Isotermas foram obtidas através de titulação direta e reversa na presença e ausência de sacarose. Análise de obtenção das constantes de ligação que independem de modelo e decomposição de valor singular, também foram empregadas. A interação da actinomicina e daunomicina com DNA é melhor interpretada pelo modelo de McGhee & von-Hippel. O número de pares de bases ocupadas ou excluídas independe da atividade de água da solução. Variações de hidratação positiva foram encontradas para os dois sistemas em estudo, indicando que os complexos são mais hidratados em relação a droga e DNA livres em solução.

**O que sabemos é uma gota.
O que ignoramos é um oceano.**

**Isaac Newton
(1643-1727)**



RESUMO

Neste trabalho investigamos o papel da água na interação da actinomicina D e daunomicina com DNA variando a atividade de água da solução, através da adição de sacarose à solução, pelo método de estresse osmótico. Constantes de ligação no equilíbrio químico foram obtidas, através dos ajustes das isotermas, com o modelo de ligação de ligantes de Scatchard e McGhee & von-Hippel. Isotermas foram obtidas através de titulação direta e reversa na presença e ausência de sacarose. Análise de obtenção das constantes de ligação que independem de modelo e decomposição de valor singular, também foram empregadas. A interação da actinomicina e daunomicina com DNA é melhor interpretada pelo modelo de McGhee & von-Hippel. O número de pares de bases ocupadas ou excluídas independe da atividade de água da solução. Variações de hidratação positiva foram encontradas para os dois sistemas em estudo, indicando que os complexos são mais hidratados em relação a droga e DNA livres em solução.

LISTA DE FIGURAS ABSTRACT

In this work, the function of water through the interaction between actinomycin D and daunomycin with DNA changing water activity from the solution by means of adding sucrose through osmotic stress method is investigated. Binding constants in the chemical equilibrium were obtained, adjusting the isotherms, with models of Scatchard and McGhee & von-Hippel ligand binding. Isotherms were obtained through direct and reverse titration on the presence and absence of sucrose. Binding constants independent of models and singular value decomposition analysis were also applied. Actinomycin D and daunomycin interaction with DNA was adjusted in a better way with McGhee & von-Hippel model. The number of base pairs occupied and excluded don't depend on water activity. Positive hydration variations were obtained for the two systems in study, suggesting that the complexes are more hydrated concerning the drug and DNA which are free in solution.

Figura 8. Espectros de absorção da daunomicina livre e intercalada com DNA na ausência de sacarose.....	64
Figura 9. Espectros de absorção da daunomicina livre na ausência de sacarose.....	69
Figura 10. Dependência da absorção com a concentração da daunomicina livre na ausência de sacarose.....	70
Figura 11. Espectros de absorção da daunomicina complexada com DNA na ausência de sacarose.....	72
Figura 12. Dependência da absorção com a concentração da daunomicina complexada com DNA na ausência de sacarose.....	73
Figura 13. Espectros de absorção da daunomicina livre e intercalada com DNA na presença de sacarose.....	75
Figura 14. Espectros de absorção da daunomicina intercalada ao DNA na presença de sacarose.....	76
Figura 15. Dependência da absorção com a concentração da daunomicina complexada com DNA na presença de sacarose.....	78
Figura 16. Curvas de titulação direta de DNA com daunomicina na ausência de sacarose.....	79
Figura 17. Gráfico de Scatchard ajustado com o modelo de Scatchard via titulação direta para a interação da daunomicina com DNA.....	81
Figura 18. Gráfico de Scatchard ajustado com o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação direta para a interação da daunomicina com DNA.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a. Estrutura Química da Actinomicina-D.....	26
Figura 1b. Representação esquemática da molécula de Actinomicina-D.....	28
Figura 2a. Estrutura Química da Daunomicina.....	30
Figura 2b. Representação esquemática da molécula de Daunomicina.....	31
Figura 3. Espectro de absorção da Actinomicina.....	55
Figura 4. Titulação espectrofotométrica de DNA com Actinomicina.....	57
Figura 5. Gráfico de Scatchard para a ligação da actinomicina com DNA via titulação direta, ajustado com o modelo de Scatchard.....	59
Figura 6. Gráfico de Scatchard para a ligação da actinomicina com DNA via titulação direta, ajustado com o modelo de McGhee & von-Hippel.....	60
Figura 7. Dependência da constante de ligação com a atividade de água para a ligação da actinomicina com DNA via titulação direta.....	64
Figura 8. Espectros de absorção da daunomicina livre e intercalada com DNA na ausência de sacarose.....	67
Figura 9. Espectros de absorção da daunomicina livre na ausência de sacarose.....	69
Figura 10. Dependência da absorção com a concentração da daunomicina livre na ausência de sacarose.....	70
Figura 11. Espectros de absorção da daunomicina complexada com DNA na ausência de sacarose.....	72
Figura 12. Dependência da absorção com a concentração da daunomicina complexada com DNA na ausência de sacarose.....	73
Figura 13. Espectros de absorção da daunomicina livre e intercalada com DNA na presença de sacarose.....	75
Figura 14. Espectros de absorção da daunomicina intercalada ao DNA na presença de sacarose.....	76
Figura 15. Dependência da absorção com a concentração da daunomicina complexada com DNA na presença de sacarose.....	78
Figura 16. Curvas de titulação direta de DNA com daunomicina na ausência de sacarose.....	79
Figura 17. Gráfico de Scatchard ajustado com o modelo de Scatchard via titulação direta para a interação da daunomicina com DNA.....	81
Figura 18. Gráfico de Scatchard ajustado com o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação direta para a interação da daunomicina com DNA.....	82

Figura 19. Dependência da constante de associação com a atividade de água para a interação da daunomicina com DNA.....	85
Figura 20. Curvas de titulação reversa de DNA com daunomicina na ausência de sacarose.....	87
Figura 21. Dependência da absorção óptica da daunomicina com a concentração de DNA.....	88
Figura 22. Gráfico de Scatchard ajustado com o modelo de Scatchard via titulação reversa para a interação da daunomicina com DNA na ausência de sacarose.....	90
Figura 23. Gráfico de Scatchard ajustado com o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação reversa para a interação da daunomicina com DNA na ausência de sacarose.....	91
Figura 24. Gráfico de Scatchard ajustado com o modelo de Scatchard via titulação reversa para a interação da daunomicina com DNA na presença 10 % de sacarose.....	94
Figura 25. Gráfico de Scatchard ajustado com o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação reversa para a interação da daunomicina com DNA na presença de 10 % sacarose.....	95
Figura 26. Gráfico de Scatchard ajustado com o modelo de Scatchard via titulação reversa para a interação da daunomicina com DNA na presença 20 % de sacarose.....	96
Figura 27. Gráfico de Scatchard ajustado com o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação reversa para a interação da daunomicina com DNA na presença de 20 % sacarose.....	97
Figura 28. Dependência da constante de associação, obtida com o modelo de Scatchard, com a atividade de água para a interação da daunomicina com DNA via titulação reversa.....	101
Figura 29. Dependência da constante de associação, obtida com o modelo de McGhee & von-Hippel, com a atividade de água para a interação da daunomicina com DNA via titulação reversa.....	102
Figura 30. Dependência da variação percentual da absorção multiplicada pela razão daunomicina/DNA com a concentração de DNA na ausência de sacarose.....	105
Figura 31. Dependência da variação percentual da absorção multiplicada pela razão daunomicina/DNA com a concentração de DNA na presença de 10 % de sacarose.....	107
Figura 32. Dependência da variação percentual da absorção multiplicada pela razão daunomicina/DNA com a concentração de DNA na presença de 20 % de sacarose.....	108

Figura 33. Dependência da variação percentual da absorção multiplicada pela razão daunomicina/DNA com a concentração de daunomicina.....	110
Figura 34. Dependência da concentração de daunomicina com a concentração de DNA.....	111
Figura 35. Gráfico de Scatchard ajustado com o modelo de Scatchard via análise de Bujalowski & Lohman para a interação da daunomicina com DNA na presença de sacarose.....	112
Figura 36. Gráfico de Scatchard ajustado com o modelo de McGhee & von-Hippel via análise de Bujalowski & Lohman para a interação da daunomicina com DNA na presença de sacarose.....	113
Figura 37. Dependência da variação percentual da absorção multiplicada pela razão daunomicina/DNA com a fração de daunomicina ligada.....	116
Figura 38. Dependência da constante de associação, obtida com o modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel, com a atividade de água para a interação da daunomicina com DNA via análise de Bujalowski & Lohman.....	118
Figura 39. Curvas de titulação reversa da daunomicina com DNA na presença de 20 % de sacarose.....	120
Figura 40. Dependência do produto da absorção óptica normalizada com a matriz transposta de V em função do comprimento de onda....	122
Figura 41. Dependência de V com a concentração de DNA em escala logaritmica.....	123
Figura 42. Dependência de V com a concentração de DNA em escala logaritmica mostrando os melhores ajustes aos dados experimentais.....	124
Figura 43. Espectros reconstruídos da daunomicina livre e complexada com DNA usando a técnica de SVD.....	125
Figura 44. Isotermas de Scatchard e McGhee & von-Hippel obtidas pelo método de SVD via titulação reversa.....	127
Figura 45. Dependência da constante de associação, obtida com o modelo de Scatchard, com a atividade de água para a interação da daunomicina com DNA via SVD e titulação reversa.....	130
Figura 46. Dependência da constante de associação, obtida com o modelo de McGhee & von-Hippel, com a atividade de água para a interação da daunomicina com DNA via análise de SVD e titulação reversa.....	131

Figura 47. Dependência da constante de associação, obtida com o modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel, com a atividade de água para a interação da daunomicina com DNA via análise de SVD e titulação direta.....134

Tabela 1. Constantes de ligação e números de pares de base ocupados da interação da actinomicina D com DNA usando o modelo de Scatchard via titulação direta.....	61
Tabela 2. Constantes de ligação e números de pares de base ocupados da interação da actinomicina D com DNA usando o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação direta.....	62
Tabela 3. Osmolalidade e logaritmo natural da atividade de água na interação da actinomicina D com DNA.....	63
Tabela 4. Variação de hidratação obtida com o modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel para a interação da actinomicina D com DNA.....	65
Tabela 5. Constantes de ligação e números de pares de base ocupados da interação da daunomicina com DNA usando o modelo de Scatchard.....	83
Tabela 6. Constantes de ligação e números de pares de base ocupados da interação da daunomicina com DNA usando o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação direta.....	83
Tabela 7. Osmolalidade e logaritmo natural da atividade de água na interação da daunomicina com DNA.....	84
Tabela 8. Variação de hidratação obtida com o modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel para a interação da daunomicina com DNA.....	86
Tabela 9. Constantes de ligação para a interação da daunomicina com DNA usando o modelo de Scatchard via titulação reversa.....	98
Tabela 10. Número de pares de base ocupadas para a interação da daunomicina com DNA usando o modelo de Scatchard via titulação reversa.....	98
Tabela 11. Constantes de ligação para a interação da daunomicina com DNA usando o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação reversa.....	99
Tabela 12. Número de pares de base ocupadas para a interação da daunomicina com DNA usando o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação reversa.....	99
Tabela 13. Valores de $\ln K_0$ obtidos por extrapolação do gráfico da dependência de $\ln K$ com $\ln a_2$	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Constantes de ligação e números de pares de base ocupados da interação da actinomicina D com DNA usando o modelo de Scatchard via titulação direta.....	61
Tabela 2. Constantes de ligação e números de pares de base ocupados da interação da actinomicina D com DNA usando o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação direta.....	62
Tabela 3. Osmolalidade e logaritmo natural da atividade de água na interação da actinomicina D com DNA.....	63
Tabela 4. Variação de hidratação obtida com o modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel para a interação da actinomicina D com DNA.....	65
Tabela 5. Constantes de ligação e números de pares de base ocupados da interação da daunomicina com DNA usando o modelo de Scatchard.....	83
Tabela 6. Constantes de ligação e números de pares de base ocupados da interação da daunomicina com DNA usando o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação direta.....	83
Tabela 7. Osmolalidade e logaritmo natural da atividade de água na interação da daunomicina com DNA.....	84
Tabela 8. Variação de hidratação obtida com o modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel para a interação da daunomicina com DNA.....	86
Tabela 9. Constantes de ligação para a interação da daunomicina com DNA usando o modelo de Scatchard via titulação reversa.....	98
Tabela 10. Número de pares de base ocupadas para a interação da daunomicina com DNA usando o modelo de Scatchard via titulação reversa.....	98
Tabela 11. Constantes de ligação para a interação da daunomicina com DNA usando o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação reversa.....	99
Tabela 12. Número de pares de base ocupadas para a interação da daunomicina com DNA usando o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação reversa.....	99
Tabela 13. Valores de $\ln K_0$ obtidos por extrapolação do gráfico da dependência de $\ln K$ com $\ln a_w$	100

Tabela 14. Variação de hidratação obtida com o modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel para a interação da daunomicina com DNA via titulação reversa.....	103
Tabela 15. Constantes de ligação e números de pares de base ocupados na interação da daunomicina com DNA obtidas com o modelo de Scatchard via titulação reversa usando a análise de Bujalowski e Lohman.....	114
Tabela 16. Constantes de ligação e números de pares de base ocupados na interação da daunomicina com DNA obtidas com o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação reversa usando a análise de Bujalowski e Lohman.....	114
Tabela 17. Valores do coeficiente de extinção molar ligado obtidos pelo método da função densidade de ligação de ligante.....	117
Tabela 18. Variação de hidratação obtida com o modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel para a interação da daunomicina com DNA via titulação reversa usando a análise de Bujalowski e Lohman.....	118
Tabela 19. Constantes de ligação para a interação da daunomicina com DNA obtidas com o modelo de Scatchard via titulação reversa usando a análise de SVD.....	128
Tabela 20. Número de pares de base ocupadas para a interação da daunomicina com DNA obtidos com o modelo de Scatchard via titulação reversa usando a análise de SVD.....	128
Tabela 21. Constantes de ligação para a interação da daunomicina com DNA obtidas com o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação reversa usando a análise de SVD.....	128
Tabela 22. Número de pares de base ocupadas para a interação da daunomicina com DNA obtidos com o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação reversa usando a análise de SVD.....	129
Tabela 23. Variação de hidratação obtida com o modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel para a interação da daunomicina com DNA via titulação reversa usando a análise de SVD.....	132
Tabela 24. Constantes de ligação e números de pares de base ocupados na interação da daunomicina com DNA obtidas com o modelo de Scatchard via titulação direta segundo a análise de SVD.....	133

Tabela 25. Constantes de ligação e números de pares de base ocupados na interação da daunomicina com DNA obtidas com o modelo de McGhee & von-Hippel via titulação direta segundo a análise de SVD.....	133
Tabela 26. Variação de hidratação obtida com o modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel para a interação da daunomicina com DNA via titulação direta usando a análise de SVD.....	135
Tabela 27. Variação de hidratação obtida com os diferentes métodos de análise na titulação direta da daunomicina com DNA.....	135
Tabela 28. Variação de hidratação obtida com os diferentes métodos de análise na titulação reversa da daunomicina com DNA.....	136

cm=centímetro

nm=nanômetro

μ m=micrômetro

M=molar

mM=milimolar

μ M=micromolar

Osm=osmolaridade

χ_w =fração molar da água

χ_s =fração molar do soluto

Δn_w =variação do número de moléculas de água

n_w =número de moléculas de água

μ =potencial químico

ΔG =variação da energia livre de Gibbs

ϵ =coeficiente de extinção molar

R=constante universal dos gases

T=temperatura absoluta

EDTA=ácido etilendinitrilotetracético sal dissódico

NaCl=cloreto de sódio

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DNA= ácido desoxirribonucléico	06
RNA=ácido ribonucléico	07
ActD=actinomicina D	08
DM=daunomicina	12
SVD= decomposição de valor singular	13
a_w =atividade de água	19
K=constante de associação	
pb=par de bases	
cm=centímetro	22
nm=nanômetro	24
μm =micrômetro	25
M=molar	28
mM=milimolar	31
μM =micromolar	33
Osm=osmolalidade	34
χ_w =fração molar da água	35
χ_s =fração molar do soluto	36
Δn_w =variação do número de moléculas de água	37
n_w =número de moléculas de água	38
μ =potencial químico	39
ΔG =variação da energia livre de Gibbs	41
ϵ =coeficiente de extinção molar	43
R=constante universal dos gases	46
T=temperatura absoluta	50
EDTA=ácido etilendinitrilotetracético sal dissódico	
NaCl=cloreto de sódio	

SUMÁRIO

Resumo.....	06
Abstract.....	07
Lista de Figuras.....	08
Lista de Tabelas.....	12
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	15
I. Introdução.....	19
I.1 Sobre a Contribuição da Água para a ligação de Drogas e Proteínas a DNA.....	22
I.2 Sobre os Modos de Ligação das Drogas Antitumorais com DNA.....	24
I.3 Sobre a Actinomicina D.....	25
I.4 Sobre a Daunomicina.....	28
I.5 Objetivos deste Estudo.....	31
II. Materias e Métodos.....	33
II.1 Preparação da Solução de DNA.....	33
II.2 Preparação da Solução de Actinomicina.....	34
II.3 Preparação da Solução de Daunomicina.....	34
II.4 Titulação Espectrofotométrica Direta da Actinomicina.....	35
II.5 Conversão dos Dados de Ligação para a titulação direta de Actinomicina D.....	36
II.6 Conversão dos Dados de Ligação para a titulação direta de Daunomicina.....	37
II.7 Titulação Espectrofotométrica Reversa da Daunomicina.....	38
II.8 Conversão dos Dados de Ligação para a titulação reversa de Daunomicina.....	39
II.9 Sobre os modelos de ligação de ligante.....	41
II.10 Dependência da constante de equilíbrio com a atividade de água da solução.....	43
II.11 Método de estresse osmótico.....	46
II.12 Método de análise da função densidade de ligação de ligante.....	50



III. Resultados.....	54
III.1 Análise espectrofotométrica da interação da actinomicina com DNA.....	54
III.1.1 Caracterização espectral da actinomicina em tampão fosfato.....	54
III.1.2 Titulação espectrofotométrica direta.....	56
III.1.3 Obtenção das isotermas de ligação.....	58
III.1.4 Dependência da constante de ligação com a atividade de água.....	62
III.2 Análise espectrofotométrica da interação da daunomicina com DNA.....	65
III.2.1 Caracterização espectral em tampão fosfato.....	66
III.2.2 Determinação do coeficiente de extinção molar livre em tampão fosfato.....	67
III.2.3 Determinação do coeficiente de extinção molar ligado em tampão fosfato.....	71
III.2.4 Caracterização espectral na presença de sacarose.....	74
III.2.5 Determinação do coeficiente de extinção molar ligado na presença de sacarose.....	75
III.2.6 Titulação espectrofotométrica direta em tampão fosfato.....	78
III.2.7 Obtenção das isotermas de ligação para titulação direta.....	80
III.2.8 Dependência da constante de ligação com a atividade de água para titulação direta.....	84
III.2.9 Titulação espectrofotométrica reversa em tampão fosfato.....	86
III.2.10 Obtenção das isotermas de ligação para titulação reversa em tampão fosfato.....	88
III.2.11 Titulação espectrofotométrica reversa na presença de Sacarose.....	92
III.2.12 Obtenção das isotermas de ligação para titulação reversa na presença de sacarose.....	93
III.2.13 Dependência da constante de ligação com a atividade de água para titulação reversa.....	99
III.3 Análise da interação da daunomicina com DNA usando a densidade de ligação de ligante.....	103
III.3.1 Análise usando a densidade de ligação de ligante em tampão fosfato.....	104



III.3.2	Análise usando a densidade de ligação de ligante na Presença de sacarose.....	106
III.3.3	Obtenção do gráfico de Scatchard.....	109
III.3.4	Obtenção do coeficiente de extinção molar ligado.....	115
III.3.5	Dependência da constante de ligação com a atividade de água.....	117
III.4	Análise da interação da daunomicina com DNA usando a técnica de decomposição de valor singular.....	119
III.4.1	Decomposição de valor singular para titulação reversa....	119
III.4.2	Dependência da constante de ligação com a atividade de água para a titulação reversa.....	129
III.4.3	Decomposição de valor singular para titulação direta.....	132
III.4.4	Dependência da constante de ligação com a atividade de água para a titulação direta.....	133
IV	Discussão.....	137
V	Conclusões.....	153
VI	Referências Bibliográficas.....	155
	Autorização para reprodução.....	165

I. INTRODUÇÃO

Grande parte dos efeitos de solutos sobre as características de ligação de ligantes a proteínas, de drogas ao DNA e da cinética de diversas enzimas, publicados ao longo dos últimos anos, foram atribuídos: a) à mudanças da constante dielétrica do meio; b) à ligação preferencial do soluto à proteína e, c) à variação da atividade de água.

No entanto, estudos recentes realizados por Colombo e colaboradores¹⁰ sobre o efeito de solutos neutros e concentração salina¹¹ sobre a oxigenação da Hemoglobina, forneceram evidências de que a afinidade desta proteína ao oxigênio é sensível à variação da atividade de água do meio. Estes autores apresentaram, também, evidências que descartam a possibilidade de que o efeito desta reação se deva à mudanças da constante dielétrica ou da ligação preferencial do soluto à proteína e da força iônica da solução.¹¹

Colombo e colaboradores atribuíram esta dependência da afinidade da hemoglobina por oxigênio, à diferença de hidratação entre estruturas da oxi e desoxihemoglobina, cujo equilíbrio é

responsável pelo controle alostérico da ligação cooperativa do oxigênio à hemoglobina.

Uma série de estudos realizados principalmente por Lee & Timasheff,²⁶ têm demonstrado que a maioria dos solutos neutros, como açúcares e polióis, são excluídos preferencialmente da superfície protéica e promovem a hidratação preferencial de proteínas nativas. Estes estudos, sugerem que a ligação preferencial destes solutos só ocorre no caso de haver algum sítio específico para o soluto na proteína e, ainda, que a constante dielétrica junto à superfície protéica deve ser pouco afetada pela presença dos solutos na solução. Os resultados também indicam a possibilidade de se interpretar mudanças conformacionais, mudanças de afinidade por ligantes e de características cinéticas, como reflexo das mudanças de atividade de água.¹⁰

Como, provavelmente, as reações bioquímicas são sensíveis à pequenas variações de atividade de água, que podem ocorrer ao nível fisiológico, há a possibilidade de que determinadas reações possam ser controladas por água *in vivo*. Portanto, na tentativa de se encontrar um provável efeito de água em sistemas

biológicos, escolhemos um sistema dinâmico, como são os sistemas de interação da droga a DNA.

Procuramos, neste trabalho, investigar o papel da água na ligação de drogas antitumorais a DNA variando a atividade de água da solução através do acréscimo de solutos neutros, em particular sacarose, buscando quantificar a variação de hidratação envolvidas na interação da actinomicina e daunomicina com DNA, bem como discriminar qual dos modelos de ligação de ligante: a) de uma classe proposto por Scatchard;⁴⁹ b) de duas classes de sítios ou c) o modelo de ligação anticooperativa, proposto por McGhee & von-Hippel,²⁹ melhor ajusta os dados experimentais da ligação da actinomicina e daunomicina por DNA, na região de alta saturação de droga-DNA, obtidos por titulação espectrofotométrica direta e reversa.

Mais recentemente, Ruggiero-Neto e Colombo⁴⁷ mostraram, nos seus estudos sobre o papel da hidratação na energética de interação da actinomicina com DNA, que a presença de solutos neutros aumenta a afinidade da actinomicina por sítios fortes indicando uma diminuição de afinidade por sítios fracos do DNA. Isto sugere que a ligação aos sítios fracos do DNA é acompanhada pelo



aumento de hidratação do complexo droga-DNA em relação a droga e DNA livres.

I.1 Sobre a Contribuição da Água para a ligação de Drogas e Proteínas a DNA.

A hidratação tem um papel importante na afinidade de ligação e especificidade de interação entre proteína-DNA e droga-DNA.³⁷

É notavelmente reconhecido que água tem um papel importante na estrutura e função de proteína. Além da água do 'bulk' da solução, que é crucial ao efeito hidrofóbico e ao enovelamento de proteína, tem sido mostrado que moléculas de água ligadas a proteína são importantes no reconhecimento de substratos.⁴⁰

Quando um ligante se liga a uma proteína, cada molécula de água no sítio de ligação ou será deslocada pelo ligante ou permanecerá ligada, em ambos os casos influenciando a conformação e energética da interação. Moléculas de água conservada na estrutura do ligante ligado, geralmente participa nas pontes de hidrogênio, mediada pela água, entre a proteína e o ligante.⁴⁰



A hidratação de DNA é de fundamental importância no reconhecimento seletivo de pequenas moléculas tais como drogas antitumorais.³⁴ A influência da hidratação na conformação e interação de DNA com ligantes tem sido assunto de muitas investigações usando técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR), dinâmica molecular, cristalográficas por raios-x e termodinâmicas.³³

Na interface entre proteínas e DNA, moléculas de água na primeira camada de hidratação do DNA designam as posições das pontes de hidrogênio entre os resíduos da proteína e o DNA.³³

A hidratação no sulco menor de uma dupla hélice de DNA na forma B, tem um papel único e fundamental na ligação de drogas. Uma investigação cristalográfica com raios-x seguida por um estudo de NMR em solução, usando um modelo de dupla hélice dodecâmero na forma B, mostrou que o sulco menor é hidratado de maneira extensiva e regular, com saliências entre a primeira e segunda camada de hidratação ao longo da extensão do sulco. De maneira contrária, a hidratação dentro do sulco maior é principalmente confinada a uma monocamada de moléculas de água.³⁴ Estes arranjos da água de hidratação na dupla hélice do DNA é considerado ser fundamental tanto para sua estabilidade quanto para o mecanismo de



reconhecimento molecular de sítios de ligação específico por proteínas e outros ligantes.

I.2 Sobre os Modos de Ligação das Drogas Antitumorais com DNA.

Muitas drogas antitumorais, antibióticas e antivirais exercem seus efeitos biológicos interagindo reversivelmente com ácidos nucleicos. Portanto, estas biomoléculas representam um alvo principal nas estratégias de desenvolvimento de drogas a serem usadas em novas terapias em doenças tais como câncer, infecções, etc. De modo a aprimorar a eficácia clínica das drogas existentes e também desenvolver novas drogas, é necessário entender as bases moleculares da interação droga-DNA em termos estruturais, termodinâmicos e cinéticos.²³

Existem dois modos principais pelos quais as drogas podem se ligar não-covalentemente ao DNA: a) ligação no sulco menor e b) intercalação.

Os ligantes do sulco menor são tipicamente drogas compostas de anéis tais como pirrólico, furano ou benzeno que são

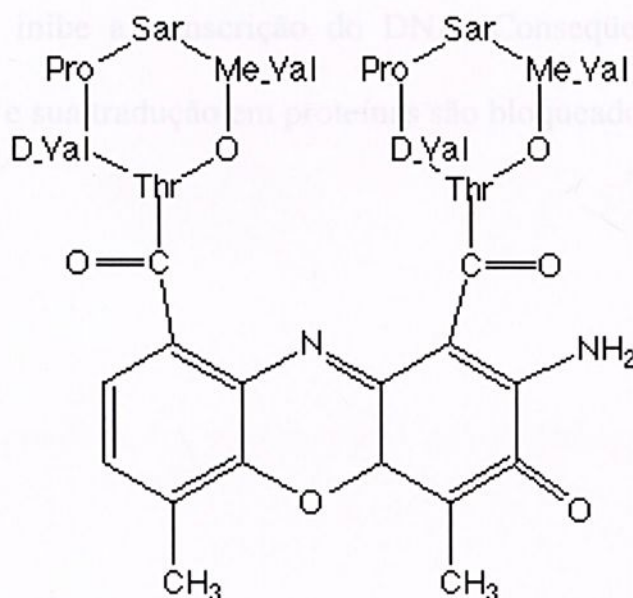
conectados por ligações com liberdade torsional. Netropsina e distamicina, são exemplos destes ligantes.

O outro modo, a intercalação, compreende as drogas intercalantes que possuem sistemas de anéis heteroaromáticos que podem inserir-se entre dois pares de base adjacentes da dupla hélice do DNA. Como exemplo destas drogas podemos citar o brometo de etídio, proflavina, daunomicina e actinomicina D.²³ A especificidade e efetividade terapêutica da actinomicina contra tumores celulares sólidos específicos, tem despertado uma intensiva examinação da atividade farmacológica deste antibiótico antitumoral.²²

I.3 Sobre a Actinomicina D (actD)

A actD é um antibiótico antitumoral que contém um cromóforo planar 2-aminofenoxazona-3 e duas volumosas lactonas pentapeptídicas cíclicas.¹⁹ Estudos que atravessaram mais de duas décadas têm demonstrado que a interação da actD com DNA se processa através de uma intercalação do cromóforo fenoxazone planar entre os pares de base adjacentes da dupla fita do DNA contendo seqüências dG-dC.^{57,52} A ligação é, entretanto, muito específica e tem

sido mostrado haver uma grande preferência por seqüências GpC. Esta especificidade por seqüências de base deriva principalmente da formação de pontes de hidrogênio no sulco menor entre o nitrogênio 2 do grupo amino e o nitrogênio 3 do anel dos resíduos de guanina, bem como também de pontes de hidrogênio entre o átomo de oxigênio da carbonila e grupos amida dos resíduos de treonina dos anéis pentapeptídicos cíclicos.^{52,24} A ligação de uma única molécula de actD abrange da ordem de 4 pares de base do DNA.²⁴



Actinomycin D (Dactinomycin)

Figura 1a. Estrutura química da actinomicina-D mostrando o anel cromóforo e as duas cadeias laterais pentapeptídicas cíclicas.

Estudos de cinética, viscosidade e equilíbrio químico, têm demonstrado que as duas cadeias laterais pentapeptídicas da actD ancoram no sulco menor do DNA, diminuindo o grau de dissociação da actD do DNA.³²

Na sua interação com DNA, a actinomicina intercala seu anel cromóforo entre dois pares de base e insere os anéis pentapeptídicos no sulco menor da dupla hélice. Acredita-se que desta forma, a actinomicina cria um impedimento estérico para a RNA polimerase que inibe a transcrição do DNA. Conseqüentemente, a síntese de RNA e sua tradução em proteínas são bloqueados.

Figura 1b. Representação esquemática da molécula de Act-D intercalada na dupla fita de DNA.

1.4 Sobre a Daunomicina

Daunomicina, o protótipo dos antibióticos de antraciclina, tem sido extensamente usado no tratamento de vários cânceres humanos.¹² Estudos baseados em medidas de viscosidade,³²

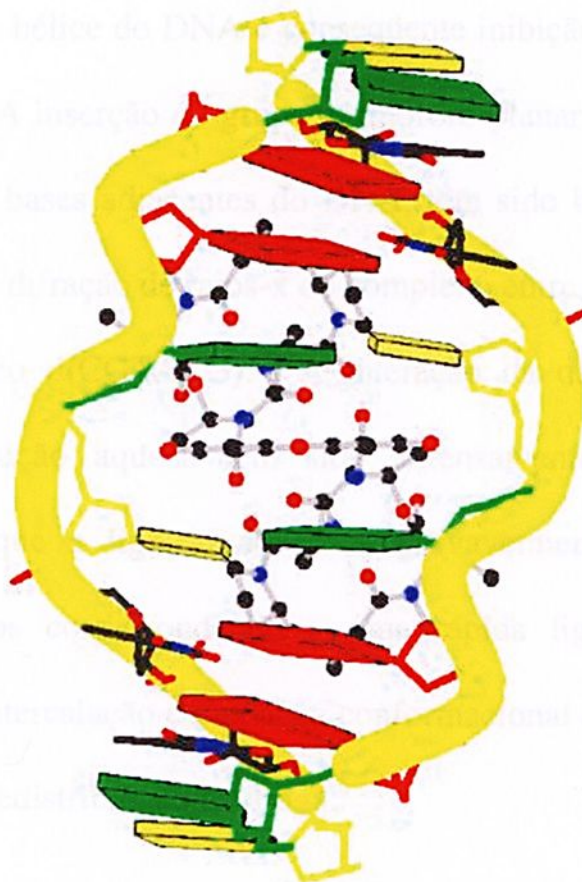


Figura 1b. Representação esquemática da molécula de Act-D intercalada na dupla fita de DNA.

I.4 Sobre a Daunomicina

Daunomicina, o protótipo dos antibióticos de antraciclinas, tem sido extensamente usado no tratamento de vários cânceres humanos.¹² Estudos baseados em medidas de viscosidade,⁴²

calorimetria³⁸ e espectroscopia⁸ são consistentes com a intercalação da droga na dupla hélice do DNA e conseqüente inibição das sínteses de DNA e RNA. A inserção do grupo cromóforo planar da daunomicina entre pares de bases adjacentes do DNA, tem sido bem estabelecida por análises de difração de raios-x do complexo entre daunomicina e o oligonucleotídeo d(CGTACG).⁵⁶ A interação da daunomicina com DNA em solução aquosa tem sido extensamente investigada e verificado-se que a ligação ao DNA provavelmente envolve três passos distintos correspondendo a uma rápida ligação “externa”, seguido pela intercalação e mudança conformacional do DNA no sítio de ligação ou redistribuição da droga.⁶

A figura abaixo apresenta uma representação esquemática da molécula de daunomicina intercalada com a dupla hélice de DNA. Nota-se os três anéis aromáticos intercalados no sulco maior do DNA entre pares de base guanina e citosina e o amino açúcar próximo ao sulco menor.

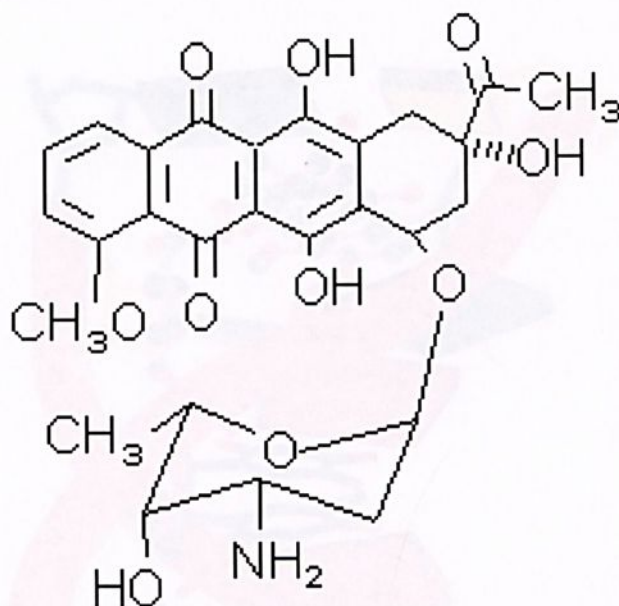


Figura 2a. Estrutura química da daunomicina mostrando os três anéis cromóforos e o amino açúcar ligado ao anel responsável pelo seu ancoramento.

A figura abaixo apresenta uma representação esquemática da molécula de daunomicina intercalada com a dupla hélice de DNA. Nota-se os três anéis aromáticos intercalados no sulco maior do DNA entre pares de base guanina e citosina e o amino açúcar próximo ao sulco menor.

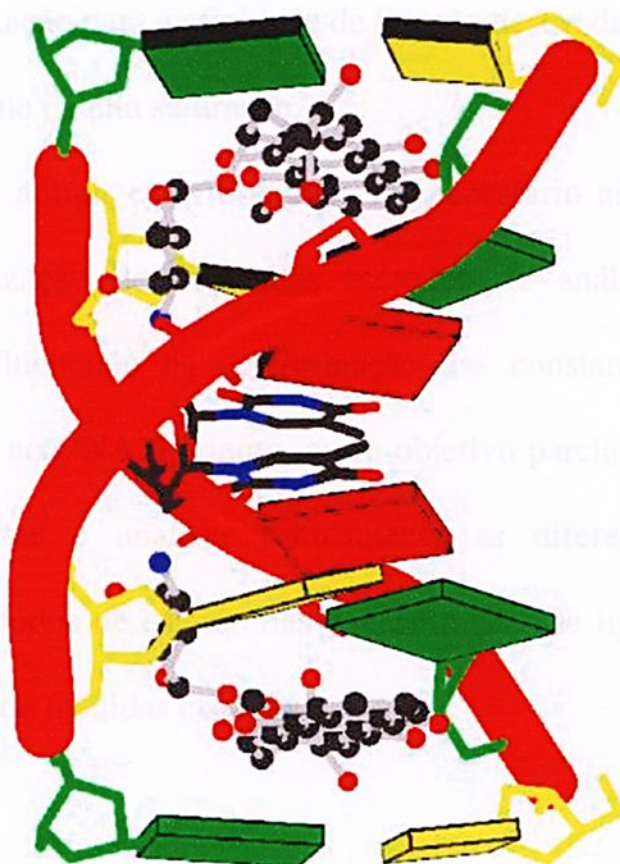


Figura 2b. Representação esquemática da molécula de daunomicina intercalada na dupla fita de DNA.

1.5 Objetivos deste Estudo

Este trabalho teve por objetivo, portanto, a) investigar os modelos de ligação que melhor descrevem as isotermas de ligação de actinomicina D e daunomicina ao DNA determinadas por

espectroscopia de absorção no visível; b) determinar a contribuição da água de hidratação para a afinidade de ligação destas drogas a sítios de DNA no regime de alta saturação.

Para se atingir estes objetivos foi necessário ainda, investigar como a utilização de diferentes métodos de análise dos dados espectrais influenciam na determinação das constantes de ligação destas drogas ao DNA. Portanto, outro objetivo parcial deste trabalho foi sistematizar e analisar criticamente as diferenças entre os diferentes métodos de cálculo das concentrações de ligante ligado ao DNA a partir de medidas espectrais.



II. MATERIAIS E MÉTODOS

II.1 Preparação da Solução de DNA

O ácido desoxirribonucléico de timo de bezerro (ct-DNA) da Pharmacia Biotech. (Upsala, Sweden) foi dissolvido em tampão fostato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. Posteriormente a solução de ct-DNA foi submetida à sonicação por 4 sessões, de 30 segundos cada, na escala de intensidade 4, usando ultrasonificador de ponta de titânio. Esperava-se um intervalo de 2 minutos entre uma aplicação e outra. Em seguida, a solução sonicada de ct-DNA era filtrada com filtro Millipore de 0,22 μm .

A concentração da solução de ct-DNA foi determinada espectrofotometricamente no comprimento de onda de 260 nm,^{32,38} usando um coeficiente de extinção molar de $12.800 \text{ M}^{-1}/\text{pb.cm}^{-1}$.

As soluções de ct-DNA com osmólitos também eram filtradas em filtro Millipore de 0,22 μm antes dos experimentos de ligação.

II.2 Preparação da Solução de Actinomicina D

Actinomicina D (actD) da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM e equilibrado para pH 7.5 à 25° C. Esta solução foi usada sem qualquer purificação subsequente.

A concentração da solução de actD em tampão foi determinada espectrofotometricamente pela absorção no comprimento de onda a 440 nm,^{32,38} usando um coeficiente de extinção molar para a droga livre de $\epsilon_F = 24.800 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. O coeficiente de extinção molar da droga ligada ao ct-DNA (ϵ_B) foi estimado por extrapolação da sua absorção na presença de um grande excesso de sítios de ligação e o valor obtido foi de $\epsilon_B = 11.900 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ em 440 nm⁵⁵ na ausência e presença de osmólitos.

II.3 Preparação da Solução de Daunomicina

Daunomicina (Daunorubicina) da Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO) foi dissolvida em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C e posteriormente usada



sem qualquer purificação. A concentração da solução de daunomicina foi determinada espectrofotometricamente em 480 nm usando um coeficiente de extinção molar (ϵ_{480}) de $11.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

II. 4 Titulação Espectrofotométrica Direta da Actinomicina e Daunomicina

Todos os dados experimentais de ligação foram obtidos por titulação espectrofotométrica em espectrofotômetro Cary-3E (Varian, Palo Alto, CA) usando cubetas de 5 cm de caminho óptico mantidas a 25°C por um banho circulante de água Neslab RTE-221.

Na titulação da actinomicina, alíquotas da solução estoque da droga foram adicionadas à cubeta termostatzada contendo aproximadamente 10 mL da solução de DNA na ausência ou na presença de osmólitos. Esperava-se 60 e 30 minutos, para DNA não saturado e saturado, respectivamente, para aquisição dos espectros após cada passo de adição de droga. Na titulação da daunomicina, emprega-se o mesmo procedimento com a diferença de que 10 minutos era o tempo de espera, uma vez que a cinética é bastante rápida.



A concentração de DNA nos experimentos de titulação, na ausência e presença de osmólitos, foi da ordem de 40 μM por par de bases.

II.5 Conversão dos Dados de Ligação para a titulação direta de Actinomicina D.

Levando-se em conta o intervalo de concentração de droga utilizado em cada titulação, da ordem de 1 a 10 μM , e considerando a baixa constante de auto associação desta droga, $K=1000 \text{ M}^{-1}$, as concentrações de droga livre e ligada, foram calculadas negligenciando qualquer tipo de auto associação da droga. A concentração da droga ligada $[\text{actD}]_B$ foi determinada conforme proposto por Muller e Crothers:³²

$$[\text{droga}]_{\text{Ligada}} = \frac{([\text{droga}]_{\text{Total}} \cdot \epsilon_{\text{Livre}}) - \left(\frac{A_i}{l} \right)}{(\epsilon_{\text{Livre}} - \epsilon_{\text{Ligado}})} \quad (1)$$

onde $\epsilon_{\text{Livre}} = 24800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{\text{Ligado}} = 11900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ são os coeficientes de extinção molar da actD livre e ligada, respectivamente. A_i é a absorbância, em 440 nm, da solução na cubeta na i -ésima adição da actD, l é o caminho óptico da cubeta e $[\text{droga}]_{\text{Total}}$ é a concentração total da droga que é dada por:

$$[\text{droga}]_{\text{Total}} = [\text{droga}]_{\text{Ligada}} + [\text{droga}]_{\text{Livre}} \quad (2)$$

onde $[\text{droga}]_{\text{Livre}}$ é a concentração da droga livre.

II.6 Conversão dos Dados de Ligação para a titulação direta de daunomicina

Os dados experimentais de absorção óptica de ligação da daunomicina livre e complexada com DNA na titulação direta, também foram calculados negligenciando qualquer tipo de auto associação da daunomicina. Os dados de absorção óptica foram convertidos em concentração de ligante ligado segundo a equação abaixo

$$[DM]_{Ligada} = \frac{([DM]_{Total} \cdot \epsilon_{Livre}) - \left(\frac{A_i}{l}\right)}{(\epsilon_{Livre} - \epsilon_{Ligado})} \quad (3)$$

onde $\epsilon_{livre} = 11.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e $\epsilon_{Ligado} = 6.100 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ são os coeficientes de extinção molar da daunomicina livre e ligada, respectivamente. A_i é a absorbância, em 480 nm, da solução na cubeta na i-ésima adição da daunomicina, l é o caminho óptico da cubeta e $[DM]_{Total}$ é a concentração total da droga definida conforme a equação abaixo

$$[DM]_{Total} = [DM]_{Ligada} + [DM]_{Livre} \quad (4)$$

II.7 Titulação Espectrofotométrica Reversa da Daunomicina

Neste tipo de titulação, alíquotas da solução estoque de DNA são adicionadas à cubeta termostatizada contendo 10 mL da solução de daunomicina na ausência ou presença de osmólitos em tampão fosfato de sódio 10 mM, NaCl 150 mM e EDTA 1 mM e pH 7.5 à 25°C. Após a adição do DNA, a solução era homogeneizada à

temperatura ambiente, em agitador magnético por 10 minutos e protegido da luz. Posteriormente, registrava-se um espectro de absorção óptica na região de 400 a 700 nm. Este procedimento era realizado a cada nova adição de DNA.

II.8 Conversão dos Dados de Ligação para a titulação reversa de daunomicina

Os dados experimentais de absorção óptica de ligação da daunomicina livre e complexada com DNA na titulação reversa, foram calculados negligenciando qualquer tipo de auto-associação da daunomicina. Os dados de absorção óptica foram convertidos em concentração de ligante livre segundo Xodo et al,⁵⁹ conforme a equação abaixo

$$[DM]_{Livre} = f_{Livre} \cdot [DM]_{Total} \quad (5)$$

onde f_{livre} é definida como

$$f_{\text{Livre}} = \frac{Abs - Abs_{\text{final}}}{Abs_{\text{inicial}} - Abs_{\text{final}}} \quad (6)$$

A concentração de daunomicina ligada foi definida conforme a equação abaixo

$$[DM]_{\text{Ligada}} = f_{\text{Ligada}} \cdot [DM]_{\text{Total}} \quad (7)$$

onde f_{Ligada} é definida como

$$f_{\text{Ligada}} = \frac{Abs - Abs_{\text{inicial}}}{Abs_{\text{final}} - Abs_{\text{inicial}}} \quad (8)$$

onde Abs, é a absorção num dado ponto qualquer da titulação, Abs_{inicial} é a absorção antes de iniciar a titulação e Abs_{final} a absorção no final da titulação. Todas as absorções foram medidas em 480 nm. A concentração de daunomicina total é definida conforme a equação 4 acima.

II.9 Sobre os Modelos de Ligação de Ligantes

Os dados experimentais da ligação de um ligante L a uma macromolécula M com vários sítios de ligação idênticos e independentes, podem ser analisados fazendo uso da equação de Scatchard,

$$\frac{r}{C_F} = k \cdot (n - r) \quad (9)$$

onde r é a fração de sítios de ligação da macromolécula ocupados pelo ligante ($C_B/[M]$), C_F é a concentração do ligante livre, k é a constante de ligação do ligante e n é o número de unidades monoméricas ocupadas na macromolécula, por cada ligante ligado. Esta equação é freqüentemente usada para estudar a ligação de ligantes a macromoléculas tais como a ligação de hormônios a proteínas, de inibidores a enzimas e antibióticos a DNA.⁵⁴ Esta equação prediz que há uma dependência linear da razão entre a saturação fracional e concentração de ligante livre com a saturação fracional.

Quando esta linearidade não é observada em gráfico r/C_F vs r , mas sim um gráfico côncavo ou convexo, há indícios de que os sítios têm constantes de ligação intrínseca diferentes ou que ocorra interação entre os vários sítios de ligação na macromolécula. Portanto, há duas condições para ajustar dados experimentais não lineares de ligação de ligantes à macromolécula.

Na condição de constantes de ligação intrínseca diferentes, temos o modelo de classes distintas de sítios de ligação. Este modelo considera que a equação de Scatchard pode ser escrita como a soma de duas isotermas como mostrado abaixo

$$\frac{r}{C_F} = \frac{n_1 \cdot k_1}{1 + k_1 \cdot C_F} + \frac{n_2 \cdot k_2}{1 + k_2 \cdot C_F} \quad (10)$$

onde r refere-se à saturação fracional da macromolécula, C_F é a concentração do ligante livre, k_1 e k_2 são as constantes de ligação do ligante às duas classes distintas de sítios e n_1 e n_2 são os números de unidades monoméricas ocupadas na macromolécula, por ligante ligado, à cada classe de sítios.⁴

Na condição em que há interação entre os sítios, temos o modelo conhecido como antiooperativo, proposto por McGhee & von-Hippel em 1974,²⁹ cuja equação é apresentada abaixo

$$\frac{r}{C_F} = k(1 - n \cdot r) \cdot \left[\frac{1 - n \cdot r}{1 - (n - 1) \cdot r} \right]^{n-1} \quad (11)$$

onde r , C_F , k e n tem o significado descrito anteriormente.

II.10 Dependência de Constante de Equilíbrio com a Atividade de Água da Solução.

A reação de uma macromolécula M com um ligante L , geralmente envolve a substituição de contatos moleculares da macromolécula e do ligante com água, por contatos moleculares diretos entre a macromolécula e o ligante.⁹ A descrição deste processo, do ponto de vista de equilíbrio químico, é mostrado abaixo



onde a constante de associação no equilíbrio químico pode ser definida como

$$K = \frac{[ML]}{[M] \cdot [L]} \quad (13)$$

Calculando a variação da energia livre no equilíbrio químico em função do potencial químico dos reagentes e produtos temos,

$$\Delta G = \mu^{ML} - \mu^M - \mu^L = 0 \quad (14)$$

Definindo os potenciais químicos acima de acordo com a análise de Colombo,⁹ temos

$$\Delta G =$$

$$\mu_{ML}^0 + R \cdot T \cdot \ln([ML_T]) - R \cdot T \cdot n_W^{ML} \cdot \ln(a_W)$$

$$-\mu_M^0 + R \cdot T \cdot \ln([M_T]) - R \cdot T \cdot n_W^M \cdot \ln(a_w) \quad (15)$$

$$-\mu_L^0 + R \cdot T \cdot \ln([L_T]) - R \cdot T \cdot n_W^L \cdot \ln(a_w)$$

= 0

Rearranjando a equação acima temos

$$\ln\left(\frac{[ML_T]}{[M_T] \cdot [L_T]}\right) = -\frac{\Delta G_0}{R \cdot T} + [(n_W^{ML} - n_W^M - n_W^L) \cdot \ln(a_w)] \quad (16)$$

Reconhecendo-se os diversos termos tem-se

$$\ln(K) = \ln(K_0) + [(n_W^{ML} - n_W^M - n_W^L) \cdot \ln(a_w)] \quad (17)$$

Esta equação prediz a dependência da constante de equilíbrio com a atividade de água via diferença de hidratação entre o produto e os reagentes. Derivando a equação acima em função do logaritmo natural da atividade de água da solução temos

$$\frac{d \ln(K)}{d \ln(a_w)} = \Delta n_w \quad (18)$$

onde K é a constante de equilíbrio da reação e Δn_w a diferença de hidratação aparente entre o estado final e inicial da reação.⁹ Esta equação é análoga às equações de “linkage” de Wyman⁵⁸ e foi usada originalmente por Colombo¹⁰ e colaboradores para determinar efeitos de solvatação na oxigenação da hemoglobina e a diferenciação de hidratação entre as estruturas oxigenada e desoxigenada da hemoglobina em solução. Posteriormente, este método ficou conhecido na literatura como método de estresse osmótico.

II.11 Método de Estresse Osmótico

A célula é o cenário natural para a maioria das reações de interações entre droga e DNA, e como 70 % ou mais de sua composição é água, podemos afirmar que a água é um componente estrutural importante tanto da droga quanto do DNA. Neste ambiente também encontramos solutos neutros naturais tais como açúcares,



polióis e aminoácidos. Estes solutos também são conhecidos como osmólitos e são acumulados na célula quando a mesma se encontra sob estresse osmótico oferecendo uma proteção à célula e às organelas celulares.⁶⁰ Outro papel atribuído aos osmólitos é a estabilização de macromoléculas biológicas contra a desnaturação:⁴⁸ infere-se de uma gama bastante grande de medidas termodinâmicas que esta estabilização ocorra devido ao fato que os osmólitos não interagem diretamente com as macromoléculas em solução,²⁶ o que promove sua exclusão preferencial da superfície e das camadas de hidratação mais próximas às macromoléculas.

Como a atividade de água depende intrinsecamente da concentração de solutos na solução, a adição de osmólitos à solução diminui a atividade de água da solução o que deve desfavorecer reações na direção em que ocorre aumento de hidratação da macromolécula. Esta perturbação termodinâmica do equilíbrio pelas mudanças da atividade de água é a base experimental do método de estresse osmótico. Na prática, osmólitos são utilizados para o controle experimental da atividade de água.

Se considerarmos uma solução ideal, composta pela água, macromolécula e soluto, na qual a concentração da macromolécula é



sempre muitíssimo menor que a concentração da água e do soluto, a atividade de água é aproximadamente igual à fração molar da água (χ_w), isto é,

$$a_w = \chi_w = \frac{n_w}{n_w + n_s} \quad (21)$$

onde n_w e n_s representam, respectivamente, o número de moles de água da solução e do soluto. O logaritmo natural de a_w é dado por

$$\ln a_w \cong \ln \chi_w = \ln(1 - \chi_s) \quad (22)$$

onde $\chi_s = n_s / n_s + n_w$ é a fração molar do soluto. Como $\chi_s \ll 1$, podemos aproximar a atividade de água. Portanto, podemos reescrever a equação acima como

$$\ln a_w \approx -\chi_s = -\frac{n_s}{n_s + n_w} \quad (23)$$

No entanto, para soluções reais, usa-se medir a osmolalidade (Osm) que é uma medida do número de partículas do soluto efetivamente dissolvidos em um quilograma de solução, ou seja, 55,55 moles quando o solvente é a água. Portanto, $\ln a_w$ é obtido, efetivamente, pela relação abaixo

$$\ln a_w = - \frac{(\text{Osmolalidade})}{55,55} \quad (24)$$

As osmolalidades das soluções são medidas diretamente em nosso laboratório com um osmômetro (Osmomette A).

No passado recente, a popularidade do método de estresse osmótico para determinar as variações de hidratação que acompanham interações biomoleculares,¹⁰ tem aumentado consistentemente.³⁵

Este método foi utilizado para determinar a variação de hidratação associado com clivagem específica e não específica de DNA por enzimas de restrição,^{45,43} a ligação de drogas a DNA,^{51,47,37} a transição conformacional de DNA sintético da forma B para a forma Z,³⁶ a ligação de oxigênio à hemoglobina,¹⁰ a associação do repressor gal,¹⁶ a associação de Eco RI a seqüências específicas e não

específicas de DNA,⁵⁰ a desnaturação de dupla e tripla fita de DNA,⁵³ a interação de proteínas com DNA,^{44,1} a abertura e fechamento de canais de membrana,^{61,41} a redução de citocromo oxidase,²⁵ a ligação de glucose à hexokinase,³⁹ a ligação do RNA a RNase A,³ a associação e dissociação da antitrobina com heparina,²⁸ a ligação de *lac* repressor a DNA,¹⁵ a transição de metarodopsina I e II no equilíbrio,³⁰ entre muitas outras.

A grande contribuição do método de estresse osmótico reside no fato de que da mesma maneira que a dependência da constante de ligação com a atividade de próton ou sal revela o número de prótons ou íons envolvidos em uma reação, a dependência da constante de ligação com a atividade de água revela o número de águas envolvidas na reação.

II.12 Método de Análise da Função Densidade de Ligação de Ligante.

Um entendimento detalhado de interações macromoleculares, tais como aquelas envolvendo proteínas e ácidos nucleicos, exigem informações sobre a energética e cinética das



moléculas que estão interagindo bem como suas informações estruturais.² Um estudo quantitativo de ligação, no equilíbrio, de proteína com ácidos nucleicos é usualmente planejado para determinar a estequiometria da interação, a existência e grau de cooperatividade (positiva ou negativa), constantes de ligação macroscópica independente de modelo e a dependência de parâmetros de ligação no equilíbrio com as variáveis da solução tais como, temperatura, atividade de próton (pH), atividade de água (a_w) e concentração de sal.

De modo a obter os parâmetros acima, isotermas de ligação no equilíbrio devem ser medidas ao longo de uma faixa de densidade de ligação. Há uma variedade de técnicas nas quais a ligação é monitorada diretamente (diálise, footprinting, etc), fornecendo isotermas de ligação independente de modelo. No entanto, métodos espectroscópicos indiretos são mais convenientes desde que propriedades espectroscópicas do ligante ou macromolécula mudam na formação do complexo. Estes também produzem isotermas de ligação independente de modelo.

O método de análise apresentado aqui refere-se às condições nas quais a absorção do ligante foi monitorado e múltiplos ligantes podem-se ligar na macromolécula. Este método foi



empregado originalmente por Bujalowski & Lohman² nos seus estudos da interação de proteína com DNA.

A partir de agora vamos apresentar as expressões da função densidade de ligação de ligante para a ligação de múltiplas moléculas de daunomicina (droga) a DNA.

Vamos considerar a ligação, no equilíbrio, da droga ao DNA tal que existem i estados possíveis de daunomicina ligada, sendo que cada estado i possível apresenta uma absorção, Abs_i . A absorção observada, Abs_{obs} , da solução da daunomicina na presença de DNA tem contribuição da daunomicina livre e ligada ao DNA em qualquer dos seus i estados ligado possíveis e pode ser expressada pela equação abaixo usando a lei de Beer-Lambert

$$Abs_{obs} = L_{Livre} \cdot \epsilon_{Livre} + \sum_{i=1}^r v_i \cdot [DNA] \cdot \epsilon_{Ligadoi} \quad (25)$$

onde $[DNA]$ é a concentração de DNA na amostra, L_{Livre} é a concentração da daunomicina livre. ϵ_{Livre} e $\epsilon_{Ligadoi}$ são os coeficientes de extinção molar da daunomicina livre e ligada ao DNA.

Definindo L_{Livre} na equação abaixo como

$$L_{Livre} = L_{Total} - \sum v_i \cdot [DNA] \quad (26)$$

e substituindo-a na equação 25, temos

$$Abs_{obs} = L_{Total} \cdot \epsilon_{Livre} + [DNA] \cdot \sum_{i=1}^r v_i (\epsilon_{Ligado_i} - \epsilon_{Livre}) \quad (27)$$

rearranjando a equação acima temos

$$\frac{A_0 - A_i}{A_0} \cdot \frac{L_{Total}}{[DNA]_i} = \sum_{i=1}^r v_i \left(\frac{\epsilon_{Livre} - \epsilon_{Ligado_i}}{\epsilon_{Livre}} \right) \quad (28)$$

Esta equação pode ser utilizada para a determinação da fração de droga ligada a partir da determinação das curvas de ligação em diferentes concentrações de DNA. A aplicação deste método será exemplificada em resultados.

III. RESULTADOS

III.1 Análise Espectrofotométrica da Interação da Actinomicina com DNA

A partir de agora apresentaremos os nossos dados da interação da actinomicina com DNA em tampão fosfato e na presença de diferentes concentrações de sacarose.

III.1.1 Caracterização Espectral da Actinomicina na Presença de Tampão Fosfato.

Com o objetivo de caracterizar os espectros da actinomicina livre e ligada em tampão fosfato, adicionamos alíquotas de volume de actinomicina na ausência e em excesso de DNA, respectivamente. A figura 3 apresenta espectros de absorção óptica na região do visível da actinomicina em tampão fosfato, livre e ligada com DNA. Nota-se a existência de um pico de absorção máxima na região de 440 nm no espectro óptico da actinomicina livre. Quando a actinomicina liga ao DNA, seu espectro de absorção sofre um efeito

hipocrômico e batocrômico com um espectro de absorção máxima na região de 480 nm.

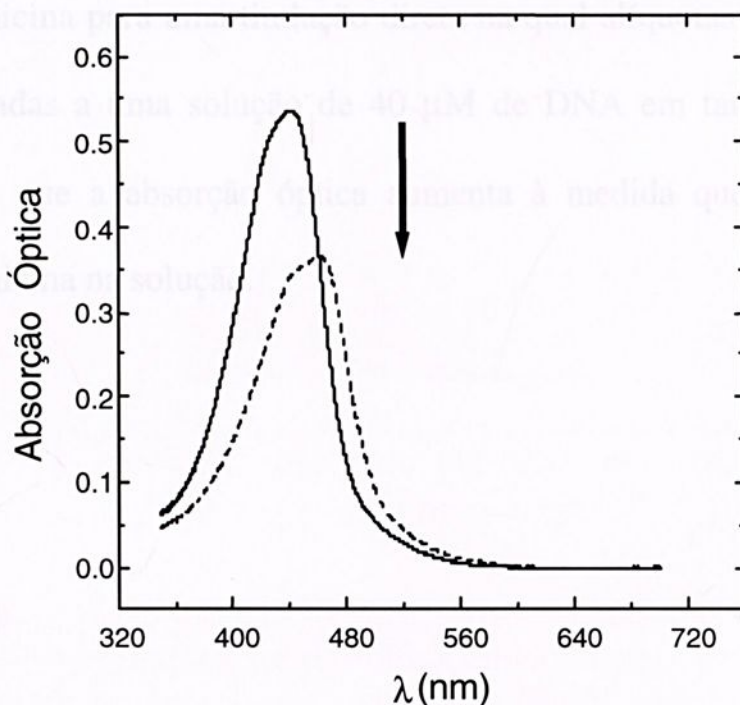


Figura 3. Espectros de absorção óptica da actinomicina em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7,5 e 25°C, na ausência (—) e presença (---) de DNA. As concentrações de actinomicina livre e DNA foram $4,43 \times 10^{-6}$ M e $7,31 \times 10^{-4}$ M, respectivamente. A seta indica que o espectro de absorção óptica da actinomicina decresce na presença de DNA.

III.1.2 Titulação Espectrofotométrica Direta

A figura 4 apresenta os espectros de absorção óptica da actinomicina para uma titulação direta na qual alíquotas da droga são adicionadas a uma solução de 40 μM de DNA em tampão fosfato. Nota-se que a absorção óptica aumenta à medida que se adiciona actinomicina na solução.

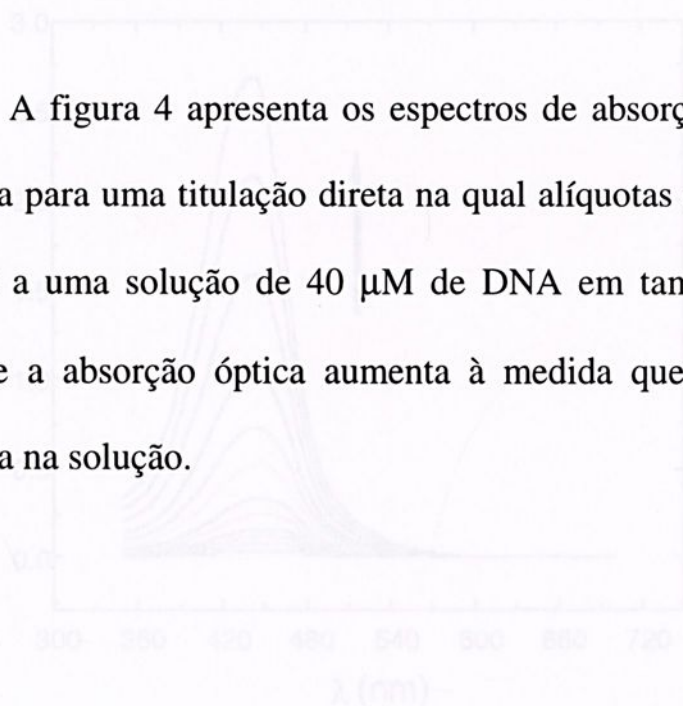


Figura 4. Titulação espectrofotométrica direta de DNA com actinomicina em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7,5 e 25°C. As concentrações totais inicial e final de actinomicina foram $4,66 \times 10^{-7}$ M e $2,36 \times 10^{-2}$ M, respectivamente. A concentração do DNA foi $4,00 \times 10^{-5}$ Mol/L. A seta indica que o espectro de absorção óptica da actinomicina cresce com a adição de actinomicina.

III.1.3 Obtenção das Isotermas de Ligação

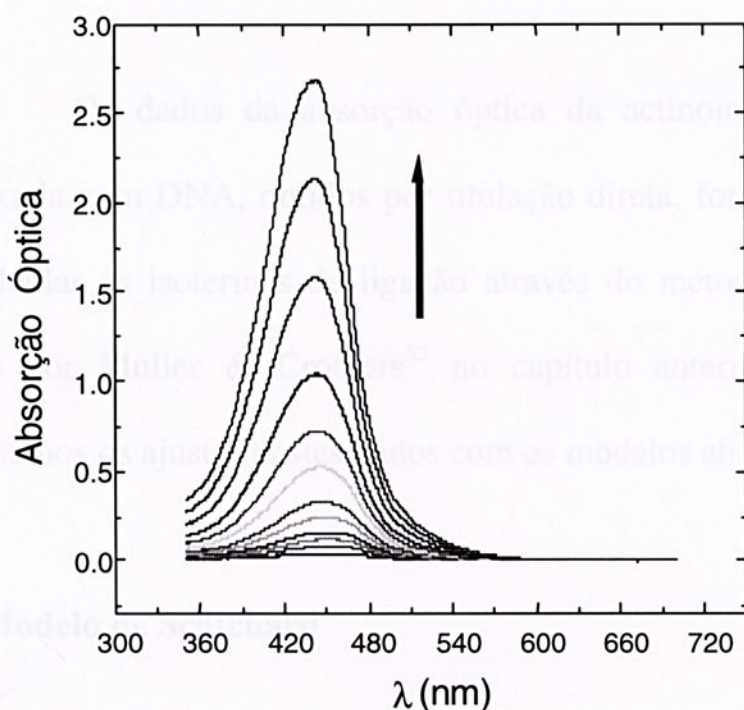


Figura 4. Titulação espectrofotométrica direta de DNA com actinomicina em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7,5 e 25°C. As concentrações totais inicial e final de actinomicina foram $4,66 \times 10^{-7}$ M e $2,36 \times 10^{-5}$ M, respectivamente. A concentração do DNA foi $4,00 \times 10^{-5}$ Mol/L. A seta indica que o espectro de absorção óptica da actinomicina cresce com a adição de actinomicina.

III.1.3 Obtenção das Isotermas de Ligação

Os dados da absorção óptica da actinomicina livre e complexada com DNA, obtidos por titulação direta, foram utilizados para calcular as isotermas de ligação através do método de análise descrito por Muller & Crothers³² no capítulo anterior. A seguir apresentamos os ajustes destes dados com os modelos abaixo,

Modelo de Scatchard

A figura 5 apresenta o gráfico de isotermas de Scatchard para a ligação da actinomicina a uma concentração fixa de DNA e na presença de várias concentrações de sacarose ajustadas com o modelo de Scatchard. Nota-se que a constante de ligação diminui com o aumento da concentração da sacarose em solução. Estas isotermas foram calculadas usando $24.800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $11.900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como os coeficientes de extinção molar da actinomicina livre e ligada, respectivamente.

A figura 6 apresenta os mesmos dados experimentais mostrados na figura 5, porém ajustados com McCabe & von-Hippel.

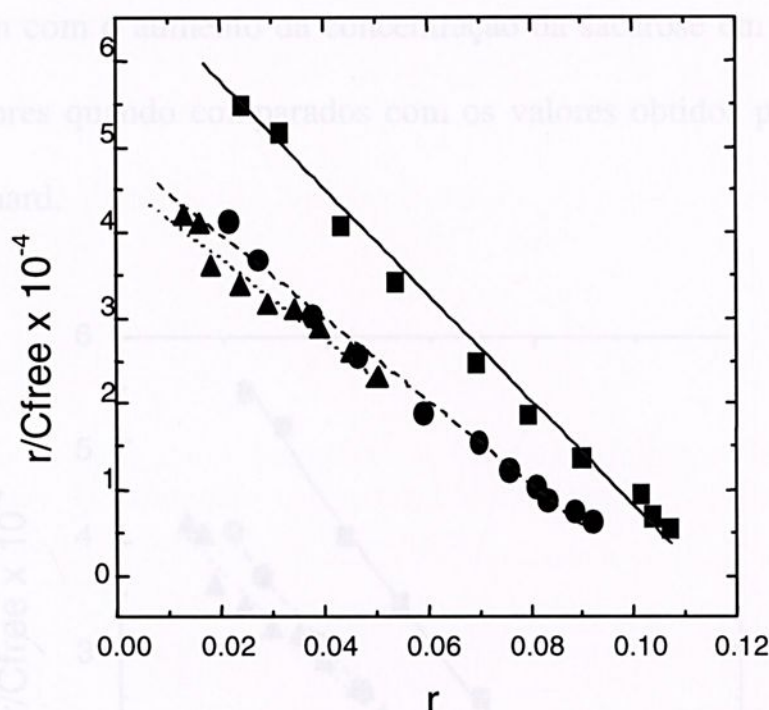


Figura 5. Gráfico de Scatchard para a ligação da actinomicina com DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações de sacarose foram ■, 0% sacarose; ●, 20% sacarose e ▲, 30% sacarose. A concentração de DNA foi 4.0×10^{-5} Mol/L. As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais usando o modelo de Scatchard. As constantes de ligação foram (—), $(6,18 \pm 0,22) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(4,85 \pm 0,15) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e (-.-.-), $(4,67 \pm 0,38) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de 9,09; 10,00 e 10,00, respectivamente.

Modelo de McGhee & von-Hippel

A figura 6 apresenta os mesmos dados experimentais mostrados na figura 5, porém ajustados com McGhee & von-Hippel.

Nota-se que as constantes de ligação, fornecidas pelos ajustes, diminuem com o aumento da concentração da sacarose em solução e são menores quando comparados com os valores obtidos pelo ajuste de Scatchard.

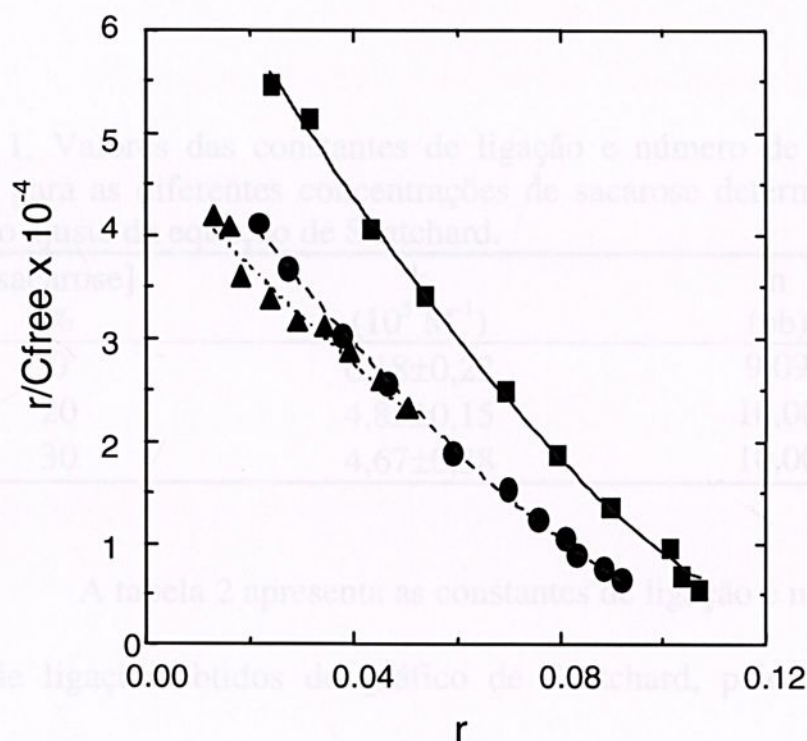


Figura 6. Gráfico de Scatchard para a ligação da actinomicina com DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações de sacarose foram ■, 0% sacarose; ●, 20% sacarose e ▲, 30% sacarose. A concentração de DNA foi 4.0×10^{-5} Mol/L. As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais usando o modelo de McGhee & von-Hippel. As constantes de ligação foram (—), $(0,75 \pm 0,01) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(0,54 \pm 0,05) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e (-.-.-), $(0,47 \pm 0,01) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de $6,11 \pm 0,06$; $6,66 \pm 0,05$ e $6,06 \pm 0,34$, respectivamente.

Tabela 2: Valores das constantes de ligação e número de sítios de ligação para as diferentes concentrações de sacarose determinados a partir do ajuste de Scatchard.

A tabela 1 apresenta as constantes de ligação e número de sítios de ligação obtidos do gráfico de Scatchard, pelo ajuste de Scatchard, na presença de tampão fosfato e diferentes concentrações de sacarose.

Tabela 1. Valores das constantes de ligação e número de sítios de ligação para as diferentes concentrações de sacarose determinados a partir do ajuste da equação de Scatchard.

[sacarose] %	k (10 ⁵ M ⁻¹)	n (pb)
0	6,18±0,22	9,09
20	4,85±0,15	10,00
30	4,67±0,38	10,00

A tabela 2 apresenta as constantes de ligação e número de sítios de ligação obtidos do gráfico de Scatchard, pelo ajuste de McGhee & von-Hippel, na presença de tampão fosfato e diferentes concentrações de sacarose.

A partir de agora passaremos a apresentar a dependência do logaritmo natural das constantes de ligação para a interação da actinomicina com DNA obtidas pelo ajuste de Scatchard e McGhee & von-Hippel em relação ao logaritmo natural da atividade de água.

Tabela 2. Valores das constantes de ligação e número de sítios de ligação para as diferentes concentrações de sacarose determinados a partir do ajuste da equação de McGhee & von-Hippel.

[sacarose] %	k (10^5 M^{-1})	n (pb)
0	$0,75 \pm 0,01$	$6,11 \pm 0,06$
20	$0,54 \pm 0,05$	$6,66 \pm 0,05$
30	$0,47 \pm 0,01$	$6,06 \pm 0,34$

A comparação dos valores das constantes de ligação determinadas pelo ajuste da equação de Scatchard aos dados experimentais (tabela 1) com os valores determinados pela equação de McGhee & von-Hippel, mostram que estes últimos são ligeiramente menores que o primeiro e que esta diferença diminui com a diminuição do valor da constante de ligação.

III.1.4 Dependência da constante de ligação com a atividade de água.

A partir de agora passaremos a apresentar a dependência do logaritmo natural das constantes de ligação para a interação da actinomicina com DNA obtidas pelo ajuste de Scatchard e McGhee & von-Hippel em relação ao logaritmo natural da atividade de água.

A tabela 3 apresenta a osmolalidade e atividade de água para as diferentes concentrações de sacarose empregadas nas titulações.

Tabela 3. Valores da Osmolalidade e logaritmo natural da Atividade de água.

[sacarose] %	Osmolalidade (Osmol)	ln (a_w)
0	0,303	-0,0055
20	0,986	-0,0177
30	1,523	-0,0274

A figura 7 apresenta a dependência da constante de ligação com a atividade de água da solução obtidas com o modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel.

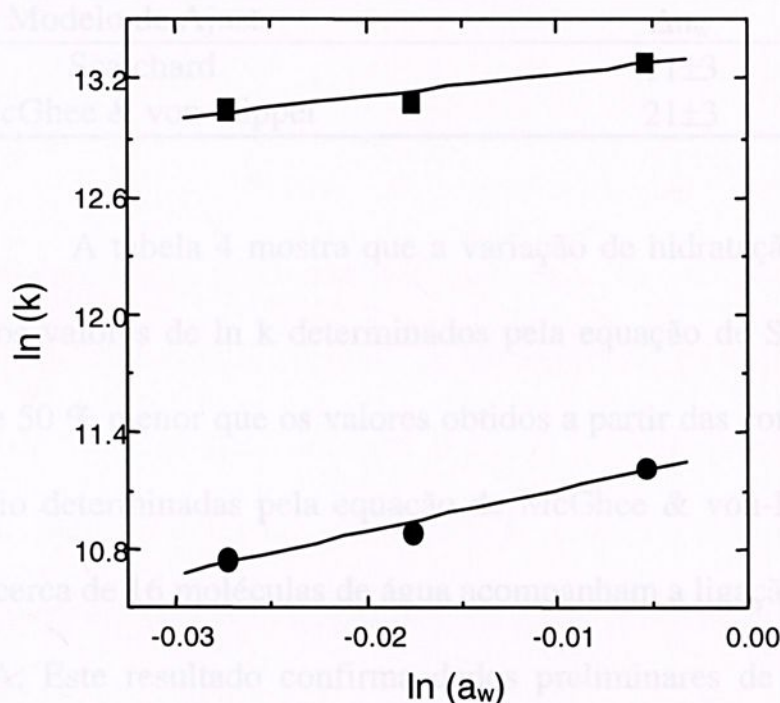


Figura 7. Dependência da constante de ligação com a atividade de água da solução para as diferentes concentrações de sacarose (0; 20 e 30%) em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. Os modelos de ajuste foram Scatchard (■) e McGhee & von-Hippel (●).

As variações de hidratação para os dois modelos de ajuste empregados neste trabalho para analisar a interação da actinomicina com DNA, via titulação direta, são apresentados na tabela 4 abaixo.

Tabela 4. Valores da variação de hidratação para os diferentes modelos.

Modelo de Ajuste	Δn_w
Scatchard	11 ± 3
McGhee & von-Hippel	21 ± 3

A tabela 4 mostra que a variação de hidratação obtida a partir dos valores de $\ln k$ determinados pela equação de Scatchard é cerca de 50 % menor que os valores obtidos a partir das constantes de equilíbrio determinadas pela equação de McGhee & von-Hippel. Na média, cerca de 16 moléculas de água acompanham a ligação da droga ao DNA. Este resultado confirma dados preliminares de Ruggiero-Neto e Colombo⁴⁷ que indicavam que a ligação de actinomicina D aos sítios fracos do DNA é desfavorecida à baixa atividade de água.

III.2 Análise Espectrofotométrica da Interação da Daunomicina com DNA

A partir de agora apresentaremos os nossos dados da interação da daunomicina com DNA na presença de tampão fosfato e sacarose.

III.2.1 Caracterização Espectral da Daunomicina em Tampão

Fosfato.

Com o objetivo de caracterizar os espectros da daunomicina livre e ligada na presença de tampão fosfato, adicionamos aliquotas de volume de daunomicina na ausência e em excesso de DNA, respectivamente. A figura 8 apresenta espectros de absorção óptica na região do visível da daunomicina em tampão fosfato, livre e ligada com DNA. Nota-se a existência de dois picos no espectro óptico da daunomicina livre. Um maior na região de 497 nm e outro menor na região de 480 nm. Quando a daunomicina liga ao DNA, seu espectro de absorção sofre um efeito hipocrômico e batocrômico com um espectro de absorção máxima em 506 nm.⁵⁹ Nota-se também um ponto isobéstico em 543 nm o que indica a existência de duas espécies em equilíbrio no espectro de absorção óptica da daunomicina.

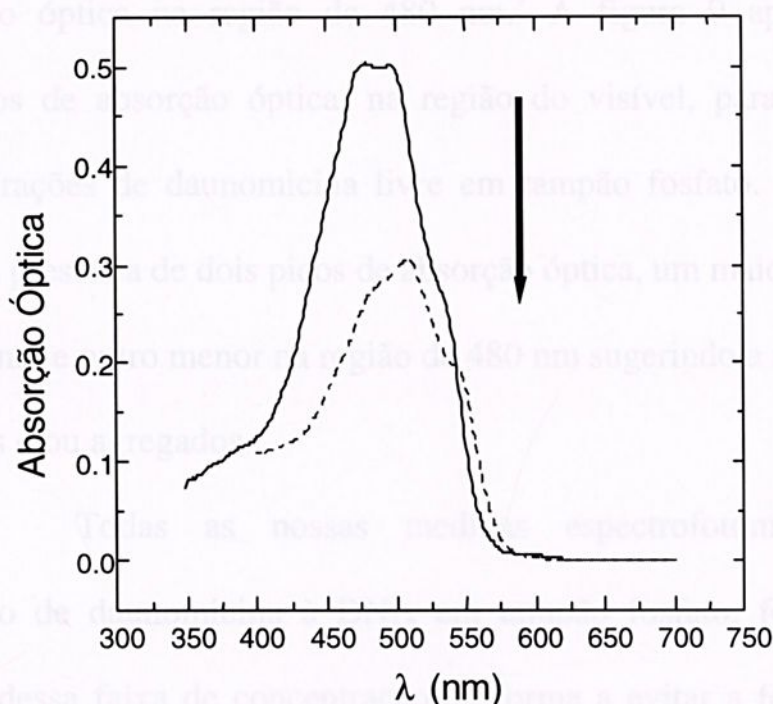


Figura 8. Espectros de absorção óptica da daunomicina em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C, na ausência (—) e presença (---) de DNA. As concentrações de daunomicina livre e DNA foram 8.74×10^{-6} M e 4.22×10^{-4} M, respectivamente. A seta indica que o espectro de absorção óptica diminui na presença de DNA.

III.2.2 Determinação do Coeficiente de Extinção Molar Livre em Tampão Fosfato

É relatado na literatura que a daunomicina se auto-associa em soluções aquosas a uma concentração acima de 10 μ M sendo o

espectro do dímero caracterizado pela presença de apenas um pico de absorção óptica na região de 480 nm.⁷ A figura 9 apresenta os espectros de absorção óptica, na região do visível, para diferentes concentrações de daunomicina livre em tampão fosfato. Nota-se na figura a presença de dois picos de absorção óptica, um maior na região de 497 nm e outro menor na região de 480 nm sugerindo a ausência de dímeros e/ou agregados.

Todas as nossas medidas espectrofotométricas da titulação de daunomicina à DNA em tampão fosfato, foram feitas dentro dessa faixa de concentração de forma a evitar a formação de dímeros e agregados de daunomicina

Figura 9. Espectros de absorção óptica da daunomicina livre em em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA a pH 7.5 e 25°C. As concentrações inicial (—) e final (---) da daunomicina foram 1.83×10^{-6} M e 8.74×10^{-6} M, respectivamente. A seta indica que o espectro de absorção óptica cresce com a adição de daunomicina.

Para confirmar concentração e outras condições experimentais investigadas neste trabalho de que a daunomicina não forma dímeros, determinamos a curva de absorção óptica da droga em função de concentração. A figura 10 mostra o gráfico do valor da absorbância em função da concentração de daunomicina. A linha

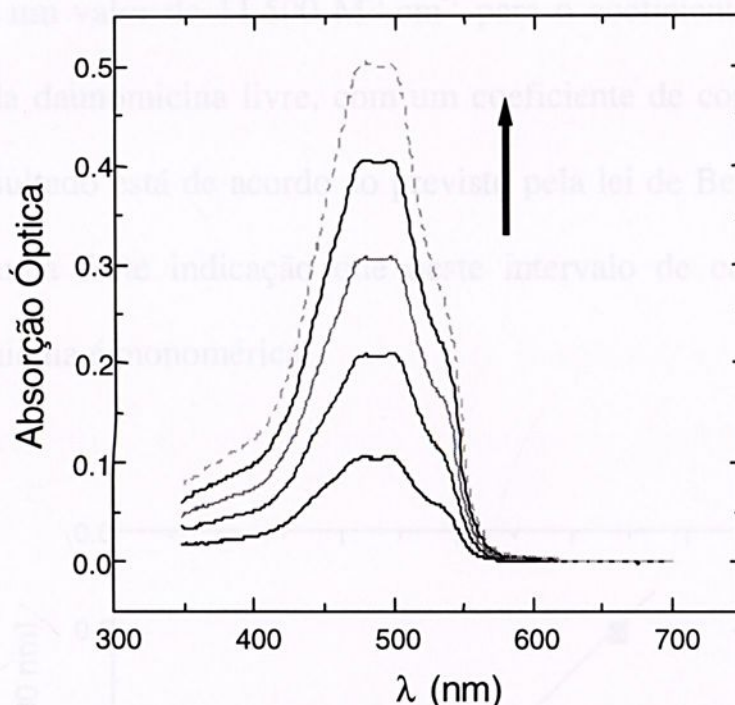


Figura 9. Espectros de absorção óptica da daunomicina livre em em tampão fostato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações inicial (—) e final (---) da daunomicina foram 1.83×10^{-6} M e 8.74×10^{-6} M, respectivamente. A seta indica que o espectro de absorção óptica cresce com a adição de daunomicina.

Para confirmar concentração e outras condições experimentais investigadas neste trabalho de que a daunomicina não forma dímeros, determinamos a curva de absorção óptica da droga em função de concentração. A figura 10 mostra o gráfico do valor da absorbância em função da concentração de daunomicina. A linha

contínua representa o melhor ajuste linear aos dados experimentais e fornece um valor de $11.500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o coeficiente de extinção molar da daunomicina livre, com um coeficiente de correlação de 1. Este resultado está de acordo ao previsto pela lei de Beer-Lambert, o que é uma forte indicação que neste intervalo de concentração a daunomicina é monomérica.

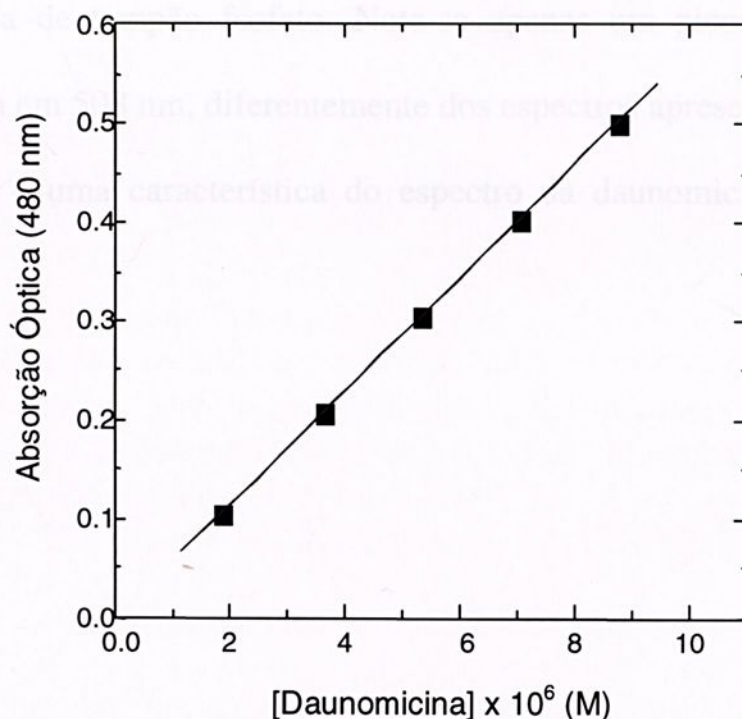


Figura 10. Dependência da absorção óptica em 480 nm com a concentração da daunomicina livre em tampão fostato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações inicial e final da daunomicina foram $1.83 \times 10^{-6} \text{ M}$ e $8.74 \times 10^{-6} \text{ M}$, respectivamente.

III.2.3 Determinação do Coeficiente de Extinção Molar Ligado na presença de Tampão Fosfato.

O coeficiente de extinção molar da daunomicina ligada ao DNA foi determinado a partir de titulação de daunomicina a uma solução com excesso de DNA. A figura 11 apresenta os espectros de absorção óptica da daunomicina monomérica ligada no DNA na presença de tampão fosfato. Nota-se apenas um pico de absorção máxima em 508 nm, diferentemente dos espectros apresentados na fig. 9. Esta é uma característica do espectro da daunomicina ligada ao DNA.

Figura 11. Espectros de absorção óptica da daunomicina em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C, ligada no DNA. As concentrações totais inicial (—) e final (---) da daunomicina foram 8.71×10^{-7} M e 8.67×10^{-8} M, respectivamente. A concentração inicial do DNA foi 4.22×10^{-4} M.

A figura 12 mostra o gráfico do valor da absorção óptica, medida em 480 nm, com a concentração da daunomicina ligada ao DNA em tampão fosfato. A linha contínua representa o melhor ajuste linear aos dados experimentais e fornece um valor de coeficiente de extinção molar igual a 6.150 ± 10 M⁻¹.cm⁻¹ em 480 nm, com coeficiente de correlação de 0.99. Chaires et al.⁸ obteve um valor de coeficiente

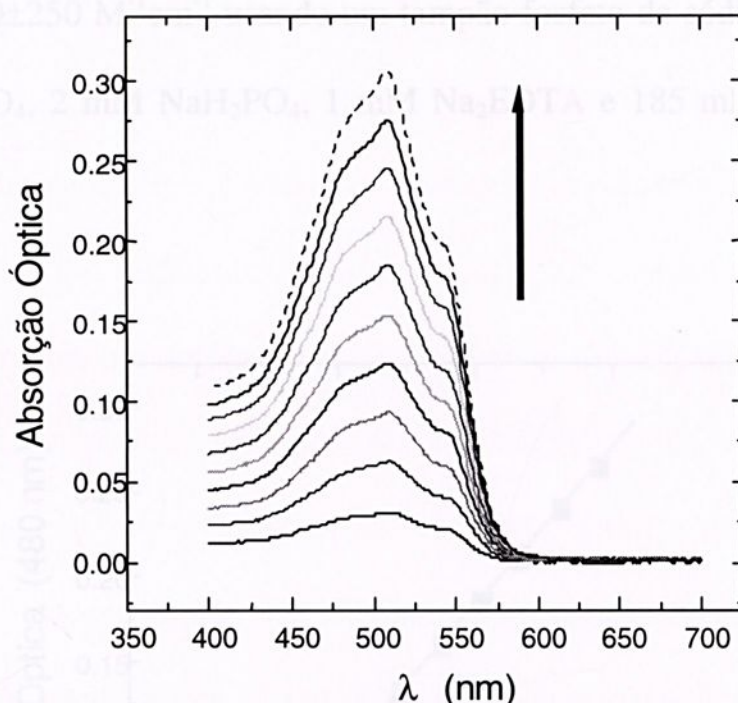


Figura 11. Espectros de absorção óptica da daunomicina em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C, ligada no DNA. As concentrações totais inicial (—) e final (---) da daunomicina foram 8.71×10^{-7} M e 8.67×10^{-6} M, respectivamente. A concentração inicial do DNA foi 4.22×10^{-4} M.

A figura 12 mostra o gráfico do valor da absorção óptica, medida em 480 nm, com a concentração da daunomicina ligada ao DNA em tampão fosfato. A linha contínua representa o melhor ajuste linear aos dados experimentais e fornece um valor de coeficiente de extinção molar igual a $6.150 \pm 10 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ em 480 nm, com coeficiente de correlação de 0.99. Chaires et al,⁸ obteve um valor de coeficiente

de extinção molar, em 505 nm, para a daunomicina ligada com DNA de $7000 \pm 250 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ usando um tampão fosfato de sódio com 6 mM Na_2HPO_4 , 2 mM NaH_2PO_4 , 1 mM Na_2EDTA e 185 mM NaCl à pH 7.0.

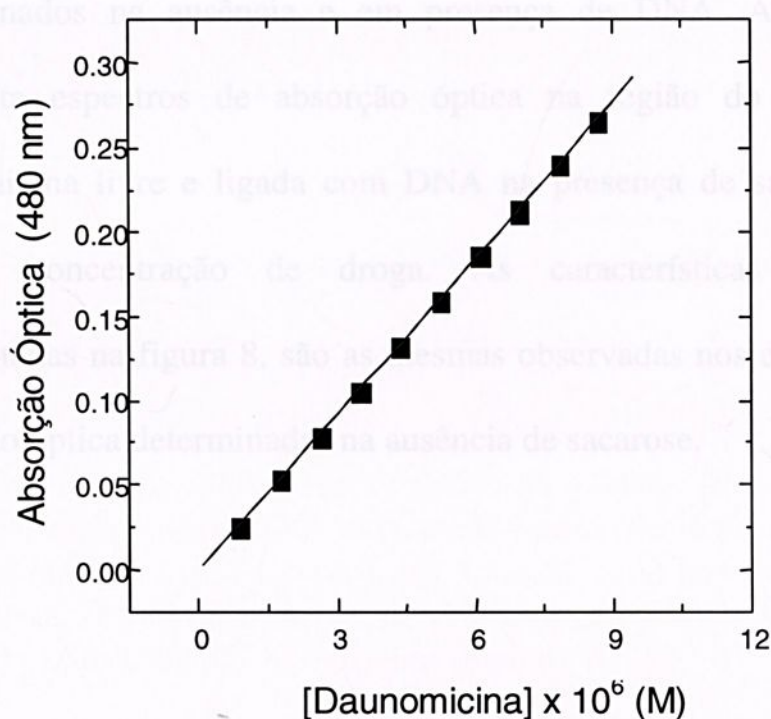


Figura 12. Dependência da absorção óptica em 480 nm com a concentração da daunomicina ligada em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações totais de daunomicina no início e fim foram $8.71 \times 10^{-7} \text{ M}$ e $8.67 \times 10^{-6} \text{ M}$, respectivamente. A concentração inicial do DNA foi $4.22 \times 10^{-4} \text{ M}$.

III.2.4 Caracterização Espectral na Presença de Sacarose

Com o objetivo de caracterizar os espectros da daunomicina livre e ligada na presença de sacarose, espectros de absorção de diferentes concentrações de daunomicina foram determinados na ausência e em presença de DNA. A figura 13 apresenta espectros de absorção óptica na região do visível da daunomicina livre e ligada com DNA na presença de sacarose e a mesma concentração de droga. As características espectrais apresentadas na figura 8, são as mesmas observadas nos espectros de absorção óptica determinadas na ausência de sacarose.

Figura 13. Espectros de absorção óptica da daunomicina na ausência (—) e presença (---) de DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA a pH 7.5 e 25°C na presença de 20 % de sacarose. As concentrações de daunomicina livre e DNA foram 9.09×10^{-6} M e 4.88×10^{-4} M, respectivamente.

III.2.5 Determinação do Coeficiente de Extinção Molar Ligado na Presença de Sacarose.

O coeficiente de extinção molar da daunomicina ligada ao DNA na presença de sacarose, foi determinado a partir dos gráficos de absorbância em 480 nm em função da concentração da droga. A figura

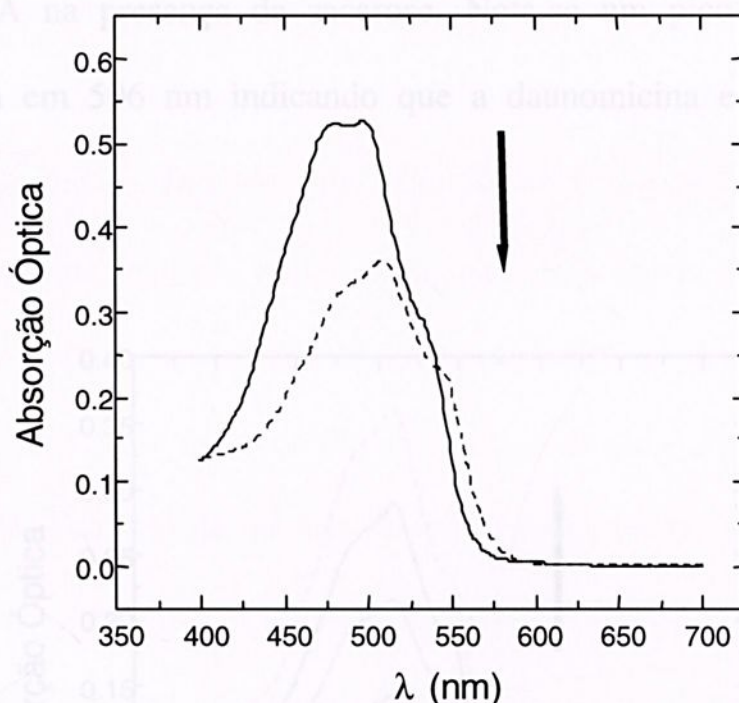


Figura 13. Espectros de absorção óptica da daunomicina na ausência (—) e presença (---) de DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C na presença de 20 % de sacarose. As concentrações de daunomicina livre e DNA foram 9.09×10^{-6} M e 4.88×10^{-4} M, respectivamente.

III.2.5 Determinação do Coeficiente de Extinção Molar Ligado na Presença de Sacarose.

O coeficiente de extinção molar da daunomicina ligada ao DNA na presença de sacarose, foi determinado a partir dos gráficos de absorbância em 480 nm em função da concentração da droga. A figura

14 apresenta os espectros de absorção óptica da daunomicina ligada no DNA na presença de sacarose. Nota-se um pico de absorção máxima em 506 nm indicando que a daunomicina está ligada no DNA.

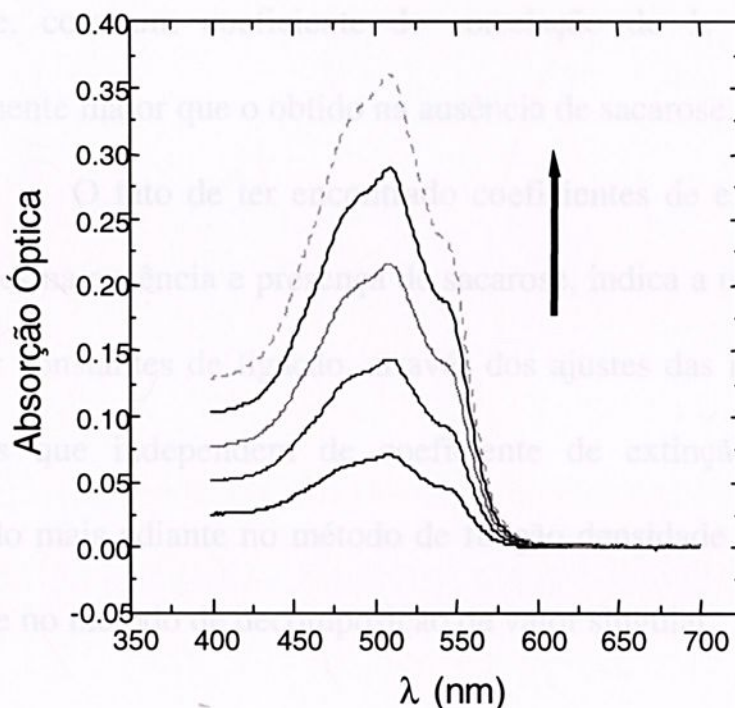


Figura 14. Espectros de absorção óptica da daunomicina ligada no DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C com 20 % de sacarose. A concentração total inicial (—) da daunomicina foi 2.00×10^{-6} M e a concentração total final (----) foi 9.97×10^{-6} M.

A figura 15 apresenta a dependência da absorção óptica com a concentração da daunomicina na presença de DNA e sacarose. A linha contínua na figura representa o melhor ajuste linear aos dados experimentais e fornece um valor de $6.335 \pm 6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ para o coeficiente de extinção molar da daunomicina ligada na presença de sacarose, com um coeficiente de correlação de 1. Este valor é ligeiramente maior que o obtido na ausência de sacarose.

O fato de ter encontrado coeficientes de extinção molar diferentes na ausência e presença de sacarose, indica a necessidade de se obter constantes de ligação, através dos ajustes das isotermas, por métodos que independem de coeficiente de extinção como será mostrado mais adiante no método de função densidade de ligação de ligante e no método de decomposição de valor singular.

III.2.6 Titulação Espectrofotométrica direta em Tampão Fosfato

As constantes de ligação da daunomicina ao DNA foram determinadas em dois tipos de titulação.

A figura 16 apresenta os espectros de absorção óptica da daunomicina para uma titulação direta de aliquotas da droga à uma

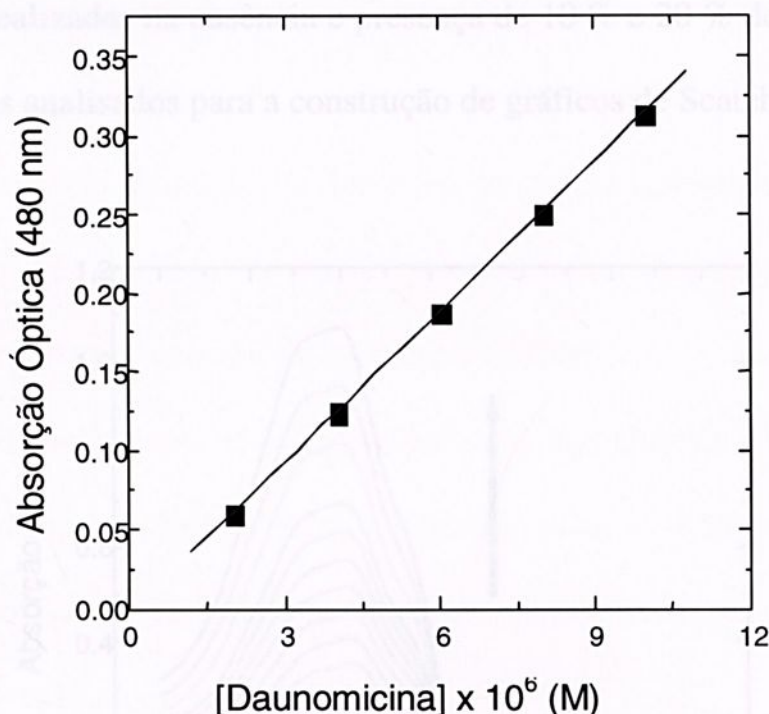


Figura 15. Dependência da absorção óptica em 480 nm com a concentração da daunomicina ligada em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C na presença de 20 % sacarose.

III.2.6 Titulação Espectrofotométrica direta em Tampão Fosfato

daunomicina em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações totais inicial e final de daunomicina foram 1.18×10^{-6} M e 2.34×10^{-5} M, respectivamente. A concentração de DNA foi 1.0×10^{-5} M.

As constantes de ligação da daunomicina ao DNA foram determinadas em dois tipos de titulação.

A figura 16 apresenta os espectros de absorção óptica da daunomicina para uma titulação direta de alíquotas da droga à uma

solução de 40 μM de DNA em tampão fosfato. Medidas deste tipo foram realizadas na ausência e presença de 10 % e 20 % de sacarose e os dados analisados para a construção de gráficos de Scatchard.

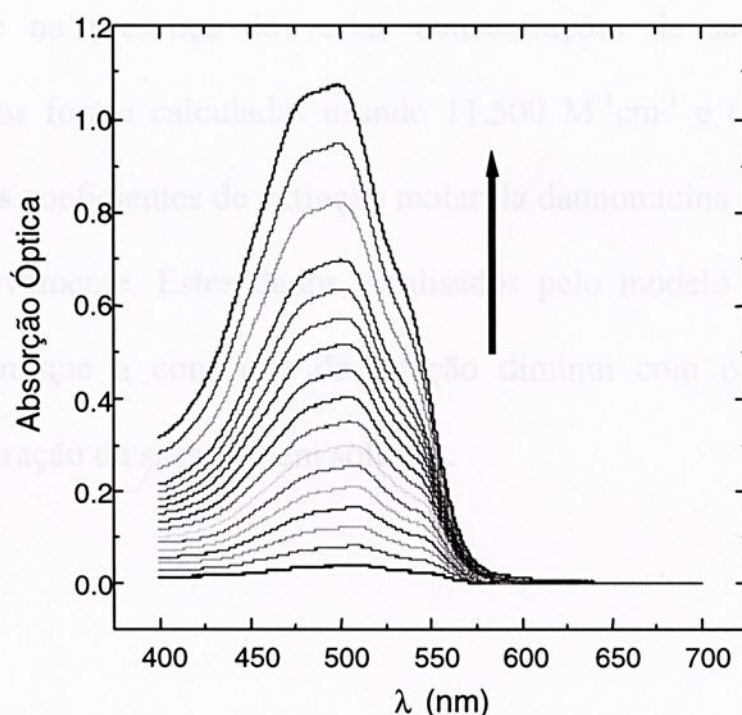


Figura 16. Titulação espectrofotométrica direta de DNA com daunomicina em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações totais inicial e final de daunomicina foram 1.18×10^{-6} M e 2.34×10^{-5} M, respectivamente. A concentração do DNA foi 4.0×10^{-5} Mol/L.

III.2.7 Obtenção das Isotermas de Ligação para Titulação Direta

A figura 17 apresenta os gráficos das isotermas de Scatchard para a ligação da daunomicina a uma concentração fixa de DNA e na presença de varias concentrações de sacarose. Estas isotermas foram calculadas usando $11.500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $6.100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ como os coeficientes de extinção molar da daunomicina livre e ligada, respectivamente. Estes dados, analisados pelo modelo de Scatchard mostram que a constante de ligação diminui com o aumento da concentração da sacarose em solução.

Figura 17. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA a pH 7.5 e 25°C. As concentrações de sacarose foram 0% sacarose (●), 10% sacarose (○) e 20% sacarose (▲). A concentração de DNA foi $4.0 \times 10^3 \text{ Mol/L}$. As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais - usando o modelo de Scatchard. As constantes de ligação foram (—), $(20,2 \pm 1,10) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$; (---), $(16,9 \pm 0,50) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ e (-.-.-), $(12,1 \pm 0,70) \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de 3,57; 3,57 e 3,45, respectivamente.

A figura 18 apresenta os mesmos dados experimentais mostrados na figura 17, sendo que o ajuste foi realizado utilizando o modelo anticompetitivo de McGhee & von Hippel.

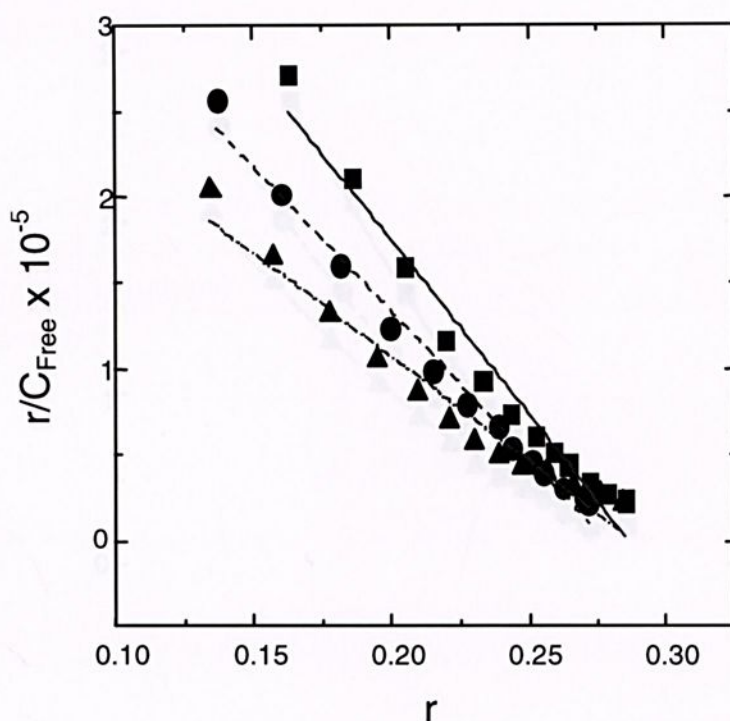


Figura 17. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com DNA em tampão fostato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações de sacarose foram ■, 0% sacarose; ●, 10% sacarose e ▲, 20% sacarose. A concentração de DNA foi 4.0×10^{-5} Mol/L. As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais usando o modelo de Scatchard. As constantes de ligação foram (—), $(20,2 \pm 1,10) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(16,9 \pm 0,50) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e (-.-.-), $(12,1 \pm 0,70) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de 3,57; 3,57 e 3,45, respectivamente.

A figura 18 apresenta os mesmos dados experimentais mostrados na figura 17, sendo que o ajuste foi realizado utilizando o modelo anticooperativo de McGhee & von-Hippel.

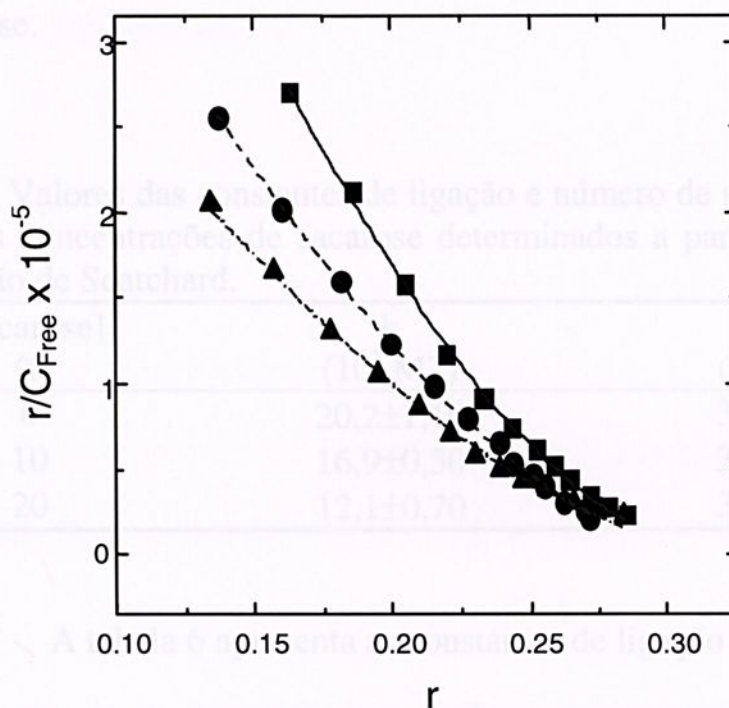


Figura 18. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações de sacarose foram ■, 0% sacarose; ●, 10% sacarose e ▲, 20% sacarose. A concentração de DNA foi 4.0×10^{-5} Mol/L. As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais usando o modelo de McGhee & von-Hippel. As constantes de ligação foram (—), $(8,89 \pm 0,15) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(6,41 \pm 0,06) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e (-.-.-), $(4,72 \pm 0,09) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de $2,94 \pm 0,01$; $2,94 \pm 0,01$ e $2,85 \pm 0,02$, respectivamente.

A tabela 5 apresenta as constantes de ligação e número de sítios de ligação obtidos do gráfico de Scatchard, pelo ajuste de

Scatchard, na presença de tampão fosfato e diferentes concentrações de sacarose.

Tabela 5. Valores das constantes de ligação e número de sítios para as diferentes concentrações de sacarose determinados a partir do ajuste da equação de Scatchard.

[sacarose] %	k (10^5 M^{-1})	n (pb)
0	$20,2 \pm 1,10$	3,57
10	$16,9 \pm 0,50$	3,57
20	$12,1 \pm 0,70$	3,45

A tabela 6 apresenta as constantes de ligação e número de sítios de ligação obtidos do gráfico de Scatchard, pelo ajuste de McGhee & von-Hippel, na presença de tampão fosfato e diferentes concentrações de sacarose.

Tabela 6. Valores das constantes de ligação e número de sítios para as diferentes concentrações de sacarose determinados a partir do ajuste da equação de McGhee & von-Hippel.

[sacarose] %	k (10^5 M^{-1})	n (pb)
0	$8,89 \pm 0,15$	$2,94 \pm 0,01$
10	$6,41 \pm 0,06$	$2,94 \pm 0,01$
20	$4,72 \pm 0,09$	$2,85 \pm 0,02$

III.2.8 Dependência da constante de ligação com a atividade de água para Titulação Direta

A análise do efeito de água na interação da daunomicina com DNA foi feita considerando as constantes de ligação obtidas pelo ajuste de Scatchard e McGhee & von-Hippel.

Os valores de osmolalidade e atividade de água determinados no fim de cada titulação, são mostrados na tabela 7.

Tabela 7. Valores da Osmolalidade e logaritmo natural da Atividade de água.

[sacarose] %	Osmolalidade (Osmol)	ln (a_w)
0	0,305	-0,0055
10	0,616	-0,0111
20	0,999	-0,0180

A figura 19 apresenta a dependência do logaritmo natural da constante de ligação com o logaritmo natural da atividade de água da solução obtidas com o modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel.

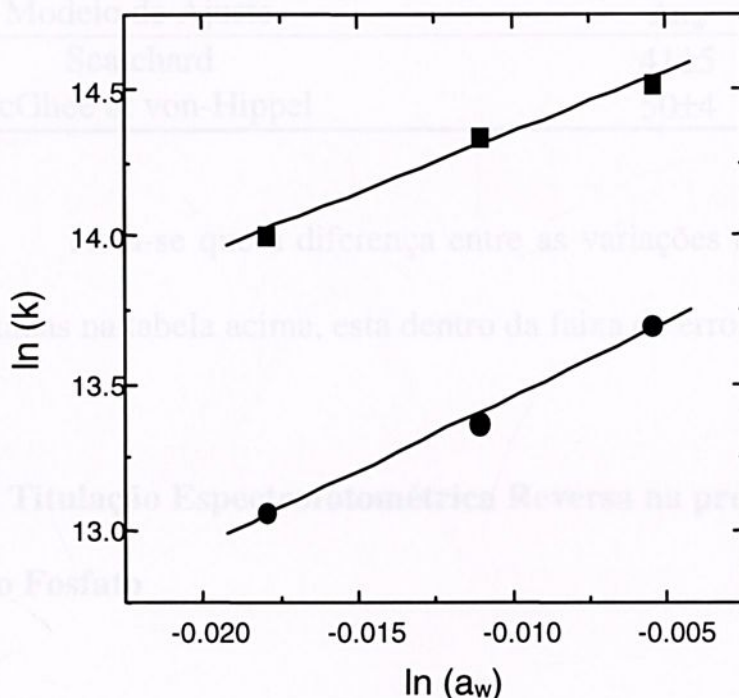


Figura 19. Dependência da constante de ligação com a atividade de água da solução para as diferentes concentrações de sacarose (0; 10 e 20%) em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. Os modelos de ajuste foram Scatchard (■) e McGhee & von-Hippel (●).

Os valores de variação de hidratação associados a ligação de daunomicina a DNA para os dois modelos de ajuste, são apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Valores da variação de hidratação para os diferentes modelos.

Modelo de Ajuste	Δn_w
Scatchard	41 ± 5
McGhee & von-Hippel	50 ± 4

Nota-se que a diferença entre as variações de hidratação apresentadas na tabela acima, esta dentro da faixa de erro obtida.

III.2.9 Titulação Espectrofotométrica Reversa na presença de Tampão Fosfato



A figura 20 apresenta espectros de absorção óptica de daunomicina em um experimento de titulação no qual alíquotas de DNA foram adicionadas à solução de daunomicina em tampão fosfato. Nota-se que a absorção óptica diminui à medida que se adiciona DNA à solução. Entretanto, esta diminuição é mais acentuada para as primeiras adições e menos acentuada para as últimas onde há excesso de DNA na solução.

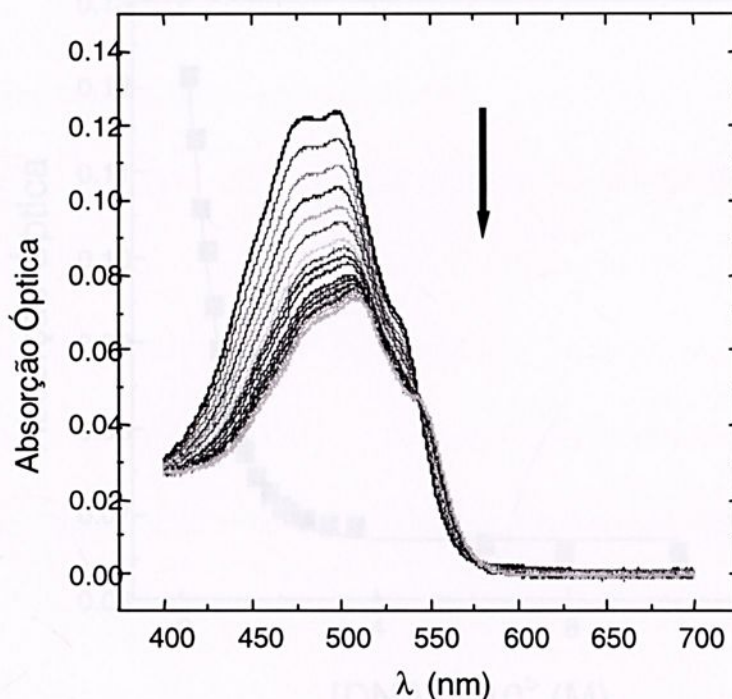


Figura 20 . Titulação espectrofotométrica reversa da daunomicina com DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. A concentração inicial da daunomicina foi 2.25×10^{-6} M. A seta indica que os espectros de absorção óptica decrescem com a titulação de DNA.

III.2.10 Obtenção das Isotermas de Ligação para Titulação

Reversa na A figura 21 apresenta a dependência da absorção óptica com a concentração de DNA. Nota-se que a absorção óptica decresce à medida que se adiciona DNA até atingir a saturação. A partir deste ponto, nenhuma variação da absorção óptica é observada mesmo que se adicione mais DNA, indicando que ou não há mais ligante livre ou a sua concentração é muito pequena.

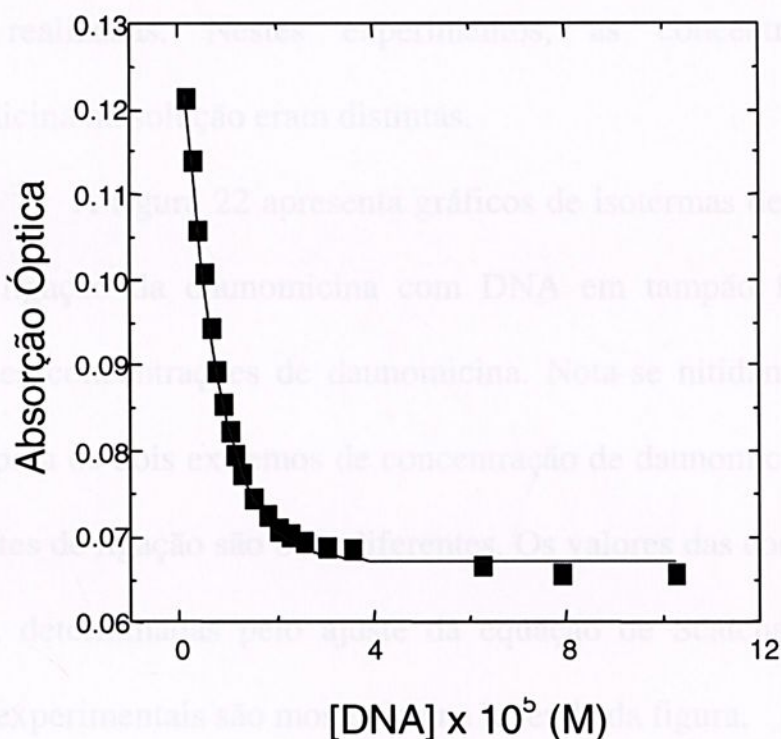


Figura 21. Dependência da absorção óptica com a concentração de DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C.

III.2.10 Obtenção das Isotermas de Ligação para Titulação

Reversa na Presença de Tampão Fosfato

Os dados da absorção óptica da daunomicina em função da concentração de DNA, apresentados na figura 21, foram utilizados para calcular as isotermas com a equação 8.

Diversas titulações independentes de DNA a daunomicina foram realizadas. Nestes experimentos, as concentrações de daunomicina na solução eram distintas.

A figura 22 apresenta gráficos de isotermas de Scatchard para a ligação da daunomicina com DNA em tampão fosfato em diferentes concentrações de daunomicina. Nota-se nitidamente, pelo menos para os dois extremos de concentração de daunomicina, que as constantes de ligação são bem diferentes. Os valores das constantes de ligação, determinadas pelo ajuste da equação de Scatchard a estes pontos experimentais são mostrados na legenda da figura.

Figura 22. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com ct-DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA a pH 7.5 e 25°C. As concentrações de daunomicina foram ■, 2 μ M; ●, 4 μ M; ▲, 6 μ M e ▼, 8 μ M. As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais usando o modelo de Scatchard. As constantes de ligação foram (—), $(32,2 \pm 1,40) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(29,7 \pm 1,90) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(23,6 \pm 1,10) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e (-.-), $(17,4 \pm 0,70) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de 4,00; 3,62; 3,57 e 3,37, respectivamente.

Os dados experimentais apresentados acima foram também analisados com o modelo de exclusão de sítios de McGhee & von Hippel. As linhas contínuas mostradas no gráfico da figura 23, representam o melhor ajuste da equação de McGhee &

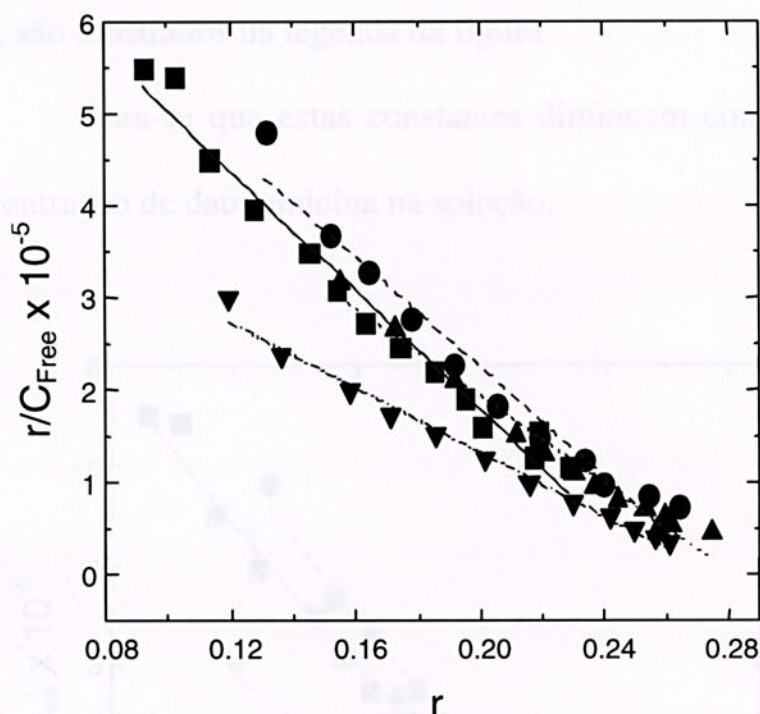


Figura 22. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com ct-DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações de daunomicina foram ■, 2 μM ; ●, 4 μM ; ▲, 6 μM e ▼, 8 μM . As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais usando o modelo de Scatchard. As constantes de ligação foram (—), $(32,2 \pm 1,40) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(29,7 \pm 1,90) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (...), $(23,6 \pm 1,10) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e (-.-), $(17,4 \pm 0,70) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de 4,00; 3,62; 3,57 e 3,57, respectivamente.

Os dados experimentais apresentados acima foram também analisados com o modelo de exclusão de sítios de McGhee & von-Hippel. As linhas contínuas, mostradas no gráfico da figura 23, representam o melhor ajuste da equação de McGhee &

von-Hippel à estes dados. Os valores das constantes de ligação obtidos, são mostrados na legenda da figura.

Nota-se que estas constantes diminuem com o aumento da concentração de daunomicina na solução.

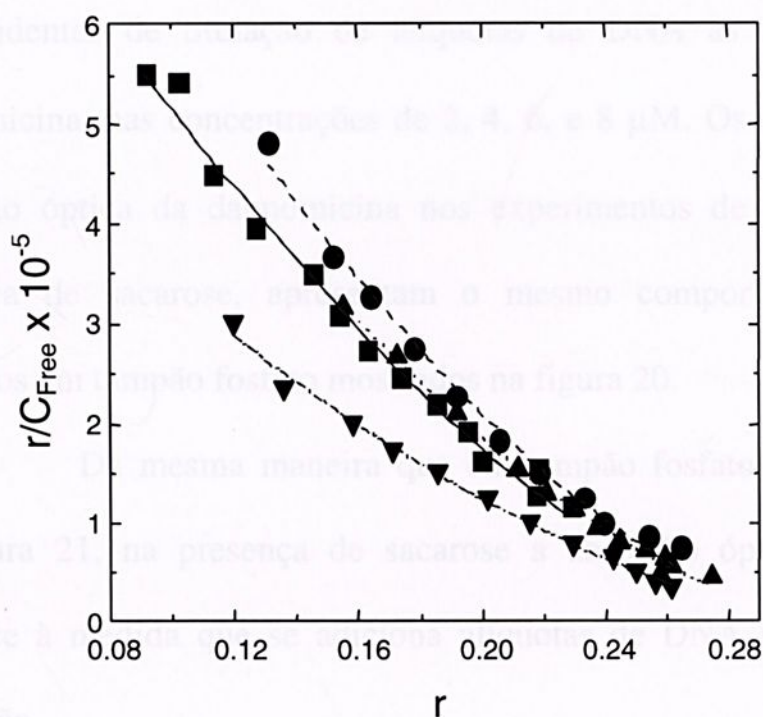


Figura 23. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com ct-DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações de daunomicina foram ■, 2 μ M; ●, 4 μ M; ▲, 6 μ M e ▼, 8 μ M. As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais usando o modelo de McGhee & von-Hippel. As constantes de ligação foram (—), $(9,55 \pm 0,23) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(10,86 \pm 0,35) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (...), $(9,37 \pm 0,21) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e (-.-.), $(6,02 \pm 0,15) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de $2,97 \pm 0,04$; $2,93 \pm 0,03$; $2,91 \pm 0,02$ e $2,87 \pm 0,03$, respectivamente.

III.2.11 Titulação Espectrofotométrica Reversa na Presença de Sacarose

Com o objetivo também de obter a constante de ligação no equilíbrio na presença de sacarose, foram realizados experimentos independentes de titulação de alíquotas de DNA às soluções de daunomicina, nas concentrações de 2, 4, 6, e 8 μM . Os espectros de absorção óptica da daunomicina nos experimentos de titulação na presença de sacarose, apresentam o mesmo comportamento dos espectros em tampão fosfato mostrados na figura 20.

Da mesma maneira que em tampão fosfato apresentado na figura 21, na presença de sacarose a absorção óptica também decresce à medida que se adiciona alíquotas de DNA até atingir a saturação.



III.2.12 Obtenção das Isotermas de Ligação para Titulação Reversa na Presença de Sacarose.

Os dados da absorção óptica da daunomicina em função da concentração de DNA, foram utilizados para calcular as isotermas de ligação na presença de sacarose através da equação 8.

A figura 24 apresenta gráficos de isotermas de Scatchard para a ligação da daunomicina com DNA na presença de 10 % de sacarose ajustadas com o modelo de Scatchard. As constantes de ligação determinadas estão mostradas na legenda da figura. Novamente se observa que estas constantes de ligação são dependentes da concentração de daunomicina na solução.

Figura 24. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com DNA na presença de 10 % de sacarose. Condições: solução tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações de daunomicina foram ■, 2 µM; ●, 4 µM; ▲, 6 µM e ▼, 8 µM. As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais usando o modelo de Scatchard. As constantes de ligação obtidas foram (—), $(33,9 \pm 1,70) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(28,5 \pm 1,70) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (...), $(17,5 \pm 0,90) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e (-.-.), $(15,7 \pm 0,60) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de 4,00, 3,70, 3,57 e 3,84, respectivamente.

A figura 25 apresenta as isotermas de ligação de daunomicina na presença de 10 % de sacarose ajustadas com o

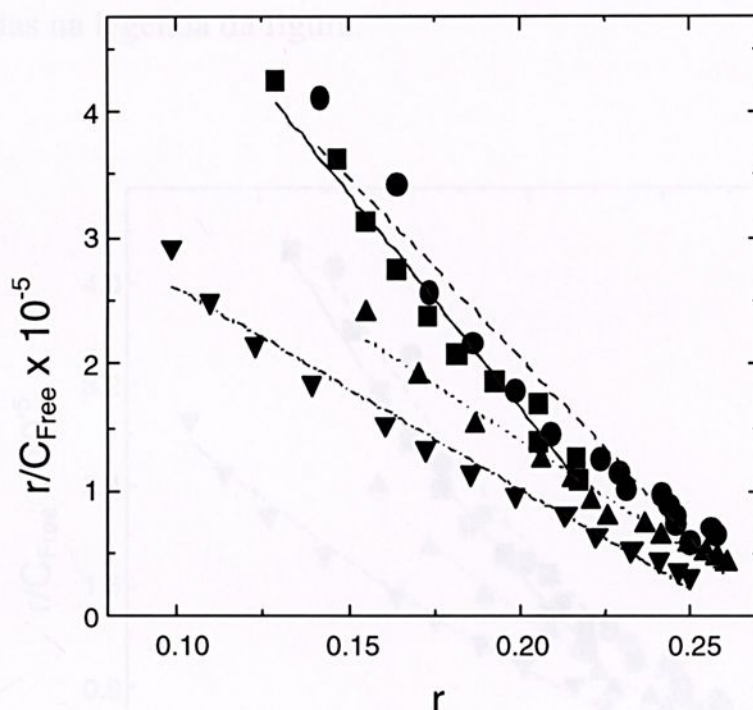


Figura 24. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com DNA, na presença de 10% sacarose, em tampão fostato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações de danunomicina foram ■, 2 μ M; ●, 4 μ M; ▲, 6 μ M e ▼, 8 μ M. As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais usando o modelo de Scatchard. As constantes de ligação obtidas foram (—), $(33,9 \pm 1,70) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(28,5 \pm 1,70) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (...), $(17,5 \pm 0,90) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e (-.-.), $(15,7 \pm 0,60) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de 4,00; 3,70; 3,57 e 3,84, respectivamente.

A figura 25 apresenta as isotermas de ligação de daunomicina na presença de 10 % de sacarose ajustadas com o

modelo de McGhee & von-Hippel. As constantes de ligação estão mostradas na legenda da figura.

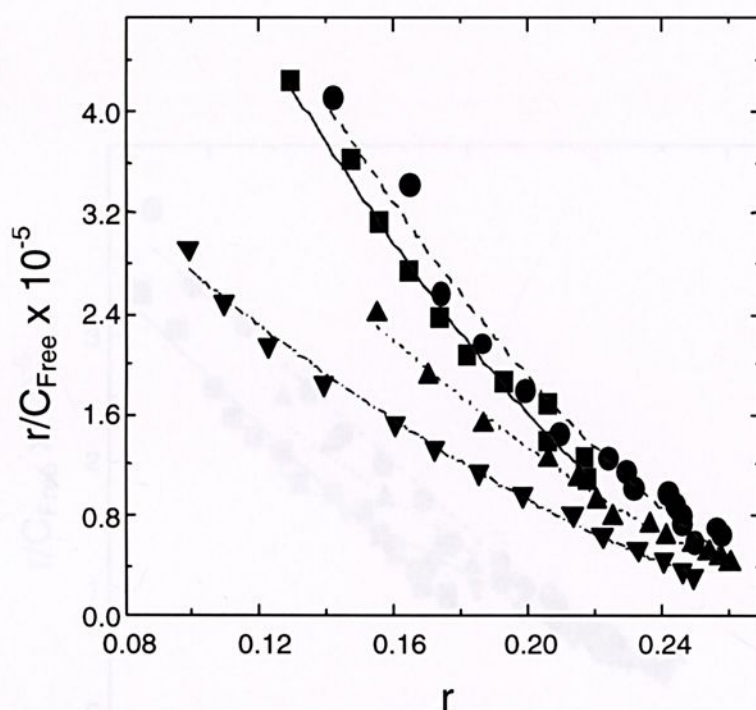


Figura 25. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com DNA, na presença de 10% sacarose, em tampão fostato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações de daunomicina foram ■, 2 μM ; ●, 4 μM ; ▲, 6 μM e ▼, 8 μM . As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais usando o modelo de McGhee & von-Hippel. As constantes de ligação foram (—), $(10,68 \pm 0,39) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(10,84 \pm 0,48) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (...), $(6,77 \pm 0,21) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e (-.-), $(5,03 \pm 0,12) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de $3,12 \pm 0,04$; $3,00 \pm 0,04$; $2,91 \pm 0,02$ e $2,97 \pm 0,03$, respectivamente.

A figura 26 apresenta as isotermas de ligação da daunomicina na presença de 20 % de sacarose ajustadas com o modelo de Scatchard.

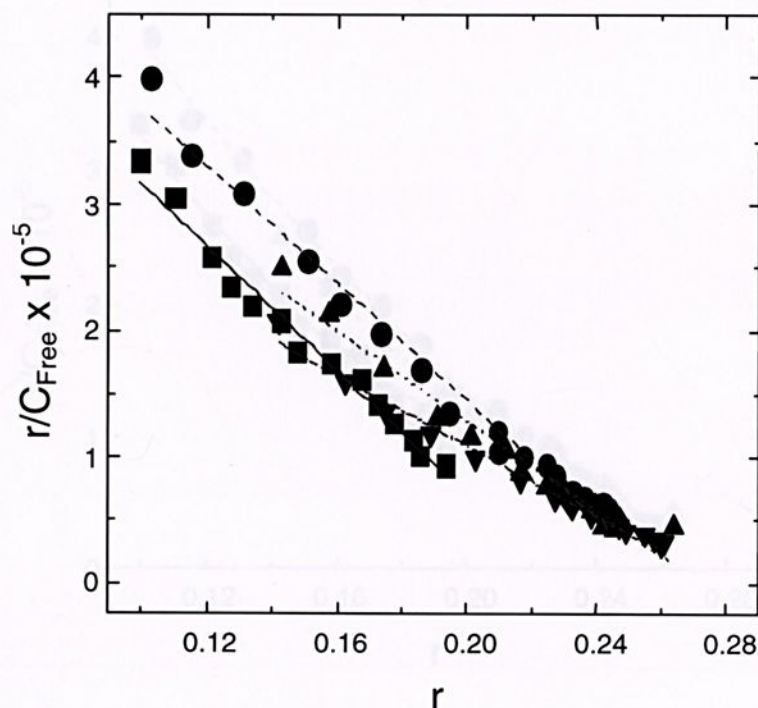


Figura 26. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com DNA, na presença de 20% sacarose, em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações de daunomicina foram ■, 2 μM ; ●, 4 μM ; ▲, 6 μM e ▼, 8 μM . As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais usando o modelo de Scatchard. As constantes de ligação obtidas foram (—), $(24,6 \pm 1,00) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(23,1 \pm 0,70) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (...), $(17,6 \pm 0,80) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e (-.-.), $(13,8 \pm 0,40) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de 4,34; 3,84; 3,70 e 3,57, respectivamente.

A figura 27 apresenta as isotermas de ligação da daunomicina na presença de 20 % de sacarose ajustadas com o modelo de McGhee & von-Hippel.

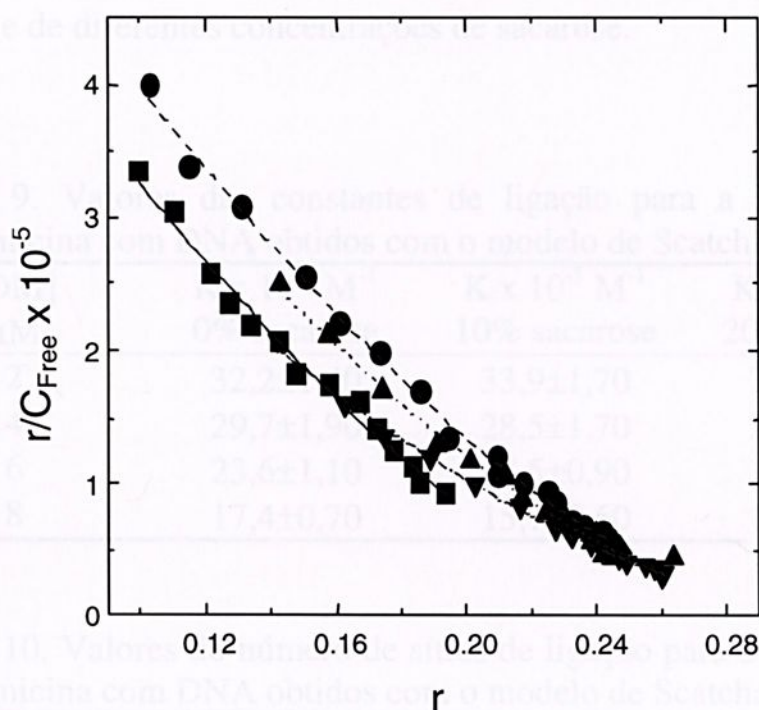


Figura 27. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com DNA ,na presença de 20% sacarose, em tampão fostato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações de danunomicina foram ■, 2 μ M; ●, 4 μ M; ▲, 6 μ M e ▼, 8 μ M. As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais usando o modelo de McGhee & von-Hippel. As constantes de ligação foram (—), $(6,59 \pm 0,19) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (---), $(7,37 \pm 0,11) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$; (...), $(6,56 \pm 0,17) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ e (-.-.), $(5,14 \pm 0,08) \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ com número de sítios de ligação de $3,26 \pm 0,04$; $2,97 \pm 0,02$; $2,96 \pm 0,02$ e $2,89 \pm 0,01$, respectivamente.

As tabela 9 e 10 apresentam, respectivamente, as constantes de ligação e número de sítios de ligação da daunomicina ao DNA, determinados em diferentes concentrações de daunomicina utilizando o modelo de ligação de Scatchard, na presença de tampão fosfato e de diferentes concentrações de sacarose.

Tabela 9. Valores das constantes de ligação para a interação da Daunomicina com DNA obtidos com o modelo de Scatchard

[DM] μM	K x 10 ⁻⁵ M ⁻¹ 0% sacarose	K x 10 ⁻⁵ M ⁻¹ 10% sacarose	K x 10 ⁻⁵ M ⁻¹ 20% sacarose
2	32,2±1,40	33,9±1,70	24,6±1,00
4	29,7±1,90	28,5±1,70	23,1±0,70
6	23,6±1,10	17,5±0,90	17,6±0,80
8	17,4±0,70	15,7±0,60	13,8±0,40

Tabela 10. Valores do número de sítios de ligação para a interação da Daunomicina com DNA obtidos com o modelo de Scatchard

[DM] μM	n(pb) 0% sacarose	n(pb) 10% sacarose	n(pb) 20% sacarose
2	4,00	4,00	4,34
4	3,62	3,70	3,84
6	3,57	3,57	3,70
8	3,57	3,84	3,57

As tabela 11 e 12 apresentam, respectivamente, as constantes de ligação e número de sítios de ligação da daunomicina ao DNA obtidos do gráfico de Scatchard, pelo ajuste de McGhee & von-

Hippel, na presença de tampão fosfato e de diferentes concentrações de sacarose.

Tabela 11. Valores das constantes de ligação para a interação da Daunomicina com ct-DNA obtidos com o modelo de McGhee & von-Hippel.

[Dauno] μM	$K \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ 0% sacarose	$K \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ 10% sacarose	$K \times 10^{-5} \text{ M}^{-1}$ 20% sacarose
2	$9,55 \pm 0,23$	$10,68 \pm 0,39$	$6,59 \pm 0,19$
4	$10,86 \pm 0,35$	$10,84 \pm 0,48$	$7,37 \pm 0,11$
6	$9,37 \pm 0,21$	$6,77 \pm 0,21$	$6,56 \pm 0,17$
8	$6,02 \pm 0,15$	$5,03 \pm 0,12$	$5,14 \pm 0,08$

Tabela 12. Valores do número de sítios de ligação para a interação da Daunomicina com ct-DNA obtidos com o modelo de McGhee & von-Hippel.

[Dauno] μM	n(pb) 0% sacarose	n(pb) 10% sacarose	n(pb) 20% sacarose
2	$2,97 \pm 0,04$	$3,12 \pm 0,04$	$3,26 \pm 0,04$
4	$2,93 \pm 0,03$	$3,00 \pm 0,04$	$2,97 \pm 0,02$
6	$2,91 \pm 0,02$	$2,91 \pm 0,02$	$2,96 \pm 0,02$
8	$2,87 \pm 0,03$	$2,97 \pm 0,03$	$2,89 \pm 0,01$

III.2.13 Dependência da constante de ligação com a atividade de água

A partir de agora passaremos a apresentar a dependência do logaritmo natural das constantes de ligação para a interação da

daunomicina com DNA obtidas pelo ajuste de Scatchard e McGhee & von-Hippel em relação ao logaritmo natural da constante de ligação obtida em água pura, mostrados na tabela 13 abaixo.

Tabela 13. Valores de $\ln(k_0)$ obtidos por extrapolação do gráfico da dependência de $\ln(k)$ com $\ln(a_w)$

[Daunomicina] μM	$\ln(k_0)$ Scatchard	$\ln(k_0)$ McGhee/von-Hippel
2	15,1685	14,0386
4	15,0388	14,1315
6	14,7278	13,8314
8	14,4653	13,3261

A figura 28 apresenta a dependência do logaritmo natural da razão da constante de ligação, obtida pelo ajuste de Scatchard, a uma dada concentração de sacarose (k) em relação a uma constante de ligação em água pura (k_0), com a atividade de água da solução para as diferentes concentrações de daunomicina.



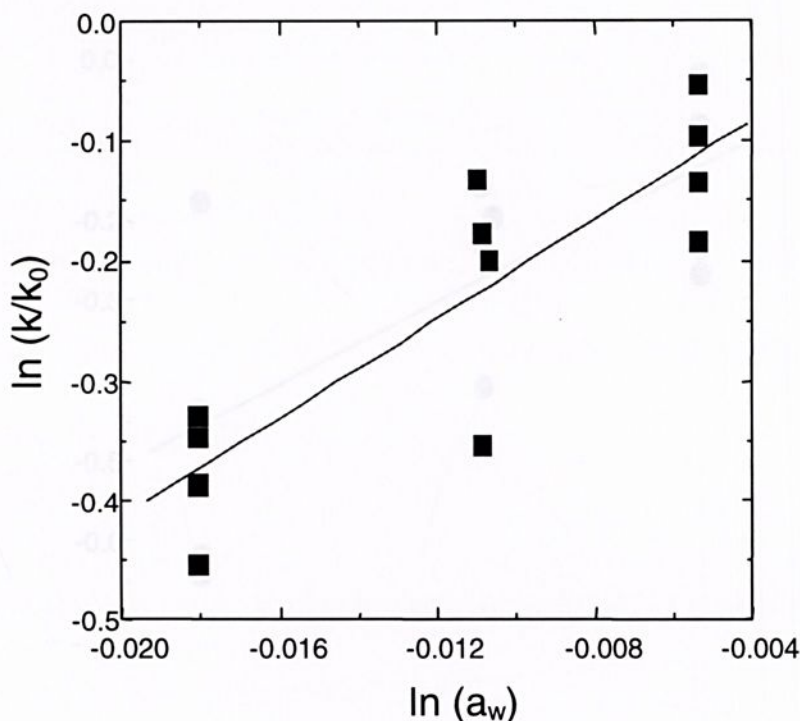


Figura 28. Dependência da constante de ligação (Scatchard) com a atividade de água da solução para as diferentes concentrações de sacarose (0, 10 e 20 %) em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C.

A figura 29 apresenta a dependência do logaritmo natural da razão da constante de ligação, obtida pelo ajuste de McGhee & von-Hippel, a uma dada concentração de sacarose (k) em relação a uma constante de ligação em água pura (k_0), com a atividade de água da solução para as diferentes concentrações de daunomicina.

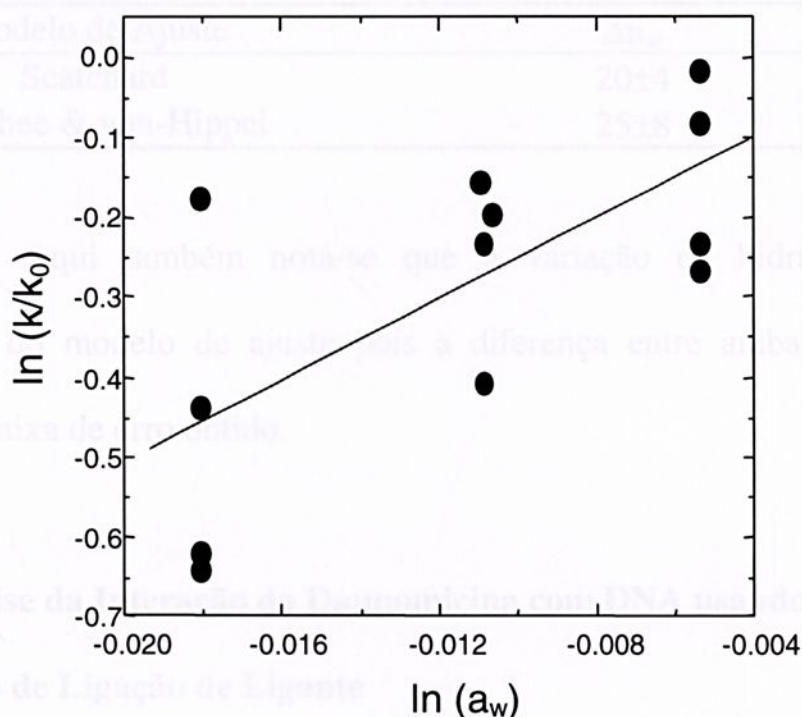


Figura 29. Dependência da constante de ligação (McGhee & von-Hippel) com a atividade de água da solução para as diferentes concentrações de sacarose (0, 10 e 20 %) em tampão fostato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C.

As variações de hidratação para os dois modelos de ajuste empregados neste trabalho para analisar a interação da daunomicina com DNA são apresentados na tabela 14. Nota-se que a variação de hidratação independe do modelo de ajuste pois a diferença entre ambas está dentro do erro experimental.

Tabela 14. Valores da Variação de hidratação para as diferentes os diferentes modelos.

Modelo de Ajuste	Δn_w
Scatchard	20 ± 4
McGhee & von-Hippel	25 ± 8

Aqui também nota-se que a variação de hidratação independe do modelo de ajuste pois a diferença entre ambas esta dentro da faixa de erro obtido.

III.3 Análise da Interação da Daunomicina com DNA usando a Densidade de Ligação de Ligante

O fato de encontrar constantes de ligação no equilíbrio que dependem da concentração da droga e variações de hidratação diferentes para titulação direta e reversa, nos levou a analisar os dados de titulação reversa com o método da função densidade de ligação de ligante, que fornece isotermas de ligação, no equilíbrio, independentes de modelo.

Uma diferença deste método com os outros empregados neste trabalho, reside no fato de que aqui as isotermas, apresentadas



no formalismo de Scatchard, foram obtidas pela análise de quatro concentrações diferentes (2, 4, 6 e 8 μM) de daunomicina.

Para analisar a ligação da daunomicina com DNA usando o método de análise da função densidade de ligação de ligante, procedemos à titulação de DNA a diversas concentrações de daunomicina em tampão fosfato e na presença de 10 e 20 % de sacarose. A absorção da daunomicina em 480 nm foi empregada para a obtenção das isotermas de ligação na presença de tampão e diferentes concentrações de sacarose conforme explicado em materiais e métodos.

A partir de agora, passaremos a apresentar os nossos dados experimentais da ligação de daunomicina com DNA obtidos pela técnica de titulação reversa.

III.3.1 Análise usando a Função Densidade de Ligação de Ligante na Presença de Tampão Fosfato.

A figura 30 mostra a variação percentual da absorção multiplicada pela razão daunomicina/DNA em função da concentração de DNA, em escala logarítmica, na presença de tampão fosfato. Nota-

se que o sinal observado diminui com o aumento da concentração do DNA em solução. A figura também mostra que para uma mesma concentração de DNA, o sinal observado aumenta com o aumento da concentração da daunomicina.

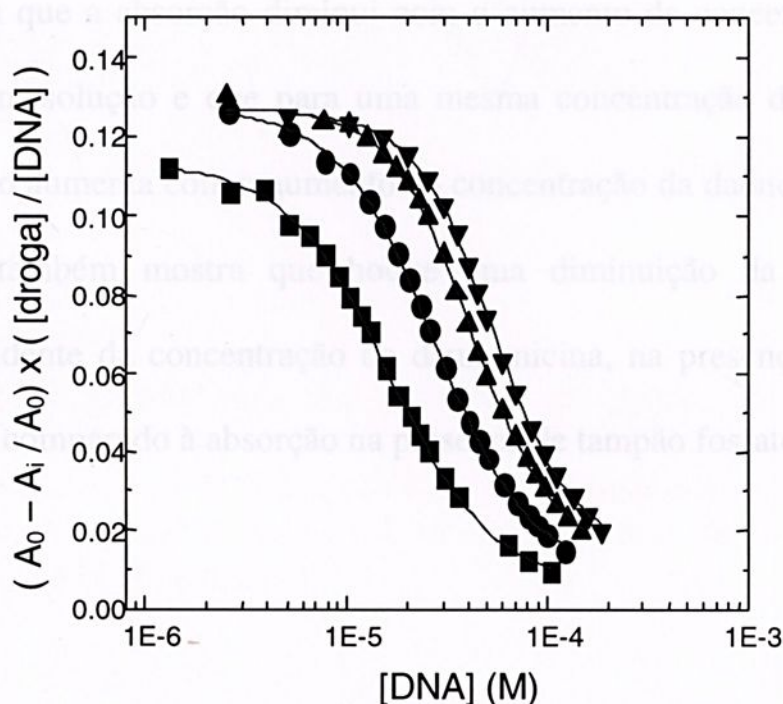


Figura 30. Dependência da absorção da daunomicina com a concentração de DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. As concentrações de daunomicina foram (■, 2 μM ; ●, 4 μM ; ▲, 6 μM e ▼, 8 μM).

III.3.2 Análise usando a Função Densidade de Ligação de Ligante na Presença de Sacarose.

A figura 31 mostra a variação percentual da absorção multiplicada pela razão daunomicina/DNA em função da concentração de DNA, em escala logarítmica, para 10% de sacarose. Nota-se também que a absorção diminui com o aumento da concentração do DNA em solução e que para uma mesma concentração de DNA, a absorção aumenta com o aumento da concentração da daunomicina. A figura também mostra que houve uma diminuição da absorção, independente da concentração da daunomicina, na presença de 10% quando comparado à absorção na presença de tampão fosfato.

Figura 31. Dependência da absorção da daunomicina com a concentração do DNA em solução, em escala logarítmica, para 10% de sacarose. As concentrações de daunomicina foram: (■), 2 μ M; (●), 4 μ M; (▲), 6 μ M e (▼), 8 μ M.

A figura 32 mostra a variação percentual da absorção multiplicada pela razão daunomicina/DNA em função da concentração de DNA, em escala logarítmica, para 20% de sacarose. Nota-se também que a absorção diminui com o aumento da concentração do DNA em solução e que para uma mesma concentração de DNA a variação percentual da absorção aumenta com o aumento de

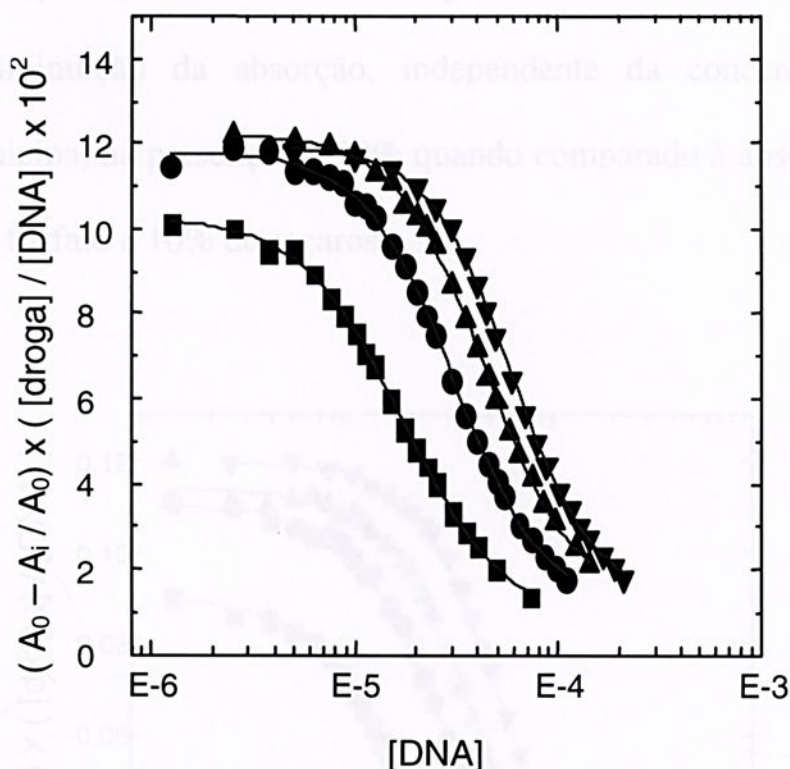


Figura 31. Dependência da absorção da daunomicina com a concentração de DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C na presença de 10% de sacarose. As concentrações de daunomicina foram (■, 2 μ M; ●, 4 μ M; ▲, 6 μ M e ▼, 8 μ M).

A figura 32 mostra a variação percentual da absorção multiplicada pela razão daunomicina/DNA em função da concentração de DNA, em escala logarítmica, para 20% de sacarose. Nota-se também que a absorção diminui com o aumento da concentração do DNA em solução e que para uma mesma concentração de DNA a variação percentual da absorção aumenta com o aumento da

concentração da daunomicina. A figura também mostra que houve uma diminuição da absorção, independente da concentração da daunomicina, na presença de 20% quando comparado à absorção com tampão fosfato e 10% de sacarose.

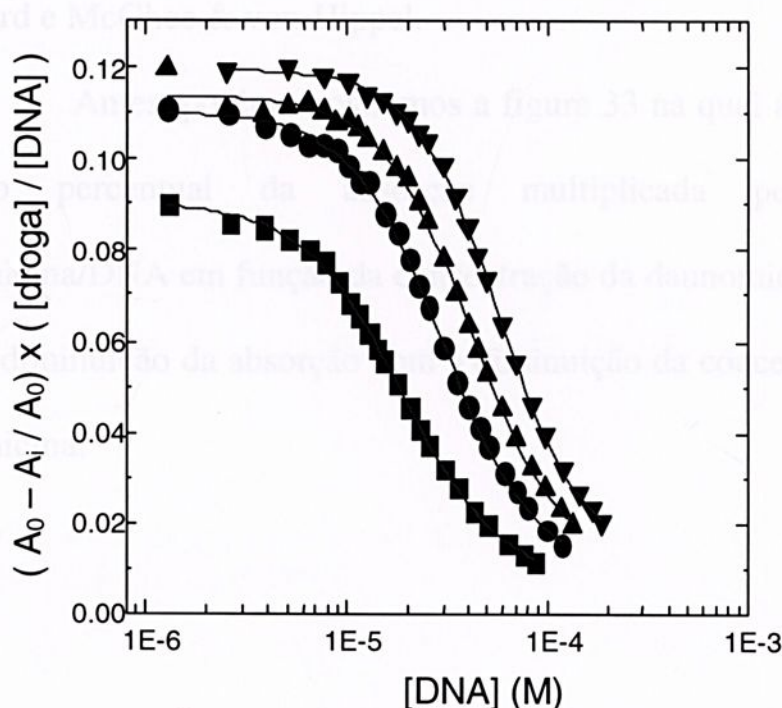


Figura 32. Dependência da absorção da daunomicina com a concentração de DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C na presença de 20% de sacarose. As concentrações de daunomicina foram (■, 2 μM ; ●, 4 μM ; ▲, 6 μM e ▼, 8 μM).

III.3.3 Obtenção do Gráfico de Scatchard

A seguir apresentamos o gráfico de Scatchard, obtido pelo método independente de modelo, no qual as isotermas para as diferentes concentrações de sacarose serão ajustadas pelo modelo de Scatchard e McGhee & von-Hippel.

Antes, porém, mostramos a figura 33 na qual apresenta a variação percentual da absorção multiplicada pela razão daunomicina/DNA em função da concentração da daunomicina. Nota-se uma diminuição da absorção com a diminuição da concentração da daunomicina.

Figura 33. Dependência da absorção com a concentração da daunomicina em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C.

A figura 34 apresenta a dependência das respectivas concentrações de daunomicina com as respectivas concentrações de DNA para as diferentes relações de absorção na ausência de DNA (A_0) com a absorção na presença de DNA (A) corrigido pela razão droga/DNA.

O intercepto dos ajustes no eixo das ordenadas, fornece a concentração de ligante livre (L_0) e a inclinação do ajuste fornece a

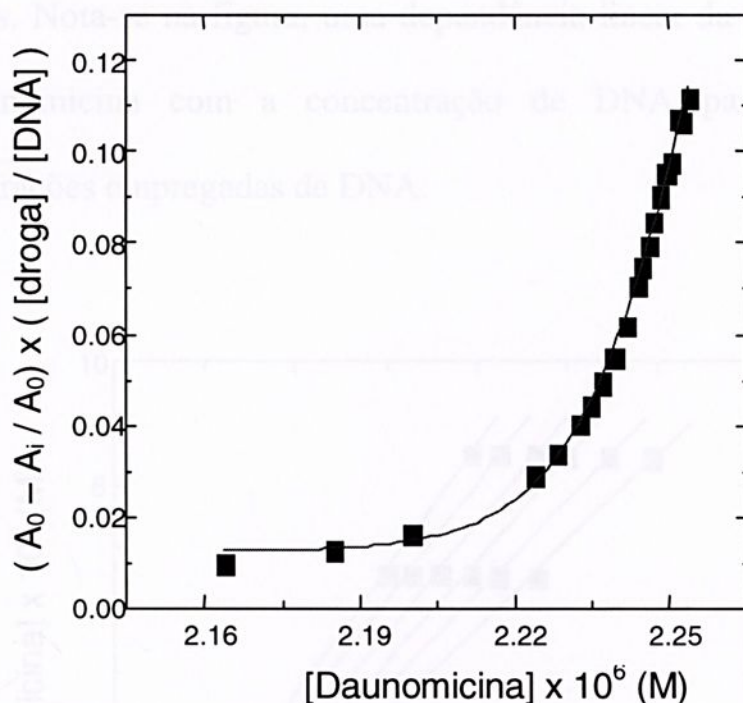


Figura 33. Dependência da absorção com a concentração da daunomicina em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C.

A figura 34 apresenta a dependência das respectivas concentrações de daunomicina com as respectivas concentrações de DNA para as diferentes relação de absorção na ausência de DNA (A_0) com a absorção na presença de DNA (A_i) corrigido pela razão droga/DNA.

O intercepto dos ajustes no eixo das ordenadas, fornece a concentração de ligante livre (L_F) e a inclinação do ajuste fornece a

densidade de ligação média (v_i) conforme mostrado em materiais e métodos. Nota-se na figura, uma dependência linear da concentração de daunomicina com a concentração de DNA para diferentes concentrações empregadas de DNA.

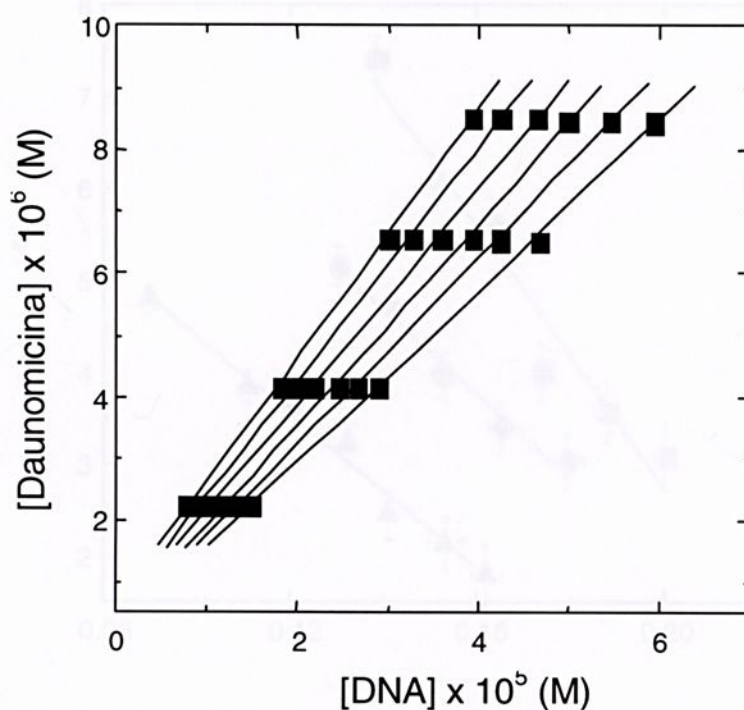


Figura 34. Dependência da concentração de daunomicina com a concentração de DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C.

A figura 35 apresenta isoterma obtidas através do método função densidade de ligação de ligante para diferentes concentrações de sacarose ajustadas com o modelo de Scatchard.

Nota-se que a constante de ligação diminui com o aumento da concentração de sacarose, o que concorda qualitativamente com as nossas constantes de ligação obtidas pelo ajuste de Scatchard das isothermas dependentes de modelo.

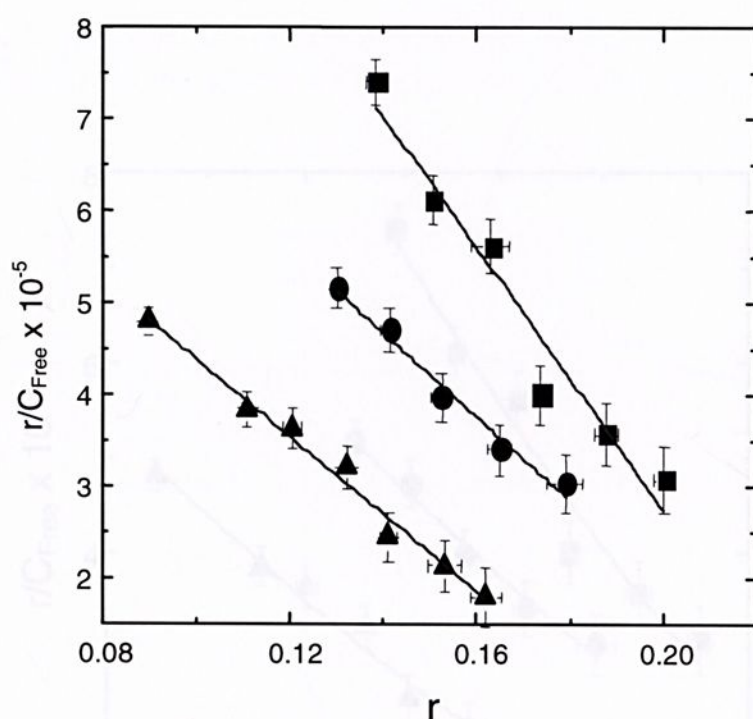


Figura 35. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C na presença de ■, 0% sacarose; ●, 10% sacarose e ▲, 20% sacarose.

A figura 36 apresenta isothermas obtidas através do método função densidade de ligação de ligante para diferentes

concentrações de sacarose ajustadas com o modelo de McGhee & von-Hippel. Aqui também a constante de ligação diminui com o aumento da concentração de sacarose, o que também concorda qualitativamente com as nossas constantes de ligação obtidas pelo ajuste de McGhee & von-Hippel das isotermas dependentes de modelo.

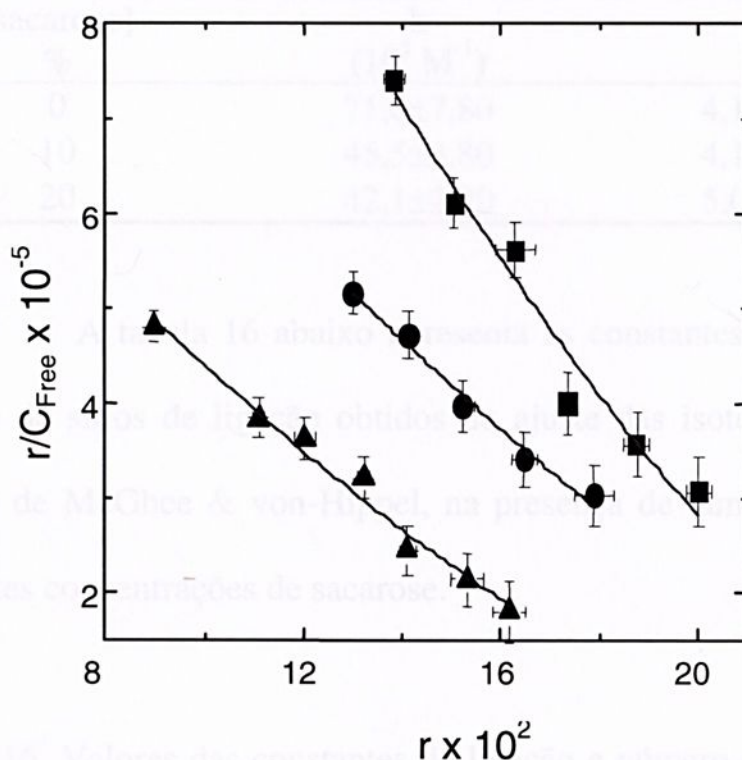


Figura 36. Gráfico de Scatchard para a ligação da daunomicina com DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C na presença de ■, 0% sacarose; ●, 10% sacarose e ▲, 20% sacarose.

A tabela 15 abaixo apresenta as constantes de ligação e número de sítios de ligação obtidos do ajuste das isotermas, com o modelo de Scatchard, na presença de tampão fosfato e diferentes concentrações de sacarose.

Tabela 15. Valores das constantes de ligação e número de sítios para as diferentes concentrações de sacarose obtidos com o modelo de Scatchard.

[sacarose] %	k (10^5 M^{-1})	n (pb)
0	$71,0 \pm 7,80$	$4,16 \pm 0,01$
10	$45,5 \pm 3,80$	$4,16 \pm 0,01$
20	$42,1 \pm 2,20$	$5,00 \pm 0,00$

A tabela 16 abaixo apresenta as constantes de ligação e número de sítios de ligação obtidos do ajuste das isotermas, com o modelo de McGhee & von-Hippel, na presença de tampão fosfato e diferentes concentrações de sacarose.

Tabela 16. Valores das constantes de ligação e número de sítios para as diferentes concentrações de sacarose obtidos com o modelo de McGhee & von-Hippel.

[sacarose] %	k (10^5 M^{-1})	n (pb)
0	$21,5 \pm 0,20$	$3,22 \pm 0,11$
10	$12,8 \pm 0,70$	$3,05 \pm 0,09$
20	$9,70 \pm 5,00$	$3,52 \pm 0,09$

III.3.4 Obtenção do Coeficiente de Extinção Ligado

A figura 37 mostra a dependência da relação de absorção na ausência de DNA (A_0) com a absorção na presença de DNA (A_i) corrigido pela razão droga/DNA com a saturação fracional da daunomicina. A extrapolação da absorção LB/LT igual a 1, fornece o coeficiente de extinção molar ligado (ϵ_B) da daunomicina segundo a equação abaixo

$$\epsilon_{Bound} = (1 - \alpha) \cdot \epsilon_{Free} \quad (29)$$

Figura 37. Dependência do sinal observado com a fração de daunomicina livre em solução fosfato de 40 mM com 150 mM onde α é o valor do ajuste para L_{Bound}/L_{Total} igual a 1.

●, 10% sacarose e ▲, 20% sacarose.

Os coeficientes de extinção molar ligados obtidos pelos

ajustes dos dados apresentados no gráfico da figura 37 são

apresentados na tabela 17 abaixo

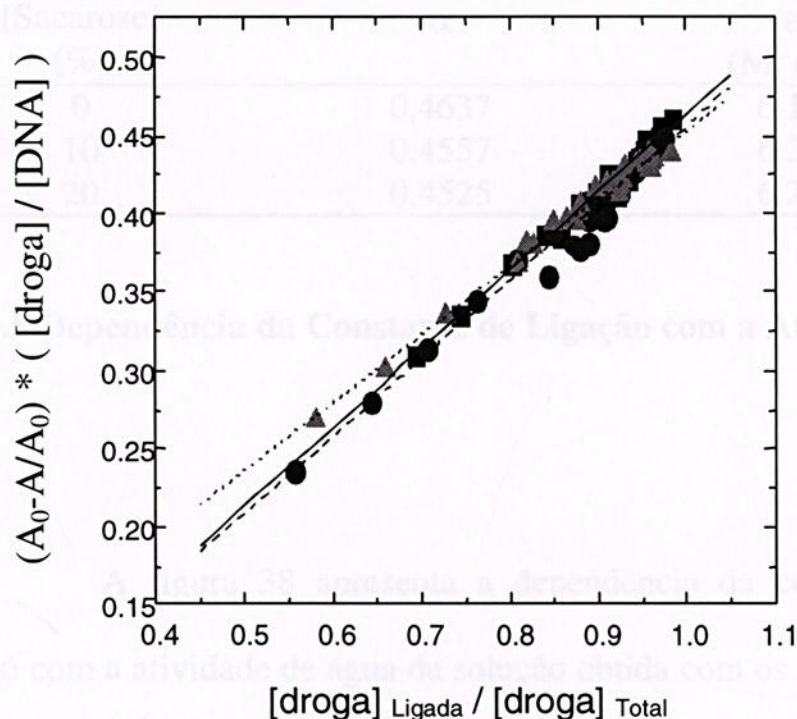


Figura 37. Dependência do sinal observado com a fração de daunomicina ligada em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C na presença de ■, 0% sacarose; ●, 10% sacarose e ▲, 20% sacarose.

Os coeficientes de extinção molar ligado obtidos pelos ajustes dos dados apresentados no gráfico da figura 37 são apresentados na tabela 17 abaixo

Tabela 17. Valores do coeficiente de extinção molar ligado obtidos pelo método da função densidade de ligação de ligante.

[Sacarose] (%)	α	ϵ_B (M ⁻¹ cm ⁻¹)
0	0,4637	6.167
10	0,4557	6.259
20	0,4525	6.296

III.3.5 Dependência da Constante de Ligação com a Atividade de Água

A figura 38 apresenta a dependência da constante de ligação com a atividade de água da solução obtida com os modelos de Scatchard e McGhee & von-Hippel, através do método da função densidade de ligação de ligante. A figura mostra que a constante de ligação diminui com a diminuição da atividade de água da solução. A linha contínua representa o melhor ajuste linear aos dados experimentais e fornece os valores de variação de hidratação que são apresentados na tabela 18 abaixo.

Modelo de Ajuste	Δn_w
Scatchard	40±20
McGhee & von-Hippel	61±16

A variação de hidratação encontrada aqui se assemelha aquela obtida para a transição direta da desnaturalização se usa os

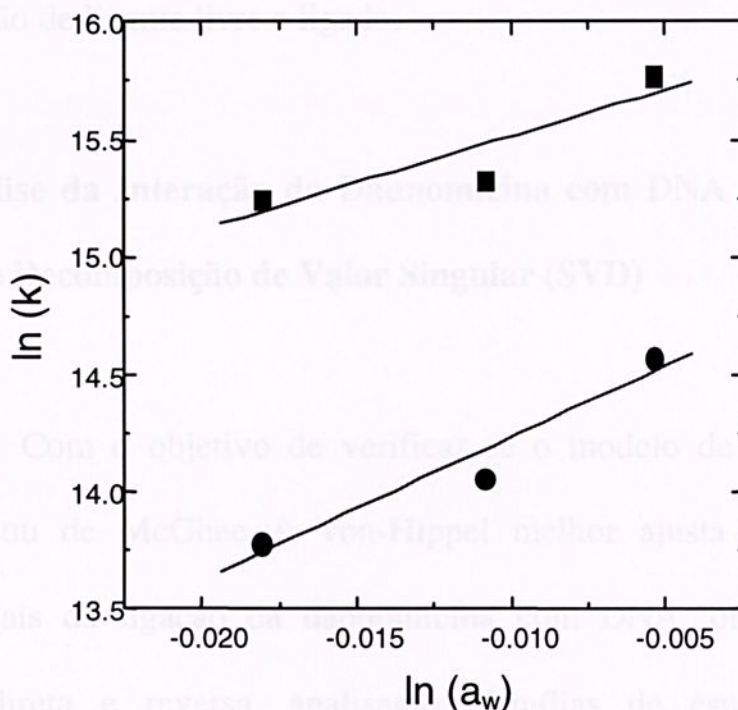


Figura 38. Dependência da constante de ligação com a atividade de água da solução em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C na presença de 0, 10 e 20 % sacarose. Os modelos de ajuste foram Scatchard (■) e McGhee & von-Hippel (●).

Tabela 18. Valores da variação de hidratação para os diferentes modelos.

Modelo de Ajuste	Δn_w
Scatchard	40±20
McGhee & von-Hippel	61±16

A variação de hidratação encontrada aqui se assemelha àquela obtida para a titulação direta da daunomicina onde se usa os

coeficientes de extinção molar para converter dados espectrais em concentração de ligante livre e ligado.

III.4 Análise da Interação da Daunomicina com DNA usando a Técnica de Decomposição de Valor Singular (SVD)

Com o objetivo de verificar se o modelo de ajuste de Scatchard ou de McGhee & von-Hippel melhor ajusta os dados experimentais da ligação da daunomicina com DNA, obtidos por titulação direta e reversa, analisamos famílias de espectros de absorção no visível do complexo daunomicina-DNA pela técnica de SVD, que tem sido aplicada para obter, entre outras, o número de componentes significativas num conjunto de espectros. A análise de SVD para a titulação reversa é análoga à titulação direta.

III.4.1 Decomposição de Valor Singular para Titulação

Reversa

Foram analisadas várias famílias de espectros de absorção no visível para a interação do DNA com diferentes concentrações de daunomicina (2, 4, 6, e 8 μM) à diferentes concentrações de sacarose (

0, 10 e 20 %). Abaixo, apresentamos a família de espectros da interação da daunomicina com DNA na presença de 20% de sacarose. A figura mostra um acentuado efeito hipocrômico e um deslocamento para a direita do pico de absorção na região de 497 nm na formação do complexo. Nota-se também um ponto isobéstico em 543 nm.

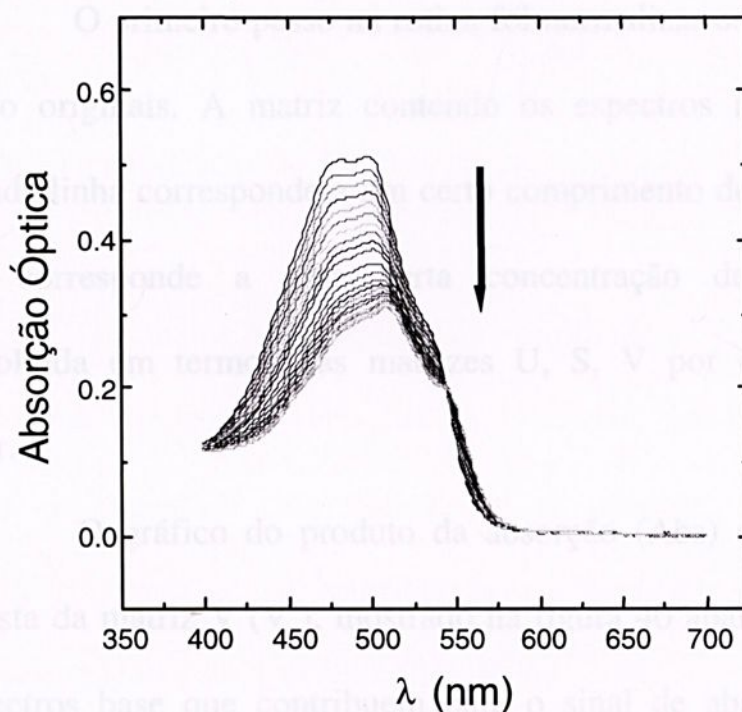


Figura 39. Titulação espectrofotométrica reversa da daunomicina com DNA em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C, na presença de 20 % de sacarose. A concentração inicial da daunomicina foi 9.09×10^{-6} M. A seta indica que os espectros de absorção óptica decrescem com a titulação de DNA.

Os dados espectrais primários da família de espectros apresentados na figura 39 acima foram importados para o programa MATLAB (The MathWorks, Inc., MA) e analisados com rotinas adequadas que forneciam, concentrações de ligante livre e ligado, espécies espectrais significativas, espectros originais reconstruídos, isotermas de ligação, etc..

O primeiro passo na rotina foi normalizar os espectros de absorção originais. A matriz contendo os espectros normalizados, onde cada linha corresponde a um certo comprimento de onda e cada coluna corresponde a uma certa concentração de DNA, foi deconvoluída em termos das matrizes U , S , V por deconvolução singular.

O gráfico do produto da absorção (Abs) com a matriz transposta da matriz V (V'), mostrado na figura 40 abaixo, apresenta os espectros base que contribuem para o sinal de absorção óptica observado. O espectro mais intenso se assemelha ao espectro da daunomicina livre, enquanto o de menor intensidade se assemelha ao espectro de diferença entre o espectro ligado e livre.



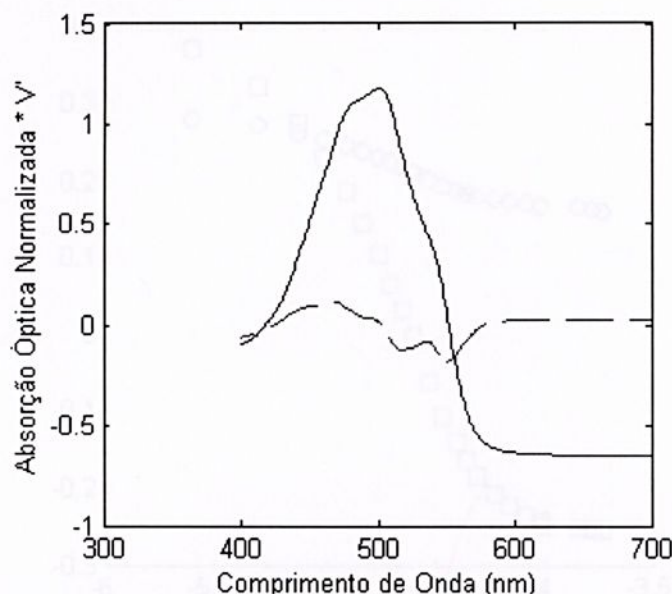


Figura 40. Dependência do Produto da Absorção óptica normalizada com a matriz transposta de V em função do comprimento de onda.

O número de componentes significativas é estimado pela variância que forneceu as variações 98,93 e 1,07, indicando que duas espécies de espectros são suficientes. O quanto cada espectro mostrado na figura acima contribui para a absorção observada em cada concentração é dado pelas linhas de V.

Procedendo ao ajuste com o modelo de Scatchard, temos que dado um valor inicial de n e K , o programa calcula a concentração de ligante livre ($[L]_{\text{livre}}$) e ligante ligado ($[L]_{\text{ligado}}$), segundo a equação abaixo e escolhe os valores de n e K tal que ajuste os gráficos de V_1 e V_2 .

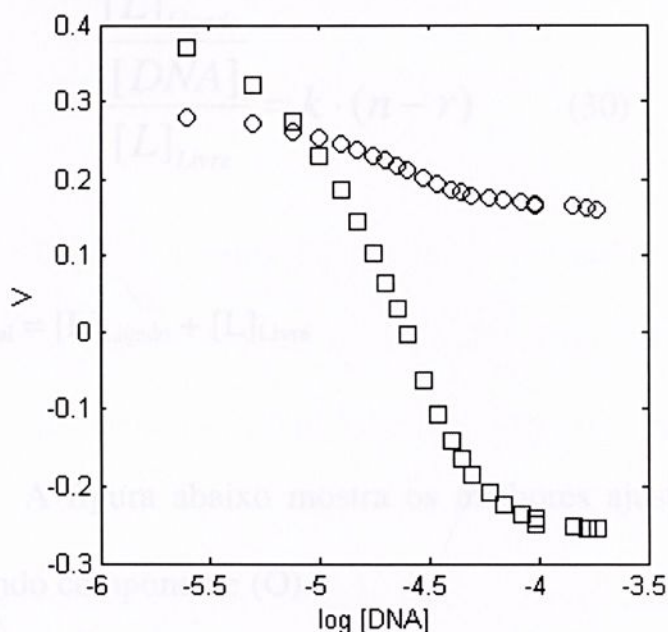


Figura 41. Dependência de V com a concentração de DNA em escala logarítmica.

As variações do primeiro componente (□) e do segundo componente (○) mostradas na figura 41 acima, são as quantidades a serem ajustadas com os modelos de Scatchard e McGhee & von-Hippel.

Procedendo ao ajuste com o modelo de Scatchard, temos que dado um valor inicial de n e K , o programa calcula a concentração de ligante livre ($[L]_{\text{Livre}}$) e ligante ligado ($[L]_{\text{Ligado}}$), segundo a equação abaixo e escolhe os valores de n e k tal que ajuste os gráficos de V_1 e V_2 .

$$\frac{[L]_{\text{Ligado}}}{[DNA]} = k \cdot (n - r) \quad (30)$$

onde $[L]_{\text{Total}} = [L]_{\text{Ligado}} + [L]_{\text{Livre}}$

A figura abaixo mostra os melhores ajustes ao primeiro () e segundo componente (O).

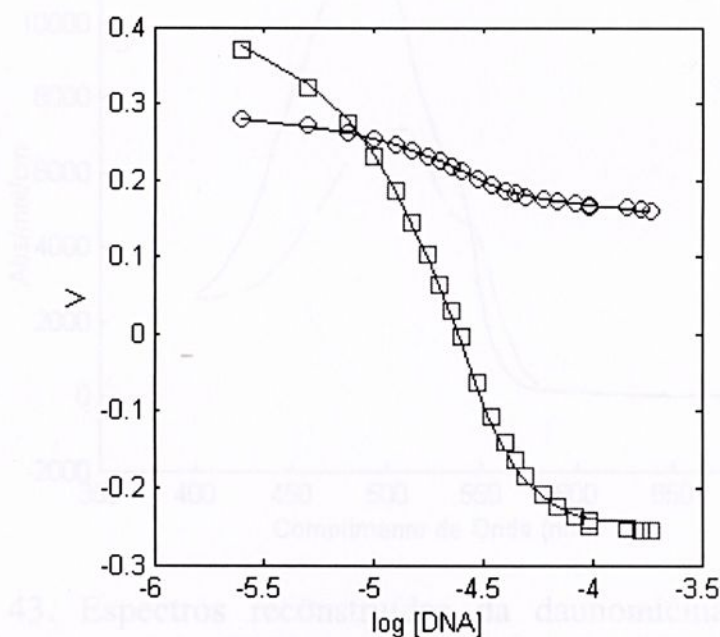


Figura 42. Dependência de V com a concentração de DNA em escala logarítmica. A linha contínua representa o melhor ajuste aos dados experimentais.

A obtenção dos parâmetros n e k com o ajuste de McGhee & von-Hippel, é análogo ao ajuste com o modelo de Scatchard.

A figura 43 apresenta os espectros reconstruídos a partir dos espectros originais pela técnica de SVD. Nota-se que os coeficientes de extinção molar livre e ligado da daunomicina são 11.500 e $7000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, respectivamente, e isto indica que os espectros reconstruídos são idênticos aos espectros originais.

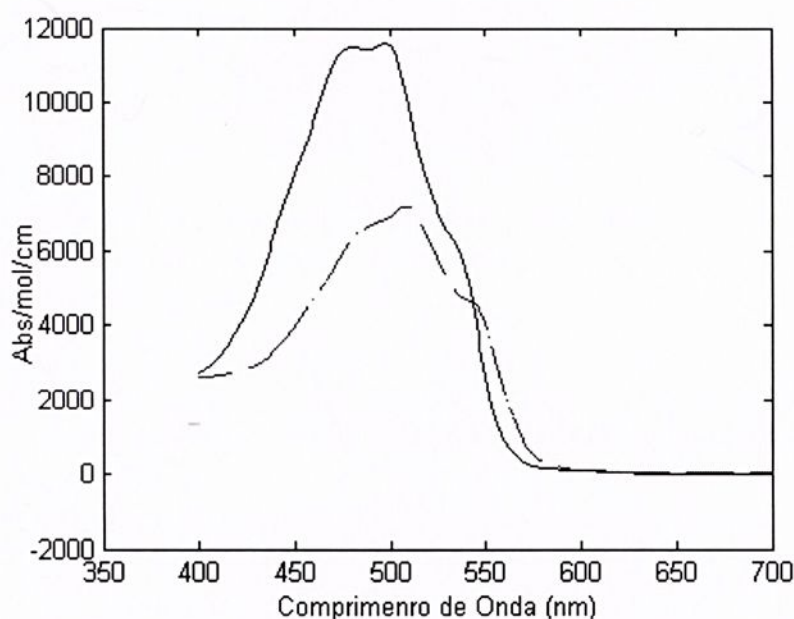


Figura 43. Espectros reconstruídos da daunomicina livre (—) e complexada (---) com DNA usando a técnica de SVD.

A figura abaixo apresenta as isotermas para a ligação da daunomicina com DNA usando titulação reversa às quais foram

analisadas via SVD pelo ajuste de Scatchard e McGhee & von-Hippel.

Nota-se na figura que apesar das isotermas serem obtidas da mesma família de espectros apresentados na figura 39 acima, elas são ligeiramente diferentes, especialmente na região de baixa razão de r . A razão para isto está nas diferenças do modelo utilizado para o ajuste. Diferente dos métodos anteriores, a análise baseada da deconvolução da matriz dos espectros de absorbância não faz uso dos gráficos de Scatchard.

Figura 44. Isotermas de Scatchard (O) e McGhee & von-Hippel (●) obtidas pelo método de SVD. As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais.

As tabelas 19 e 20 apresentam, respectivamente, as constantes de ligação e o número de pares de bases ocupados por cada molécula de dexametaceto ligada, fornecidas pelo modelo de ajuste de Scatchard usando a metodologia de SVD.

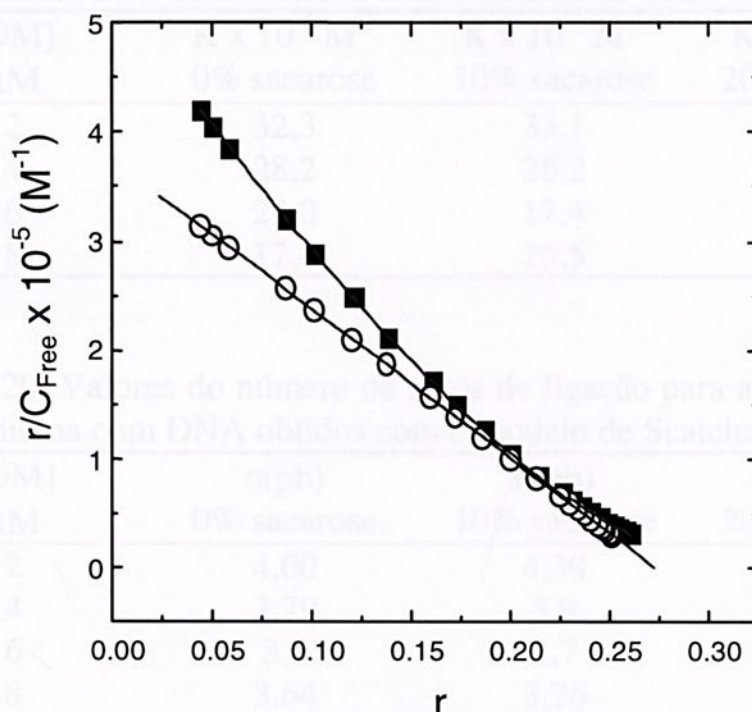


Figura 44. Isotermas de Scatchard (O) e McGhee & von-Hippel (■) obtidas pelo método de SVD. As linhas representam o melhor ajuste aos dados experimentais.

As tabelas 19 e 20 apresentam, respectivamente, as constantes de ligação e o número de pares de bases ocupados por cada molécula de daunomicina ligada, fornecidas pelo modelo de ajuste de Scatchard usando a metodologia de SVD.

Tabela 19. Valores das constantes de ligação para a interação da daunomicina com DNA obtidos com o modelo de Scatchard.

[DM] μM	K x 10 ⁻⁵ M ⁻¹ 0% sacarose	K x 10 ⁻⁵ M ⁻¹ 10% sacarose	K x 10 ⁻⁵ M ⁻¹ 20% sacarose
2	32,3	33,1	24,0
4	28,2	28,2	23,0
6	23,0	17,4	17,0
8	17,4	15,5	13,8

Tabela 20. Valores do número de sítios de ligação para a interação da daunomicina com DNA obtidos com o modelo de Scatchard.

[DM] μM	n(pb) 0% sacarose	n(pb) 10% sacarose	n(pb) 20% sacarose
2	4,00	4,30	4,32
4	3,79	3,9	3,9
6	3,7	3,7	3,8
8	3,64	3,76	3,66

As tabelas 21 e 22 apresentam, respectivamente, as constantes de ligação e o número de pares de bases ocupados por cada molécula de daunomicina ligada, fornecidas pelo modelo de ajuste de McGhee & von-Hippel usando a metodologia de SVD.

Tabela 21. Valores das constantes de ligação para a interação da daunomicina com DNA obtidos com o modelo de McGhee & von-Hippel.

[DM] μM	K x 10 ⁻⁵ M ⁻¹ 0% sacarose	K x 10 ⁻⁵ M ⁻¹ 10% sacarose	K x 10 ⁻⁵ M ⁻¹ 20% sacarose
2	9,77	9,55	6,45
4	10,00	10,70	7,76
6	9,12	6,45	6,16
8	6,76	5,88	5,25

Tabela 22. Valores do número de sítios de ligação para a interação da daunomicina com DNA obtidos com o modelo de McGhee & von-Hippel.

[DM] μM	n(pb) 0% sacarose	n(pb) 10% sacarose	n(pb) 20% sacarose
2	3,01	3,22	3,15
4	2,96	3,09	3,04
6	2,94	2,91	2,97
8	2,90	2,97	2,92

III.4.2 Dependência da Constante de Ligação com a Atividade de Água para a Titulação Reversa.

A figura 45 apresenta a dependência da razão do logaritmo natural da constante de ligação com a constante de ligação em água pura, obtida pela equação de scatchard usando a técnica de SVD, com a atividade de água da solução. Nota-se que a constante de ligação aumenta com o aumento da atividade de água da solução e, como anteriormente, que o valor das constantes de ligação são dependentes da concentração de daunomicina utilizada nos experimentos.

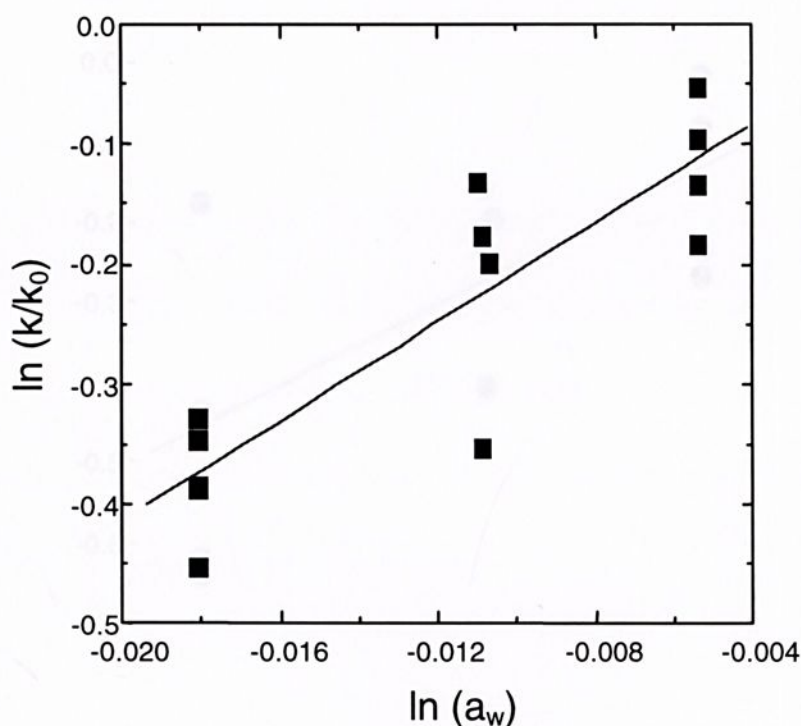


Figura 45. Dependência da constante de ligação (Scatchard) com a atividade de água da solução para as diferentes concentrações de daunomicina e sacarose em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C.

A figura 46 apresenta a dependência da razão do logaritmo natural da constante de ligação com a constante de ligação em água pura, obtida pela equação de McGhee & von-Hippel usando a técnica de SVD, com a atividade de água da solução. Nota-se que a constante de ligação aumenta com o aumento da atividade de água da solução.

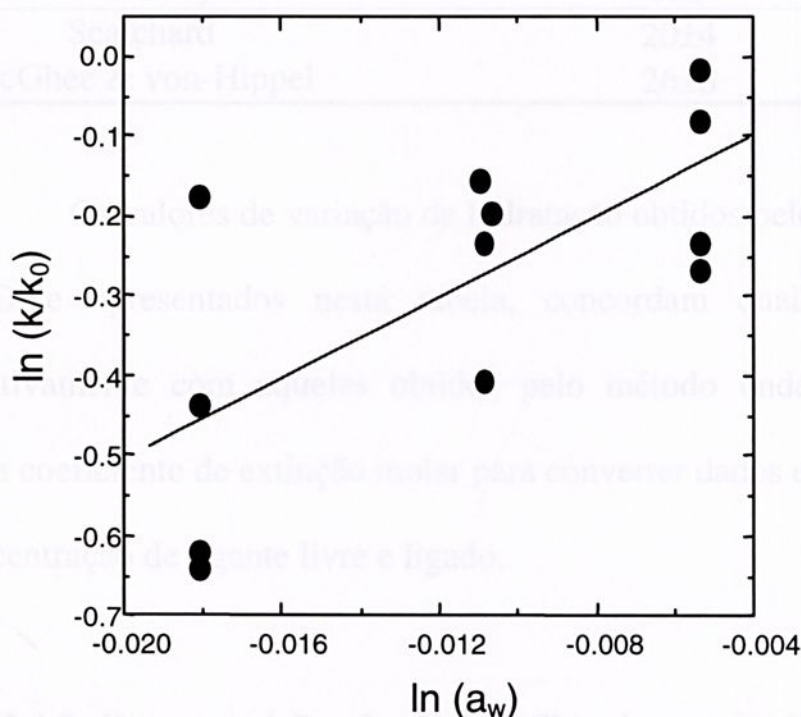


Figura 46. Dependência da constante de ligação (McGhee & von-Hippel) com a atividade de água da solução para as diferentes concentrações de daunomicina e sacarose em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C.

A tabela 23, apresenta os valores de variação de hidratação para a interação da daunomicina com DNA obtidos com dois modelos de ajustes. Nota-se que a variação de hidratação é a mesma para os dois modelos empregados uma vez que a pequena diferença entre elas está dentro do erro experimental.

Tabela 23. Valores da variação de hidratação obtidos por SVD

Modelo de ajuste	Δn_w
Scatchard	20 ± 4
McGhee & von-Hippel	26 ± 6

Os valores de variação de hidratação obtidos pelo método de SVD e apresentados nesta tabela, concordam qualitativa e quantitativamente com aqueles obtidos pelo método onde não se emprega coeficiente de extinção molar para converter dados espectrais em concentração de ligante livre e ligado.

III.4.3 Decomposição de Valor Singular para Titulação

Direta

Nesta etapa, analisamos famílias de espectros da interação da daunomicina com DNA com diferentes concentrações (0, 10 e 20 %) de sacarose com uma concentração fixa de DNA de 40 μM em par de base (pb).

A tabela 24 apresenta as constantes de ligação e o número de pares de bases ocupados por cada molécula de daunomicina ligada, fornecidas pelo modelo de ajuste de Scatchard, usando a metodologia de SVD.

Tabela 24. Valores das constantes de ligação e número de sítios de ligação para as diferentes concentrações de sacarose obtidos com o modelo de Scatchard.

[sacarose] %	$K \times 10^{-5} (M^{-1})$	n (pb)
0	12,3	3,9
10	10,5	3,9
20	9,50	4,1

A tabela 25 apresenta as constantes de ligação e o número de pares de bases ocupados por cada molécula de daunomicina ligada, fornecidas pelo modelo de ajuste de McGhee & von-Hippel, usando a metodologia de SVD.

Tabela 25. Valores das constantes de ligação e número de sítios de ligação para as diferentes concentrações de sacarose obtidos com o modelo de McGhee & von-Hippel.

[sacarose] %	$K \times 10^{-5} (M^{-1})$	n (pb)
0	6,16	3,05
10	5,01	3,00
20	4,36	3,1

III.4.4 Dependência da Constante de Ligação com a Atividade de Água para a Titulação Direta.

A figura 47 apresenta a dependência da constante de ligação com a atividade de água da solução obtida com as equações de

Scatchard e McGhee & von-Hippel, através da método de decomposição de valor singular.

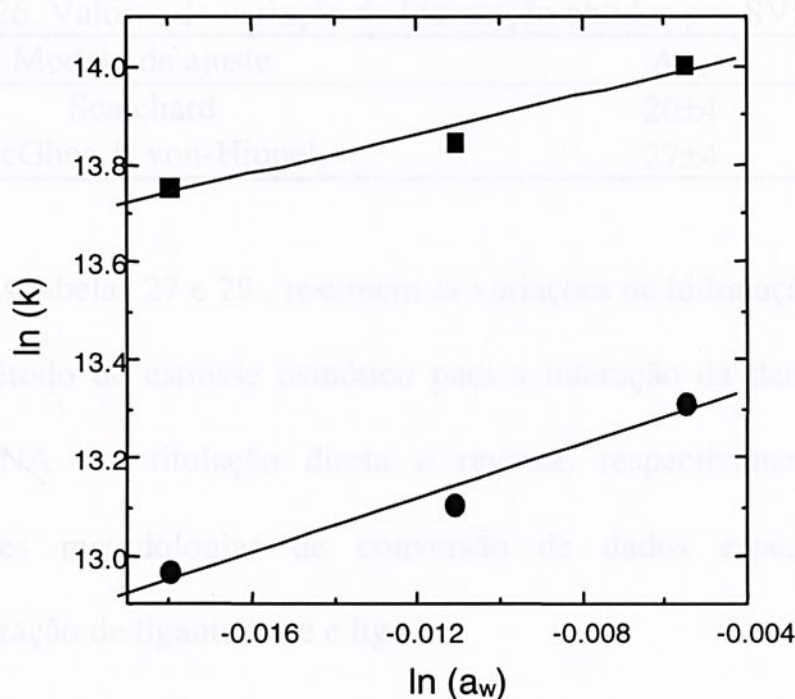


Figura 47. Dependência da constante de ligação com a atividade de água da solução para as diferentes concentrações de sacarose (0; 10 e 20%) em tampão fosfato de sódio 10 mM com 150 mM NaCl e 1 mM EDTA à pH 7.5 e 25°C. Os modelos de ajuste foram Scatchard (■) e McGhee & von-Hippel (●).

A tabela 26 apresenta os valores de variação de hidratação para a interação da daunomicina com DNA obtidos com dois modelos de ajustes. Nota-se que a variação de hidratação é a mesma para os dois

modelos empregados uma vez que a diferença entre elas está dentro do erro experimental.

Tabela 26. Valores da variação de hidratação obtidos por SVD

Modelo de ajuste	Δn_w
Scatchard	20 ± 4
McGhee & von-Hippel	27 ± 4

As tabelas 27 e 28 , resumem as variações de hidratação obtidas pelo método de estresse osmótico para a interação da daunomicina com DNA via titulação direta e reversa, respectivamente, para diferentes metodologias de conversão de dados espectrais em concentração de ligante livre e ligado.

Tabela 27. Titulação Direta Daunomicina

Modelo de Ajuste	Análise Crothers $\epsilon_{\text{Free}}=11500$ $\epsilon_{\text{Bound}}=6100$	Análise Crothers $\epsilon_{\text{Free}}^S=11292$ $\epsilon_{\text{Bound}}^S=5786$ $\epsilon_{\text{Free}}^M=11508$ $\epsilon_{\text{Bound}}^M=6035$	Análise SVD
Scatchard	41 ± 5	36 ± 2	20 ± 4
McGhee & von-Hippel	50 ± 4	50 ± 6	27 ± 4

Tabela 28. Titulação Reversa Daunomicina

Modelo de Ajuste	Análise Xodo A_i, A e A_f	Análise SVD	Análise Lohman A_i, A	Análise Crothers $\epsilon_{Free}=11500$ $\epsilon_{Bound}=6100$
Scatchard	20±4	20±4	40±20	41±8
McGhee & von-Hippel	25±8	26±6	61±16	47±9

IV. DISCUSSÃO

As características da interação de actinomicina D com DNA tem sido amplamente investigadas.^{32,24} Em trabalho recente em nosso grupo, foi demonstrado que a adição de solutos neutros (sacarose, glicerol, etilenoglicol, e betaina) à solução, aumenta a constante de ligação da actinomicina D ao DNA a baixas razões de concentração droga/DNA, e diminui a constante de ligação a altas razões de concentração droga/DNA. Estes resultados, interpretados em termos do efeito da atividade de água no equilíbrio desta reação, indicaram que a diminuição da atividade de água, propiciada pela adição de osmólitos à solução, aumenta a constante de ligação aos sítios fortes, e diminui a constante de ligação aos sítios fracos.

Nestes estudos, o efeito da atividade de água na interação da droga aos sítios fortes foi caracterizada quantitativamente, demonstrando que a formação do complexo actD-DNA é acompanhada pela liberação de moléculas de água de hidratação. A análise preliminar deste efeito nas características de ligação de actinomicina D aos sítios fracos do DNA sugeriram que,

diferentemente do que ocorre com sítios fortes, esta interação ocorre com a ligação de um número extra de moléculas de água.

O efeito da adição de sacarose na ligação de actinomicina D ao DNA natural foi caracterizado neste trabalho, e a dependência da constante de equilíbrio com a atividade de água analisada. As isothermas de ligação deste composto ao DNA foram analisadas utilizando tanto o modelo de ligação de Scatchard, quanto o modelo de ligação de McGhee & von-Hippel. O modelo de Scatchard descreve a ligação do ligante a n sítios distintos e equivalentes. O modelo de exclusão de sítios de ligação de McGhee & von-Hippel considera a possibilidade que a ligação do ligante a um certo número n de pares de bases exclui pares de base adjacentes para a ligação do próximo ligante.

Os resultados da análise das curvas de ligação com estes modelos, mostrou que os valores das constantes de equilíbrio determinadas com McGhee & von-Hippel é cerca de uma ordem de grandeza menor que as constantes de ligação determinadas pelo modelo de Scatchard. Considerando estes ajustes, podemos concluir que os dados experimentais, determinados na região de alta razão de concentração actD/DNA na presença e ausência de sacarose, são bem



descritos com modelos que consideram um único tipo de sítios de ligação.

A contribuição da hidratação para o equilíbrio de ligação de actD/DNA foi determinado via a análise da dependência do logaritmo da constante de ligação com o logaritmo da atividade de água, modificada pela adição de sacarose ao tampão. Apesar das constantes de ligação determinadas com o modelo de Scatchard serem 1 ordem de grandeza maior que aquelas determinadas pelo modelo de McGhee & von-Hippel, a variação de hidratação obtida utilizando constantes determinada por Scatchard é da mesma ordem de grandeza que a determinada a partir das constantes de McGhee & von-Hippel, e diferem em cerca de 50% entre si. O resultado destas análises mostraram que entre 10-20 moléculas de água ligam-se à mais ao complexo actD/DNA que às espécies livres.

Qu e Chaires³⁷ determinaram recentemente a contribuição da hidratação para a reação de actinomicina D com DNA, utilizando o método de estresse osmótico. Estes autores determinaram que cerca de 32 H₂O se ligam a mais com a formação do complexo actD-DNA. Portanto, tanto os nossos resultados, quanto o destes autores, mostram que o complexo formado é mais hidratado que a droga e sítio livres.



Este aumento de hidratação com a formação do complexo actD-sítios fracos é contrário ao que se observa na intercalação de actinomicina D aos sítios fortes do DNA, que na presença de sacarose libera cerca 50 moléculas de água com a formação do complexo.⁴⁷

O aumento de hidratação do complexo actD/sítios fracos não são facilmente visualizados. Por exemplo, a estrutura cristalográfica do complexo de actD com o oligonucleotídeo d(GAAGCTTC),²⁴ mostra que o anel cromóforo fenoxazona da actinomicina D intercala-se entre os pares de base GpC no sulco maior da dupla hélice de DNA e insere os anéis pentapeptídicos cíclicos no sulco menor da dupla hélice do DNA. Esta condição sugere que moléculas de água do sulco maior e menor do DNA são liberadas para a solução na formação do complexo. Mais provavelmente, a intercalação da actinomicina aos sítios fracos provoca rearranjos estruturais que exponham sítios de hidratação no complexo, em quantidade que compense os sítios perdidos no estabelecimento das interações diretas entre a droga e o seu sítio de DNA.

Os aspectos metodológicos para a determinação do equilíbrio de ligação de daunomicina ao DNA foi mais extensamente investigado neste trabalho. Isto foi motivado pela dificuldade em se



determinar as isotermas de ligação desta droga na região de baixa relação de concentrações droga/DNA, que potencialmente contém informação de ligação à sítios fortes. Nesta região, pequenos erros na determinação da concentração de droga ligada, devido a pequenos erros nos valores do coeficiente de extinção molar desta espécie, produzem um grande espalhamento dos dados no gráfico de Scatchard. Como estávamos interessados em investigar se, como observado para actinomicina, a adição de solutos poderia discriminar sítios de ligação da daunomicina fortes de sítios de ligação fracos foi preciso investir na análise de qual seria a melhor maneira de se obter os dados de ligação a partir de medidas espectrais. Por esta razão, os conjuntos de dados espectrais obtidos, na presença e ausência de sacarose, foram analisados utilizando quatro diferentes metodologias para a determinação da fração de droga ligada.

Inicialmente, utilizamos o método de Muller & Crothers, onde os coeficientes de extinção molar da droga livre e da droga ligada são utilizados para o cálculo das frações de droga livre e ligada a partir da medida da absorbância em um comprimento de onda fixo. Esta análise não produziu resultados confiáveis e reprodutíveis na região de baixa saturação, e as isotermas na região de mais alta saturação foram



consistentes com a existência de um único sítio de ligação da daunomicina ao DNA. Os gráficos de Scatchard obtidos puderam ser ajustados tanto pelo modelo de Scatchard quanto pelo modelo de McGhee & von-Hippel. No entanto, se considerarmos os erros nos ajustes nos dois modelos, o modelo de McGhee & von-Hippel descreve melhor os dados experimentais.

O segundo método utilizado para a determinação da fração de droga ligada, designado neste trabalho como método de Xodo et al,⁵⁹ fez uso das variações espectrais medidas quando uma concentração fixa de daunomicina é titulada com DNA, até que a concentração de DNA adicionada à amostra fosse suficientemente alta para garantir que toda a droga estivesse ligada. Este método foi utilizado para analisar dados de titulação de DNA às soluções de daunomicina em diferentes concentrações (2, 4, 6 e 8 μM). As constantes de ligação determinadas, utilizando os dois modelos de ligação, mostraram que o valor da constante de ligação da daunomicina ao DNA diminui com o aumento da concentração de daunomicina na solução. Normalmente, a constante de ligação de um ligante à uma macromolécula depende da concentração de qualquer uma das espécies se uma, ou ambas as espécies, sofram agregação.



Medidas da absorbância da daunomicina em função da concentração, e tentativas de medir qualquer possível aumento do espalhamento de luz da solução de DNA com o aumento da concentração, não mostraram evidências claras que agregação poderia estar ocorrendo. Só estes resultados não descartam, entretanto, a possibilidade de formação de pequenos agregados. Outra possibilidade da constante de ligação da daunomicina ao DNA variar com a concentração da droga pode ser devido ao polimorfismo do DNA utilizado (timo de bezerro sonicado), mas esta hipótese não foi testada por outros experimentos.

O terceiro método, conhecido como o método Bujalowski & Lohman², diferentemente do método de Xodo et al, não utiliza a absorção final para a obtenção das frações de ligante livre e ligado. Este método utiliza o produto da variação percentual da absorção com a razão droga/DNA em função da concentração de DNA. As constantes de ligação de Scatchard e McGhee & von-Hippel obtidas com o método de Bujalowski & Lohman são maiores que as constantes de ligação de Scatchard e McGhee & von-Hippel obtidas com os dois métodos anteriores discutidos e esta diferença pode ser atribuída ao fato de que nesta metodologia, cada isoterma de ligação



na ausência e na presença de sacarose é obtida de quatro diferentes curvas de titulação (2, 4, 6 e 8 μM). Outra dificuldade desta metodologia é que não é possível determinar as constantes de ligação para as diferentes concentrações de sacaroses na mesma faixa de variação percentual da absorção. Isto acarreta em diferentes faixas de saturação fracional para as diferentes concentrações de sacarose no gráfico de Scatchard. Como consequência, perde-se informação de ligação na região de baixa saturação droga/DNA, o que é uma limitação séria deste método.

O quarto método de análise empregado neste trabalho, foi o método de deconvolução da matriz singular (SVD). O método consiste em analisar os dados de ligação utilizando toda a informação espectral contida nos espectros medidos a cada razão de concentração droga/DNA investigada. Tipicamente, os experimentos de titulação envolvem a medida de 10-20 espectros, na região de 400-700 nm, de razões crescentes (ou decrescentes) droga/DNA. Estes espectros são organizados em uma matriz onde cada linha corresponde a um comprimento de onda, e cada coluna corresponde a absorbância numa dada concentração do ligante titulado. Caso todos os espectros, da espécie livre e das espécies ligadas forem conhecidos, pode-se



mostrar, utilizando as propriedades de matrizes e a Lei de Beer-Lambert, que a matriz de absorvância medida, ABS, é simplesmente igual ao produto da matriz dos espectros das espécies puras, P, pela transposta da matriz que contem a concentração de cada espécie em cada ponto da titulação, F, i.é., $ABS = P \cdot F^T$.

Quando não se conhece bem os espectros destas espécies, o método de escolha para a análise é o de SVD, que consiste em fazer a deconvolução da matriz ABS no produto de três matrizes: $U \cdot S \cdot V^T$. Para a presente análise basta dizer que a matriz S é uma matriz diagonal, com elementos decrescentes que se aproximam de zero. O numero de elementos diferentes de zero, dentro do erro experimental, informa o número de espécies espectrais que contribuem para a variação observada. Os resultados obtidos, tanto na presença quanto na ausência de -sacarose, e em diferentes concentrações de daunomicina, mostraram que os dados podem ser analisados considerando só dois espectros independentes: o espectro da droga livre, e um espectro característico da droga ligada. Este resultado implica que a daunomicina ligada em qualquer parte do DNA tem o mesmo espectro. Conseqüentemente, ou esta droga liga-se à uma

seqüência específica de pares de base do DNA, ou seu espectro é pouco afetado pelas características específicas do sítio de intercalação.

Dados de ligação da daunomicina a pequenos oligomeros mostram que esta droga tem maior afinidade para seqüências GCT, mas também se liga à outras seqüências com menor afinidade (GCA>ACT>ATA≥GCG>ATG),³¹ onde o sítio de intercalação esta entre as duas primeiras bases. Portanto, medidas dos espectros de absorção da daunomicina intercalada ao DNA de timo de bezerro, como realizadas neste estudo, não permitem dizer se o espectro da droga ligada é o mesmo, porque ela se liga preferencialmente a um tipo de sítio, ou se seu espectro é pouco sensível a seqüência do sítio de ligação. Embora esta informação seria importante do ponto de vista da caracterização das bases físicas que determinam as características espectrais da droga intercalada, do ponto de vista quantitativo bastamos a informação de que os espectros experimentais são constituídos por apenas duas espécies espectrais distintas: o da droga livre e o da droga ligada.

Uma vez conhecido, da análise de SVD, que só duas espécies contribuem para as variações espectrais observadas, podemos utilizar as duas primeiras linhas da matriz V para determinar as



constantes de equilíbrio de ligação, a partir do ajuste das equações de Scatchard (ou da equação de McGhee & von-Hippel) aos dados experimentais contidos nos gráficos das duas linhas de V em função da concentração do titulante (que pode ser o DNA ou a droga). Estes tipo de ajuste dos modelos aos dados experimentais é independente, portanto, de qualquer suposição sobre os coeficientes de extinção molar de qualquer espécie, e considera todos os pontos dos espectros de absorção medidos. A proceder o ajuste, as equações de Scatchard e McGhee & von-Hippel foram utilizada para calcular a concentração de droga livre e ligada para cada condição experimental e valores tentativos das constantes dos modelos. Uma vez conhecidas, estas concentrações são utilizadas para o cálculo dos espectros de absorção ajustados, que são comparados com os espectros medidos.

Os resultados obtidos, utilizando ambos os modelos, produziram bons ajustes aos dados experimentais, e retornaram espectros base para a droga livre idênticos aos medidos experimentalmente, e espectros da droga ligada muito similares ao espectro que se considera ligado (na verdade não temos um espectro da daunomicina ligada que possa se considerar com um padrão absoluto).



Da análise de SVD dos dados de ligação de daunomicina ao DNA na ausência e presença de sacarose podemos concluir que, do ponto de vista estatístico, os modelos de ligação de Scatchard e McGhee & von-Hippel são indistinguíveis: ambos ajustam os dados espectrais com erros próximos ao ruído espectrofotométrico. Os valores das constantes de ligação são, como observados de outros métodos, ligeiramente maiores para o ajuste de Scatchard do que para o ajuste de McGhee & von-Hippel. Isto é uma consequência do modelo utilizado.

O ajuste destes dois modelos fornecem, além da constante de ligação, o número de pares de base aparentemente ocupados pela droga ligada (Scatchard), ou o número de pares de bases excluídos pela ligação da droga (McGhee & von-Hippel). Notavelmente, estes parâmetros de ligação da daunomicina ao DNA não são afetados pela presença de sacarose, como foi observado ocorrer na reação de intercalação da actinomicina aos sítios fortes de DNA por Ruggiero-Neto e Colombo.⁴⁷ Em sua análise do efeito de solutos neutros no tamanho do sítio (forte) de ligação de actinomicina ao DNA, Ruggiero-Neto e Colombo propuseram que a ligação deste ligante ao sítio forte do DNA é acompanhada pelo desparafuzamento da hélice



formada pelo sítio de ligação da droga e por pares de base adjacentes à este sítio. Posteriormente, esta sugestão ganhou suporte extra com estudos do efeito de osmólitos e hidratação nas propriedades torcionais de plasmídeos de DNA.⁴⁶ A ausência de efeitos da sacarose no número de pares de base ocupados (ou excluídos) pela droga ligada sugerem, portanto, que a ligação aos sítios fracos do DNA tem consequências apenas locais ao sítio de ligação, e não se espalham para outros pontos da hélice como ocorre com a ligação da actinomicina aos sítios fortes do DNA.

O cálculo da variação de hidratação, associada a ligação de daunomicina ao DNA, utilizando constantes de equilíbrio determinadas pelos diferentes métodos de cálculo da fração de droga ligada, mostrou dois conjuntos de valores. Um valor $\sim 50 \text{ H}_2\text{O}$, obtido com as constantes determinadas utilizando coeficientes de extinção molar, e o outro utilizando o método de Lohman. Outro valor, em torno de 20-25, com as constantes calculadas da variação da Absorbância em 480 nm em função da concentração de DNA, e com as constantes determinadas pela análise de SVD. Estes últimos valores são consistentes com o valor determinado por Qu & Chaires.



Considerando a dificuldade de se determinar com precisão o espectro padrão da daunomicina ligada, e as limitações do método de Lohman na determinação das isotermas de ligação na região de baixa saturação da droga, e o fato de que as constantes determinadas pela variação de Abs(480) versus a concentração de DNA e as constantes determinada via SVD não utilizam dados externos ao dado experimental, consideramos que a variação de hidratação de cerca de 20-25 moléculas de água é a melhor avaliação para a intercalação de daunomicina aos sítios fracos do DNA.

Estudos cristalográficos²⁷ têm mostrado um grande número de moléculas de água dentro do complexo daunomicina-DNA. Estas águas incluem uma molécula de água fazendo ponte de hidrogênio simultaneamente com o oxigênio na posição 13 da daunomicina e a citosina na porção superior do sítio de intercalação, cerca de três a quatro moléculas de água interagindo com um íon sódio e com a daunomicina e substituintes do DNA no sulco maior e várias moléculas de água que formam uma pequena saliência de hidratação no sulco menor nas vizinhanças do grupo amino sobre a porção daunosamino. Outras moléculas de água, distribuídas na

estrutura do complexo devem também contribuir para a maior hidratação do complexo quando comparados com as espécies livres.

Frederick e colaboradores¹⁴ tem mapeado de 15 a 20 moléculas de água na primeira camada de hidratação de três diferentes estruturas cristalográficas de antraciclinas. Este número de moléculas de água corresponde à variação de hidratação medida, por estresse osmótico, para a formação do complexo. Este resultado sugere que outras moléculas de água, que compensariam a desidratação das superfícies moleculares escondidas na formação do complexo, não são vistas cristalograficamente.

O método de estresse osmótico tem demonstrado que a formação de complexos de outras droga e várias proteínas com DNA é acompanhada pelo aumento de hidratação do complexo. Sidorova & Rau⁵¹, por exemplo, observaram este fenômeno para a ligação de um análogo da netropsina a DNA, e Qu & Chaires³⁷ para a ligação de actinomicina e daunomicina ao DNA. Dados na literatura mostram que *gal* repressor,¹⁶ *Eco* RI e *Bam* HI,⁴⁵ são exemplos de algumas proteínas que se ligam ao DNA, ou com absorção de água ou com uma variação de água nula. Este resultados indicam que não só as superfícies de contato droga/DNA ou proteína/DNA sofrem mudanças



de hidratação, mas também outras partes do complexo para compensar as moléculas de água perdidas nestas superfícies interagentes.

Os resultados apresentados permitem concluir que:

- Constantes de ligação fornecidas pelo ajuste do modelo de Scatchard sempre foram maiores que as constantes de ligação fornecidas com o modelo de McGhee & von-Hippel, independentemente dos quatro diferentes métodos de obtenção de fração de ligante ligado;
- O número de sítios fracos ocupados (Scatchard) ou o número de sítios fracos excluídos (McGhee & von-Hippel) pela droga ligada, não são sensíveis à variação da atividade de água com sacarose;
- Os dados experimentais são bem descritos com modelos que consideram uma única classe de sítios;
- O modelo de ajuste de McGhee & von-Hippel melhor interpreta os resultados da interação da actinomicina e da daunomicina com sítios fracos do DNA.

V. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados permitem concluir que:

- a) Constantes de ligação fornecidas pelo ajuste do modelo de Scatchard sempre foram maiores que as constantes de ligação fornecidas com o modelo de McGhee & von-Hippel, independentemente dos quatro diferentes métodos de obtenção de fração de ligante ligado;
- b) O número de sítios fracos ocupados (Scatchard) ou o número de sítios fracos excluídos (McGhee & von-Hippel) pela droga ligada, não são sensíveis à variação da atividade de água com sacarose;
- c) Os dados experimentais são bem descritos com modelos que consideram uma única classe de sítios;
- d) O modelo de ajuste de McGhee & von-Hippel melhor interpreta os resultados da interação da actinomicina e daunomicina com sítios fracos do DNA;

VL REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- e) Todos os métodos de análise usados neste estudo para averiguar a interação da actinomicina e daunomicina a sítios fracos do DNA, indicam que água é absorvida na formação do complexo.
- f) O método de análise que emprega coeficiente de extinção molar apresenta maior variação de hidratação (~40) quando comparado aos métodos de análise que não empregam coeficientes de extinção molar (~20-25);
- g) O método de análise que obtém as isotermas a partir de quatro curvas de titulação, apresenta uma variação de hidratação da ordem de 60;
- h) A intercalação da daunomicina aos sítios fracos do DNA é acompanhada da absorção de 20-25 moléculas de água, tornando o complexo daunomicina/DNA mais hidratado que daunomicina e DNA livres em solução.
- i) A intercalação da actinomicina aos sítios fracos do DNA é acompanhada da absorção de 16 moléculas de água.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berquist, S., O'Brien, R., Ladbury, J. E. Site-Specific Cation Binding Mediates TATA Binding Protein-DNA Interaction from a Hyperthermophilic Archaeon. *Biochemistry*, v.40, p.2419-2425, 2001.
2. Bujalowski, W., Lohman, T. M., A general method of analysis of ligand-macromolecule equilibria using a spectroscopy signal from the ligand to monitor binding. Application to Escherichia coli single-strand binding protein-nucleic acid interactions. *Biochemistry*, v.26, p.3099-3106, 1987.
3. Caetano, R. C. Efeito de água sobre a atividade da ribonuclease A. Dissertação de Mestrado, 1996.
4. Cavalieri, L., Nemchin, R. The mode of actinomycin D with deoxyribonucleic acid. *Biochim. Biophys. Acta*, v.87, p.641-652, 1964.
5. Chaires, J. B., Allosteric conversion of Z DNA to na intercalated right-handed conformation by daunomycin. *J. Biol. Chem.*, v.261, p.8899-8907, 1986.

6. Chaires, J. B., Dattagupta, N. D., Crothers, D. M. Kinetics of the daunomycin-DNA interaction. *Biochemistry*, v.24, p.260-267, 1985.
7. Chaires, J. B., Dattagupta, N. D., Crothers, D. M., Self-association of daunomycin. *Biochemistry*, v.21, p.3927-3932, 1982.
8. Chaires, J. B., Dattagupta, N., D., Crothers, D. M., Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic acid: equilibrium binding studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, v.21, p.3933-3940, 1982.
9. Colombo, M. F. O papel da água na regulação de macromoléculas biológicas: do controle alostérico à especificidade no reconhecimento molecular. Tese de Livre Docência, 1996.
10. Colombo, M. F., Rau, D. C., Parsegian, V. A. Protein solvation in allosteric regulation: a water effect on hemoglobin. *Science*, v.256, p.655-659, 1992.
11. Colombo, M. F., Rau, D. C., Parsegian, V. P. Reevaluation of chloride's regulation of hemoglobin oxygen uptake: the neglected contribution of protein hydration in allostereism. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v.91, p.10517-10520, 1994.



12. Crooke, S. T., Reich, S. D. Anthracyclines: Current status and new developments , Academic Press, New York, 1980.
13. Dattagupta, N., Hogan, M., Crothers, D. M. Interactions of netropsin and distamycin with deoxyribonucleic acid: electric dichroism study. *Biochemistry*, v.19, p.5998-6005, 1980.
14. Frederick, C. A. et al. Structural comparison of anticancer drug-DNA complexes: adriamycin and daunomycin. *Biochemistry*, v.29, p.2538-2549, 1990.
15. Fried, M. G. et al. Role hydration in the binding of lac repressor to DNA. *J. Biol. Chem.*, v.277, p.50676-50682, 2002.
16. Garner, M. M., Rau, D. C. Water release associated with specific binding of gal repressor. *EMBO J.*, v.14, p.1257-1263, 1995.
17. Gellert, M., Smith, C. E., Neville, D., Fesenfeld, G. Actinomycin binding to DNA: mechanism and specificity. *J. Mol. Biol.*, v.11, p.445-457, 1965.
18. Gigli, M., Doglia, S. M., Millot, J. M., Valentini, L., Manfait, M. Quantitative study of doxorubicin in living cell nuclei by microspectrofluorometry. *Biochim. Biophys Acta*, v.950, p.13-20, 1988.



19. Goldberg, I. H., Rabinowitz, M., Reich, E. Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.48, p.2094-2101, 1962.
20. Goodisman, J., Rehfuss, R., Ward, B., Dabrowiak, J. C. Site-specific binding constants for actinomycin D on DNA determined from footprinting studies. *Biochemistry*, v.31, p.1046-1058, 1992.
21. Graves, D. E., Krugh, T. R. Adriamycin and daunorubicin bind in a cooperative manner to deoxyribonucleic acid. *Biochemistry*, v.22, p.3941-3947, 1983.
22. Graves, D. E., Wadkins, R. M. 7-azidoactinomycin D: a novel probe for examining actinomycin D-DNA interactions. *J. Biol. Chem.*, v.264, p.7262-7266, 1989.
23. Haq, I. Thermodynamics of drug-DNA interactions. Part II: the thermodynamics of drug-bipolymer interaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.403, p.1-15, 2002.
24. Kamitori, S., Takusagawa, F. Crystal structure of the 2:1 complex between d(GAAGCTTC) and the anticancer drug actinomycin D. *J. Mol. Biol.*, v.225, p.445-456, 1992.



- 25.Kornblatt, J., Hoa, G. H. B. A nontraditional role for water in the cytochrome c oxidase reaction. *Biochemistry*, v.29, p.9370-9376, 1990.
- 26.Lee, J. C., Timasheff, S. N. The stabilization of proteins by sucrose. *J. Biol. Chem.*, v.256, p.7193-7201, 1981.
- 27.Lipscomb, L. A et al. Water ring structure at DNA interfaces: hydration and dynamics of DNA-antracycline complexes. *Biochemistry*, v.33, p.3649-3659, 1994.
- 28.McGee, M. P. et al. Hydration effects of heparin on antithrombin probed by osmotic stress. *Biophys. J.*, v.82, p.1040-1049, 2002.
- 29.McGhee, J. D., von-Hippel, P. H. Theoretical aspects of DNA-protein interaction: cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice. *J. Mol. Biol.*, v.86, p.469-489, 1974.
- 30.Mitchell, D. C., Litman, B. J. Effect of protein hydration on receptor conformation: decreased levels of bound water promote metarhodopsin II formation. *Biochemistry*, v.38, p.7617-7623, 1999.

37.Qin, X., Challa, G. B. Hydration changes for DNA intercalation reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, v.123, p.1-7, 2001.

31. Moore, M. H. et al. DNA-drug interactions: the crystal structure of d(CGATCG) complexed with daunomycin. *J. Mol. Biol.*, V.206, p.693-705, 1989.
32. Muller, W., Crothers, D. M. Studies of the binding of actinomycin and related compounds to DNA. *J. Mol. Biol.*, v.35, p.251-290, 1968.
33. Pal, S. K. et al, Site-and sequence-seletive ultrafast hydration od DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.,USA*, Early Edition.
34. Pal, S. K. et al, Water at DNA surfaces: ultrafast dynamics in minor groove recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci.,USA*, v.100, p.8113-8118, 2003.
35. Parsegian, V. A., Rand, R.P., Rau, D. C. Macromolecules and water: probing with osmotic stress. *Meth. Enzymol.*, v.259, p.43-94, 1995.
36. Priesler, R. S., Chen, H. H., Colombo, M. F., Choe, Y., Short, B. J. Jr., Rau, D. C. The B Form to Z Form Transition of Poly(dG-m5dC) Is Sensitive to Neutral Solutes Through an Osmotic Stress. *Biochemistry*, v.34, p.14400-14407, 1995.
37. Qu, X., Chaires, J. B. Hydration changes for DNA intercalation reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, v.123, p.1-7, 2001.



38. Quadrifoglio, F., Crescenzi, V. On the binding of actinomycin and of daunomycin to DNA: a calorimetric and spectroscopic investigation. *Biophys. Chem.*, v.2, p.64-69, 1974
39. Rand, R. P., Fuller, N. L., Butko, P., Francis, G., Nicholls, P. Measured change in protein solvation with substrate binding and turnover. *Biochemistry*, v.32, p.5925-5929, 1993.
40. Raymer, M. L. et al., Predicting conserved water-mediated and polar ligand interactions in proteins using a k-nearest-neighbors genetic algorithm. *J. Mol. Biol.*, v.265, p.445-464, 1997.
41. Rayner, M. D., Starkus, J. G., Ruben, P. C., Alicata, D. A. Voltage-sensitive and solvent-sensitive processes in ion channel gating. Kinetic effects of hyperosmolar media on activation and deactivation of sodium channels. *Biophys. J.*, v.61, p.96-108, 1992.
42. Reinert, K. E., Anthracycline-binding induced DNA stiffening, bending and elongation; stereochemical implications from viscometric investigations. *Nucleic Acids Res.*, v.11, p.3411-3430, 1983.
43. Robinson, C. R., Sligar, S. G. Hydrostatic and osmotic pressure as tools to study macromolecular recognition. *Meth. Enzymol.*, v.259, p.395-427, 1995.



44. Robinson, C. R., Sligar, S. G. Participation of water in Hin recombinase-DNA recognition. *Protein Sci.*, v.5, p.2119-2124, 1996.
45. Robinson, C. R., Sligar, S.G. Heterogeneity in Molecular Recognition by Restriction Endonucleases: Osmotic and Hydrostatic Pressure Effects on BamHI, Pvu II, and EcoRI Specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.92, p.3444-3448, 1995.
46. Ruggiero-Neto, J. et al. Hydration effects on DNA double helix stability modulate ligand binding to natural DNA in response to changes in water activity. *Cell. Mol. Biol.*, v.47, p.801-814, 2001.
47. Ruggiero-Neto, J., Colombo, M. F. Water regulation of actinomycin-D binding to DNA: the interplay among drug affinity, DNA long-range conformation, and hydration. *Biopolymers*, v.53, p.46-59, 2000.
48. Santoro, M. M., Liu, Y., Khan, S. M. A., Hou, L., Bolen, D. W. Increased thermal stability of proteins in the presence of naturally occurring osmolytes. *Biochemistry*, v.31, p.5278-5283, 1992.
49. Scatchard, G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.51, p.660-672, 1949.



- 50.Sidorova, N. Y., Rau, D. C. Differences in water release for the binding of *Eco* RI to specific and nonspecific DNA sequences. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, v.93, p.12272-12277, 1996.
- 51.Sidorova, N. Y., Rau, D. C. The osmotic sensitivity of netropsin analogue binding to DNA. Biopolymers, v.35, p.377-384, 1995.
- 52.Sobell, H. M., Jain, S. C. Stereochemistry of actinomycin binding to DNA. II. Detailed molecular model of actinomycin-DNA complex and its implications. J. Mol. Biol., v.68, p.21-34, 1972.
- 53.Spink, C. H., Chaires, J. B. Effects of Hydration, Ion Release, and Excluded Volume on the Melting of Triplex and Duplex DNA. Biochemistry, v.38, p.496-508, 1999.
- 54.Tinoco, I., Sauer, K., Wang, J. C. Physical Chemistry , Principles and Applications in Biological Sciences, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1995, p.203-211.
- 55.Varani, G., Torre, L. D., Baldini, G. Nonspecific interactions in dye binding to DNA. Influence of alcohols and amides. Biophys. Chem., v.28, p.175-181, 1987.
- 56.Wang, A., H., Ughetto, G., Quigley, G. J., Rich, A. Interactions between an anthracycline antibiotic and DNA: molecular structure

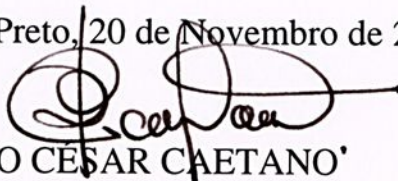


- of daunomycin complexed to d(CpGpTpApCpG) at 1.2-Å resolution. *Biochemistry*, v.26, p.1152-1163, 1987.
57. Wells, R. D., Larson, J. E. Studies on the binding of actinomycin D to DNA and DNA model polymers. *J. Mol. Biol.*, v.49, p.319-342, 1970.
58. Wyman, J. Jr. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. *Adv. Protein Chem.*, v.19, p.223-286, 1964.
59. Xodo, L. E., Manzini, G., Ruggiero, J. On the interaction of daunomycin with synthetic alternating DNAs: sequence specificity and polyelectrolyte effects on the intercalation equilibrium. *Biopolymers*, v.27, p.1839-1857, 1988.
60. Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., Somero, G. N. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, v.217, p.1214-1222, 1982.
61. Zimmerberg, J., Parsegian, V. A. Polymer inaccessible volume changes during opening and closing of a voltage-dependent ionic channel. *Nature*, v.323, p.36-39, 1986.



Autorizo a reprodução deste trabalho.

São José do Rio Preto, 20 de Novembro de 2003



RENATO CÉSAR CAETANO'

