Estudo da Transição Entrópica do DNA Induzida por Intercalantes Utilizando a Técnica de Pinçamento Óptico e Espectroscopia de Autocorrelação de Intensidades

Maria Clara Ferreira

Setembro de 2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

Estudo da Transição Entrópica do DNA Induzida por Intercalantes Utilizando a Técnica de Pinçamento Óptico e Espectroscopia de Autocorrelação de Intensidades

Maria Clara Gonçalves Miranda Ferreira

Orientador: Prof. Dr. Oscar Nassif de Mesquita

Co-orientador: Prof. Márcio Santos Rocha

Dissertação de Mestrado apresentado à
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Setembro de 2007

"Tanto bem me fez a explicação
que a dúvida transformou-se em deslumbramento"
Dante

Agradecimentos

Agradeço a todos as pessoas que contribuiram direta e indiretamente para o processo. Algumas acompanharam mais de perto, não só nos momentos de felicidade, como também as situações de desespero e de perda momentânea da razão... Queria dizer a estas pessoas que sou completamente grata por me trazerem de volta à realidade nestes momentos.

Queria agradecer de forma especial ao grande mestre, Prof. Dr. Oscar Nassif de Mesquita, por ter me orientado e também me ajudado sempre que precisei. Queria agradecer também a todos os professores do departamento que contribuiram para a minha formação acadêmica. Em especial, aos mestres Alaor Chaves, José Marcos e Ronald Dickman, fontes de inspiração para prosseguir fazendo ciência e produzindo conhecimento.

Ao Márcio, que todos os dias me encorajava, dizendo: "It's not easy my friend... it is very difficult", o que nunca pude deixar de concordar. Sem a ajuda dele o processo teria se tornado muito mais difícil. Aos meus queridos amigos do laboratório de biofísica, Camilla, Henrique, Mayumi, Lívia, Giuseppe, Léo, Bira, Coelho e Aline, que estiveram sempre presentes e sempre me apoiaram nas pesquisas e nas reformas... nas disciplinas e nas faxinas... sem estas pessoas a vida no lab seria simplesmente impossível. Ao Jotinha, grande amigo, que me surpreende a cada dia com o seu senso de humor inabalável, que resiste até à rotina desgastante da física. À Gabi Lemos, que mesmo estando distante está sempre muito presente. À Rosinha, minha amiga de todas as horas. Ao Fredinho, que sempre me ajuda na vida pessoal e profissional. Aos meus amigos da graduação, Alex, Gabis, Fefê, Gui e Daniel. À

Martinha, que é para mim um grande exemplo de determinação e força de vontade. Aos meus eternos amigos do IEMG, Davi, Mary e Ana, que me acompanham e me ajudam no meu amadurecimento pessoal, cada um em um aspecto diferente.

Queria agradecer também a todos da minha família que sempre contribuem para que os meus sonhos se tornem realidades. Aos meus priminhos queridos, Carol, Dani e Nata, que considero meus irmãos, que sempre preenchem a minha vida com grandes momentos de alegria. A tia Rosinha, que sempre esteve presente e me ajudou sempre que precisei. A minha vovó, confidente e amiga, que está sempre pronta para me apoiar nas minhas decisões. A todos os meus tios, em especial ao Dudu, que sempre me socorre, principalmente nos momentos em que eu precisaria ser duas. À Mamis que sem ela não estaria aqui aonde estou e que sempre me perdoa pelos meus infinitos erros e pela minha constante falta de tempo.

Queria agradecer também a todos os funcionários do departamento que estão presentes todos os dias, tornando a vida na física possível, em especial à Shirley, bibliotecária, ao Sr. João da oficina mecânica, à Irene, da limpeza e aos meninos, técnicos de eletrônica e técnicos de laboratório. Queria agradecer também ao Prof. Dr. Antero Silva, do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear, pela atenção e pela contribuição com o Brometo de Etídio. E também ao Prof. Mazzoli, que gentilmente me cedeu as figuras da pinça óptica.

Agradeço também às agências brasileiras de financiamento de pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPEMIG, FINEP-PRONEX, Instituto do Milênio de Nanotecnologia e Instituto do Milênio de Óptica Não-Linear, Fotônica e Biofotônica - MCT.

Sumário

Lista de Figuras **iii**

RESUMO **viii**

ABSTRACT **ix**

1 Introdução **1**

2 DNA: a Molécula da Vida **6**

2.1 A Estrutura dos Ácidos Nucléicos 6

2.2 O DNA como um Polímero 15

2.3 Modelos de Elasticidade de Polímeros 18

2.4 Complexos DNA-Intercalantes 28

2.5 Modelo de Exclusão de Pares 31

3 Pinças Ópticas **41**

3.1 Aplicações Biológicas de Forças Ópticas 41

3.2 Pinça-óptica como sensor de força 42

4 Técnicas Experimentais **49**

4.1 Montagem Experimental 49

4.2 Preparação das Amostras 51

4.3 Medidas Experimentais 53

5 Resultados e Discussões **62**

5.1 DNA-Brometo de Etídio 62

5.2 DNA-Daunomicina 64

6 Conclusões **72**

A Artigo **73**

Revista *Journal of Chemical Physics* 73

Referências Bibliográficas **81**

Lista de Figuras

2.1 A estrutura dos nucleotídeos é composta por um açúcar, uma base nitrogenada e um grupo fosfato. Nesta figura a base nitrogenada representada é uma adenina. 7

2.2 Estrutura secundária helicoidal do DNA. As ligações fosfodiéster nas duas fitas estão em direções opostas, uma na direção $5' \rightarrow 3'$ e outra na direção $3' \rightarrow 5'$, sendo portanto, antiparalelas. As bases nitrogenadas adjacentes são unidas por pontes de hidrogênio. 8

2.3 Diferentes tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas: B, A e Z respectivamente. Observamos tamanhos diferentes de cavidades entre as duas hélices para cada tipo de DNA. Na figura Cm representa a cavidade menor e CM a cavidade maior. 10

2.4 Imagem de microscopia eletrônica de diferentes graus de superenrolamento do DNA. Da esquerda para a direita observa-se um grau de superenrolamento crescente. O primeiro encontra-se relaxado, o último totalmente superenrolado e os intermediários apresentam níveis parciais de superenrolamento (A. Kornberg DNA Replication, pg. 29, W.H.Freeman, 1980). 12

2.5 a) DNA circular, fechado e sem superenrolamento. b) DNA com dois superenrolamentos negativos, todos as bases pareadas e n voltas em torno da hélice. c) DNA circular, sem superenrolamento, com $n - 2$ voltas na hélice e uma região localmente desenrolada. 14

2.6 Diferentes graus de empacotamento do DNA dentro da célula 16

2.7 As colisões entre as moléculas do meio e o polímero farão com que, aos poucos, ele enovele-se sobre si mesmo, até atingir uma configuração de equilíbrio. Esta é uma configuração de enovelamento aleatório e de alta entropia. 18
2.8 Curva aleatória s cuja posição no espaço é dada pelos vetores $\vec{r}(s)$. . 19
2.9 A haste de comprimento L e momento de inércia I encontra-se inicialmente esticada. A haste sofre uma deformação em forma de um semi-círculo de raio R, a haste terá uma energia de curvatura dada por $E_f = \kappa_f L/2R^2$. 19
2.10 Cadeia polimérica contínua pode ser simulada por uma cadeia com segmentos de tamanho b, rotação livre e vetor orientacional $\mathbf{t}_i$. 21
2.11 a) Brometo de Etídio b) Aumento do comprimento e o desenrolamento da dupla-hélice do DNA causados pelo processo de intercalação do EtBr. 29
2.12 Molécula de Daunomicina. 30
2.13 Definição dos três tipos distinguíveis de sítios ligantes: **i)**sítio isolado, ao qual o intercalante se liga com uma constante de associação intrínseca $K(M^{-1})$ **ii)** sítio com apenas um primeiro vizinho de um dos lados, no qual o intercalante se liga com uma constante de associação $K\omega(M^{-1})$ **iii)** sítio com dois primeiros vizinhos, cada qual de um lado, ao qual o intercalante se liga com uma constante de associação $K\omega^2(M^{-1})$. 33
2.14 Os $(2n-1)$ sítios ligantes eliminados em uma rede vazia devido a intercalação de um único ligante com $n = 3$. 35
2.15 Os $(g-n+1)$ sítios ligantes disponíveis em um gap com $g = 5$ para um ligante com $n = 3$. 35
2.16 Único sítio ligante: assumindo que apenas um ligante se liga ao receptor 36

3.1 Perfil Gaussiano da Pinça 44
3.2 Microesfera centrada no eixo do perfil e abaixo do foco. 45
3.3 Microesfera no centro do perfil e acima do foco do laser. Os vetores de onda dos raios incidentes, $\vec{K}_0$ e $\vec{K}_1$, refratam, originando $\vec{K}'_0$ e $\vec{K}'_1$. Observamos que o momento linear resultante aponta para baixo, em direção ao foco. 46

3.4 centro da microesfera deslocada do centro do perfil e abaixo do foco. Neste caso, o momento linear resultante pode ser decomposto em uma componente apontando para o centro do perfil e outra, para cima. . . 47
3.5 Pressão de radiação devido à reflexão da luz pela micresfera. Neste caso, qualquer que seja a posição do centro da microesfera, o momento linear resultante sempre terá um efeito de empurrar a microesfera. E a força de gradiente, gerada pela refração, que compensa portanto a pressão de radiação da luz incidente, fazendo com que a partícula permaneça aprisionada. 47

4.1 Montagem experimental utilizada para as medidas. 50
4.2 a) Configurações possíveis e b) Configuração desejada: uma das extremidades do DNA presa à microesfera e a outra presa à lamínula do microscópio. Nesta configuração a molécula estica para todas as direções da mesma forma, o que é um forte indício de que há apenas uma molécula presa à microesfera. 54
4.3 Perfil de Retroespalhamento de Intensidades: obtido capturando-se a microesfera com a pinça óptica, movendo-a em relação ao He-Ne e capturando a intensidade de luz retroespalhada. 56
4.4 Curva de Autocorrelação de Intensidades: 57
4.5 Intensidade versus Estiramento 59
4.6 Força versus Estiramento 60

5.1 **a)** Comprimento de persistência A em funçao da concentração de EtBr utilizada, com a concentração de DNA fixa $C_{bp} = 11\mu M$. Observamos que o valor de A inicialmente aumenta com C_{EtBr} até atingir um valor máximo de $A \sim 150nm$ na concentração crítica $C^c_{EtBr} = 3,1\mu M$. A partir da concentração crítica ocorre uma queda abruta no comprimento de persistência do DNA, que permanece constante em torno de $A \sim 50nm$ para concentrações maiores. A figura abaixo **b)** mostra o comprimento de contorno L do complexo DNA-EtBr, que exibe um comportamento mais suave, crescendo monotonicamente à medida que aumentamos a concentração total do fármaco. O comprimento de persistência tem um valor inicial de $L = 16,5 \pm 1$ e aumenta até a saturação completa do DNA atingindo um valor de $L = 23 \pm 1$. O parâmetro de exclusão estimado com base nestes dados experimentais é $n = 2,5$. 63

5.2 **a)** Comprimento de persistência A em função da concentração de daunomicina utilizada. Observamos um comportamento muito semelhante ao que ocorre com o EtBr. Neste caso, o comprimento de persistência aumenta com o aumento da concentração até atingir um valor máximo $A \sim 280nm$ para concentração crítica $C^c_{Dau} = 18,3\mu M$. Neste ponto ocorre uma queda abrupta no comprimento de persistência, que permanece aproximadamente constante em torno de $A \sim 75nm$ para concentrações superiores. Abaixo, observamos que **b)** comprimento de contorno L do complexo DNA-daunomicina, ao contrário do comprimento de persistência, apresenta um comportamento suave, crescendo monotonicamente com o aumento da concentração total de daunomicina C_{Dau}. O comprimento de contorno tem um valor inicial de $L = 16,5 \pm 1$ e aumenta até a saturação completa do DNA atingindo um valor de $L = 21 \pm 1,8$. O parâmetro de exclusão estimado com base nestes dados experimentais é $n = 3,3$. 65

5.3 a) Três curvas de força versus extensão dos dados experimentais originais obtidos para a daunomicina: para duas concentrações diferentes de daunomicina e para o DNA livre de daunomicina. Quadrados: DNA puro; círculos: $C_{Dau} = 20,1\mu M$ (acima da concentração crítica); e $C^c_{Dau} = 18,3\mu M$ (na concentração crítica). Para fins de comparação, as curvas foram normalizadas, dividindo-se pelo comprimento de contorno obtido para cada uma e, para facilitar a vizualização, foi feita uma média sobre os pontos da curva, diminuindo o ruido devido às flutuações Brownianas. 67

5.4 Concentração total de Brometo de Etídio (em μM) por aumento relativo do comprimento de contorno da molécula. Observamos que $\Delta L/L_0$ cresce monotonicamente com o aumento da concentração de EtBr e não exibe mudanças abruptas de comportamento. Cada ponto da curva foi obtido usando uma determinada concentração do brometo de etídio. A curva experimental pode ser fitada com a equação 5.10, curva pontilhada da figura. O ajuste teórico da curva nos fornece os valores dos parâmetros $K = (1,4 \pm 0,4) \times 10^5 M^{-1}$ e $n = 2,35 \pm 0,15$ para o EtBr, sendo o erro determinado pelo próprio ajuste. 70

Resumo

No presente trabalho foram feitas medidas do comprimento de persistência e de contorno de complexos formados entre o DNA e dois intercalantes: a daunomicina e o brometo de etídio . Um estudo sistemático foi realizado utilizando diversas concentrações dos intercalantes e medindo o comprimento de persistência e de contorno de cada complexo formado. Para isto foi utilizado um sistema de pinçamento óptico associado à espectroscopia de autocorrelação de intensidades. Observamos que o comprimento de persistência dos complexos DNA-fármacos aumentam de maneira significativa com o aumento da concentração do fármaco até atingir um valor crítico. Acima deste valor crítico o comprimento de persistência decai abruptamente e permanece aproximadamente constante para concentrações superiores do fármaco. Este comportamento sugere uma possível transição *helix-coil* do DNA. O comprimento de contorno da molécula aumenta monotonicamente e atinge um ponto máximo que permanece constante com o aumento da concentração do fármaco. O modelo de exclusão de pares coincide com os nossos resultados para a concentração total de fármaco como função do aumento relativo do comprimento de contorno.

Abstract

At the present work we have made measurements of persistence and contour length of DNA-drug complexes. We studied particulary the effects of two drugs that intercalates DNA molecule: daunomycin and ethidium bromide. A systematic study was made using different drug concentrations and measuring the persistence and contour length of each one of these complexes. To do this we used a system of optical tweezers and intensity autocorrelation spectroscopy. We observed that the persistence length of DNA-drug complexes increases strongly as the drug concentration increases up to some critical value. Above this critical value, the persistence length decreases abruptly and remains approximately constant for larger drug concentrations. This behavior suggests that a helix-coil transition might de occuring. The contour length of the molecules increases monotonically and saturates as drug concentration increases. The neighbor exclusion model fits to our results for the total drug concentration as a function of the relative increase of the contour length.

Capítulo 1

Introdução

Os sistemas vivos são os exemplos mais notáveis de como a matéria pode se organizar em estados de extrema complexidade. As investigações acerca da estrutura organizacional de sistemas biológicos ganharam um grande estímulo após a descoberta da estrutura de dupla hélice do DNA* por Watson e Crick em 1953 [1,2] e decorrentes descobertas de inúmeras proteínas.

Com o advento de novas técnicas de aquisição de imagens e manipulação de microsistemas biológicos [3], as portas deste fascinante universo se abriram, revelando um mundo complexo, com uma riqueza de detalhes impressionante. Em sistemas vivos, ocorre uma complexa rede de interações entre milhares de metabólitos, proteínas e moléculas de DNA, nos níveis celulares e moleculares. Estas biomoléculas realizam uma imensa varidade de tarefas e exibem uma admirável regularidade e ordem, sem comparação com qualquer outro evento observado na matéria inanimada. Para se ter uma idéia da complexidade dos sistemas vivos, observemos a replicação celular: cerca de dois trilhões de novas células são geradas por dia em um ser humano, ou seja, trinta milhões por segundo. Cada célula diplóide possui 48 cromossomos e cada cromossomo possui três bilhões de pares de base† que carregam toda a informação genética. Portanto, são copiados cerca de 4×10^{18} informações por segundo. Sem dizer que a célula possui um mecanismo de reparo de erros [4] no código que faz uma revisão de tudo o que foi copiado. O mais surpreendente

*Ácido desoxirribonucleico.

†O DNA possui quatro tipos de unidades fundamentais, as bases, que se organizam em pares Guanina-Citosina e Adenina-Timina. A ordem destes pares de base origina o código genético.

do processo de replicação é que a probabilidade de erro é de um a cada 10^9 pares de base copiados. Esta estabilidade garante que as espécies sejam reproduzidas por várias gerações sem alterações apreciáveis. Este mesmo erro permite também que as espécies sejam aprimoradas segundo os critérios da seleção natural [5].

O grande desafio da biofísica contemporânea encontra-se em descrever estes sistemas complexos a partir das leis físicas. O renomado físico austríaco Erwin Schroedinger (1887-1961) já se preocupava com a questão da redutibilidade dos fenômenos biológicos a fenômenos físico-químicos, reconhecendo que a vida é bastante complexa para tal redutibilidade. Em 1944 publicou "O que é vida?" [6], em que já previa as dificuldades encontradas e que não seria fácil descrever sistemas vivos a partir de leis físicas. Sobre a discussão acerca da complexidade da vida, Schroedinger escreve:

> Não devemos, portanto, sentir-nos desencorajados pela dificuldade de interpretar a vida a partir das leis comuns da física. Pois dificuldade é justamente o que se deve esperar do conhecimento que adquirimos da estrutura da matéria viva. Devemos estar preparados para nela encontrar um novo tipo de lei física. Ou devemos dizer uma lei não física, para não dizer superfísica?

É intressante observar que este problema, apesar de muito antigo, é extremamente atual e ainda suscita várias discussões acerca do assunto [7,8]. Qual seria a forma mais eficiente de se abordar problemas tão complexos que desafiam nossa compreensão do universo?

A termodinâmica destes pequenos sistemas está longe de ser uma termodinâmica de equilíbrio. Com energias da ordem de algumas unidades de K_BT * as reações biomoleculares ocorrem em condições de grandes flutuações brownianas† devido às moléculas de água que circundam o ambiente. As leis da termodiâmica, que

*Em biofísica é comum referir-se a energias em unidades de K_BT. À temperatura ambiente T $\simeq$ 300K e portanto, $1K_BT \simeq 4$ pN $\times$ nm $\simeq 0.6$ Kcal mol^{-1}

†Em 1827 o botânico escocês Robert Brown (1773-1858) descobriu que pequenos grãos de pólen executavam pequenos movimentos aparentemente aleatórios. Intrigado, observou que o mesmo fenômeno ocorria em partículas de pó, o que lhe permitiu concluir que os movimentos não eram devido a mecanismos biológicos associados ao pólen. Apesar de não ter conseguido encontrar a verdadeira explicação para o fenômeno observado, este ficou conhecido como movimento browniano, em homenagem ao seu descobridor.

descrevem sistemas em equilíbrio, não se aplicam a estes sistemas. Portanto, processos estocásticos, teorema da flutuação, metaestabilidade e flutuação térmica [9] são algumas das disciplinas envolvidas na tentativa de entender os padrões de comportamento dessas biomoléculas. Esta relação entre propriedades de não equilíbrio de pequenas máquinas e suas propriedades termodinâmicas está modelando uma nova disciplina em física estatística, chamada termodinâmica de não equilíbrio de sistemas pequenos [10]. Esta disciplina tem desempenhado um papel fundamental ao descrever processos de troca de energia e de matéria que ocorrem nos níveis moleculares e celulares.

No presente trabalho trataremos sobre uma complexa questão acerca das interações dos ácidos nucleicos com alguns compostos químicos. São estudadas as mudanças nas propriedades mecânicas de moléculas únicas de DNA ocorridas quando estas são expostas a diferentes compostos químicos. Uma das motivações deste estudo é o fato de que a molécula de DNA é o principal alvo de vários fármacos utilizados em quimioterapia. Além disso, este estudo visa também a compreensão das propriedades físicas fundamentais da dupla-hélice.

A maioria dos fármacos utilizados em quimioterapia apresenta efeito direto sobre as funções de transcrição, tradução e replicação gênica, como por exemplo, a daunomicina e o psoralen. Eles intercalam entre os pares de base das moléculas de DNA comprometendo suas funções vitais, levando consequentemente à morte celular. Surpreendentemente, a quimioterapia foi descoberta durante a Segunda Guerra Mundial, quando os alemães atacaram com armas químicas as águas costeiras da Itália em 1943. Durante este período foi possível observar os efeitos biológicos causados pelas bombas de gás de mostarda [11]. Em 1946, Alfred Gilman e Frederick Phillips relataram que os efeitos colaterais causados pelo gás eram semelhante àqueles causados devido à exposição aos raios X. A partir da publicação dos estudos clínicos feitos com o gás mostarda verificou-se um avanço crescente da quimioterapia antineoplásica*. Hoje sabemos que tanto a quimioterapia quanto a radioterapia agem sobre a molécula de DNA, cada qual utilizando uma mecanismo de ação particular. Os mecanismos de ação destes fármacos sobre o DNA têm sido amplamente estudados [13] e são de crucial importância para o aprimoramento de técnicas de

*A quimioterapia é o método que utiliza compostos químicos, chamados quimioterápicos, no tratamento de doenças causadas por agentes biológicos. Quando aplicada ao câncer, a quimioterapia é chamada de quimioterapia antineoplásica ou quimioterapia antiblástica.

quimioterapia.

No presente trabalho estudamos os complexos formados entre o DNA e dois intercalantes: o brometo de etídio (EtBr) e a daunomicina. O brometo de etídio é amplamente utilizado como marcador de moléculas de DNA, uma vez que o complexo formado se torna fluorescente quando exposto à radiação ultravioleta. A daunomicina por sua vez é um fármaco utilizado em tratamentos de alguns tipos de câncer. As propriedades mecânicas medidas são o comprimento de persistência e de contorno da molécula. A análise destas propriedades torna-se possível pois o DNA é um biopolímero. O modelo que descreve o comportamento de polímeros sob ação de forças - no limite entrópico - é conhecido como Worm-Like Chain (WLC) [14]. Na prática o que fazemos é prender uma das extremidades do DNA na lamínula do microscópio e outra a uma microesfera de poliestireno. Utilizando um sistema de pinçamento óptico, associado à espectroscopia de autocorrelação de intensidades [15], torna-se possível esticar a molécula e medir simultaneamente a força aplicada. Deste procedimento, obtemos uma curva de força versus extensão, que revela propriedades importantes da molécula como seu comprimento e elasticidade. Este é um poderoso método que nos permite obter informações de uma única molécula isolada, ao invés de médias sobre um sistema composto por inúmeras moléculas.

Neste trabalho foi feito um estudo sistemático dos efeitos da concentração dos fármacos sobre a molécula de DNA. Observa-se que para determinada concentração ocorre uma transição estrutural na dupla-hélice. Esse mesmo efeito é observado tanto para o brometo de etídio quanto para a daunomicina, indicando uma característica recorrente destes intercalantes. Vários trabalhos na literatura reportam mudanças no comprimento de persistência de acordo com determinada concentração de um fármaco. Mas ainda não haviam sido feitos estudos detalhados da relação entre a concentração do fármaco e o efeito causado. No capítulo 2 abordaremos as características físicas, químicas e biológicas do DNA e dos fármacos intercalantes. No capítulo seguinte descreveremos a teoria das pinças ópticas e mostraremos como este método pode ser utilizado como um sensor de forças da ordem de alguns picoNewtons. As técnicas experimentais como preparo de amostras e configuração da montagem são descritas no capítulo 4, juntamente com algumas considerações experimentais e teóricas finais. Os resultados obtidos serão analisados e discutidos

no capítulo 5 e as conclusões do trabalho são finalmente apresentadas no capítulo 6.

Capítulo 2

DNA: a Molécula da Vida

2.1 A Estrutura dos Ácidos Nucléicos

O ácido desoxiribonucleico (DNA) é responsável por armazenar a informação genética nos seres. Ele é capaz de se autoduplicar e de se traduzir em proteínas, e é também susceptível a mutações. O modelo estrutural compatível com o DNA foi proposto por Watson e Crick, em 1953, o que lhes rendeu o Prêmio Nobel de Medicina no ano de 1962. O modelo ainda é utilizado nos dias atuais e é conhecido como modelo de dupla hélice (fig2.2). Nesta seção descreveremos o modelo estrutural da dupla-hélice [22].

Estrutura do DNA

O ácido desoxirribonucleico (DNA) é um polímero de unidades de desoxirribonucleotídeos. Os desoxirribonucleotídeos são compostos por um açúcar (desoxirribose), uma base nitrogenada ligada ao carbono $1'$ da pentose e um ou até três grupos fosfato (PO_4^-), ligados ao carbono $5'$ da pentose. As bases nitrogenadas podem ser purinas (dois anéis aromáticos), adenina (A) e guanina (G) ou pirimidinas (um anél aromático), citosina (C) e timina (T). As bases ligam-se ao carbono $1'$ da pentose através de uma ligação glicosídica β. Os desoxirribonucleotídeos formam cadeias ligadas entre si por pontes fosfodiéster estabelecidas entre o grupo fosfato e o grupo OH (hidroxila) do carbono $3'$ do nucleotídeo adjacente.

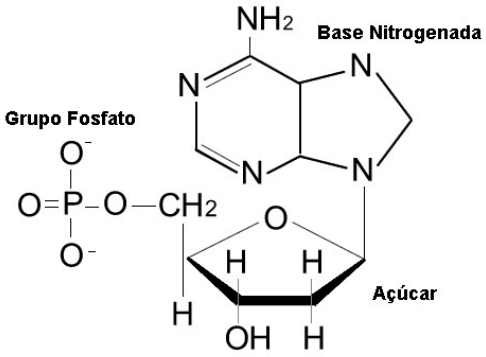

Figura 2.1: A estrutura dos nucleotídeos é composta por um açúcar, uma base nitrogenada e um grupo fosfato. Nesta figura a base nitrogenada representada é uma adenina.

Todos os nucleotídeos da molécula de DNA têm a mesma orientação relativa. Se o carbono $5'$ da pentose do primeiro nucleotídeo estiver voltado para cima, todos os demais nucleotídeos da cadeia estarão na mesma posição . As cadeias polinucleotídicas possuem portanto uma direcionalidade. Sempre haverá um grupo fosfato na extremidade $5'$ da cadeia enquanto que na extremidade $3'$ haverá um grupo OH. Por definição as cadeias polinucleotídicas são representadas na direção $5' \rightarrow 3'$ e somente as letras indicativas das bases nitrogenadas são representadas:

5′ TTACGACCGTACC 3′.

A cadeia polinucleotídica é considerada altamente flexível e, portanto, capaz de assumir uma conformação completamente aleatória *a priori*. Entretanto, estudos detalhados da sua estrutura demonstraram que o maior grau de rotação ocorre nas ligações entre o oxigênio e o fósforo nas ligações fosfodiéster e entre a pentose e a base nitrogenada, na ligação glicosídica. Nestas posições, existem localizações preferenciais, mostrando que a molécula de DNA assume conformações não aleatórias.

A dupla-hélice do DNA

As ligações fosfodiéster nas duas fitas estão em direções opostas, uma na direção $5' \rightarrow 3'$ e outra na direção $3' \rightarrow 5'$, sendo portanto, antiparalelas. As bases nitrogenadas adjacentes são unidas por pontes de hidrogênio. Entre T e A são formadas

duas pontes de hidrogênio, enquanto que entre C e G se formam três pontes. As bases possuem dois tamanhos: as pirimidinas são menores, com apenas um anél aromático. Ao passo que as purinas são maiores, com dois anéis. Entretanto, estudos indicam que os pares AT e CG têm aproximadamente o mesmo tamanho e dimensões semelhantes. Como ambos os pares ocupam o mesmo espaço, a dupla-hélice apresenta um diâmetro uniforme ao longo da sua extensão. Sendo assim, não existem restrições quanto a sequência assumida pelos nucleotídeos ao longo da molécula. A relação molar entre A e T é igual a 1, o mesmo acontece para as concentraçõe de C e G. Entretanto, a quantidade molar de AT e de CG varia de acordo com a sequência de DNA analisada. Essa característica de pareamento tem grande significância fisiológica. As duas fitas são ditas portanto complementares. Essa propriedade garante a replicação precisa de cadeias longas de DNA e a transmissão das informações genéticas às proteínas, via transcrição.

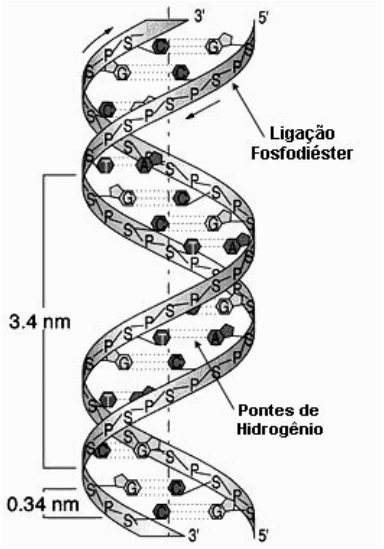

Figura 2.2: Estrutura secundária helicoidal do DNA. As ligações fosfodiéster nas duas fitas estão em direções opostas, uma na direção $5' \rightarrow 3'$ e outra na direção $3' \rightarrow 5'$, sendo portanto, antiparalelas. As bases nitrogenadas adjacentes são unidas por pontes de hidrogênio.

Para estabilizar a estrutura da dupla-hélice de DNA, várias forças agem em conjunto. Essas forças devem ser fortes o suficientes para manterem sua integridade, mas

devem permitir uma flexibilidade conformacional que é essencial para sua atividade. Além das ligações covalentes, que unem os átomos nas moléculas, outras forças mais fracas atuam no DNA. Efeitos hidrofóbicos estabilizam o pareamento, ou seja, os anéis púricos e pirimídicos das bases são forçados para o interior da dupla-hélice, por coesão das moléculas internas de água. Por outro lado, os sítios hidrofílicos das bases ficam expostos aos solventes do meio, através das cavidades da dupla-hélice. Assim, moléculas que interagem com sequências específicas de base, em geral proteínas, podem identificar estas sequências sem romper a estrutura da dupla-hélice.

Desnaturação e Renaturação do DNA

Esses fenômenos físicos são fundamentais para os processos de replicação, transcrição e recombinação. Os termos desnaturação e renaturação significam fusão e reanelamento. O fenômeno de desnaturação caracteriza-se pelo rompimento das pontes de hidrogênio, o que leva à separação das fitas complementares do DNA. O processo inverso é denominado renaturação. Ambos os processos podem ser obtidos *in vitro*, sob condições apropriadas.

Alguns fatores podem desencadear a desnaturação do DNA como, por exemplo, o aumento da temperatura, a titulação com ácidos ou álcalis e por agentes desnaturantes como a formamida e o dimetil sulfóxido (DMSO). Outro fatores como o estiramento da molécula na presença de substâncias intercalantes também levam à desnaturação do DNA [23,24].

Uma das maneiras de se medir a desnaturação da molécula de DNA é através da medida da absorbância da luz ultravioleta (UV). Como as bases nitrogenadas são as maiores responsáveis pela absorção - absorção é máxima para $\lambda = 260nm$ - quando as fitas da dupla-hélice do DNA estão completamente separadas, a absorbância é 37% maior do que aquela obtida para o DNA em sua forma nativa. Isto pode ser verificado experimentalmente, aumentando-se a temperatura de uma solução de DNA e medindo simultaneamente a absorbância para $\lambda = 260nm$. A temperatura para a qual 50% do DNA foi desnaturado é chamada T_m, que seria a temperatura de transição *helix-coil* ou *melting*. Nesta temperatura ocorre a separação das fitas do DNA ou desnaturação do DNA, através da quebra das pontes de hidrogênio. Essa temperatura varia para cada tipo de DNA, pois cada um exibe uma quantidade diferente de pares AT e pares CG. A ligação CG, por apresentar três pontes de

hidrogênio, é uma ligação mais estável e mais difícil de ser desfeita que a ligação AT. Para desnaturar os pares CG são necessárias temperaturas mais altas, pH mais elevado ou concentrações de agentes desnaturantes mais elevadas. Portanto, T_m é maior quanto maior for a concentração de pares CG. Podemos obter a porcentagem de pares CG (CG%) a partir do valor de T_m, determinado experimentalmente através da equação:

$$T_m(^\circ C) = 69,3 + 0,41(CG\%). \tag{2.1}$$

Em condições fisiológicas a dupla-hélice apresenta-se bastante estável. Para que haja uma desnaturação durante a replicação, por exemplo, é necessária a ação de enzimas (DNA-helicases) que estabilizam as fitas separadas.

Tipos de DNA

Os tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas são: tipo B, tipo A e tipo Z como mostra a fig.2.3. O DNA pode assumir diferentes conformações, dependendo de sua composição de bases e do meio em que se encontra. Os diferentes tipos de DNA são descritos com base em estudos cristalográficos.

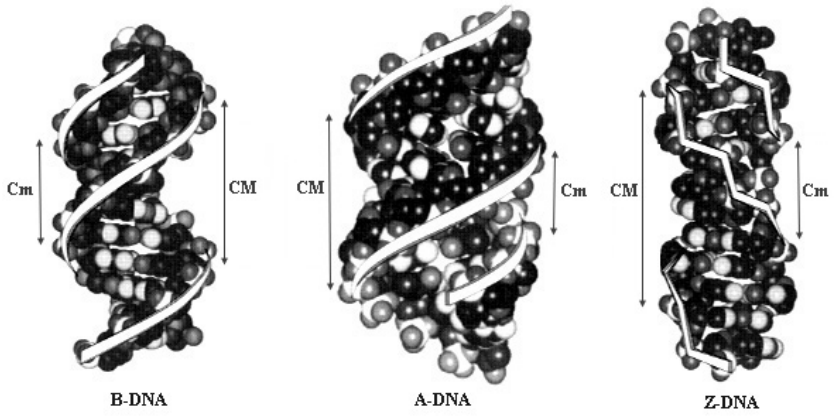

Figura 2.3: Diferentes tipos de DNA encontrados em condições fisiológicas: B, A e Z respectivamente. Observamos tamanhos diferentes de cavidades entre as duas hélices para cada tipo de DNA. Na figura Cm representa a cavidade menor e CM a cavidade maior.

As regras de pareamento também se aplicam a estas formas de DNA e a informação contida na sequência de bases não se altera. Entretanto a conformação pode facilitar ou dificultar a interação do DNA com proteínas. O tipo mais comum encontrado na natureza é o B-DNA, descrito por Watson e Crick e encontrado em abundância nas células. O B-DNA encontra-se em condições de alta umidade (92%) e em soluções de baixa força iônica. Por definiçao, dizemos que a dupla-hélice do B-DNA gira no sentido horário. A distância entre dois pares de base adjacentes é igual a 0,34nm e a cada 10,4 pares de base a hélice completa uma volta. O passo da hélice portanto é igual a 3,4nm enquanto que o seu diâmetro possui apenas 2,37nm de comprimento.

O DNA do tipo A pode ser obtido quando submetemos o B-DNA a certas condições.Quando, por exemplo, cristais de DNA do tipo B são desidratados em 75% de etanol, ou se o conteúdo de sal for diminuido, a molécula, originalmente longa e fina, torna-se mais curta e mais espessa. Sua cavidade maior torna-se mais estreita e mais profunda e a cavidade menor torna-se mais larga e mais rasa. Nestas condições cada passo da hélice apresenta 2,6nm de comprimento e 11 pares de base. O DNA tipo A normalmente não é encontrado em condições fisiológicas, mas há indícios de que seja o tipo de estrutura formada nos híbridos DNA:RNA durante o processo de transcrição. Além disso, essa é a forma que provavemente ocorre na dupla fita do RNA.

No Z-DNA a dupla-hélice gira no sentido horário. Essa forma foi reconhecida inicialmente em oligonucleotídeos e foi denominada forma Z devido à sua aparência de ziguezague. O Z-DNA é mais longo e fino que o tipo B. O passo de sua hélice possui 12 pares de base e 4,56nm de comprimento e o diâmetro possui apenas 1,84nm. A cavidade maior fica tão rasa que quase desaparece, enquanto a menor se torna curta e profunda. Aparentemente algumas regiões do DNA podem estar nesta forma. Algumas condições propiciam a estabilização do Z-DNA como a metilação ou a bromação das bases e a ligação de proteínas específicas ao DNA. Esta estabilização também pode ocorrer quando o DNA é submetido a um estresse torsional. Isto pode ser verficado em regiões em que o DNA fica superenrolado negativamente, como veremos no seguinte ítem. A ocorrência e a significância fisiológica do Z-DNA na natureza ainda não está completamente esclarecida. Algumas regiões do B-DNA pode se converter em Z-DNA em condições naturais. Os fatores que determinam esta ocorrência são a sequência de nucleotídeos e a estrutura global da dupla-hélice.

Uma outra forma de DNA que pode ser encontrada na natureza é o DNA em fita simples. Embora não seja muito comum, esta forma de DNA compõe o genoma de alguns vírus animais e vegetais, bem como os bacteriófagos, i.e. vírus que infectam as bactérias. Alguns exemplos são os bacteriófagos da *E. Coli*, o M13 e o ØX174.

Estrutura conformacional do DNA

A molécula de DNA assume uma conformação tridimensional ou terciária denominada supertorsida, superenrolada ou super-hélice (Fig. 2.4). Este superenrolamento é definido como sendo o enrolamento da dupla-hélice sobre si mesma. Esta conformação foi inicialmente encontrada apenas em pequenas moléculas circulares, como genomas virais, plasmídeos e DNA mitocondrial*.

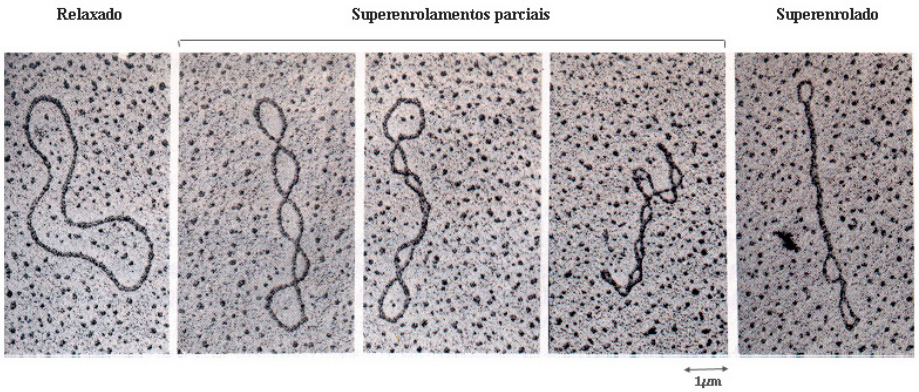

Figura 2.4: Imagem de microscopia eletrônica de diferentes graus de superenrolamento do DNA. Da esquerda para a direita observa-se um grau de superenrolamento crescente. O primeiro encontra-se relaxado, o último totalmente superenrolado e os intermediários apresentam níveis parciais de superenrolamento (A. Kornberg DNA Replication, pg. 29, W.H.Freeman, 1980).

Apesar de ser comum em moléculas de DNA circulares o superenrolamento também ocorre em moléculas de DNA na forma linear. Atualmente sabe-se que esta

*A forma linear do DNA pode ter suas extremidades ligadas covalentemente, formando estruturas circulares. As bactérias têm seu cromossomo na forma circular e podem possuir outras formas extramitocondriais também em forma circular. As mitocôndrias, os cloroplastos e alguns bacteriófagos também possuem DNA na forma circular.

estrutura conformacional exerce um importante papel no empacotamento do DNA dentro das células [25]. A figura 2.6 mostra de forma esquemática os diferentes graus de empacotamento do DNA dentro de uma célula.

Empacotar o material genético dentro da célula não é uma tarefa fácil, pois comprimento do DNA pode ser milhares de vezes o tamanho da célula. O DNA superenrolado reduz o espaço e permite que uma quantidade maior de DNA seja empacotada. O superenrolamento também é observado durante os eventos de divisão celular, em que o DNA deve ser condensado e segregado para as células filhas. As proteínas responsáveis por este processo são conhecidas como condensinas e coesinas. O superenrolamento também se faz necessário durante a síntese do DNA e RNA. Para que seja copiada, a molécula de DNA é desenrolada pela DNA polimerase. O estresse gerado por este desenrolamento nas regiões vizinhas é compensado com superenrolamentos na dupla-hélice. Algumas enzimas como a Topoisomerase II e a DNA girase são responsáveis por aliviar o estresse durante a síntese de DNA. A enzima Topoisomerase II é capaz de cortar a dupla-hélice em um determinado ponto de estresse. As fitas, livres, giram até alcançarem um estado relaxado e a enzima emenda as fitas novamente no mesmo ponto.

Estas estruturas superenroladas do DNA podem ser descritas pela Topologia*. Uma propriedade topológica importante da molécula é o seu **número de ligações** L_k (*Linking Number*), que é um invariante topológico. O L_k é igual ao número de vezes que uma fita de DNA passa em torno da outra, como mostra a figura 2.5a. O número de voltas de uma fita em torno da outra, ou seja, o número de voltas da hélice é definido por **número de voltas** T_w (*Twist*). As voltas que são adicionadas ou removidas (ver fig.2.5c), como fazem algumas enzimas , criam algum tipo de tensão na molécula. Essa tensão gerada pelas voltas pode ser estabilizada de modo a formar um superenrolamento da dupla hélice. As flutuações térmicas exercem um papel crucial na determinação da conformação do superenrolamento [26]. O **número de superenrolamentos** é representado por W_r (Writhe). A relação entre entre estes parâmetros é dada por:

$$L_k = T_w + W_r. \tag{2.2}$$

*Topologia, do grego *topos*, forma, e *logos*, estudo - "estudo das formas"é o ramo da matemática que estuda os espaços topológicos.

O número de ligação L_k é uma propriedade topológica da molécula dupla circular que permanece inalterada independente do que ocorre com a molécula, desde que as cadeias de açúcar-fosfato não sejam rompidas. T_w e W_r são parâmetros geométricos e podem variar livremente, desde que sua soma seja constante.

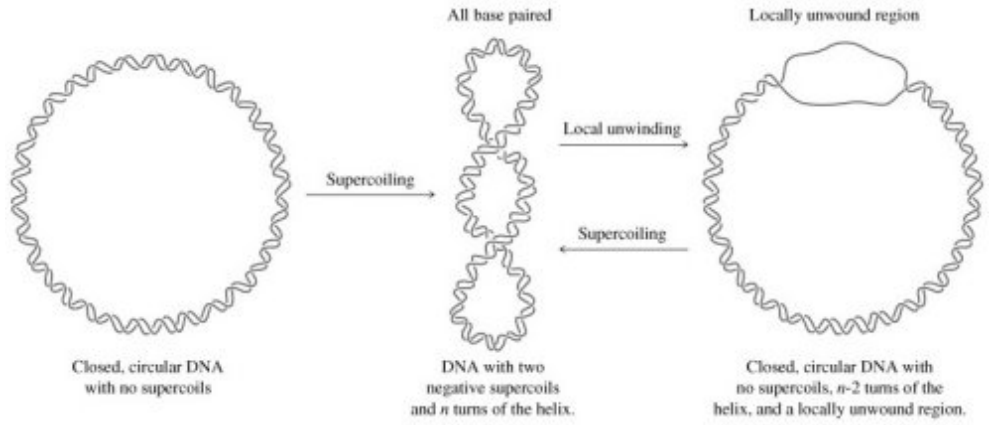

Figura 2.5: a) DNA circular, fechado e sem superenrolamento. b) DNA com dois superenrolamentos negativos, todos as bases pareadas e n voltas em torno da hélice. c) DNA circular, sem superenrolamento, com $n - 2$ voltas na hélice e uma região localmente desenrolada.

Existem algumas técnicas que permitem medir o grau de superenrolamento, sua geração e remoção em moléculas de DNA. As mais conhecidas são: eletroforese em gel de agarose; velocidade de sedimentação e microscopia eletrônica. Recentemente foi desenvolvida uma técnica de medida direta de torque em moléculas únicas [27]. A técnica consiste em uma montagem de pinça óptica convencional com feixe de perfil gaussiano com polarização linear. A diferença é que ao invés de serem usadas microesferas de poliestireno, são utilizados microdiscos dielétricos. Este artifício confere não só um poço potencial translacional, como também um poço rotacional. Desta forma é possível medir o torque em moléculas únicas de DNA, ao invés de medidas sobre médias de moléculas.

2.2 O DNA como um Polímero

Muitas das principais moléculas biológicas são polímeros. Algumas mais rígidas como os filamentos de actina e microtúbulos do citoesqueleto, outras mais flexíveis como a molécula de DNA. Um polímero* é formado da adição de um número muito grande de unidades fundamentais, chamadas monômeros, ligados através de ligações químicas. A adição destas unidades pode continuar indefinidamente, formando enormes cadeias poliméricas. O comprimento de uma extremidade à outra quando a molécula está completamente desenrolada é chamado comprimento de contorno L. Do ponto de vista da flexibilidade dessas macromoléculas, elas podem se caracterizar de duas formas: flexíveis ou rígidas. Geralmente, a maioria das moléculas estão em estágios intermediários de flexibilidade.

Cadeias longas de DNA são bastante flexíveis. Entretanto, sequências menores que 100 pb são relativamente rígidos para serem curvadas. Algumas sequências específicas e proteínas especiais tornam o DNA mais suscetível à curvatura. A ligação DNA-proteína também pode facilitar a curvatura. Um exemplo ocorre no nucleossomo, no qual um segmento de DNA de 145 pb se enrola quase duas vezes em torno de um octâmero de histonas (ver fig. 2.6). A flexibilidade do DNA possui um importante papel em muitas de suas funções como: a condensação e empacotamento do DNA, observados no nucleossomo; aproximações dos sítios de ligações distantes do DNA linear; formação de estruturas especiais proteína-DNA para alinhar determinados sítios, como no caso de recombinação sítio-específica; indução da molécula de DNA para a clivagem e desnaturação.

O DNA possui uma estrutura polimérica onde a unidade monomérica é um par de nucleotídeos (CG ou AT), para o caso de hélices duplas. Como o tipo de monômero tem pouca influência no comportamento macroscópico do polímero, podemos estudar o comportamento da molécula de DNA sob a ótica da dinâmica de polímeros, utilizando o modelo de Worm-Like Chain (WLC). Este modelo, derivado do modelo de Kratky-Porod, descreve o comportamento de polímeros semi-flexíveis e será explicado na próxima seção.

O modelo WLC define o comprimento de persistência A como sendo uma

*Do grego *polys*, muitos e *meros*, partes - "muitas partes".

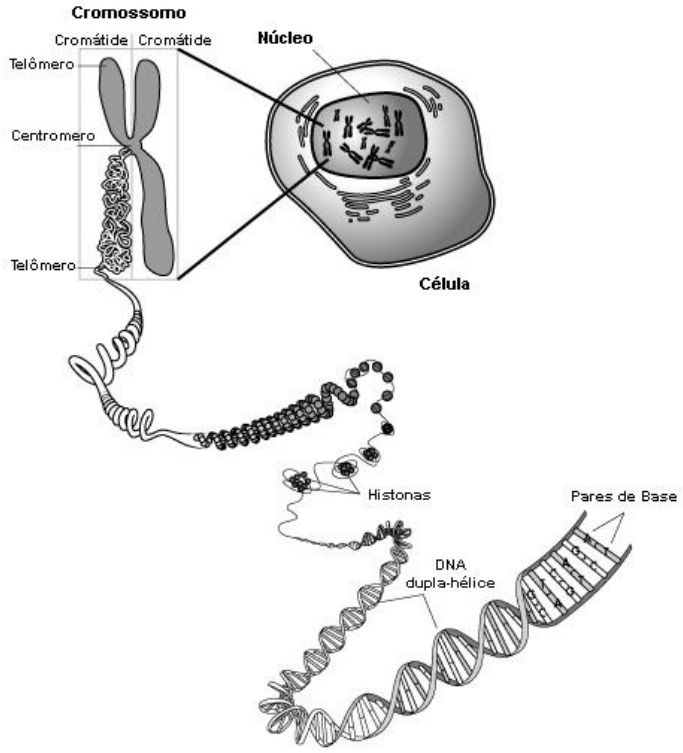

Figura 2.6: Diferentes graus de empacotamento do DNA dentro da célula

medida do alcance de perturbações na cadeia polimérica. Em um polímero cujo A é pequeno, as perturbações na cadeia serão percebidas localmente, apenas por monômeros vizinhos, que têm maior liberdade de deslocamento. Isso caracteriza uma molécula flexível. Por outro lado, moléculas cujo $A \gg L$, qualquer perturbação será transmitida ao longo de toda a cadeia, ao mesmo tempo em que seus monômeros quase não se deslocam de suas posições de equilíbrio, o que caracteriza um polímero rígido. Portanto, dizer se um polímero é flexível ou não depende da escala de interesse. O comprimento de persistência do DNA dupla-hélice por exemplo está em torno de 50nm, em condições fisiológicas. O que significa que, olhando para uma escala de comprimento menor do que 50nm, a molécula se comporta mais ou menos como uma haste rígida. Em escalas de comprimento muito maiores que 50nm, ela se comporta como uma cadeia flexível.

Elasticidade Entrópica e a Maximização da Entropia

Um polímero com comprimento bem definido, chamado comprimento de contorno L da molécula, imerso em uma solução aquosa, terá uma dada configuração de equilíbrio termodinâmico. Suponha que a molécula esteja inicialmente esticada. As colisões entre as moléculas do meio e o polímero, farão com que, aos poucos, ele se enovele sobre si mesmo, até atingir uma configuração de equilíbrio. Esta é uma configuração de enovelamento aleatório e de alta entropia*. Nesta configuração a distância média entre uma extremidade do polímero e outra $\mathbf{r}_{ee}$ (*end-to-end distance*) permanece constante no tempo. Esta distância depende, entre outras coisas, da flexibilidade do polímero e da temperatura do meio. Para temperaturas muito baixas $T \to 0$ o raio de curvatura R do polímero tende a infinito e a curvatura C tende a zero. Nesta configuração, a entropia é drasticamente reduzida, pois ela terá um número menor de configurações possíveis. A entropia relaciona-se com o número de configurações possíveis através da equação de Boltzmann:

$$S = k_B \ln \Omega \tag{2.3}$$

onde Ω é o número de configurações acessíveis ao sistema e k_B é a constante de Boltzmann. A maximização da entropia ocorre quando as extremidades da molécula estão mais próximas, ou seja, quando há maximização das configurações possíveis (ver fig.2.7).

Dá-se o nome de elasticidade entrópica a essa tendência da molécula de aumentar a entropia do sistema. A elasticidade entrópica depende não só das propriedades do meio como também da elasticidade da própria molécula. Para que a molécula retorne à sua posição inicial esticada, e assim permaneça , é necessário aplicar uma força $\overrightarrow{F}$, denominada força entrópica, em suas extremidades para compensar o efeito das colisões ininterruptas das partículas do meio com a molécula. As forças entrópicas geralmente são fracas, tipicamente < 10 pN. Acima desta força e até aproximadamente 70 pN, o DNA encontra-se no regime entálpico. Estas forças causam uma deformação na estrutura da molécula e são chamadas forças entálpicas. Em nossos experimentos trabalhamos apenas no regime de forças entrópicas.

*Originalmente, o termo entropia (troca interior) surgiu como uma palavra cunhada do grego de *en*, dentro e *trepo*, troca ou evolução. O termo foi primeiramente usado em 1850 pelo físico alemão Rudolf Julius Emmanuel Clausius (1822-1888).

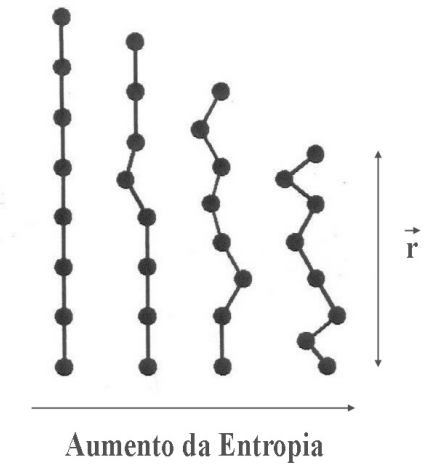

Figura 2.7: As colisões entre as moléculas do meio e o polímero farão com que, aos poucos, ele enovele-se sobre si mesmo, até atingir uma configuração de equilíbrio. Esta é uma configuração de enovelamento aleatório e de alta entropia.

2.3 Modelos de Elasticidade de Polímeros

O Modelo Kratky-Porod

Nesta seção iremos descrever o modelo de Kratky-Porod, que nos fornece a energia de um polímero para uma dada conformação de equilíbrio. Uma cadeia polimérica sem estresse torsional pode ser descrita pelo modelo de Kratky-Porod. Considere uma curva aleatória $\vec{r}(s)$ (ver fig. 2.8) com comprimento total fixo L. A curva pode ser dividida em N segmentos de comprimento s, tal que $0 < s < L$. Os vetores $\vec{r}(s)$ e $\vec{r}(s + \Delta s)$ definem um segmento de arco s. O vetor unitário tangente à curva $\hat{t}(s)$ pode ser definido pela relação:

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s}. \tag{2.4}$$

A curvatura da haste será definida por:

$$C = \frac{1}{R}\hat{n} = \frac{1}{R}\frac{\partial \hat{t}}{\partial \theta} = \frac{\partial \theta}{\partial s}\frac{\partial \hat{t}}{\partial \theta} = \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \tag{2.5}$$

onde $ds = Rd\theta$ Podemos considerar cada segmento como uma haste fina, flexível e comprimento L e momento de inércia I (ver fig. 2.9). Uma deformação causada

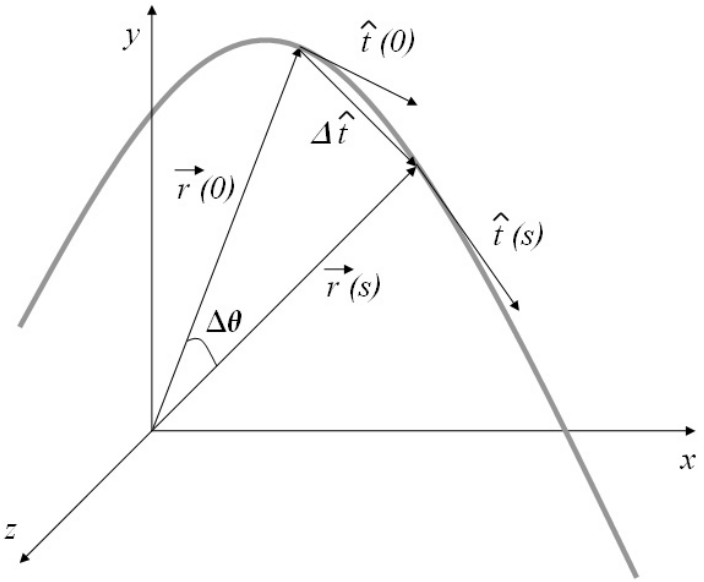

Figura 2.8: Curva aleatória s cuja posição no espaço é dada pelos vetores $\vec{r}(s)$.

nesta haste em forma de um semi-círculo terá uma energia de flexão dada por:

$$E_f = \frac{\kappa_f L}{2R^2} \tag{2.6}$$

onde $\kappa_f = YI$ é o módulo de rigidez flexional da haste e Y o módulo de Young.

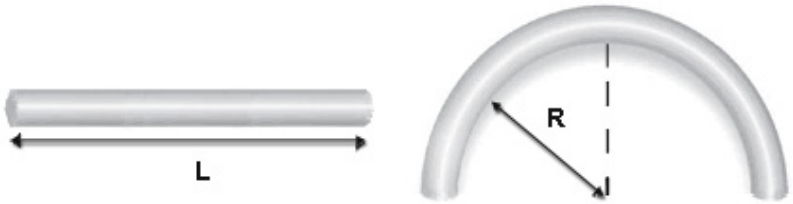

Figura 2.9: A haste de comprimento L e momento de inércia I encontra-se inicialmente esticada. A haste sofre uma deformação em forma de um semi-círculo de raio R, a haste terá uma energia de curvatura dada por $E_f = \kappa_f L/2R^2$.

Substituindo a relação para a curvatura (eq. 2.5) na equação 2.6 podemos obter a energia de curvatura em função de uma determinada configuração do segmento.

$$E_f = \frac{1}{2}\kappa_f \left|\frac{\partial \hat{t}}{\partial s}\right|^2 L. \tag{2.7}$$

Somando-se sobre todos os elementos da cadeia, temos a expressão para a energia total da cadeia:

$$E_{KP} = \frac{1}{2}\kappa_f \int_0^{L_c} \left|\frac{\partial \hat{t}}{\partial s}\right|^2 ds \tag{2.8}$$

podendo ser escrita da seguinte forma:

$$E_{KP} = \frac{\kappa_B T}{2} \int_0^{L_c} A \left|\frac{\partial \hat{t}}{\partial s}\right|^2 ds. \tag{2.9}$$

Esta relação é conhecida como modelo de Kratky-Porod e nos fornece a energia de curvatura de uma cadeia com configuração aleatória. O termo $A = \beta\kappa_f$ é chamado comprimento de persistência, sendo $\beta = 1/\kappa_B T$. Fisicamente, A é a distância característica ao longo do polímero sobre o qual a autocorrelação espacial dos vetores tangentes $< \hat{t}(s) \cdot \hat{t}(s') >$ cai a zero. Para o DNA *in vivo* (onde existem aproximadamente $150mM$ de Na^+ mais outros íons) o comprimento de persistência é $A \approx 50nm$ ou $150bp$, apesar de que para concentrações iônicas baixas este parâmetro pode atingir um valor de $350nm$. Geralmente quando se trata de cadeias poliméricas com estas características assume-se sempre que $L \gg A$.

Um DNA linear longo é um polímero semi-flexível e realiza um movimento aleatório. Podemos calcular as flutuações na distância que separa as extremidades deste polímero $< \overrightarrow{r}^2_{ee} >$. Considere uma sucessão de N segmentos de comprimento b e vetor de orientação $\hat{t}_i$ (ver fig. 2.10). A energia E_{KP} de uma determinada configuração pode ser dada levando-se em consideração os ângulos suscessivos entre os segmentos do polímero:

$$E_{arc} = \frac{\kappa_f}{2R^2} s = \frac{\kappa_f \theta^2}{2s}, \tag{2.10}$$

onde θ é o ângulo entre os vetores de orientações sucessivas e $s = R\theta$ o arco de círculo para θ pequeno. O valor do desvio quadrático médio $\langle \theta^2 \rangle$ ao longo da cadeia é uma forma de estimar a magnitude das flutuações de curvatura e é dado pela distribuição de Boltzmann:

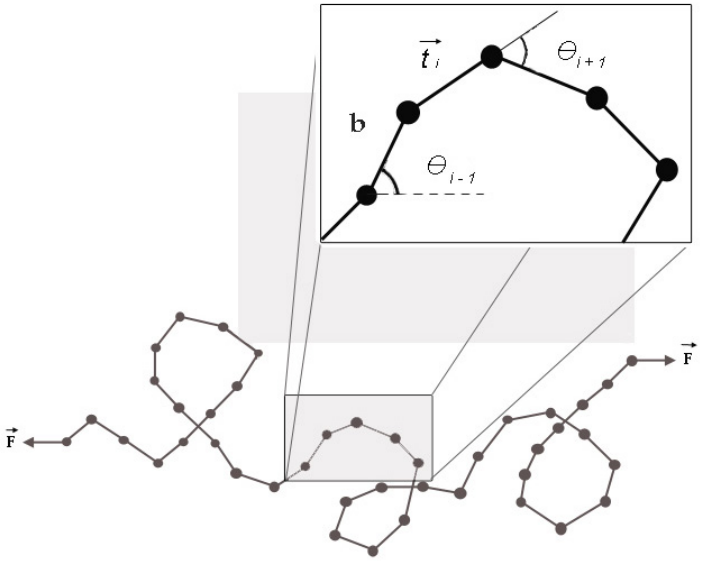

Figura 2.10: Cadeia polimérica contínua pode ser simulada por uma cadeia com segmentos de tamanho b, rotação livre e vetor orientacional $\mathbf{t}_i$.

$$\langle\theta^2\rangle = \frac{\int \theta^2 P(E_{arc}) d\Omega}{\int P(E_{arc}) d\Omega}, \tag{2.11}$$

onde $P(E_{arc}) = \exp(-\beta E_{arc})$ e $d\Omega = \sin\theta d\theta d\phi$. Então, $\langle\theta^2\rangle$ se torna:

$$\langle\theta^2\rangle = \frac{\int \theta^2 \exp(-\beta E_{arc}) \sin\theta d\theta}{\int \exp(-\beta E_{arc}) \sin\theta d\theta}. \tag{2.12}$$

Para pequenas flutuações, temos que $\sin\theta \sim \theta$ e $E \sim \frac{\kappa_f \theta^2}{2s}$. Fazendo a seguinte mudança de variáveis:

$$x^2 = \beta E_{arc} = \frac{\beta \kappa_f \theta^2}{2s}, \tag{2.13}$$

temos que

$$\theta^2 = \frac{2sx^2}{\beta\kappa_f} \quad \text{e} \tag{2.14}$$

$$d\theta = \sqrt{\frac{2s}{\beta\kappa_f}} dx. \tag{2.15}$$

Substituindo em $\langle\theta^2\rangle$, temos que:

$$\langle\theta^2\rangle = \frac{2s}{\beta\kappa_f}\frac{\int x^3\exp(-x^2)dx}{\int\exp(-x^2)dx}, \tag{2.16}$$

estas integrais gaussianas podem ser efetuadas de zero a infinito com erros pequenos, pois as flutuações são muito pequenas. Temos portanto que:

$$\langle\theta^2\rangle = \frac{2s}{\beta\kappa_f} \tag{2.17}$$

ou podemos escrever em termos do comprimento de persistência:

$$\langle\theta^2\rangle = \frac{2s}{A}. \tag{2.18}$$

Podemos calcular a distância quadrática média entre as duas extremidades da molécula polimérica para a conformação de equilíbrio nos limites flexível e rígido. Para isso, considere a função de autocorrelação espacial para os vetores tangentes $\hat{t}(s)$ [28,30]:

$$<\hat{t}(0)\cdot\hat{t}(s)>=<\cos\theta>, \tag{2.19}$$

o valor de θ é pequeno para baixas temperaturas, de maneira que podemos fazer $\cos\theta \simeq 1-\theta^2/2$, ou seja:

$$<\hat{t}(0)\cdot\hat{t}(s)>\simeq 1-\frac{<\theta^2>}{2} = 1-\frac{s}{A} = 1-\frac{s}{A} \tag{2.20}$$

observamos que este é o primeiro termo da expansão de uma função exponencial. Considerando-se todos os termos, temos:

$$<\hat{t}(0)\cdot\hat{t}(s)>=\exp\left(-\frac{s}{A}\right) \tag{2.21}$$

portanto, a função de autocorrelação espacial exibe um decaimento exponencial.

A distância quadrática média pode ser obtida atrvés da eq. 2.21, avaliada nas extremidades da molécula:

$$\hat{t} = \frac{\partial\vec{r}}{\partial s} \tag{2.22}$$

$$\int_0^L d\vec{r} = \int_0^L \hat{t}(s)ds, \tag{2.23}$$

o que nos leva à relação

$$\vec{r}(L) = \vec{r}(0) + \int_0^L \hat{t}(s)ds \tag{2.24}$$

o valor de $< \overrightarrow{r}_{ee}^{\,2} >$ se torna

$$< \overrightarrow{r}_{ee}^{\,2} >=< [\vec{r}_{ee}(L) - \vec{r}_{ee}(0)]^2 >= \int_0^L ds \int_0^L ds' < \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) >, \tag{2.25}$$

mas utilizando a relação 2.21 podemos reescrever 2.25 da forma:

$$< \overrightarrow{r}_{ee}^{\,2} >= 2\int_0^L ds \int_0^s ds' exp\left(-\frac{(s-s')}{A}\right) = 2AL - 2A^2\left[1 - exp(-\frac{L}{A})\right] \tag{2.26}$$

no limite flexível ($L \gg A$), $\exp(-L/A) \to 0$ e

$$< \overrightarrow{r}_{ee}^{\,2} > \simeq 2AL \tag{2.27}$$

e no limite rígido ($L \ll A$), $\exp(-L/A) \to 1$

$$< \overrightarrow{r}_{ee}^{\,2} > \simeq 2AL - 2A^2\left[1 - (1 - \frac{L}{A} + \frac{L^2}{2A^2})\right] \tag{2.28}$$

$$< \overrightarrow{r}_{ee}^{\,2} > \simeq L^2 \tag{2.29}$$

Esta é, portanto, a relação para se estimar a distância quadrática média entre as extremidades do polímero em dois limites distintos. Observa-se que no limite flexível o valor quadrático médio depende do comprimento de persistência A. Por outro lado, para o limite rígido, $< \overrightarrow{r}_{ee}^{\,2} >$ depende predominantemente do comprimento de contorno L, o que era de se esperar, já que neste limite o polímero assemelha-se a uma haste rígida. É interessante notar que, durante vários anos, a única forma de se estimar o comprimento de persistência do DNA era através da medida de $\vec{r}_{ee}$ por métodos como sedimentação, espalhamento de luz, etc.

O Modelo Worm-Like Chain

Uma descrição mais precisa é dada pelo modelo conhecido como Worm-Like Chain (WLC) [14]. Este modelo nos fornece a relação entre a força aplicada ao polímero com o estiramento resultante. Os modelos anteriores ao WLC não levam em consideração a energia devido à elasticidade de uma haste fina, responsável por descrever a curvatura do DNA. Na maior parte do *range* experimental (distância entre as extremidades de 30 a 95% do comprimento de contorno), a diferença entre o comprimento de contorno e a distância entre as extremidades vai a zero com $1/f^{\frac{1}{2}}$, onde f é a força aplicada. O modelo Freely-Jointed Chain (FJC), por exemplo, só é capaz de descrever o DNA para regimes de forças muito fracas. Nesta seção iremos discutir a mecânica estatística básica para um polímero modelado pelo WLC sob tensão.
Assim como todos os polímeros flexíveis, uma separação entre as extremidades do DNA de uma quantidade $z \ll L$ custa uma energia livre $F = 3\kappa_B T z^2/(2R_0^2)$ e portanto requer uma força $f = \partial F/\partial z = 3\kappa_B T z/(2AL)$. Abaixo da força característica de $\kappa_B T/A$ a extensão z é pequena comparada a L e esta lei de força linear é válida. Como $1\kappa_B T/nm = 4,1pN$, para $A = 50nm$, $\kappa_B T/A = 0,08pN$, ou seja, a força necessária para destender o DNA é muito pequena comparada com piconewtons necessários para destender completamente polímeros convencionais. Primeiramente, considere pequenos estiramentos, a relação entre a força aplicada e o deslocamento causado obedece a equação:

$$\vec{F} = -\kappa \vec{z}. \tag{2.30}$$

No caso de polímeros flexíveis em que $L \gg A$ e $< \overrightarrow{r}_{ee}^{\,2} > \simeq 2AL$, teremos:

$$z \cong \sqrt{< \overrightarrow{r}_{ee}^{\,2} >} = \sqrt{2AL}. \tag{2.31}$$

E, devido ao princípio da equipartição de energia para a energia elástica do polímero, podemos dizer que:

$$\frac{1}{2}\kappa z^2 = \frac{3}{2}\kappa_B T, \tag{2.32}$$

substituindo z por $\sqrt{2AL}$, isolando a constante κ e substituindo-a na eq. 2.30 para a força, teremos:

$$\vec{F} = -\frac{3\kappa_B T}{2AL}\vec{z}. \tag{2.33}$$

Portanto, a equação acima é válida para o limite de estiramentos pequenos.

Para forças além de $\kappa_B T/A$, a elasticidade não-linear entrópica determina o comportamento da curva força versus extensão. A energia efetiva de um WLC destendido é dada por:

$$E = \frac{1}{2}\kappa_f \int_0^L \left|\frac{\partial \hat{t}}{\partial s}\right|^2 ds - Fz \tag{2.34}$$

Onde a força F aparece como um multiplicador de Lagrange, representando o vínculo existente entre as extremidades do polímero.

$$\kappa_f = \frac{A}{\beta} = \kappa_B T A \tag{2.35}$$

Quando forças maiores são aplicadas sobre o polímero, sua extensão se aproxima do comprimento total L e o vetor tangente apresenta uma oscilação desprezível em torno do eixo z. A força exercida sobre o polímero, portanto, tem direção predominantemente na direção do eixo z, para o polímero estirado. Portanto, a componente $\vec{F}_z$ da força será mais expressiva. O vetor tangente $\hat{t}$ pode ser escrito em termos de suas componentes:

$$\hat{t} = t_x\hat{i} + t_y\hat{j} + t_z\hat{k} \tag{2.36}$$

O módulo será dado por:

$$|\hat{t}|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2 + |t_z|^2 = 1 \tag{2.37}$$

podendo ser separado em duas componentes, transversal ($t_\perp = \sqrt{|t_x|^2 + |t_y|^2}$) e a componente z. Considerando apenas a aproximação de primeira ordem, podemos dizer que o módulo da componente z será dado por:

$$|t_z| \simeq 1 - \frac{1}{2}|t_\perp|^2 \tag{2.38}$$

portanto, a distância z entre as duas extremidades do polímero será:

$$z = \int_0^L |t_z| ds \tag{2.39}$$

substituindo esta relação na eq.2.34 para a energia e considerando que o vetor tangente é aproximadamente constante ao longo do polímero, temos que:

$$\begin{aligned} E &= \frac{k_B T}{2} A \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - F \int_0^L \left(1 - \frac{|t_\perp|^2}{2} \right) ds \\ &= \frac{k_B T}{2} \int_0^L \left[A \left| \frac{\partial t_\perp}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_B T} |t_\perp|^2 \right] ds - FL \end{aligned} \tag{2.40}$$

Usando a transformada de Fourrier ($\widetilde{t_\perp}(q) = \int ds \exp(iqs) t_\perp(s)$) podemos passar para o espaço de vetores e decompor a energia em seus modos normais. Tomando a transformada inversa temos:

$$t_\perp(s) = \frac{1}{2\pi} \int dq \exp(-iqs) \widetilde{t_\perp}(q), \tag{2.41}$$

$$\frac{\partial t_\perp(s)}{\partial s} = \frac{1}{2\pi} \int dq (-iq) \exp(-iqs) \widetilde{t_\perp}(q). \tag{2.42}$$

A equação para a energia será:

$$\begin{aligned} E &= \frac{k_B T}{2} \int_0^L ds \{ A \frac{1}{4\pi^2} \left| \int dq (-iq) \exp(-iqs) \tilde{t_\perp}(q) \right|^2 \\ &+ \frac{F}{\kappa_B T} \frac{1}{4\pi^2} \left| \int dq \exp(-iqs) \tilde{t_\perp}(q) \right|^2 \} - FL \end{aligned} \tag{2.43}$$

$$\begin{aligned} E = \frac{A\kappa_B T}{2} \int_0^L ds \left\{ \frac{1}{2\pi} \int dq q \exp(-iqs) \tilde{t_\perp}(q) \right\} \left\{ \frac{1}{2\pi} \int dq' q' \exp(iq's) t_\perp \tilde{*}(q') \right\} + \\ \frac{F}{2} \int_0^L ds \left\{ \frac{1}{2\pi} \int dq \exp(-iqs) \tilde{t_\perp}(q) \right\} \left\{ \frac{1}{2\pi} \int dq' \exp(iq's) t_\perp \tilde{*}(q') \right\} - FL \end{aligned}$$

Utilizando a definição de delta de Dirac:

$$\frac{1}{2\pi} \int ds \exp[i(q' - q)s] = \delta(q - q') \tag{2.44}$$

A expressão para a energia se torna:

$$E = \frac{k_B T}{2} \int \frac{dq}{2\pi} \left[Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right] |\widetilde{t_\perp}(q)|^2 - FL \tag{2.45}$$

Escrevendo a energia para cada modo normal, temos:

$$E_i = \frac{k_B T}{2}\left(Aq^2 + \frac{F}{k_B T}\right)|\widetilde{t_i}(q)|^2 \tag{2.46}$$

A função de partição Z do sistema pode ser escrito como:

$$\begin{aligned} Z &= \int \exp\left(-\frac{E_i}{k_B T}\right) d|\widetilde{t_i}(q)| \\ &= \int \exp\left[-\frac{1}{2}\left(Aq^2 + \frac{F}{k_B T}\right)|\widetilde{t_i}(q)|^2\right] d|\widetilde{t_i}(q)| \\ &= \sqrt{\frac{2\pi k_B T}{Aq^2 k_B T + F}} \end{aligned} \tag{2.47}$$

onde $|\widetilde{t_i}(q)|$ é a variável de integração, cujo valor quadrático médio é dado por:

$$\begin{aligned} < |\widetilde{t_i}(q)|^2 > &= \frac{1}{Z}\int |\widetilde{t_i}(q)|^2 \exp\left[-\frac{1}{2}\left(Aq^2 + \frac{F}{k_B T}\right)|\widetilde{t_i}(q)|^2\right] d|\widetilde{t_i}(q)| \\ &= \frac{k_B T}{Aq^2 k_B T + F} \end{aligned} \tag{2.48}$$

Para encontrarmos a energia do sistema como um todo, devemos integrar $|\widetilde{t_i}(q)|^2$ sobre todos os modos normais e multiplicar por um fator 2 correspondente às coordenadas x e y:

$$< |t_\perp|^2 >= 2\int \frac{dq}{2\pi} < |\widetilde{t_i}(q)|^2 >= \sqrt{\frac{k_B T}{FA}} \tag{2.49}$$

No limite de grandes estiramentos, teremos que:

$$z/L \cong |t_z| \cong 1 - |t_\perp|^2/2 = 1 - \frac{1}{2}\sqrt{\frac{\kappa_B T}{A}} \tag{2.50}$$

Podemos isolar F na equação acima para obtermos uma relação da força em função do estiramento do polímero:

$$F = \frac{\kappa_B T}{A}\frac{1}{4}\left[\frac{1}{(1 - z/L)^2}\right] \tag{2.51}$$

Esta equação descreve a força para o regime de grandes estiramentos. Para que a expressão também fosse válida para pequenos estiramentos, Marko e Siggia apresentaram uma correção para a equação. O termo $z/L - 1/4$ não altera o resultado previsto para a força para grandes estiramentos e prediz valores corretos para pequenas forças. Portanto, a expressão generalizada para o modelo WLC é dada por:

$$F = \frac{k_B T}{A}\left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4\left(1-\frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4}\right]. \tag{2.52}$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura, z a disância média entre as extremidades da molécula para um dado valor de F, L o comprimento de contorno da molécula e A o comprimento de persistência da molécula. A flexibilidade do DNA é caracterizada pelo seu comprimento de persistência A. Para uma molécula típica de DNA, o valor de A encontra-se entre 40 e 500 nm. Este valor pode ser obtido do ajuste entre a curva $F \times z$ medida experimentalmente, com a curva teórica. Estas forças encontram-se no limite entrópico $F \leq 10pN$ e para forças superiores a $10pN$ o DNA não pode mais ser descrito pelo modelo WLC [12]. O método experimental utilizado para obter a curva experimental será descrito no Capítulo 4.

2.4 Complexos DNA-Intercalantes

As interações DNA-intercalantes têm sido amplamente estudadas ao longo dos últimos anos. Uma das motivações de caracterizar e descrever estas interações é que vários destes compostos são utilizados no tratamento de vários tipos de cancer e outras doenças. Além da daunomicina, podemos citar também o psoralen, que também se intercala ao DNA. O psoralen é um fármaco utilizado para tratar algumas doenças de pele como a psoríase ou vitiligo, através da técnica conhecida como PUVA (psoralen seguido de iluminação com luz UVA). Recentemente foi feito um estudo da interação DNA-psoralen quando iluminado com luz UVA. O comprimento de persistência dos complexos DNA-psoralen formados foram medidos e podem ser encontrados em [34]. Todos estes intercalantes apresentam várias semelhanças nos processos de intercalação. Uma das características destas ligações é que os intercalantes induzem mudanças na elasticidade da molécula DNA. Nesta

seção apresentaremos algumas propriedade dos complexos DNA-brometo de etídio e DNA-daunomicina.

Complexo DNA-Brometo de Etídio

O brometo de etídio (EtBr) é um composto químico muito utilizado como marcador de DNA [35]. Ele intercala entre os pares de base dos ácidos nucleicos (ver fig. 2.11) e o complexo formado se torna fluorescente quando iluminado com luz UV. Essa característica tornou-se uma conveniente técnica de detecção de fragmentos de DNA em gel de agarose. A ligação do EtBr com a molécula de DNA altera sua massa, rigidez e, portanto, sua motilidade. A intercalação do brometo de etídio depende fortemente da concentração iônica da solução aquosa i.e. sua constante de ligação intrínseca K_i depende da concentração de Na^+ em solução [36].

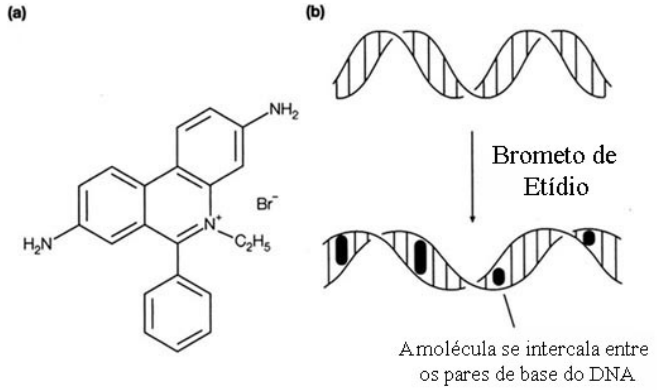

Figura 2.11: a) Brometo de Etídio b) Aumento do comprimento e o desenrolamento da dupla-hélice do DNA causados pelo processo de intercalação do EtBr.

A ligação do brometo de etídio ao DNA é caracterizado estruturalmente por um aumento na distância entre os pares de base de $0,34nm$ por molécula intercalada [37]. Além disso, cada molécula intercalada causa um desenrolamento da dupla-hélice. Portanto, o comprimento de contorno L sofre em geral um aumento e são observadas mudanças também no comprimento de persistência A do DNA.

Complexo DNA-Daunomicina

A daunomicina, Fig.2.12 é um fármaco antraciclinico * amplamente utilizado no tratamento de vários tipos de cancer em humanos. Na célula, a daunomicina se aloja no interior do núcleo. Ela se intercala à molécula de DNA, preferencialmente onde há dois sítios C-G seguidos, inibindo tanto a replicação do DNA quanto a transcrição do RNA. Cada daunomicina intercalada aumenta o comprimento de contorno do complexo de $0,31nm$ [39].

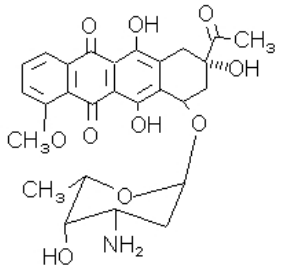

Figura 2.12: Molécula de Daunomicina.

A intercalação da daunomicina apresenta uma forte dependência com a concentração iônica da solução, i.e. um aumento da concentração de Na^+ em solução causa uma grande diminuição da constante de ligação intrínseca K_i [31]. As moléculas de daunomicina se auto-associam em solução aquosa para concentrações maiores que $10\mu M$ [41,42]. Da maneira semelhante ao EtBr, cada molécula de daunomicina intercalada desenrola a dupla-hélice do DNA de graus.

A toxicidade da daunomicina está associada às altas taxas de proliferação celular, como ocorre nos tecidos cancerígenos. Isto se deve ao fato de que os tecidos com estas características apresentam uma maior quantidade de Topoisomerase I e II, enzimas responsáveis pela clivagem do DNA. A daunomicina e outros fármacos alkalis apresentam uma afinidade bioquímica com estas enzimas, estabilizando o complexo

*Fármacos antraciclinicos são uma classe de agentes quimioterapêuticos, geralmente com quatro anéis aromáticos. Estes compostos apresentam um mecanismo de intercalação semelhante ao da daunomicina e são usados para tratar diferentes tipos de câncer, incluindo leucemias, linfomas, câncer de mama, de útero, de ovário e câncer de pulmão.

DNA-Topoisomerase e impedindo a continuidade dos processos de divisão celular. Os tecidos normais que apresentam altas taxas de proliferação celular (e.g. tecido epitelial do trato gastrointestinal e células da medula-óssea) apresentam uma maior susceptibilidade a estes agentes. Os principais efeitos colaterais causados ao organismo de pacientes tratados com daunomicina são anemia e deficiência imunológica, devido à redução das células vermelhas e brancas. A daunomicina é um agente cancerígeno e causa principalmente câncer de mama e cancer nos rins. O contato com o fármaco deve ser evitado, pois não há níveis seguros de exposição.

2.5 Modelo de Exclusão de Pares

Cada um dos ligantes que intercalam ao DNA exibem uma seletividade sequencial e estrutural diferente. Numerosos estudos acerca destas interações têm sido feitos e o entendimento desta dinâmica de intercalação ainda permanece em aberto para muitos compostos intercalantes [13,31,32]. A análise teórica das interações DNA-proteína e DNA-intercalante foi primeiramente proposta por Scatchard em 1949. Este tratamento clássico, porém, é incompleto e não descreve adequadamente o comportamento destas interações no limite de saturação. Apresentaremos nesta seção o Modelo de Exclusão de Pares, calculado primeiramente pelo algorítmo de Crothers (1968) e apresentado de forma analítica por McGhee e von Hippel [33] em 1974.

A idéia fundamental desse modelo consiste em determinar qual o comportamento seguido por um determinado composto químico ao intercalar em uma rede, no caso a dupla-hélice. O objetivo é encontrar o modelo mais simples possível que descreva interações rede-ligante. Este modelo deve levar em consideração tanto o tamanho efetivo do sítio quanto a cooperatividade entre os intercalantes. O modelo clássico de Scatchard foi inicialmente proposto para ligantes não interagentes e pequenos o suficiente para ocupar apenas um sítio da rede. Quando um ligante cobre dois ou mais sítios da rede, como acontece usualmente em problemas de interesse biológico, algumas complicações surgem na análise. Neste caso, não podemos mais tratar o sistema com a relação de Scatchard simples. No Modelo de Exclusão de Pares consideramos tanto a sobreposição de um intercalante sobre mais de um sítio

da rede (tamanho efetivo do sítio) como também a interação da molécula intercalada com os seus primeiros vizinhos.

Para soluções com baixas concentrações de intercalante os sítios vazios encontram-se muito distantes uns dos outros. Portanto, o preenchimento de sítios da molécula irá acontecer de forma linear. Ou seja, a concentração de fármaco ligado C_b (intercalado entre os pares de base) será proporcional à concentração total de fármaco C_t na solução. A medida que a concentração total do fármaco em solução aumenta este comportamento sai do regime linear e passa a obedecer critérios mais elaborados de intercalação. Nesta faixa de concentração teremos a influência de alguns fatores como a cooperatividade exibida pelo ligante, ou seja se há atração ou repulsão entre as moléculas do composto; o tamanho do sítio ligante, i.e. quantas bases ou pares de bases são complexadas por molécula ligante e ainda outros fatores não lineares. Portanto, para qualquer grau de saturação o número de sítios livres depende não apenas do número de sítios ocupados, como também da distribuição destes sítios ocupados na rede. Para tais sistemas fora da região linear ocorre uma divergência substancial das previsões clássicas.

Consideremos uma rede como sendo um arranjo linear de N sítios idênticos repetidos. Cada unidade básica da rede, no caso, corresponde a um par de base do DNA. Por conveniência, pegamos um caso específico em que a cadeia é polar e orientada em uma determinada direção. O ligante também é cosiderado polar e possui uma orientação fixa com relação à cadeia. Assumimos que uma molécula intercalada cobre (i.e. torna inacessível para outros ligantes) n sítios consecutivos da cadeia. Portanto, admitiremos que um sítio livre consiste em quaisquer n sítios livres consecutivos na rede. O parâmetro n portanto nos fornece o tamanho efetivo de uma unidade da rede e é denominado *parâmetro de exclusão*. Consideramos também que a cadeia é longa o suficiente $N \gg n$ para que os efeitos de borda possam ser negligenciados.

As interações ligante-ligante somente são permitidas entre vizinhos próximos, ou seja, não pode haver nenhum sítio vazio separando as moléculas intercaladas. Esta restrição resulta em três tipos distintos de sítios ligantes como vemos na figura 2.13.

(i) Um sítio isolado, ao qual o intercalante se liga com uma constante de associação intrínseca $K(M^{-1})$;

(ii) Um sítio com apenas um primeiro vizinho de um dos lados, no qual o intercalante se liga com uma constante de associação $K\omega(M^{-1})$;

(iii) Um sítio com dois primeiros vizinhos, cada qual de um lado, ao qual o intercalante se liga com uma constante de associação $K\omega^2(M^{-1})$

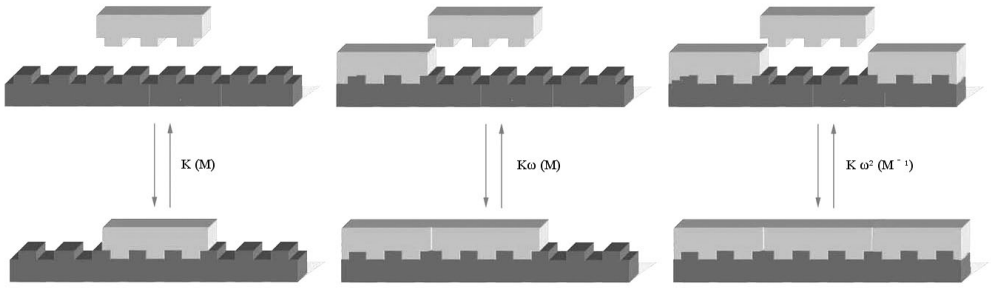

Figura 2.13: Definição dos três tipos distinguíveis de sítios ligantes: **i)**sítio isolado, ao qual o intercalante se liga com uma constante de associação intrínseca $K(M^{-1})$ **ii)** sítio com apenas um primeiro vizinho de um dos lados, no qual o intercalante se liga com uma constante de associação $K\omega(M^{-1})$ **iii)** sítio com dois primeiros vizinhos, cada qual de um lado, ao qual o intercalante se liga com uma constante de associação $K\omega^2(M^{-1})$.

A constante de associação intrínseca K varia com a concentração iônica da solução, que pode ser controlada experimentalmente. O parâmetro cooperativo ω é uma constante adimensional de equilíbrio. Este parâmetro representa o processo de mover um ligante intercalado de um sítio isolado para um sítio com apenas um primeiro vizinho, ou de um sítio com um primeiro vizinho para um sítio com dois primeiros vizinhos. Físicamente, podemos dizer que para $\omega > 1$, existe uma atração entre os ligantes e a ligação é positivamente cooperativa; para $\omega < 1$, existe uma repulsão e a ligação é negativamente cooperativa; e finalmente, para $\omega = 1$ a ligação é não cooperativa.

Nosso objetivo é obter uma equação relacionando os parâmetros que descrevem o processo de intercalação (i.e. K, n e ω) com os parâmetros experimentais tais como concentração de intercalantes livres e concentração de intercalantes ligados. A concentração de ligantes livres é representada por C_f (a unidade é mol de ligante

por litro) e r representa a fração dos sítios ligados na rede (em unidade de mol de intercalante ligado na rede por mol de sítios totais da rede):

$$r = \frac{C_b}{C_{bp}}, \tag{2.53}$$

em que C_b representa a concentração de ligantes ligados na rede e C_{bp} a concentração total de pares de base (ou sítios totais da rede). Para todos os casos sempre teremos $r \leq 1$. Além disso, na saturação da rede, r terá um valor crítico r_c dado por:

$$r_c = \frac{1}{n}. \tag{2.54}$$

Para introduzir vários aspectos do problema, primeiro mostraremos porquê a análise clássica de Scatchard falha, mesmo para ligações não cooperativas, para ligantes com $n > 1$. A equação clássica foi originalmente concebida para ligantes pequenos com múltiplos sítios ligantes - porém discretos e isolados - em proteínas. Um consequência direta desta relação para redes unidimensionais é que, na saturação completa da rede, teríamos N/n intercalantes ligados (negligenciando os efeitos de borda). Entretanto, considerar que N/n é o número total de intercalantes ligados na saturação (ou número total de sítios disponíveis em uma rede vazia) é uma inferência errônea para qualquer concentração considerada. Esta abordagem não leva em consideração que em uma rede homogênea, sem nenhuma molécula ligada, a intercalação pode se iniciar em qualquer um dos sítios disponíveis da rede. O que significa que os ligantes não são obrigados a se ligarem apenas em intervalos regularmente espaçados de uma distância n. Portanto, o número real de sítios livres em uma rede vazia é $(N - n + 1)$, o que pode ser obviamente muito maior que N/n. Uma das consequências imediatas desta interpretação errônea da relação de Scatchard é que para baixas concentrações de ligantes, o número de sítios ligantes disponível será subestimado, e portanto, K será superestimado por um fator de até $2n$, como veremos posteriormente.

Existem mais dois aspectos do problema que devem ser levados em consideração e que serão úteis em interpretações futuras:

1. O número de sítios ligáveis eliminados quando um intercalante se liga à rede varia de um (se o ligante se liga em um gap com exatamente n de comprimento,

como é o caso de um sítio com dois primeiros vizinhos) até $2n-1$ (se ele se liga a uma rede vazia) veja figura 2.14.

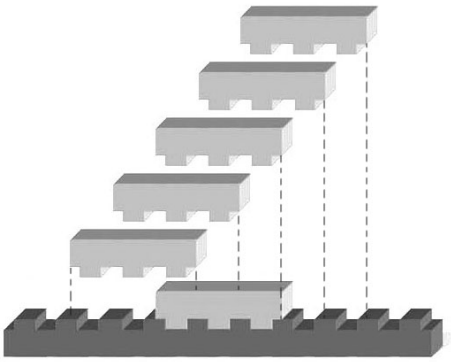

Figura 2.14: Os $(2n-1)$ sítios ligantes eliminados em uma rede vazia devido a intercalação de um único ligante com $n=3$.

2. Em um gap de comprimento g unidades de rede situado entre dois sítios intercalados (veja figura 2.15), o número de sítios ligáveis $\bar{s}$ é $g-n+1$ se $g \geq n$, mas é zero se $g < n$ Este fato faz com que seja difícil alcançar a saturação completa da rede.

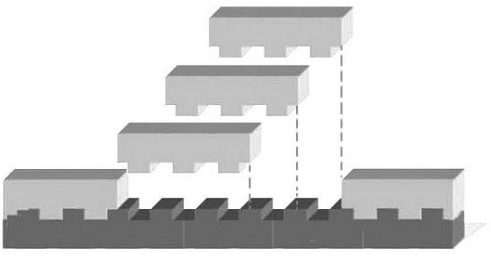

Figura 2.15: Os $(g-n+1)$ sítios ligantes disponíveis em um gap com $g=5$ para um ligante com $n=3$.

Faremos agora um esboço do procedimento utilizado para obter a relação para ligantes não-interagentes. Para o caso de ligantes interagentes, a dedução involve uma simples extensão desta abordagem.

Em uma reação química em que um ligante livre [F] se liga a um receptor [R], formando um único complexo [B] (ver fig.2.16), podemos dizer que:

$$[F] + [R] \underset{k_2}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} [B], \tag{2.55}$$

onde os colchetes representam as concentrações molares das espécies envolvidas; k_1 e k_2 são as contantes intrínsecas de ligação, que definem taxa da reação elementar (redução do reagente ou formação do produto).

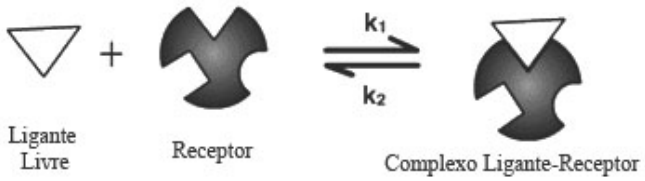

Figura 2.16: Único sítio ligante: assumindo que apenas um ligante se liga ao receptor

No equilíbrio químico, podemos afirmar que:

$$\frac{[B]}{[F][R]} = \frac{k_1}{k_2} = K, \tag{2.56}$$

onde K é a constante de associação ou constante de ligação, dada em unidades de M^{-1}. O inverso de K é definido como sendo a constante de dissociação da reação. No caso da rede unidimensional: C_f é a concentração de ligantes livres, C_b é a concentração de fármaco ligado e S é o número de sítios livres ligáveis em toda a extensão da rede. De forma análoga, a reação química pode ser escrita como:

$$C_f + S \overset{K}{\rightleftharpoons} C_b, \tag{2.57}$$

e, na situação de equilíbrio:

$$\frac{C_b}{C_f S} = K; \tag{2.58}$$

$$\frac{C_b}{C_f} = KS, \tag{2.59}$$

Dividindo a equação pela concentração total de pares de base C_{bp}, teremos:

$$\frac{C_b}{C_f C_{bp}} = \frac{KS}{C_{bp}}; \tag{2.60}$$

$$\frac{r}{C_f} = K\bar{S}, \tag{2.61}$$

onde $\bar{S}$ é o número médio de sítios ligáveis por unidade de rede. O parâmetro r, definido por $r = C_b/C_{bp}$ (eq. 2.53), nos fornece a fração dos sítios ligados, isto é se todos os sítios estiverem preenchidos (para um ligante com $n = 1$), teremos $r = 1$. Em todos os casos teremos $r \leq 1$. No limite em que ocorre a saturação (concentração máxima de fármacos ligados) o parâmetro r atinge seu valor máximo r_c (eq. 2.54), denominado razão crítica. O comportamento típico do parâmetro r em função da concentração total de fármaco em solução C_t pode ser visualizado no seguinte gráfico:

O número médio de sítios ligáveis por unidade de rede $\bar{S}$ é determinado de acordo com as seguintes considerações:

(i) Usando as probabilidades condicionais deduzimos uma expressão para a probabilidade P_g de qualquer gap particular entre dois ligantes intercalados tenha o comprimento exato de g sítios livres.

(ii) Como podemos escrever o número exato de sítios ligáveis livres para qualquer tamanho de gap g, então podemos obter uma expressão para o número médio de sítios ligáveis livres *por gap*, $\bar{s}$, como sendo:

$$\bar{s} = \sum_{g=n}^{N} (g - n + 1) P_g \tag{2.62}$$

(iii) Para uma concentração de C_b ligantes ligados na rede, existe uma concentração $(C_b + 1)$ de gaps (contando todos os gaps em que $g \geq 0$). Portanto, a concentração média de sítios ligáveis livres por unidade de rede $\bar{S}$ é simplesmente $(C_b + 1)\bar{s}$, que pode ser substituída na equação 2.61:

$$\begin{aligned} \frac{C_b}{C_f} &= K(C_b+1)\bar{s} \\ &= K(C_b+1)\sum_{g=n}^{N}(g-n+1)P_g \end{aligned} \tag{2.63}$$

O maior problema, portanto, está em encontrar uma expressão para a probabilidede P_g de encontrarmos gaps com g sítios de comprimento. A forma final de P_g (escrita em termos de n, r e w) vai depender de onde os ligantes se ligam de forma cooperativa ou não-cooperativa. A dedução da expressão para P_g não é trivial e foge ao escopo deste trabalho. Para uma discussão mais detalhada o leitor poderá consultar [33]. Para ligantes não interagentes, teremos $w = 1$ e todos os três tipos de sítios ligantes ilustrados na figura 2.13 serão equivalentes. Assim obtemos uma expressão para a probabilidade P_g de encontrarmos um gap que tenha g resíduos de rede de comprimento dada por:

$$P_g = \left(\frac{1-nr}{1-(n-1)r}\right)^g \left(\frac{r}{1-(n-1)r}\right) \tag{2.64}$$

Esta equação pode ser utilizada para calcularmos o comprimento médio do gap $\bar{g}$, que deve ser igual a:

$$\bar{g} = \sum_{g=0}^{N} gP_g \tag{2.65}$$

Substituindo P_g pela equação 2.64, temos que:

$$\bar{g} = \sum_{g=0}^{N} g\left(\frac{1-nr}{1-(n-1)r}\right)^g \left(\frac{r}{1-(n-1)r}\right) \tag{2.66}$$

Para simplificar a notação, escreveremos $P_g = cx^g$:

$$\begin{aligned} \bar{g} &= \sum_{g=0}^{N} gcx^g \\ &= cx\frac{\partial}{\partial x}\sum_{g=0}^{N} x^g \end{aligned} \tag{2.67}$$

onde x corresponde ao termo elevado a g-ésima potência na equação 2.64 e c corresponde ao segundo termo entre parênteses na mesma equação. Fazendo $N \to \infty$ na eq. 2.66, podemos dizer que:

$$\begin{aligned} \bar{g} &= cx\frac{\partial}{\partial x}\left(\frac{1}{1-x}\right) \\ &= \frac{cx}{(1-x)^2} \end{aligned} \tag{2.68}$$

Observando que $(1-x) = c$ e substituindo os valores de x e c na equação acima temos:

$$\bar{g} = \frac{1-nr}{r} = \frac{1-n(C_b/C_{bp})}{(C_b/C_{bp})} = \frac{C_{bp}-nC_b}{C_b}. \tag{2.69}$$

Portanto o comprimento médio de um gap $\bar{g}$ é tanto maior quanto menor for a concentração de ligantes ligados C_b. O número médio de sítios ligáveis livres por gap $\bar{s}$, de acordo com a equação 2.62, pode ser dado por:

$$\bar{s} = \sum_{g=n}^{N}(g-n+1)P_g. \tag{2.70}$$

Aqui a série começa em n, pois para gaps menores que este valor não teremos sítios ligáveis. Substituimos novamente P_g pela equação 2.64, fazemos N tender a infinito e observamos que todos os termos da equação correspondem ou a uma série geométrica ou à derivada de uma série geométrica. Podemos reescrever esta equação da forma:

$$\begin{aligned} \bar{s} &= \sum_{g=n}^{N}(g-n+1)cx^g \\ &= c\left[\sum_{g=n}^{N} gx^g + (1-n)\sum_{g=n}^{N} x^g\right] \\ &= c\left[x\frac{\partial}{\partial x}\sum_{g=n}^{N} x^g + (1-n)\sum_{g=n}^{N} x^g\right] \\ &= c\left[x\frac{\partial}{\partial x}\left(\frac{x^n}{1-x}\right) + (1-n)\left(\frac{x^n}{1-x}\right)\right] \\ &= x^n - \frac{x^{n+1}}{c} \end{aligned} \tag{2.71}$$

Substituindo os valores de x e c na equação acima, temos que:

$$\bar{s} = \left(\frac{1-nr}{r}\right)\left(\frac{1-nr}{1-(n-1)r}\right)^{n-1} \tag{2.72}$$

Portanto, o número médio de sítios ligáveis livres por rede $\bar{S}$ é $(C_b+1)\bar{s}$ e, para a rede infinita $C_b \simeq C_b + 1$, temos:

$$\bar{S} = N(1-nr)\left[\frac{(1-nr)}{1-(n-1)r}\right]^{n-1} \tag{2.73}$$

Substituindo na equação 2.61,

$$\frac{C_b}{C_f} = KN(1-nr)\left[\frac{(1-nr)}{1-(n-1)r}\right]^{n-1} \tag{2.74}$$

Mas $r = C_b/C_{bp}$ e $C_{bp} = N$ (número de sítios da rede) e teremos finalmente:

$$\frac{r}{C_f} = K(1-nr)\left[\frac{(1-nr)}{1-(n-1)r}\right]^{n-1} \tag{2.75}$$

Que representa a forma analítica do modelo de exclusão de pares. Observamos que, para $n = 1$, a equação 2.76 se reduz à equação clássica de Scatchard:

$$\frac{r}{C_f} = K(1-r). \tag{2.76}$$

Na equação 2.75, o parâmetro r representa a fração de sítios da rede que encontram-se ligados; K é a constante de ligação intrínseca; n o parâmetro de exclusão, dado em pares de base; C_f a concentração de intercalante livre na solução. Esta equação relaciona os diferentes parâmetros relevantes para a análise, e pode ser generalizada para diferentes intercalantes. Além disso, a equação 2.75 é uma equação simples e fita bem os dados de intercalação, fornecendo valores razoáveis para o tamanho do sítio. No capítulo 5 mostraremos os resultados obtidos através da eq. 2.75 para o parâmetro de exclusão n para a daunomicina e para o brometo de etídio.

Capítulo 3

Pinças Ópticas

3.1 Aplicações Biológicas de Forças Ópticas

Historicamente, a idéia de que a luz transporta momento - e portanto pode exercer forças sobre os objetos eletricamente neutros - surgiu primeiramente com Newton e Kepler. Esta idéia foi confirmada teoricamente pelo físico escocês James Clerk Maxwell, em sua teoria eletromagnética de 1873. Porém até a metade do século XX esta teoria não havia sido verificada experimentalmente. Uma das razões para a pressão de radiação ter permanecido oculta por tanto tempo se deve ao fato de que ela é muito pequena. Alguns miliwatts de potência, é capaz de produzir apenas alguns pinonewtons de força. Somente com o advento do laser, no final da década de 60, tornou-se possível o estudo da radiação de pressão através do uso de um feixe de luz intenso e colimado. O pioneiro no estudo experimental deste fenômeno foi Arthur Ashkin dos Laboratórios AT&T (Bell), nos EUA, em 1969. Focalizando um feixe de laser, Ashkin e seus colaboradores demostraram que pequenas partículas, tais como esferas de poliestireno, com poucos micrômetros de diâmetro, poderiam ser deslocadas e até mesmo suspensas, contra a gravidade, utilizando a pressão de radiação [44–49]. O trabalho de Ashkin sobre o efeito da pressão de radiação foi de fundamental importância para o desenvolvimento do pinçamento atômico e para muitos outros trabahos posteriores até os dias atuais.

Um esquema particular de pinçamento óptico, proposto em 1978 e demon-

strado em 1986 [50] consiste basicamente em focalizar o feixe de laser, usando lentes tais como a objetiva do microscópio. Sobre determinadas condições, o intenso gradiente de luz perto da região focal cria um poço potencial estável tridimensional, capaz de aprisionar objetos dielétricos. Pinças ópticas com este desing não são capazes de aprisionar átomos à temperatura ambiente, mas podem ser usadas para capturar e manipular remotamente um amplo espectro de partículas maiores, variando em tamanho desde muitos nanometros até algumas dezenas de micrômetros. Ashkin e seus colaboradores mostraram em 1987 que a pinça óptica poderia ser usada para manipular material vivo ou inanimado. Através de uma escolha apropriada do comprimento de onda, observaram que os danos às espécies biológicas poderiam ser minimizados. Utilizando um laser de onda contínua, com comprimento de onda próximo do infra-vermelho, Ashkin capturou vírus, bactérias e protozoários [52,53]. Experimentos em outros laboratórios durantes os últimos anos, começaram a explorar as inúmeras possibilidades permitidas pela pinça óptica em biologia [58]. A pinça óptica, portanto, transformou-se em uma ferramenta bastante versátil, principalmente por permitir manipular objetos na escala microscópica.

3.2 Pinça-óptica como sensor de força

O princípio físico da pinça óptica consiste na competição entre a força de gradiente e a força devido à pressão de radiação, que agem sobre o material dielétrico. Os raios refletidos geram uma pressão de radiação, enquanto os raios refratados geram uma pressão de gradiente sobre a microesfera. Para que haja pinçamento óptico, deve haver uma compensação entre a força de gradiente e a pressão de radiação. Para que isso ocorra, o índice de refração da esfera deve ser maior que o do meio que a circunda e o perfil de intensidades do feixe de luz deve ser gaussiano. A combinação destas forças sobre a microesfera tenderá a aprisioná-la na região focal do feixe. A força devido à pressão de radiação se deve ao fato de que a luz transporta momento em seus fótons. Ao incidir sobre um objeto, o momento linear dos fótons são transmitidos aos objetos. O momento de um único fóton relaciona-se com a frequência ν da onda eletromagnética de acordo com:

$$p = \frac{h\nu}{c} = \frac{\hbar\omega}{c} = \frac{E}{c} \tag{3.1}$$

onde h é a constante de Planck, c a velocidade da luz no vácuo, ω a frequência angular, e E a energia de um fóton. O momento transferido ao objeto será igual à variação do momento linear do fóton, ou seja $\Delta p = 2E/c$. Para termos uma idéia da magnitude da força, consideremos um feixe luminoso com N fótons, com energia total $E_T = NE$. A força aplicada, quando o feixe é refletido por um objeto, será:

$$\vec{F} = \frac{\partial \vec{p}}{\partial t} = \frac{2}{c}\frac{\partial E_T}{\partial t}\hat{p} = \frac{2}{c}P_T\hat{p} \tag{3.2}$$

onde P_T é a potência total do feixe. Para uma potência de 1mW, por exemplo, a força será da ordem de $F \simeq 1pN$. Essa é a magnitude típica de uma força obtida por um laser, da ordem de alguns picoNewtons. Portanto, a força de pinçamento depende da intensidade e da frequência do laser utilizado. Em nossos experimentos utilizamos um laser na faixa do infravermelho ($\lambda = 832nm$) e a potência incidente medida na amostra é da ordem de 2mW.

Além da pressão de radiação, temos também um segundo tipo de força, devido à refração da luz no objeto. A luz, ao refratar, sofre um desvio devido à diferença entre os índices de refração dos meios. De acordo com a conservação do momento linear, o momento inicial do sistema deve ser igual ao momento final do sistema. Como a luz é desviada, então a partícula também será desviada, de forma a conservar o momento linear total do sistema.

A figura 3.1 mostra, de forma simplificada, uma microesfera em um poço potencial da pinça óptica. Na parte superior da figura, podemos observar o perfil gaussiano do laser. Do lado esquerdo da figura representamos apenas metade do perfil gaussiano, para mostrar a situação da esfera fora do centro do perfil. Neste caso a esfera encontra-se acima do foco e do lado esquerdo do perfil. Nesta posição, o momento linear resultante sobre a esfera, devido a força de gradiente dos raios refratados, apontam para o centro do perfil. Do lado direito, temos uma situação em que a esfera encontra-se abaixo do foco, no centro do perfil. Nesta situação, o momento linear resultante aponta para cima, na direção do foco. Em resumo, percebemos que quando a esfera encontra-se nas extremidades do perfil, a força resultante aponta para o centro do perfil. Caso ela esteja abaixo do foco, a força resultante é para cima, em direção ao foco. E, caso a esfera esteja acima do foco, a

resultante aponta para baixo, também em direção ao foco. A partícula permanece presa em uma posição próxima ao foco, onde a força de gradiente e a força de pressão de radiação exercidas sobre a partícula se compensam. Dessa forma, o perfil de luz se torna um poço potencial harmônico, confinando a microesfera, que realiza pequenos movimentos aleatórios em torno da sua posição de equilíbrio.

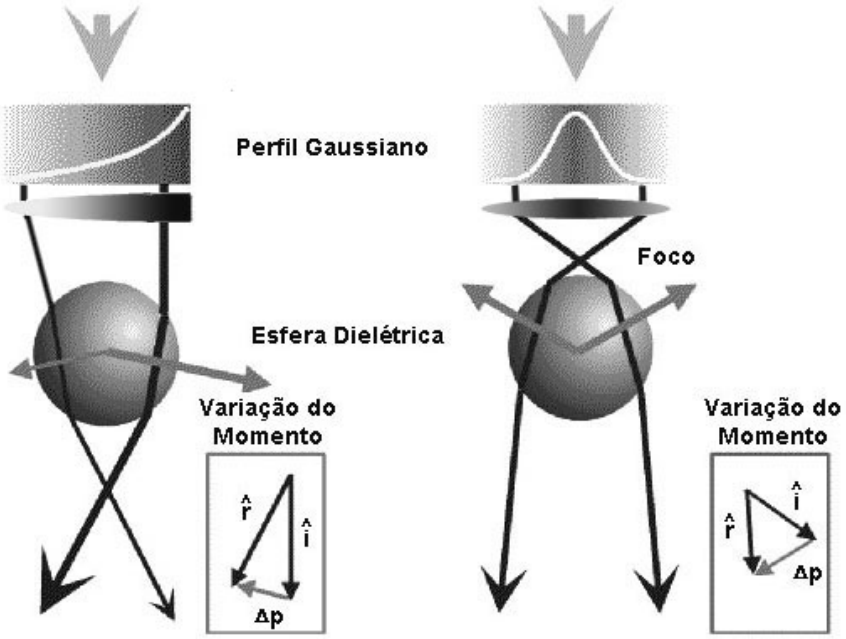

Figura 3.1: Perfil Gaussiano da Pinça

Para um tratamento quantitativo mais adequado, devemos levar em consideração fatores como os coeficientes de reflexão e transmissão na interface meio-esfera e múltiplas reflexões dentro da esfera [64,65]. Temos dois limites definidos para o tratamento do problema. O primeiro, o limite da óptica geométrica, temos comprimento de onda muito menor que o raio da esfera $\lambda \ll r$. O segundo caso, quando $\lambda \gg r$, é chamado limite Rayleigh.

Começaremos com a análise na caso de $\lambda \ll r$, ou seja, no limite da óptica geométrica. Na figura 3.2 podemos observar os vetores de onda devido a um feixe de luz cônico, incidindo sobre a microesfera. O centro da microesfera, neste caso,

encontra-se abaixo do foco e centrado no eixo do perfil. Vamos analisar os raios refratados pela microesfera: os vetores de onda dos raios incidentes $\vec{K}_0$ e $\vec{K}_1$ refratam, originando $\vec{K}_0'$ e $\vec{K}_1'$. A variação dos momentos lineares dos raios será o momento depois menos o momento antes. As variações serão dadas por $\vec{p}_0^{\,D} - \vec{p}_0^{\,A} = \delta\vec{p}_0$ e $\vec{p}_1^{\,D} - \vec{p}_1^{\,A} = \delta\vec{p}_1$ para $\vec{K}_0$ e $\vec{K}_1$, respectivamente. A variação do momento na microesfera terá o mesmo módulo e sentido contrário. A soma dos momentos será o momento resultante $\delta\vec{p}_0 + \delta\vec{p}_1 = \delta\vec{p}_r$. A direção resultante do momento linear da esfera pode ser visualizada no lado direito da figura 3.2. Portanto, para a esfera localizada abaixo do centro focal, o momento linear resultante irá apontar para cima, ou seja, em direção ao foco.

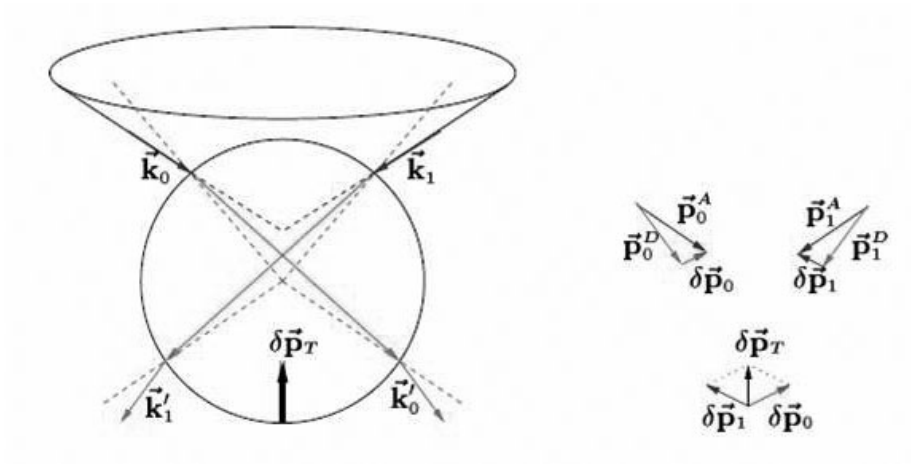

Figura 3.2: Microesfera centrada no eixo do perfil e abaixo do foco.

A situação em que a microesfera encontra-se centrada no perfil e acima do foco do laser, é representada na figura 3.3. Os vetores de onda dos raios incidentes, $\vec{K}_0$ e $\vec{K}_1$, refratam, originando $\vec{K}_0'$ e $\vec{K}_1'$. As variações dos momentos serão dadas por $\vec{p}_0^{\,D} - \vec{p}_0^{\,A} = \delta\vec{p}_0$ e $\vec{p}_1^{\,D} - \vec{p}_1^{\,A} = \delta\vec{p}_1$ para $\vec{K}_0$ e $\vec{K}_1$, respectivamente. A soma dos momentos será o momento resultante $\delta\vec{p}_0 + \delta\vec{p}_1 = \delta\vec{p}_r$. Neste caso, a variação do momento linear resultante $\delta\vec{p}_r$ irá apontar para baixo, ou seja, em direção ao foco.

A situação em que o centro da esfera encontra-se fora do centro do perfil e abaixo do foco é representada na figura 3.4. Neste caso, os vetores de onda dos raios incidentes, $\vec{K}_0$ e $\vec{K}_1$, refratam, originando $\vec{K}_0'$ e $\vec{K}_1'$. As variações dos momentos

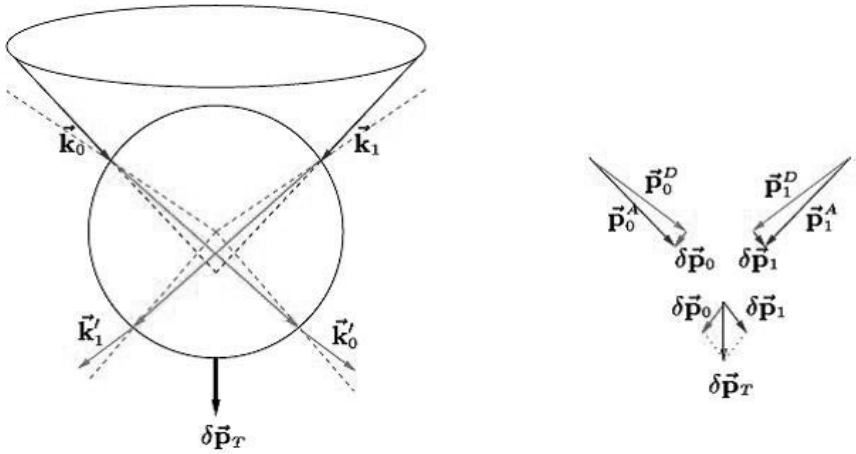

Figura 3.3: Microesfera no centro do perfil e acima do foco do laser. Os vetores de onda dos raios incidentes, $\vec{K}_0$ e $\vec{K}_1$, refratam, originando $\vec{K}'_0$ e $\vec{K}'_1$. Observamos que o momento linear resultante aponta para baixo, em direção ao foco.

serão dadas mais uma vez por $\vec{p}_0^{\,D} - \vec{p}_0^{\,A} = \delta\vec{p}_0$ e $\vec{p}_1^{\,D} - \vec{p}_1^{\,A} = \delta\vec{p}_1$ para $\vec{K}_0$ e $\vec{K}_1$, respectivamente. O momento resultante será $\delta\vec{p}_0 + \delta\vec{p}_1 = \delta\vec{p}_r$. Neste caso, a variação do momento linear resultante $\delta\vec{p}_r$ pode ser decomposto em uma componente apontando para o centro do perfil e outra, para cima. Portanto, em todas as situações analisadas quando a microesfera encontra-se nas vizinhanças da região focal, ela sempre será atraida para o ponto focal do perfil. Neste ponto, ela comporta-se como um pequeno oscilador harmônico em torno do seu ponto de equilíbrio.

A pressão de radiação, devido à reflexão da luz pela micresfera é representada na figura 3.5. Neste caso, qualquer que seja a posição do centro da microesfera, observaremos o mesmo comportamento. Os vetores de onda dos raios incidentes são dados por $\vec{K}_0$ e $\vec{K}_1$. Os raios refletidos serão representados por $\vec{K}'_0$ e $\vec{K}'_1$. Os feixes refletidos têm uma variação de momento dada por $\vec{p}_0^{\,D} - \vec{p}_0^{\,A} = \delta\vec{p}_0$ e $\vec{p}_1^{\,D} - \vec{p}_1^{\,A} = \delta\vec{p}_1$, respectivamente. Observamos que o momento resultante será $\delta\vec{p}_0 + \delta\vec{p}_1 = \delta\vec{p}_r$. Neste caso, o momento linear resultante $\delta\vec{p}_r$ sempre apontará para fora da direção de incidência do feixe, ou seja, a microesfera será empurrada pelo feixe. Este foi o primeiro fenômeno observado por Ashkin, utilizando um feixe cilíndrico. Somente com o auxílio da objetiva para tornar o feixe cônico, foi possível aprisionar a partícula. O feixe cônico, portanto, da origem à força de gradiente, que compensa a pressão de radiação da luz incidente.

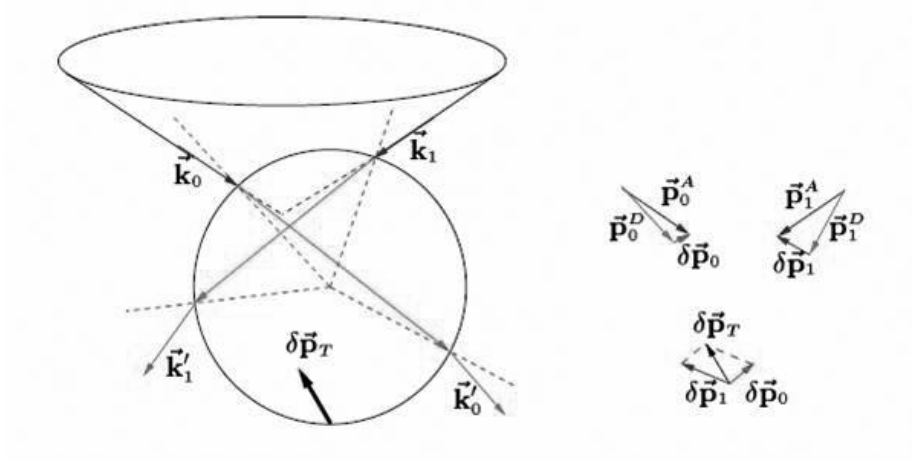

Figura 3.4: centro da microesfera deslocada do centro do perfil e abaixo do foco. Neste caso, o momento linear resultante pode ser decomposto em uma componente apontando para o centro do perfil e outra, para cima.

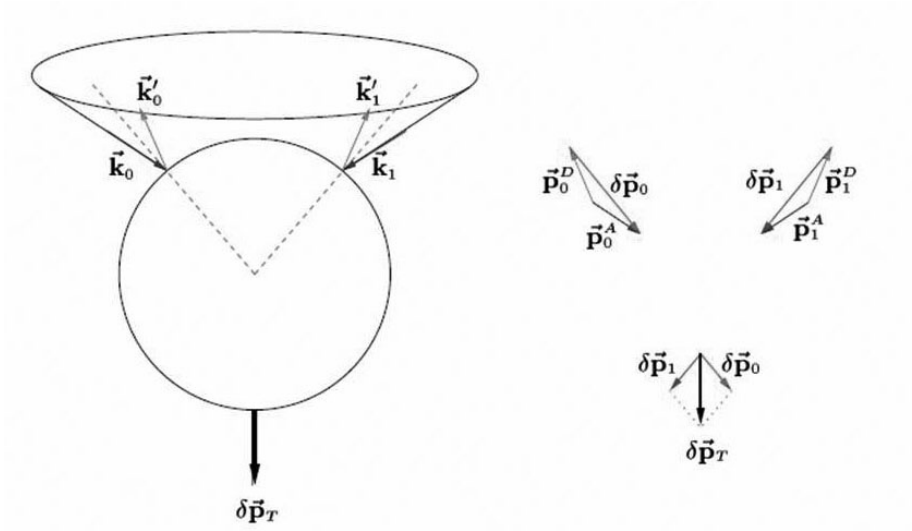

Figura 3.5: Pressão de radiação devido à reflexão da luz pela micresfera. Neste caso, qualquer que seja a posição do centro da microesfera, o momento linear resultante sempre terá um efeito de empurrar a microesfera. E a força de gradiente, gerada pela refração, que compensa portanto a pressão de radiação da luz incidente, fazendo com que a partícula permaneça aprisionada.

No limite da óptica geométrica $\lambda \ll r$ teremos:

$$F \propto \frac{x}{r} \tag{3.3}$$

E, portanto

$$\kappa \propto \frac{1}{r} \tag{3.4}$$

a constante de força da pinça κ será proporcional ao inverso do raio r da esfera, para pequenos deslocamentos em relação à região de equilíbrio.

No caso en que o comprimento de onda da luz é muito maior que o raio da esfera $\lambda \gg r$, temos o limite Rayleigh. Neste caso, a microesfera dielétrica comporta-se como um dipolo induzido em um campo elétrico não-homogêneo. Neste limite, apenas a força de gradiente existe. A força para uma partícula, com momento de dipolo $\vec{p}$, em um campo elétrico $\vec{E}$, será dada por:

$$\vec{F} = \nabla(\vec{p} \cdot \vec{E}) \tag{3.5}$$

sendo o momento de dipolo dado por:

$$\vec{p} = 4\pi\varepsilon_0 \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} r^3 \vec{E} \tag{3.6}$$

onde ε é a constante dielétrica e r o raio da esfera. A força, portanto será dada por:

$$\vec{F} = 4\pi\varepsilon_0 \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} r^3 \nabla E^2 \tag{3.7}$$

No limite Rayleigh, portanto, a microesfera comporta-se como um dipolo induzido e tenderá a ser levada para a região odnde o gradiente do campo elétrico for maior, no caso, para o foco do laser. A constante de força da pinça para este limite, será:

$$\kappa \propto r^3 \tag{3.8}$$

a constante de força da pinça κ, será proporcional ao cubo do raio da esfera. Recentemente, foi desenvolvida a teoria de calibração absoluta das pinças ópticas, conhecida como Mie-Debye-spherical aberration (MDSA) [59,60]. A teoria prevê o comportamento da força de pinçamento transversal desde o domínio Rayleigh, até o limite de esferas com raios maiores. Esta teoria é livre de parâmetros ajustáveis e todos os parâmetros utilizados podem ser experimentalmente acessíveis. No capítulo 4, Técnicas Experimentais, veremos como é determinada a força da pinça sobre uma microesfera dielétrica.

Capítulo 4

Técnicas Experimentais

4.1 Montagem Experimental

A montagem utilizada consiste basicamente em um microscópio óptico invertido (Nikon TE 300, objetiva de óptica corrigida no infinito, aumento de 100X e abertura numérica NA = 1,4) ver fig. 4.1, associado a um laser com perfil gaussiano infra-vermelho (SLD 5422-H1, λ =832nm, com potência máxima de 150mW). O laser é focalizado com o auxílio de uma objetiva originando a pinça óptica. Este feixe, ao deixar a fonte, possui simetria cilíndrica. Após atravessar a objetiva, este feixe se torna cônico. A objetiva exerce também a função de coletar a intensidade de luz retroespalhada (laser He-Ne) e observar as microesferas. Também incide sobre a amostra um laser de He-Ne (modelo SP-127, λ=632,8 nm), que é utilizado para a análise da posição relativa da microesfera no poço potencial da pinça. Podemos observar na figura 4.1 as lentes L_1 e L_2. A primeira representa o condensador do sistema de iluminação do microscópio (IL) e a segunda é usada para colimar o feixe de laser IV.

A solução aquosa com a amostra (DNA e microesferas) localiza-se sobre a lamínula do microscópio, que é o nosso porta amostra. A microesfera encontra-se localizada no poço potencial da pinça, representado pela parábola côncava pontilhada. No centro da microesfera encontra-se o sistema de cooredenadas utilizado. A distância entre o centro da microesfera e a lamínula é indicada como sendo h.

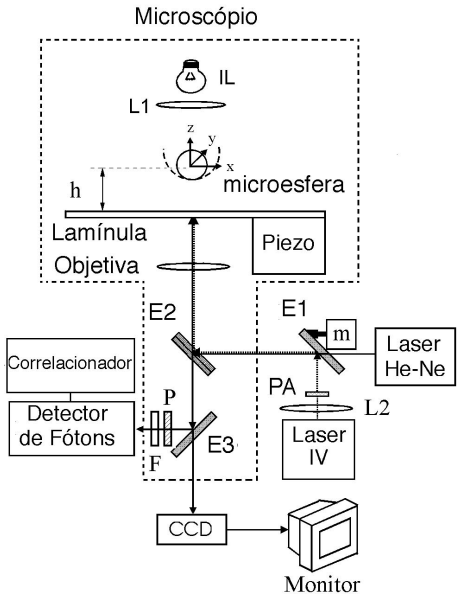

Figura 4.1: Montagem experimental utilizada para as medidas.

Abaixo da lamínula, à direita, localiza-se o deslocador Piezo, que permite movimentar a lamínula com precisão submicrométrica de posição e velocidade. Esta caracteística é essencial para esticar a molécula de DNA, que possui apenas alguns micrômetros.

Na saída do laser infra-vermelho encontra-se um prisma anamóffico PA, cuja função é uniformizar a distribuição radial de potência do laser IV. No caminho óptico do laser He-Ne, encontram-se os espelhos E_1 e E_2. O primeiro é um espelho dicróico, transparente ao He-Ne e refletor para o IV. O segundo é composto por um espelho dicróico e um semi-espelho, reflete o IV para a objetiva e transmite a luz visível. O motor m conectado ao espelho E_1 nos permite variar a sua inclinação. Mudando a posição do laser IV em relação ao He-Ne, mudamos a posição da microesfera em relação ao feixe visível He-Ne.

Às saídas do microscópio estão acoplados uma camera CCD (CCD-72 DAGE-MTI) para vizualização e um detector de fótons (EGG-Photo Counting Module, SPCM-200-PQ-F500), com abertura de 150 μm de diâmetro, montado em deslocadores Newport para ser posicionado com precisão. Para cada fóton que chega ao detector,um pulso de 10ns de largura (TTL) é enviado a um correlacionador digital Brookhaven BI9000AT que nos fornece as funções de autocorrelação temporais das

flutuações de intensidade da luz retroespalhada pela microesfera. Em fente ao detector de fótons encontra-se um polarizador P, que coleta a luz retroespalhada com polarização cruzada em relação a luz incidente. Além do polarizador, há um filtro passa faixa F, centrado em 632 nm e com largura de faixa de 20 nm. Com esta montagem, garantimos que a luz coletada no detector seja proveniente apenas do laser de He-Ne. Finalmente, na outra saída do microscópio conectamos uma câmera CCD (modelo CCD-72 DAGE-MTI), que leva a imagem até o monitor, permitindo a visualização da amostra.

4.2 Preparação das Amostras

Porta Amostras

Com um pincel macio, limpo e seco, limpamos uma lamínula de vidro. Utilizando parafina derretida, colamos um *o-ring* sobre esta lamínula e estará pronto o porta-amostras. Antes do uso, eles são levados à capela e esterelizados com luz ultra-violeta durante 20 minutos.

Solução DNA e Microesferas

A solução de DNA-microesferas é preparada em ambiente estéril. A capela em que são feitas as amostras é limpa com álcool 70°C e em seguida, esterelizada durante 20 minutos com ultravioleta.

O meio aquoso em que o DNA é preparado consiste em uma solução tampão, no caso o PBS (Phosphate-Buffered Saline). Para o preparo da amostra são necessários dois tipos diferentes de PBS, um mais ácido, com pH 5,5, e outro levemente básico, com pH 7,4. O primeiro é utilizado no estagio inicial de preparo das amostras. Ele garante a aderência das microesferas de poliestireno à extremidade do DNA e do DNA à lamínula [43]. Depois de um período nesta solução (entre 12 e 24 horas) a amostra é lavada com o PBS pH 7,4 (pH fisiológico) para que não haja interferência do pH sobre as características mecânicas do DNA durante a medidas.

Preparo do PBS

Os PBS pH 5,5 e PBS pH 7,4 são preparados da seguinte forma: primeiramente prepara-se as soluções bases - soluçao doadora (D) e solução aceptora (A) - e a porcentgem de cada uma irá determinar os dois tipos de PBS utilizados.

1. Solução Aceptor (A):

   - Misturar $5mM$ de Na_2HPO_4 (Fosfato de Sódio Dibásico Anidro) em $600mL$ de H_2O deionizada (DI).
     OBS: Como um mol de Na_2HPO_4 corresponde a $m = 141,96g$, então a massa correspondente a $5mM$ será $m = 426mg$.

2. Solução Doador (D):

   - Misturar $10mM$ de NaH_2PO_4 (Fosfato de Sódio Monobásico Anidro) em $500mL$ de H_2O DI.
     OBS: Como um mol de NaH_2PO_4 corresponde a $m = 119,98g$, então a massa correspondente a $10mM$ será $m = 600mg$.

3. PBS pH 5,5

   - Misturar $363,6mL$ da solução Doadora em $36,4mL$ da solução Aceptora.
   - A concentração de Na desta solução é de $10mM$. Devemos elevá-la a $150mM$, acrescentando $140mM$ de $NaCl$ ($m_{NaCl} = 3,27g$).
   - O pH deverá ser medido para a confirmação após acrescentar-se o $NaCl$, pois este altera levemente o pH da solução.

4. PBS pH7,4

   - Misturar $355,4mL$ da solução aceptora em $44,6mL$ da solução doadora.
   - Acrescentar $3,27g$ de $NaCl$ como no caso anterior.
   - O pH deverá ser medido para a confirmação após acrescentar-se o $NaCl$, pois este altera levemente o pH da solução.

Preparo da Amostra de DNA

A amostra é preparada de acordo com o seguinte protocolo:

1. Separamos dois microtubos limpos. No primeiro, coloca-se 1,5 mL da solução de PBS pH 5,5 e em seguida adiciona-se 1 μL da solução de microsferas 2.8μm.

2. No segundo, coloca-se 136μl PBS pH 5,5 e adiociona-se 180μl da solução do primeiro microtúbulo.

3. À solução resultante, adiciona-se 5μl da solução de DNA previamente descongelada em banho térmico a 54°C, durante 5 minutos. Balançamos levemente para homogeneizar a solução .

4. Deixamos a solução descançar por um período de 20 minutos.

5. Colocamos o conteúdo do microtúbulo cuidadosamente em 2 porta-amostras (aproximadamente 150μl para cada uma delas).Tampamos o porta-amostra com outra lamínula.

6. Deixamos a solução descançar por um período entre 12 e 24 horas. Neste período,as extremidades do DNA irão aderir às microesferas e à superfície da lamínula.

Lavagem da amostra

1. Coloca-se a concentração desejada de daunomicina ou brometo de etídio em um microtúbulo contendo PBS pH 7,4.

2. Retiramos a tampa do porta-amostra. Com uma pipeta, coloca-se 50μl da solução do passo (1) na amostra. Esperamos 30s e removemos a mesma quantidade de solução da amostra. Repetimos este procedimento 4 vezes. A amostra agora está pronta para ser levada ao microscópio.

4.3 Medidas Experimentais

Método de Medida da Flexibilidade Entrópica do DNA

A medida da flexibilidade entrópica do DNA, ou mais precisamente, do seu comprimento de persistência, é feita prendendo uma das extremidades da molécula à uma lamínula de vidro e a outra a uma microesfera de poliestireno de $2,8\mu m$ de diâmetro. Esse arranjo é obtido (fig. 4.2a) após uma minunciosa manipulação do DNA em soluções especiais com pH controlado.

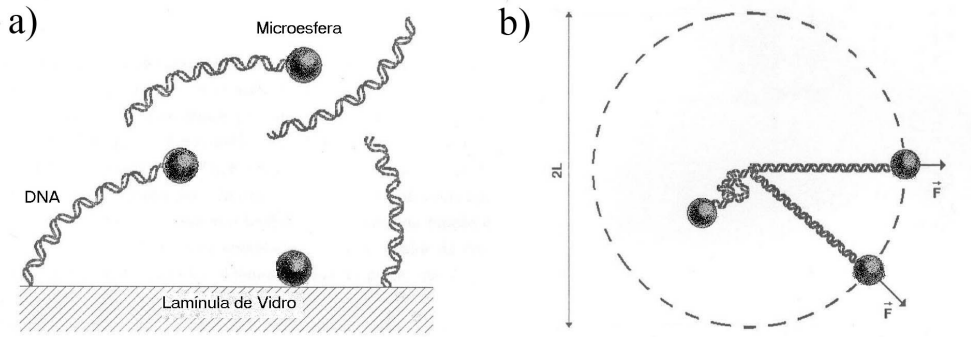

Figura 4.2: a) Configurações possíveis e b) Configuração desejada: uma das extremidades do DNA presa à microesfera e a outra presa à lamínula do microscópio. Nesta configuração a molécula estica para todas as direções da mesma forma, o que é um forte indício de que há apenas uma molécula presa à microesfera.

Para sabermos se a microesfera encontra-se na configuração desejada, devemos esticar o DNA puxando a microesfera com a pinça no plano xy, e observar se a molécula estica da mesma forma para todos os lados (ver fig. 4.2b). Isto não garante que haverá apenas uma molécula presa à microesfera, mas é um forte indício. A concentração de DNA utilizada em nossos experimentos é de $C_{DNA} = 6,81\mu g/mL$, o que corresponde a uma concentração de pares de base de $C_{bp} = 11\mu M$. Neste procedimento utilizado para preparar as amostras, apenas 5% a 10% dos DNAs encontram-se na configuração desejada, ou seja, uma extremidade presa à microesfera e outra à lamínula do microscópio. A concentração de DNA livre na solução (que não está preso nem na lamínula e nem na microesfera de poliestireno) é muito baixa, uma vez que a amostra passa por um longo período de incubação. O procedimento de preparação de amostras é descrito na seção de preparação de amostras.

A microesfera é então capturada e confinada no poço potencial da pinça, realizando pequenas oscilações em torno do ponto de equilíbrio. Incidindo um segundo laser de baixa potência sobre essa microesfera e coletando a luz retroespalhada, podemos determinar as características do seu movimento browniano, como tempo característico e amplitude. Conhecendo o atrito entre o meio e a microesfera e o tempo característico do seu movimento, podemos determinar a constante de força da pinça. Essa medida deve ser realizada com a microesfera na posição em que o DNA encontra-se em equilíbrio. A constante de força será uma função do raio da microesfera a e da altura h na qual ela se encontra da lamínula.

Para determinar o comprimento de persistência A, é preciso estirar a molécula e, ao mesmo tempo, coletar a luz retroespalhada pela microesfera. A luz retroespalhada nos fornece a posição da microesfera no perfil gaussiano da pinça, o que nos permite determinar qual a força que está sendo aplicada sobre a molécula de DNA. Dessa forma, podemos extrair a força na molécula em função do seu estiramento. O ajuste com a curva teórica 4.10 nos permite determinar o valor de A. Este procedimento será explicado detalhadamente mais adiante na última seção do presente capítulo.

Perfil de Retroespalhamento

O perfil de retroespalhamento é obtido capturando-se a microesfera com a pinça óptica, movendo-a em relação ao He-Ne e capturando a intensidade de He-Ne retroespalhado.

Podemos ver na figura 4.1, montagem experimental, que na saída do He-Ne encontra-se um espelho dicróico E_1, que nos permite movimentar o laser infravermelho, ou seja, a microesfera em relação ao He-Ne. O espelho está acoplado a um motor (m) que movimenta a microesfera pinçada com velocidade constante. Através do sistema de câmeras CCD, podemos gravar a posição inicial P_i e final P_f da microesfera. A velocidade do motor é calculada através da diferença entre P_f e a P_i (dadas em pixels) dividida pelo intervalo de tempo Δt e pelo número de pixels por micrêometro:

$$\Delta x(\mu m) = \frac{\Delta x(px)}{15,64 px/\mu m} \tag{4.1}$$

A velocidade ($\mu m/s$) é obtida dividindo-se pelo intervalo de tempo Δt em segundos:

$$v = \frac{\Delta x}{\Delta t} \tag{4.2}$$

O centro do perfil representa a posição central da microesfera, ou seja, de retroespalhamento máximo. Este ponto central é definido como sendo zero. Daí podemos obter a curva de *Intensidade* $\times$ *Posição* ou perfil de retroespalhamento fig.4.3 da microesfera:

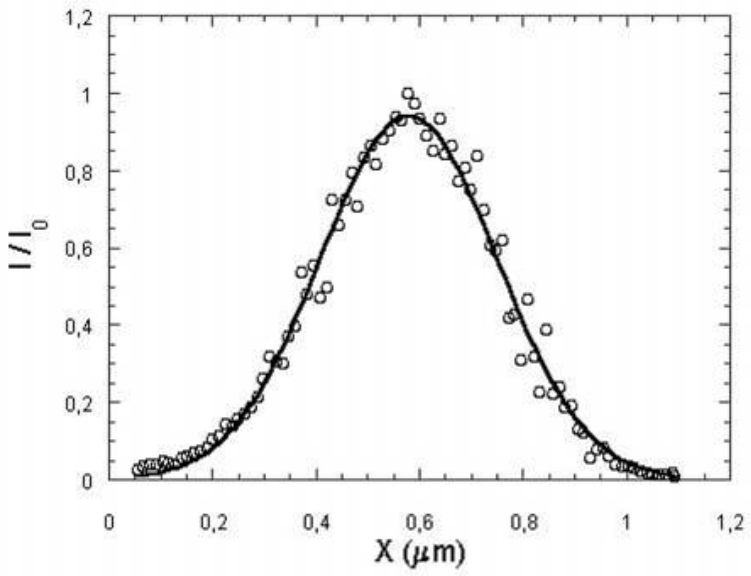

Figura 4.3: Perfil de Retroespalhamento de Intensidades: obtido capturando-se a microesfera com a pinça óptica, movendo-a em relação ao He-Ne e capturando a intensidade de luz retroespalhada.

A curva é normalizada dividindo-se a intensidade pela intensidade máxima ($I = I(x)/I_{max}$). Podemos ajustar a curva experimental a uma curva gaussiana da forma:

$$I = I_0 \exp\left[-\frac{(x - x_0)^2}{2\sigma^2}\right] \tag{4.3}$$

onde I_0 vale 1, x_0 é o valor médio e σ é a largura da gaussiana. A figura 4.3 mostra uma curva de perfil característica. Essa curva relaciona a intensidade da luz retroespalhada a cada ponto do perfil da pinça. Essa informação será essencial para

obtermos a posição da microesfera no poço potencial da pinça e portanto, a força que esta sendo aplicada à microesfera.

Função de Autocorrelação de Intensidades

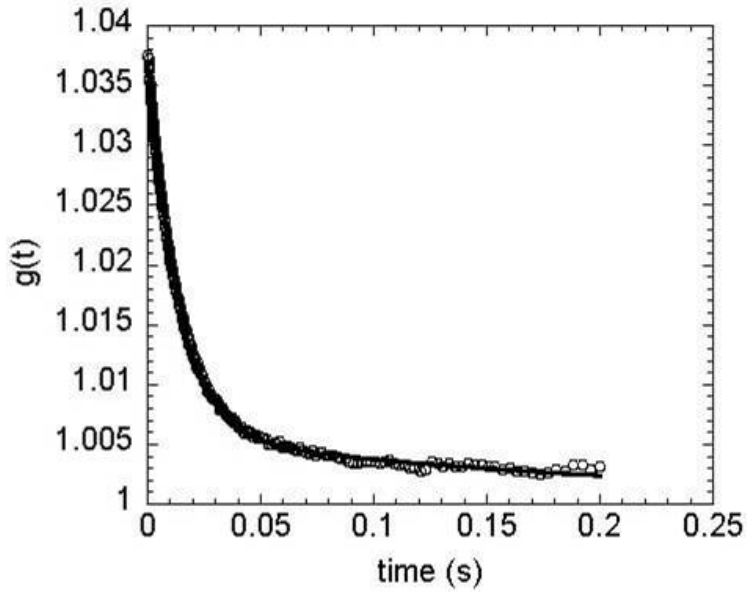

Figura 4.4: Curva de Autocorrelação de Intensidades: .

A curva da função de autocorrelação (ACF) é obtida colocando a microesfera na posição de derivada máxima do perfil da luz retroespalhada, que é em $x = \sigma$. Neste ponto temos a melhor relação sinal-ruído para a função de autocorrelação . A curva deve ser normalizada dividindo-se pela média da soma dos quatro últimos valores da intensidade. A figura 4.4 é uma típica função de autocorrelação . Ela é ajustada com a curva de decaimento exponencial da forma:

$$\langle I(\overrightarrow{r_0}(0))I(\overrightarrow{r}(t))\rangle = C + A_{\shortparallel}e^{\frac{-t}{\tau_{\shortparallel}}} + A_z e^{\frac{-t}{\tau_z}} \tag{4.4}$$

onde $\tau_{\shortparallel} < \tau_z$, pois a constante de força transversal κ_x é maior que a axial κ_z. Do ajuste da curva, extraímos os valores do tempo característico $\tau_{\shortparallel}$ do movimento no plano-xy, ou seja paralelo à lamínula, que é o que nos interessa. Geralmente são feitas três curvas de autocorrelação para cada esfera pinçada. Fazendo a média

aritmética dos valores encontrados para $\tau_{\shortparallel}$, podemos calcular a constante da pinça, κ_x, através da relação:

$$\overline{\tau_{\shortparallel}} = \frac{\gamma_{\shortparallel}}{\kappa_x} \tag{4.5}$$

onde $\gamma_{\shortparallel}$ é o coeficiente de arraste transversal sobre a microesfera. O coeficiente de arraste na direção z é diferente e está relacionado com o tempo τ_z. Na próxima seção mostraremos como é feito o cálculo da constante de força da pinça κ_x.

Atrito sobre a Microesfera

A equação para o coeficiente de Stokes transversal perto de uma parede $\gamma_{\shortparallel}$ (expressão de Faxen) é da forma:

$$\gamma_{\shortparallel} = \gamma_0 \left[1 - \frac{9}{16}\left(\frac{r}{h}\right) + \frac{1}{8}\left(\frac{r}{h}\right)^3 - \frac{45}{254}\left(\frac{r}{h}\right)^4 - \frac{1}{16}\left(\frac{r}{h}\right)^5\right]^{-1} \tag{4.6}$$

onde $\gamma_0 = 6\pi\eta_a r$ e r é o raio da esfera, h é a distância que o centro da esfera encontra-se da lamínula, η_a é a viscosidade da água, dada por:

$$\bar{\eta} = 0,26 + 1,51e^{-\frac{T}{29}} \tag{4.7}$$

observa-se que a viscosidade depende da temperatura T do sistema (dada em °C). Uma vez calculado o valor de $\gamma_{\shortparallel}$, podemos determinar facilmente o valor da constante de força da pinça, através da equação 4.5

Intensidade *versus* Estiramento

O próximo passo no procedimento experimental é determinar a curva de intensidade versus estiramento para as moléculas de DNA. Para isso, capturamos a microesfera presa ao DNA e movemos o estagio do microscópio. Esta curva é obtida experimentalmente coletando-se diretamente a luz retroespalhada pela microesfera (em função do tempo) enquanto esticamos o DNA.

A extensão do DNA pode ser facilmente encontrada, uma vez que conhecemos a velocidade do estagio do microscópio (58nm/s). Esta velocidade é baixa o suficiente para garantir que o DNA passa pelas configurações de equilíbrio. Para esta velocidade a força de Stokes sobre a microesfera pode ser negligenciada. Transformamos, portanto a coordenada do tempo em extensão absoluta ao longo do eixo

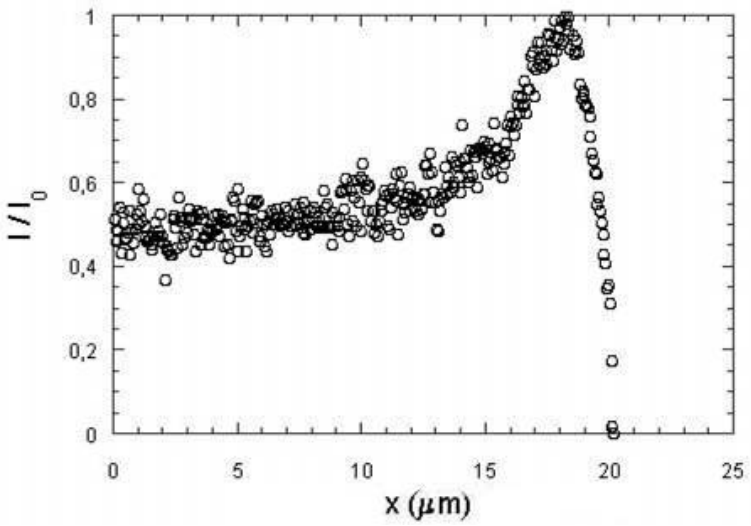

Figura 4.5: Intensidade versus Estiramento

x (paralelo ao estágio do microscópio), o qual denominamos x_{DNA}. Este procedimento é realizado para todas as medidas, inclusive medidas repetidas com a mesma molécula. A microesfera de poliestireno é mantida a uma distância fixa da lamínula ($h = 3,5\mu m$) durante todo o experimento. A distância entre as extremidades da molécula de DNA z é relacionada ao x_{DNA} através de:

$$z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2} \tag{4.8}$$

Teremos portanto a curva Intensidade *versus* Estiramento, característica deste tipo de medida, como vemos na figura 4.5.

Perfil de Força *versus* Estiramento

O próximo passo é obter a curva de Força *versus* Estiramento para a molécula de DNA e para os complexos DNA-intercalante. A curva típica obtida (4.5), relaciona intensidade com o estiramento. A partir da intensidade da luz retroespalhada pela microesfera obtemos o deslocamento x da microesfera em relação à posição de equilíbrio no poço potencial da pinça. Isolando x na equação 4.3, temos:

$$x = x_0 \pm \sigma\sqrt{2\ln\left(\frac{I_0}{I}\right)}, \tag{4.9}$$

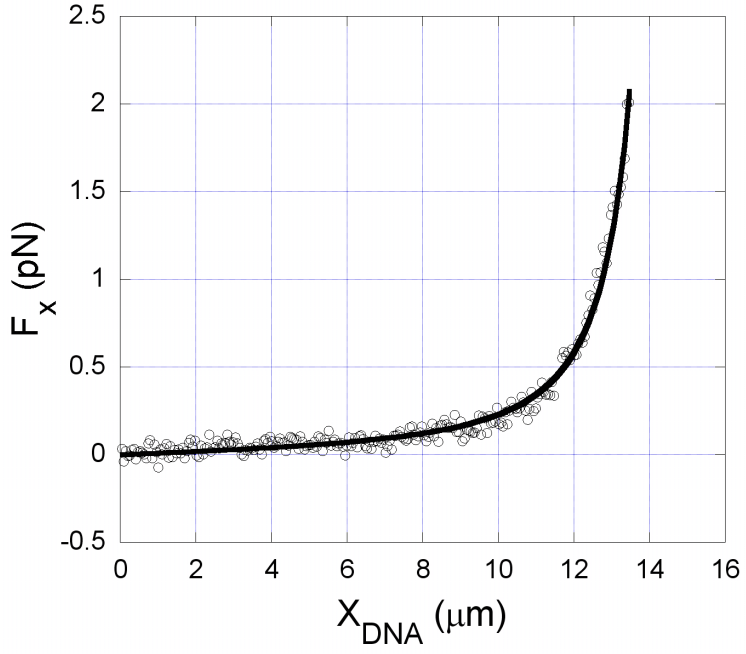

Figura 4.6: Força versus Estiramento

e, substituindo no eixo da intensidade obtemos a posição da microesfera no poço potencial da pinça. Como a constante de força foi calculada, obtemos, finalmente a curva força versus estiramento (4.6). Finalmente, fazemos o ajuste com a expressão teórica aproximada derivada por Marko e Siggia [14] para obter o comprimento de contorno L e o comprimento de persistência A da molécula de DNA e dos complexos DNA-intercalantes:

$$F_x = \frac{k_B T}{A}\left[\frac{(x_{DNA}^2 + h^2)^{1/2}}{L} + \frac{1}{4(1-\frac{(x^2+h^2)^{1/2}}{L})^2} - \frac{1}{4}\right]\frac{x_{DNA}}{(x_{DNA}^2+h^2)^{1/2}}, \qquad (4.10)$$

onde F_x é a componente da força no eixo x, K_B a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, A o comprimento de persistência do DNA, L o seu comprimento de contorno, h a altura da microesfera em relação à lamínula e x_{DNA} é a projeção da distância entre as extremidades da molécula do DNA no eixo x. Como o ângulo θ entre a molécula e a lamínula é pequeno, podemos dizer que F_x é praticamente a força total. A altura é fixada em todos os experimentos em $h = 3,5\mu m$ e medimos apenas o x_{DNA}. Para a curva particular mostrada na figura 4.6 o ajuste nos fornece

$A = 49,9nm$ e $L = 15,5\mu m$.

No capítulo 5, veremos alguns resultados interessantes do comprimento de persistência e do comprimento de contorno do DNA.

Capítulo 5

Resultados e Discussões

Varios trabalhos na literatura reportam mudanças no comprimento de persistência de acordo com uma determinada concentração do fármaco. Mas ainda não haviam sido feitos estudos detalhados da relação entre a concentração do fármaco e o efeito causado. Realizamos medidas sistemáticas do comprimento de persistência A da molécula para várias concentrações destes compostos. Neste capítulo, mostraremos os resultados encontrados para o brometo de etídio e a daunomicina.

5.1 DNA-Brometo de Etídio

A figura 5.1a) mostra o comportamento do comprimento de persistência A do complexo EtBr-DNA em função da concentração total de EtBr para uma concentração fixa de pares de base de DNA $C_{bp} = 11\mu M$. O ponto $C_{EtBr} = 0$ no gráfico representa a solução isenta de EtBr, ou seja, o comprimento de persistência do DNA puro. Este valor está em total concordância com os valores reportados na literatura para o DNA dupla-hélice $A = 50 \pm 3$nm. Observamos que o valor de A inicialmente aumenta com o aumento de C_{EtBr} até atingir um valor máximo de $A \sim 150nm$ na concentração crítica $C^c_{EtBr} = 3,1\mu M$. A partir da concentração crítica ocorre uma queda abruta no comprimento de persistência do DNA, que permanece constante em torno de $A \sim 50nm$ mesmo para concentrações superiores. Na figura 5.1b) podemos observar o comportamento do comprimento de contorno L do complexo DNA-EtBr, para a mesma variação de concentração. Ao contrário do comprimento

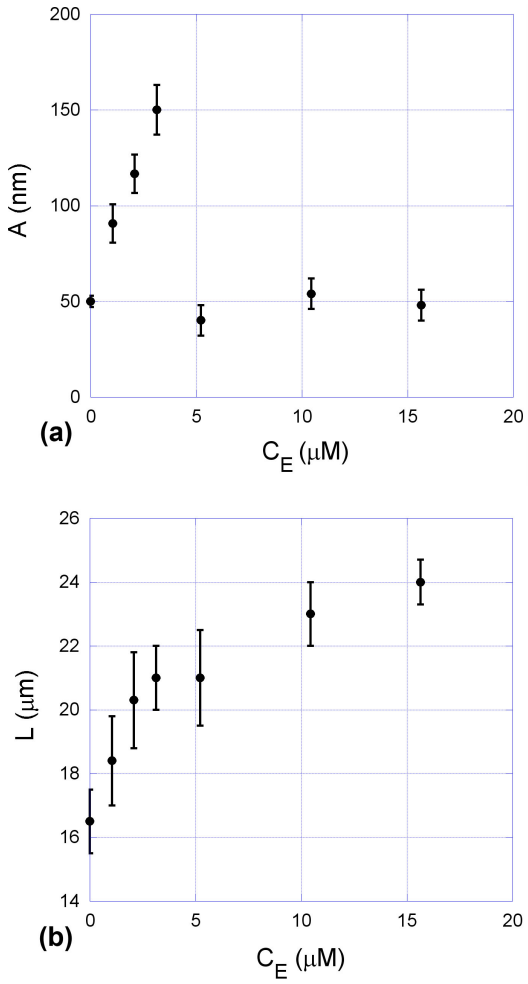

Figura 5.1: a) Comprimento de persistência A em funçao da concentração de EtBr utilizada, com a concentração de DNA fixa $C_{bp} = 11\mu M$. Observamos que o valor de A inicialmente aumenta com C_{EtBr} até atingir um valor máximo de $A \sim 150nm$ na concentração crítica $C^c_{EtBr} = 3,1\mu M$. A partir da concentração crítica ocorre uma queda abruta no comprimento de persistência do DNA, que permanece constante em torno de $A \sim 50nm$ para concentrações maiores. A figura abaixo **b)** mostra o comprimento de contorno L do complexo DNA-EtBr, que exibe um comportamento mais suave, crescendo monotonicamente à medida que aumentamos a concentração total do fármaco. O comprimento de persistência tem um valor inicial de $L = 16,5 \pm 1$ e aumenta até a saturação completa do DNA atingindo um valor de $L = 23 \pm 1$. O parâmetro de exclusão estimado com base nestes dados experimentais é $n = 2,5$.

de persistência, o comprimento de contorno exibe um comportamento mais suave, crescendo monotonicamente à medida em que aumentamos a concentração total do fármaco. O comprimento de persistência tem um valor inicial de $L = 16,5 \pm 1$ e

aumenta até a saturação completa do DNA, atingindo um valor de $L = 23 \pm 1$.

A partir destes valores experimentais para o comprimento de contorno do DNA, podemos estimar o valor do parâmetro de exclusão n para o Brometo de Etídio. Na condição de saturação completa, podemos dizer que a molécula teve seu comprimento de contorno aumentado de aproximadamente 39% do seu valor inicial. De acordo com Sischka et al. [37] cada molécula intercalada de EtBr aumenta o comprimento de contorno do DNA de $0,34$nm. Mas, na saturação completa da rede o DNA tem seu valor aumentado de $\Delta L = 6,5\mu m$. Isso significa que teremos em torno de $C_b = 19.100$ ($\simeq 6500nm/0,34nm$) moléculas de EtBr ligadas à molécula de DNA. Sabemos que na saturação crítica $r_c = 1/n$ (eq.2.54) e que $r = C_b/C_{bp}$ (eq.2.53). Portanto, podemos dizer que o parâmetro de exclusão $n = C_{bp}/C_b$ (em que $C_{bp} = 48.500$ para o λ-DNA utilizado nos experimentos) será dado por:

$$n = 2,5 \tag{5.1}$$

Este valor encontrado para o parâmetro de exclusão está em razoável concordância com os valores reportados na literatura de $n = 2,01$ [38].

5.2 DNA-Daunomicina

Realizamos o mesmo procedimento experimental com a daunomicina. Observamos um comportamento muito semelhante ao exibido pelo brometo de etídio, a menos das concentrações críticas. Na figura 5.2a) podemos observar o comprotamento do comprimento de persistência A em função da concentração total de daunomicina C_{Dau}. Observamos que o comprimento de persistência aumenta monotonicamente com o aumento da concentração do fármaco até atingir um valor máximo de $A \sim 280nm$, em uma concentração crítica de $C^c_{Dau} = 18,3\mu M$. Neste ponto acontece uma queda abrupta no comprimento de persistência do complexo. Para concentrações superiores à concentração crítica observamos que o valores de A permanecem constantes, em torno de $A \simeq 75nm$. O comprimento de contorno L do complexo DNA-daunomicina, ao contrário do comprimento de persistência, apresenta um comportamento suave, crescendo monotonicamente com o aumento da concentração total de daunomicina C_{Dau}. O comprimento de persistência tem um

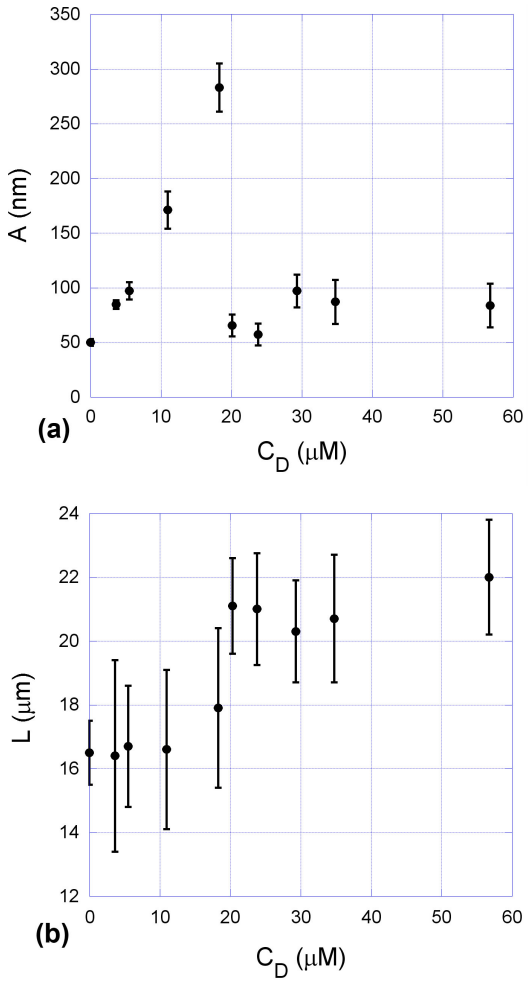

Figura 5.2: a) Comprimento de persistência A em função da concentração de daunomicina utilizada. Observamos um comportamento muito semelhante ao que ocorre com o EtBr. Neste caso, o comprimento de persistência aumenta com o aumento da concentração até atingir um valor máximo $A \sim 280nm$ para concentração crítica $C^c_{Dau} = 18,3\mu M$. Neste ponto ocorre uma queda abrupta no comprimento de persistência, que permanece aproximadamente constante em torno de $A \sim 75nm$ para concentrações superiores. Abaixo, observamos que **b)** comprimento de contorno L do complexo DNA-daunomicina, ao contrário do comprimento de persistência, apresenta um comportamento suave, crescendo monotonicamente com o aumento da concentração total de daunomicina C_{Dau}. O comprimento de contorno tem um valor inicial de $L = 16,5 \pm 1$ e aumenta até a saturação completa do DNA atingindo um valor de $L = 21 \pm 1,8$. O parâmetro de exclusão estimado com base nestes dados experimentais é $n = 3,3$.

valor inicial de $L = 16,5 \pm 1$ e aumenta até a saturação completa do DNA atingindo um valor de $L = 21 \pm 1,8$.

Com base nestes dados experimentais podemos estimar o valor do parâmetro de exclusão n da mesma forma que calculamos para o brometo de etídio. Neste caso o aumento no comprimento de contorno do DNA na saturação da molécula foi de $\Delta L = 4,5\mu m$, ou seja, de 27% do seu comprimento total inicial. De acordo com referências encontradas na literatura [39], cada molécula de daunomicina intercalada ao DNA causa-lhe um aumento de $\Delta L = 0,31nm$ no seu comprimento total. Com base nestes dados, ao atingir a saturação completa da molécula, teremos em torno de $C_b = 14.500$ moléculas intercaladas ao DNA. Assim, o parâmetro de exclusão encontrado é de:

$$n = 3,3 \tag{5.2}$$

Valor que encontra-se em boa concordâcia com os valores reportados na literatura de $n = 3,5$ para a daunomicina [39].

Na figura 5.3 podemos verificar alguns dados experimentais originais obtidos para a daunomicina. A figura 5.3a) mostra três curvas de força versus extensão: para duas concentrações diferentes de daunomicina e para o DNA livre de daunomicina. As concentrações utilizadas foram $C_{Dau} = 20,1\mu M$ (acima da concentração crítica) e $C^c_{Dau} = 18,3\mu M$. Para fins de comparação, as curvas foram normalizadas, dividindo-se pelo comprimento de contorno obtido para cada uma. Para facilitar a vizualização, foi feita uma média sobre os pontos da curva, diminuindo o ruido devido às flutuações Brownianas.

Constantes de Equilíbrio Químico

Conforme vimos no capítulo 2, seção 2.5 existem vários parâmetros que descevem a intercalação de ligantes, relacionados através do modelo de exclusão de pares 2.75, dado pela relação:

$$\frac{r}{C_f} = K(1 - nr)\left[\frac{(1 - nr)}{1 - (n - 1)r}\right]^{n-1} \tag{5.3}$$

Que representa a forma analítica . Na equação, r é a razão entre a concentração de intercalante ligado C_b e a concentração de pares de base de DNA C_{bp}; K é a

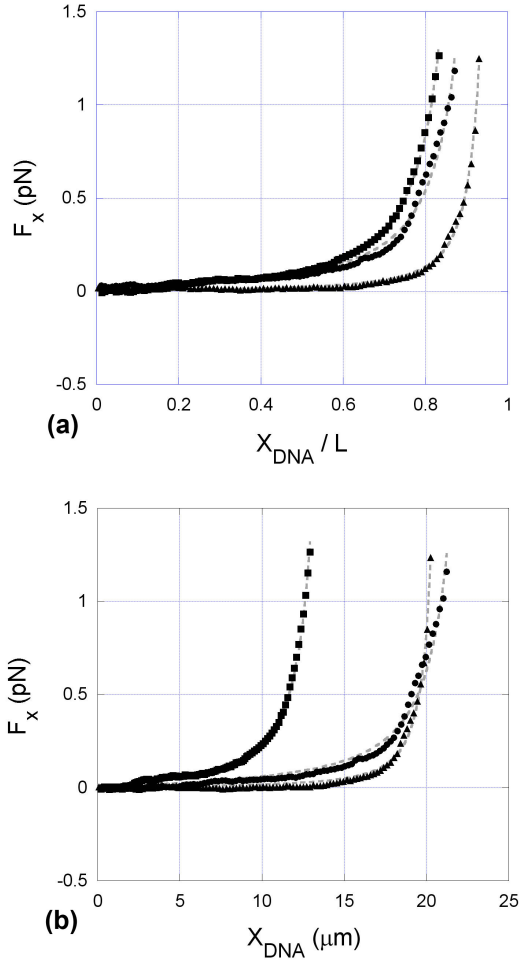

Figura 5.3: a) Três curvas de força versus extensão dos dados experimentais originais obtidos para a daunomicina: para duas concentrações diferentes de daunomicina e para o DNA livre de daunomicina. Quadrados: DNA puro; círculos: $C_{Dau} = 20,1\mu M$ (acima da concentração crítica); e $C^c_{Dau} = 18,3\mu M$ (na concentração crítica). Para fins de comparação, as curvas foram normalizadas, dividindo-se pelo comprimento de contorno obtido para cada uma e, para facilitar a vizualização, foi feita uma média sobre os pontos da curva, diminuindo o ruido devido às flutuações Brownianas.

constante de ligação intrínseca; n o parâmetro de exclusão, dado em pares de base; C_f a concentração de intercalante livre na solução ou não ligado. A concentração total de intercalantes é dada pela relação $C_T = C_f + C_b$. Utilizando esta relação, a equação 2.75, os valores encontrados para o parâmetro de exclusão e as respectivas constantes de ligação intrínseca K, podemos calcular a razão de transição r_t. Este parâmetro é definido como sendo o valor de r no ponto de transição abrupta do

comprimento de persistência. Portanto, a razão de transição para o brometo de etídio e para a daunomicina serão:
Brometo de Etídio: $r_t = 0,131$
Os valores utilizados para o EtBr foram:

- $n = 2,5$
- $K = 1,5 \times 10^5 M^{-1}$ [40]
- $C^c_{EtBr} = 3,1\mu M$
- $C_{bp} = 11\mu M$

Daunomicina: $r_t = 0,248$
Os valores utilizados para a daunomicina foram:

- $n = 3,3$
- $K = 7 \times 10^5 M^{-1}$ [31]
- $C^c_{Dau} = 18,3\mu M$
- $C_{bp} = 11\mu M$

Podemos relacionar o aumento relativo da molécula $\ell = \Delta L/L_0$ com o parâmetro $r = C_b/C_{bp}$, utilizando a equação 2.75. Primeiro, observamos que podemos dizer que:

$$L_0 = N_{bp}\Delta, \tag{5.4}$$

onde N_{bp} é o número de pares de base e Δ é a distância entre dois pares de base consecutivos. Para o λ-DNA teremos $N_{bp} = 48.000$ e $\Delta = 0,34nm$. Quando N_b moléculas se intercalam ao DNA, seu comprimento de contorno final L pode ser escrito como sendo:

$$L = L_0 + N_b\delta = N_{bp}\Delta + N_b\delta, \tag{5.5}$$

onde δ é o aumento no comprimento devido a cada uma das moléculas intercaladas ao DNA. Conforme discutimos nas seções 2.4 e 2.4, cada molécula de EtBr aumenta

o comprimento do DNA de $\delta = 0,34nm$ e a daunomicina de $\delta = 0,31nm$. Podemos dizer portanto que:

$$\ell = \frac{\Delta L}{L_0} = \frac{N_b \delta}{N_{bp} \Delta} \tag{5.6}$$

o parâmetro r pode ser escrito em função de M_b e M_{bp}, que representam o peso molar do intercalante e do par de base do DNA, respectivamente. Podemos escrever a razão r como sendo:

$$r = \frac{C_b}{C_{bp}} = \frac{N_b M_b}{N_{bp} M_{bp}} \tag{5.7}$$

e, substituindo N_b/N_{bp} em 5.6, temos:

$$\ell = \frac{\delta}{\Delta} \frac{M_{bp}}{M_b} r = \gamma r \tag{5.8}$$

onde foi definido o parâmetro γ como sendo:

$$\gamma \equiv \frac{\delta}{\Delta} \frac{M_{bp}}{M_b} \tag{5.9}$$

utilizando a equação 2.75, a relação $C_T = C_f + C_b$ e $r = \ell/\gamma$, podemos escrever a concentração total do fármaco C_T como função dos parâmetros ℓ e γ e da concentração total de pares de base C_{bp}:

$$C_T = \frac{C_{bp}}{\gamma} \ell + \frac{\ell(\gamma - n\ell + \ell)^{n-1}}{K(\gamma - n\ell)^n}. \tag{5.10}$$

A concentração molar de pares de base de DNA utilizada em nossos experimentos é $C_{bp} = 11\mu M$ e o peso molar do DNA é $M_{pb} = 646.4$ A seguinte tabela relaciona os valores dos pesos molares M_b e dos parâmetro dos parâmetros γ para os dois intercalantes utilizados:

Molécula	γ	M_b (g/mol)
EtBr	1,64	394,3
Daunomicina	1,04	564

A figura 5.4 mostra os valores experimentais obtidos para o valor do parâmetro ℓ (ou $\Delta L/L_0$).

Observamos que $\Delta L/L_0$ cresce monotonicamente com o aumento da concentração de EtBr e não exibe mudanças abruptas de comportamento. Cada ponto

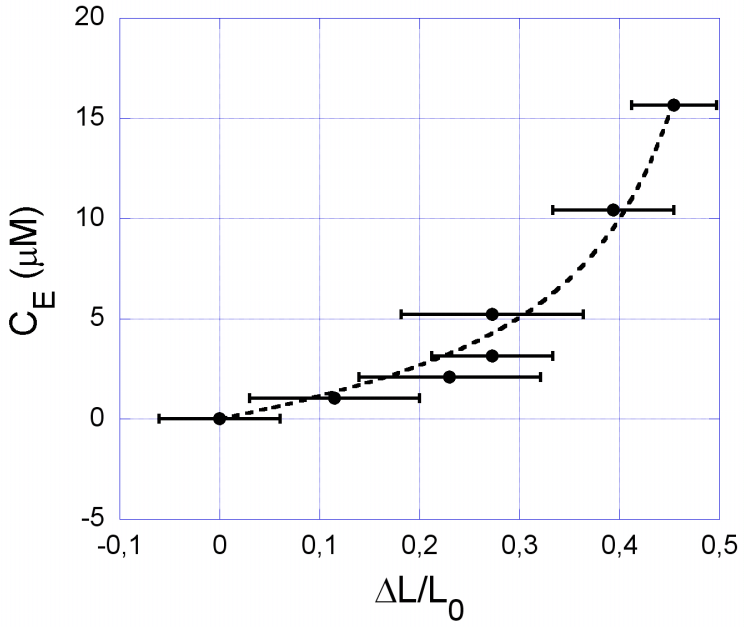

Figura 5.4: Concentração total de Brometo de Etídio (em μM) por aumento relativo do comprimento de contorno da molécula. Observamos que $\Delta L/L_0$ cresce monotonicamente com o aumento da concentração de EtBr e não exibe mudanças abruptas de comportamento. Cada ponto da curva foi obtido usando uma determinada concentração do brometo de etídio. A curva experimental pode ser fitada com a equação 5.10, curva pontilhada da figura. O ajuste teórico da curva nos fornece os valores dos parâmetros $K = (1,4 \pm 0,4) \times 10^5 M^{-1}$ e $n = 2,35 \pm 0,15$ para o EtBr, sendo o erro determinado pelo próprio ajuste.

da curva foi obtido usando uma determinada concentração do brometo de etídio. A curva experimental pode ser fitada com a equação 5.10 (curva pontilhada da figura 5.4). O ajuste teórico da curva nos fornece os valores dos parâmetros $K = (1,4 \pm 0,4) \times 10^5 M^{-1}$ e $n = 2,35 \pm 0,15$ para o EtBr, sendo o erro determinado pelo próprio ajuste. O valor obtido para a constante de ligação intrínseca K_i encontra-se em razoável concordância com os dados reportados em [40]. Da mesma forma, o valor obtido para o parâmetro de exclusão n estão em concordância com o valor encontrado anteriormente nesta seção de $n = 2,5$ para o brometo de etídio e com o valor $n = 2,01$ reportado na literatura [38].

Portanto, observamos que os comprimentos de persistência, tanto do complexo DNA-EtBr quanto do DNA-daunomicina, apresentam comportamentos semelhantes. O comprimento de persistência A cresce inicialmente até atingir um valor máximo

para uma determinada concentração crítica do fármaco. Logo após esta concentração crítica, observamos uma queda abrupta do comprimento de persistência. Para concentrações superiores, o valor de A permanece constante. O comprimento de contorno, neste mesmo intervalo de concentração, não exibe nenhuma mudança abrupta em seu comportamento, indicando que a transição observada no comprimento de persistência não é um artifício experimental.

A concentração crítica em que ocorre a queda abrupta no comprimento de contorno é diferente para cada um dos intercalantes. Este resultado é esperado, uma vez que cada um dos fármacos apresenta propriedades de intercalação diferentes. Uma das características dos intercalantes é causar um desenrolamento à dupla-hélice conforme vimos na seção 2.4. O desenrolamento causado à dupla-hélice pelo EtBr é 1,7 vezes maior que o desenrolamento causado pela daunomicina. Portanto, espera-se que a transição *helix-coil* aconteça para uma concentração menor do fármaco para a mesma concentração de DNA utilizada. Este resultado é observado em nossos experimentos, como mostram as figuras 5.1 e 5.2. O comprimento de persistência cresce mais rapidamente para o EtBr. A concentração crítica para o EtBr é de $C^c_{EtBr} = 3,1\mu M$, enquanto que para a daunomicina, este valor é $C^c_{Dau} = 18,3\mu M$. Observamos que o comprimento de persistência máximo atingido também é diferente para cada um dos fármacos utilizados. A daunomicina alcança um valor máximo de $A \sim 280nm$, enquanto que para o EtBr o máximo é $A \sim 150nm$ nas respectivas concentrações críticas. Este fato talvez se deva à competição entre os dois efeitos causados pelos fármacos. Enquanto o número de moléculas intercaladas aumenta o valor de A, o ângulo desenrolado por cada molécula causa uma diminuição no valor do comprimento de persistência. Esta transição abrupta também pode estar sendo causada devido às diferentes formas de intercalação dos fármacos à dupla-hélice do DNA. Se este fato for verdadeiro, deveríamos observar uma mudança no comprimento de persistência do DNA para concentrações superiores. De fato, valores encontrados na literatura mostram mudanças no comprimento de persistência. Estes valores foram obtidos para razões C_T/C_{bp} muito superiores ao intervalo de concentrações utilizado em nossos experimentos. É possível que esta transição não tenha sido observada antes devido ao intervalo de concentração C_T/C_{bp} ser muito superior, na maior parte dos experimentos.

Capítulo 6

Conclusões

Neste trabalho foi feito um estudo sistemático dos efeitos da concentração dos fármacos sobre a molécula de DNA. Observa-se que para determinada concentração ocorre uma transição estrutural na dupla-hélice. Esse mesmo efeito é observado tanto para o brometo de etídio quanto para a daunomicina, indicando uma característica recorrente destes intercalantes. Vários trabalhos na literatura reportam mudanças no comprimento de persistência de acordo com determinada concentração de um fármaco. Mas ainda não haviam sido feitos estudos detalhados da relação entre a concentração do fármaco e o efeito causado. Observamos que o comprimento de persistência dos complexos DNA-fármacos aumentam de maneira significativa com o aumento da concentração do fármaco até atingir um valor crítico. Acima deste valor crítico o comprimento de persistência decai abruptamente e permanece aproximadamente constante para concentrações superiores do fármaco. Este resultado sugere que a transição abrupta observada possa ser devido a uma transição *helix-coil* ou desnaturação da molécula de DNA. O comprimento de contorno da molécula aumenta monotonicamente e atinge um ponto máximo que permanece constante com o aumento da concentração do fármaco. O modelo de exclusão de pares coincide com os nossos resultados para a concentração total de fármaco como função do aumento relativo do comprimento de contorno. Nossas futuras pesquisas visam formular um modelo que explique a dinâmica do processo de interação do DNA com essas substâncias. Além disso, pretendemos realizar experimentos com outros tipos de substâncias que, assim como a daunomicina, são amplamente importantes no desenvolvimento de novas terapias para o tratamentos de doenças carcinogênicas.

Apêndice A

Artigo

Neste apêndice enconta-se anexado o artigo publicado na revista *Journal of Chemical Physics* pela autora durante o período de realização do mestrado.

THE JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS **127**, 105108 (2007)

Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules

M. S. Rocha, M. C. Ferreira, and O. N. Mesquita
Departamento de Física, ICEx, Universidade Federal de Minas Gerais, Caixa Postal 702, Belo Horizonte, CEP 31270-901 Minas Gerais, Brazil

(Received 29 December 2006; accepted 12 July 2007; published online 13 September 2007)

We use optical tweezers to perform stretching experiments on DNA molecules when interacting with the drugs daunomycin and ethidium bromide, which intercalate the DNA molecule. Our results show that the persistence length of the DNA-drug complexes increases strongly as the drug concentration increases up to some critical value. Above this critical value, the persistence length decreases abruptly and remains approximately constant for larger drug concentrations, at least in the concentration range used in our experiments. Measured intercalators critical concentrations for the persistence length transition coincide with the reported values for the helix-coil transition of DNA-drug complexes obtained from sedimentation experiments. The contour length of the molecules increases monotonically and saturates as the drug concentration increases. The neighbor exclusion model fits to our results for the total drug concentration as a function of the relative increase of the contour length. © *2007 American Institute of Physics*. [DOI: 10.1063/1.2768945]

I. INTRODUCTION

DNA-drug interactions have been much studied for the past years. An important motivation for these studies is the fact that many of the studied drugs are used for treatment of human diseases, particularly, in cancer chemotherapy.

Single molecule stretching experiments using optical tweezers have yielded a great amount of information about DNA-protein and DNA-drug interactions.[1–6]

Recently, we studied the interaction between psoralen and DNA when illuminated with ultraviolet light A (UVA). Psoralen is a drug used to treat some skin diseases, such as psoriasis and vitiligo. This drug intercalates the DNA molecule and can form covalent linkages with the thymines if the complex is illuminated with ultraviolet light, modifying drastically its elasticity and impeding the DNA replication and transcription. The persistence length of the DNA-psoralen complexes formed after UVA illumination was measured in Ref. 7.

Daunomycin and ethidium bromide (EtBr) are other examples of drugs which intercalate the DNA molecule and can modify its elasticity, depending on the drug concentration. Both drugs unwind the DNA double helix when intercalating.[8] Daunomycin is an anthracycline antibiotic used in the treatment of various cancers. It inhibits DNA replication and transcription when intercalating, impeding cell duplication.[9] Ethidium bromide (EtBr) is commonly used as a nonradioactive marker for identifying and visualizing nucleic acid bands in electrophoresis and in other methods of nucleic acid separation.

Several works have reported different results for the effects of these drugs on the entropic elasticity of DNA molecules. In those works, the measured parameter used to study elasticity modifications is the persistence length of the DNA-drug complex. Smith *et al.*[2] reported that ethidium bromide does not modify the elasticity of the DNA molecule; it only increases its contour length by ~40%. Tessmer *et al.*[10] reported that ethidium bromide causes a large increase in the contour length and a decrease in the persistence length of the complex for 1 μM of the drug, and at lower concentrations, an increase in both persistence and contour lengths. Sischka *et al.*[11] reported the value of 28.1 nm for the persistence length of DNA-daunomycin complexes and 20.7 nm for DNA-EtBr complexes, smaller than the bare DNA persistence length of about 50 nm. The authors in this work have used a concentration of 1 μM for both drugs, and a DNA concentration of 15 pM. Recently, Vladescu *et al.*[12] reported the value of 5.7 nm for the persistence length of highly saturated DNA-EtBr complexes. In the present work, in order to clearly establish the effect of these intercalating drugs on the persistence length of the DNA complexes, we performed stretching experiments at various drug concentrations, from zero up to saturation of the complexes. We show that the values obtained for the persistence length depend strongly on the concentration ratio between drug and DNA base pairs. Our results show that the persistence length of the complexes increases as we increase the drug concentration until certain critical concentration is reached. Above this critical concentration the persistence length decreases abruptly and remains practically constant for larger drug concentrations.

II. EXPERIMENTAL PROCEDURE

To measure the persistence and contour length of DNA molecules and DNA-drug complexes, we use optical tweezers[1–6] and intensity autocorrelation spectroscopy.[13]

The samples consist of λ-DNA molecules in a phosphate buffered saline *p*H 7.4 with [NaCl]=140 mM solution. We attach one end of the molecule to a microscope coverslip, and the other end is attached to a polystyrene bead. To do this, we use the procedure described in Ref. 14. The DNA concentration used in all experiments was C_{DNA}

 © 2007 American Institute of Physics

Downloaded 14 Sep 2007 to 150.164.12.179. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jcp.aip.org/jcp/copyright.jsp

=6.81 μg/ml, which corresponds to a base pairs concentration of C_{bp}=11 μM. In the procedure used to prepare the samples, only 5%–10% of DNA attach simultaneously both to the coverslip and to one bead (this is the condition that we needed to perform the measurements). The sample is always prepared with bare DNAs and incubated for ~12 h. The drug is added to the sample after this time and we waited for at least 1 h to start the measurements. The concentration of free DNA in the solution (which is not attached at least to one bead or to the coverslip) is very low, since the incubation time is very long.

Our optical tweezers is mounted in a Nikon TE300 microscope with an infinite corrected objective (100×, numerical aperture=1.4). The trapping laser is an infrared (IR) laser with λ=832 nm (SDL, 5422-H1). The optical tweezers is used to trap a polystyrene bead of 2.8 μm diameter attached to the end of the DNA molecule, so we can manipulate and stretch the DNA molecule.

In addition, we use a He–Ne laser (λ=632.8 nm) as the scattering probe. The backscattered light by the polystyrene bead is collected by a photodetector, which delivers pulses to a digital correlator. We, then, obtain the autocorrelation function of the backscattered light, which allows us to determine the stiffness of the optical trap, due to the Brownian motion of the trapped bead.

The next step in the experimental procedure is to obtain the force versus extension curves for the DNA molecules and DNA-drug complexes. To do this, we use the optical tweezers to trap the bead with the DNA while pulling the microscope slide, stretching the DNA. The backscattered light is collected over time while stretching the DNA. From the backscattered light intensity, one obtains the displacement of the trapped bead in relation to its equilibrium position, and by multiplying it by the tweezers' stiffness, the force exerted by the DNA molecule while it is stretched is obtained. The DNA extension is obtained knowing the pulling velocity of the coverslip (58 nm/s). This velocity is low enough to guarantee that the DNA passes through equilibrium configurations and low enough such that the Stokes force on the bead is negligible. Therefore, we transform time from the data into absolute extension along the x axis (parallel to the coverslip), which we call x_{DNA}. This procedure is done for all measurements, even on repeated measurements with the same molecule. The bead center is maintained at a fixed distance (h =3.5 μm) from the coverslip during all measurements. The end-to-end distance z of the DNA molecule is related to x_{DNA} by $z=\sqrt{x_{DNA}^2+h^2}$.

Finally, with the force versus extension curves, we use the approximate expression derived by Marko and Siggia[15] [Eq. (1)] to obtain the persistence and contour length of the DNA molecules and DNA-drug complexes,

$$F_x = \frac{k_B T}{A}\left[\frac{\sqrt{x_{DNA}^2+h^2}}{L} + \frac{1}{4[1-(\sqrt{x_{DNA}^2+h^2})/L]} - \frac{1}{4}\right] \times \frac{x_{DNA}}{\sqrt{x_{DNA}^2+h^2}}, \quad (1)$$

where F_x is the x component of the force, k_B is the Boltzmann constant, T is the absolute temperature, A is the DNA persistence length, L is the DNA contour length, x_{DNA} is the projection of DNA molecule end-to-end distance along the x axis (parallel to the coverslip), and h is the height of the bead relative to the coverslip (distance between the center of the bead and the coverslip). The height is fixed in all experiments at h=3.5 μm, and we measure x_{DNA}.

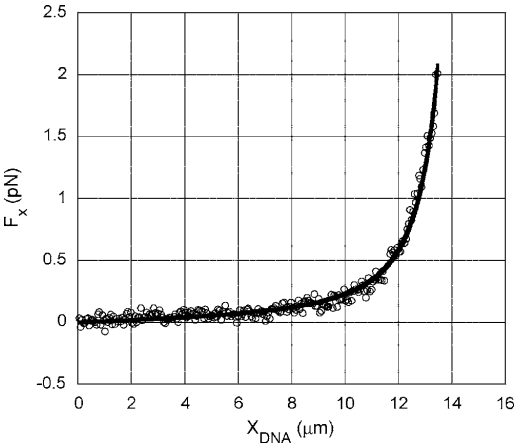

FIG. 1. Force as a function of extension for a drug-free DNA molecule. By fitting this curve to Eq. (1), we determine the persistence length A =49.9 nm and the contour length L=15.5 μm for this particular λ-DNA.

The details about our experimental setup and experimental procedure can be found in Refs. 7 and 13.

Figure 1 is a typical force versus extension curve obtained with this procedure, for a bare DNA molecule. By fitting this curve with Eq. (1), we extract the persistence length and the contour length for the λ-DNA. For the particular DNA molecule shown in Fig. 1, we find A=49.9 nm and L=15.5 μm.

Observe that we limit the range of forces used to $\lesssim$2 pN. We have limited our measurements to low forces because higher forces may change the chemical equilibrium of the DNA-drug complex. Also, lower forces avoids enthalpic effects which are not taken into account in Eq. (1). To show that the forces used in our experiments are sufficient for determining the persistence length, we repeat several times the measurement of the persistence length for a single bare DNA molecule over time. The values obtained in several different runs and different DNAs are A=50±3 nm and L =16.5±1 μm. These values correspond to the well-known values reported in the literature.[3,16,17] This result indicates the accuracy of our method, and shows that the experimental apparatus do not exhibit significant drifts.

To determine the error bars of both persistence and contour lengths, we use the following procedure. We first perform five measurements (different force×extension curves) with the same DNA molecule (or DNA-drug complex). The data of these curves are summed and averaged to a single curve for this complex. The fit to Eq. (1) then gives the values of both A and L for the complex, as in Fig. 1 for a bare DNA. We then repeat the same procedure for five dif-

Downloaded 14 Sep 2007 to 150.164.12.179. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jcp.aip.org/jcp/copyright.jsp

ferent complexes, obtaining the values for both A and L for each complex. The presented values of A and L are averages over the different values obtained for each complex. We then determine the error bars by calculating the standard deviation from the mean value. The variability of L for different complexes is relatively large, but the resulting A varies very little, indicating that L and A are little correlated for $L \gg A$. This fact occurs because the contour length of bare λ-DNA molecules is not always 16.5 μm. Performing several measurements, one can find different results around this value. Such distribution of contour length values was also observed by Mihailovic *et al.*[18]

III. RESULTS

In this section we show the results obtained for the two drugs used: daunomycin and ethidium bromide.

A. Daunomycin

We have performed experiments with DNA-daunomycin complexes for several drug concentrations. In Fig. 2(a) we show the persistence length (A) of the complexes as a function of total daunomycin concentration (C_D) for fixed DNA base pair concentration of $C_{bp}=11$ μM. We denote by C_D the total daunomycin concentration used to prepare the sample, which is the sum of both the bounded to DNA and the free drug concentration in the solution.

The point which the drug concentration is zero corresponds to the drug-free DNA situation with $A=50\pm3$ nm.

The behavior of the persistence length A as a function of daunomycin concentration C_D can be described as follows: it initially increases with C_D until it reaches a maximum value (~280 nm) at the critical concentration $C_D^{\text{critical}}=18.3$ μM. Then, it decays abruptly to around 75 nm and remains approximately constant at this value for the concentration range used.

The contour length, otherwise, increases monotonically from 16.5 ± 1 μm up to the saturation value of 21 ± 1.8 μm. In Fig. 2(b) we plot the corresponding values of the contour length of the same DNA-drug complexes of Fig. 2(a) as a function of the total drug concentration C_D. As we have pointed out in Sec. II, the error bars of the contour length are relatively large as a consequence of the contour length distribution around 16.5 μm.[18]

In addition, we can estimate the exclusion parameter n (number of total base pairs divided by the number of total intercalated drug molecules) from our experimental data. The average value of the contour length for DNA-daunomycin complexes obtained when using a saturated concentration of the drug increases about 27% relative to drug-free DNA contour length (16.5 μm). This means that when all possible drug molecules are intercalated, the DNA increases its contour length by 4.5 μm. Knowing that each intercalated daunomycin molecule increases the contour length of the complex by 0.31 nm,[8] we determine the total number of intercalated daunomycin molecules, which is around 14 500. Finally, the exclusion parameter can be obtained by dividing the number of base pairs of the λ-DNA (48 500) by the number of total intercalated drug molecules (14 500). We obtain $n=3.3$, which is in good agreement with the value of 3.5 reported in Ref. 9.

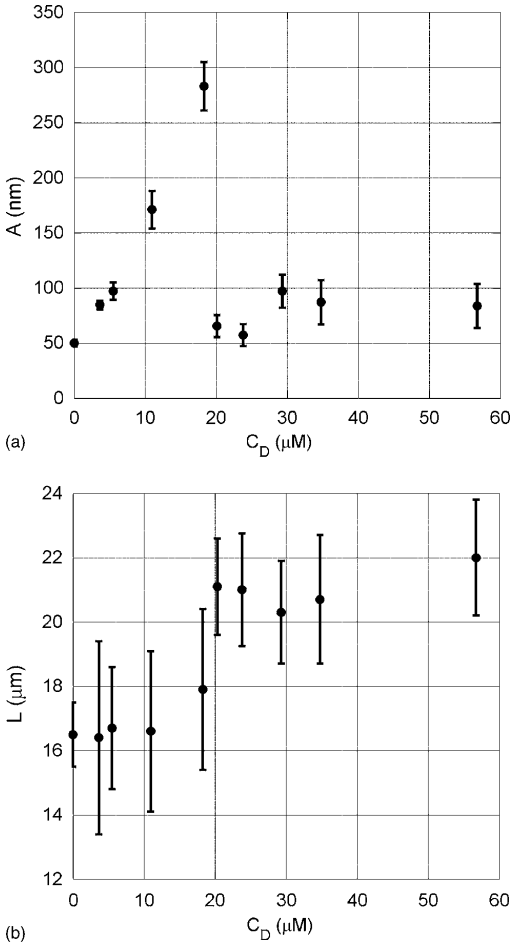

FIG. 2. (a) Persistence length A of DNA-daunomycin complexes as a function of drug concentration for fixed DNA concentration ($C_{bp}=11$ μM). A initially increases with C_D until it reaches a maximum value (~280 nm) at the critical concentration $C_D^{\text{critical}}=18.3$ μM. Then, the persistence length decays abruptly to around 75 nm and remains approximately constant at this value for the concentration range used. (b) Corresponding contour lengths L of the DNA-daunomycin complexes shown in Fig. 2(a) as a function of drug concentration. L increases monotonically with C_D up to the saturation value of 21 ± 1.8 μm.

For comparison purposes, Fig. 3(a) shows three force versus extension curves (normalized by the contour length) for a bare DNA and two different daunomycin concentrations, before and after the transition. The data points in this figure are smoothed out. The purpose of this smoothing process is only to diminish the Brownian fluctuations, and therefore, to make the data easier and clearer to visualize in a plot. This process is done using the smooth routine of the software KALEIDA GRAPH (Synergy Software). We emphasize, however, that all fittings and values for A and L are obtained

Downloaded 14 Sep 2007 to 150.164.12.179. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jcp.aip.org/jcp/copyright.jsp

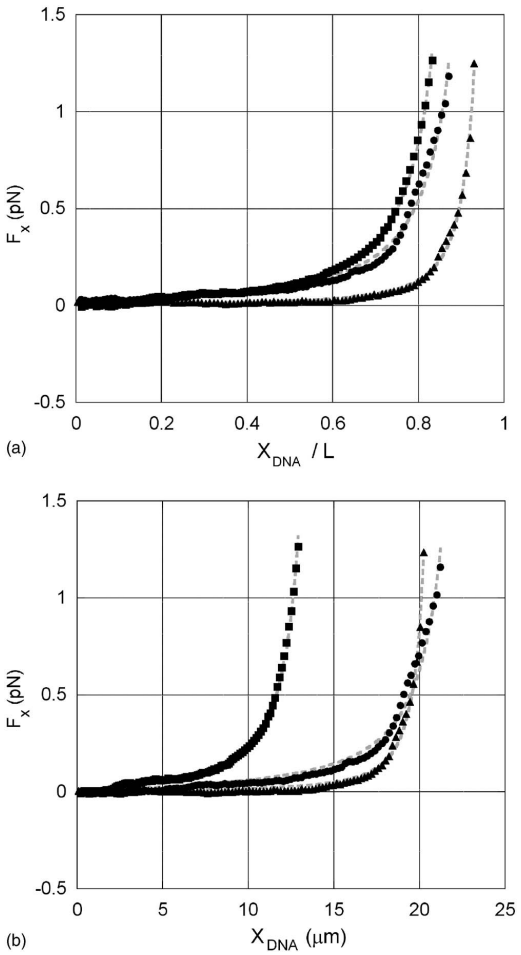

FIG. 3. (a) Force vs extension curves (normalized by the contour length) for a bare DNA molecule and two DNA-daunomycin complexes with different concentrations. The Brownian fluctuations are averaged out for better visualization of the data using a smoothing routine. (b) The same curves of Fig. 3(a) (unscaled). Squares: bare DNA; circles: C_D=20.1 μM (above the critical concentration) and $A\sim$61 nm; triangles: C_D=18.3 μM and $A\sim$263 nm. Dashed lines are fittings using Eq. (1).

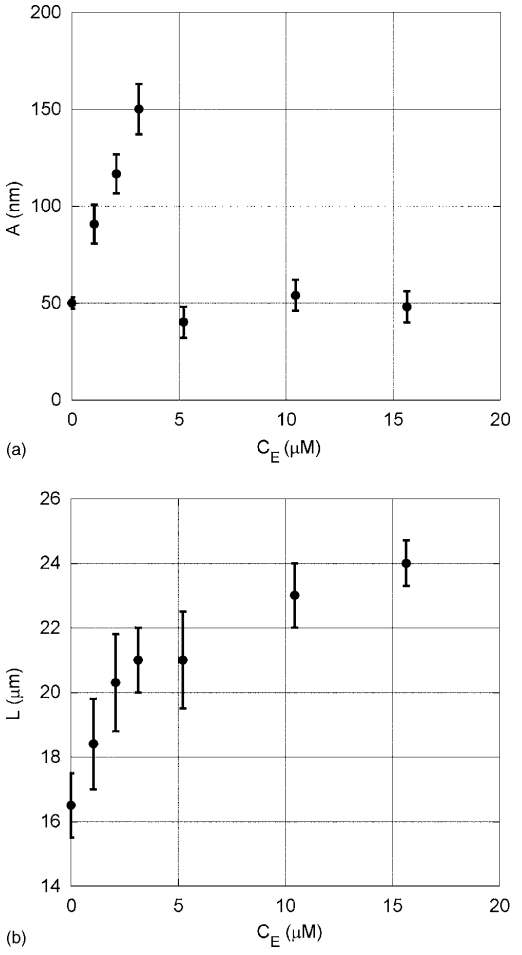

FIG. 4. (a) Persistence length of DNA-EtBr complexes as a function of drug concentration for fixed DNA concentration (C_{bp}=11 μM). In this case, the transition occurs at a lower drug concentration. The maximum value measured for the persistence length of DNA-EtBr complexes is ~150 nm, at the critical concentration $C_E^{critical}$=3.1 μM. (b) Corresponding contour lengths L of the DNA-EtBr complexes shown in Fig. 4(a) as a function of drug concentration. L increases monotonically with C_E up to the saturation value of 23±1 μm.

from the raw data. Figure 3(b) shows the same curves unscaled. In general smoothed data for lower drug concentrations (smaller than the critical concentration) fit better to Eq. (1) than the data for higher drug concentration, as can be seen in Figs. 3(a) and 3(b).

B. Ethidium bromide (EtBr)

The behavior of the persistence length as a function of the drug concentration for DNA-EtBr complexes is very similar to the DNA-daunomycin complexes. The difference is that in this case the transition occurs at a lower drug concentration [see Fig. 4(a)] for the same DNA base pair concentration C_{bp}=11 μM. The maximum value measured for the persistence length of DNA-EtBr complexes is ~150 nm, at the critical concentration $C_E^{critical}$=3.1 μM.

The contour length again increases monotonically from 16.5±1 μm up to the saturation value of 23±1 μm. In Fig. 4(b) we plot the corresponding values of the contour length of the same DNA-drug complexes of Fig. 4(a) as a function of total drug concentration C_E.

Repeating the same calculation for the exclusion parameter of EtBr, which increases the DNA contour length by 0.34 nm per intercalated molecule,[11] we obtain n=2.5, which is in reasonable agreement with the value of 2.01 reported in Ref. 19. In Sec. III C we will show a better estimation for n.

Downloaded 14 Sep 2007 to 150.164.12.179. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jcp.aip.org/jcp/copyright.jsp

C. Equilibrium binding constants

In our experiments we control the total drug concentration C_T and the total concentration of DNA base pairs C_{bp}. To discuss the elastic properties of the DNA complex formed the important parameter to consider is the ratio r between the concentration of bounded drug (C_b) per concentration of DNA base pairs (C_{bp}). In order to obtain r, the binding of molecules to DNA is analyzed using the neighbor exclusion model.[9] A closed form for this model was obtained by McGhee and von Hippel[20] and can be expressed by the equation

$$\frac{r}{C_f} = K_i(1-nr)\left[\frac{1-nr}{1-(n-1)r}\right]^{n-1} \tag{2}$$

where r is the ratio between the concentration of bounded drug (C_b) per concentration of DNA base pairs (C_{bp}), C_f is the concentration of free drug (not bounded), K_i is the intrinsic binding constant, and n is the exclusion parameter in base pairs. For a more detailed discussion about the neighbor exclusion model, see Ref. 20.

The concentration of free drug (C_f) can be simply related to the concentration of bounded drug (C_b) and the total drug concentration (C_T) through the equation

$$C_T = C_f + C_b. \tag{3}$$

Using Eqs. (2) and (3) with the determined exclusion parameter $(n=3.3)$, the intrinsic binding constant reported in Ref. 9 for daunomycin, $K_i = 7\times 10^5 M^{-1}$, the critical daunomycin concentration measured in this work $(C_D^{\text{critical}} = 18.3\ \mu\text{M})$, and the concentration of DNA base pair used in our experiments $(C_{bp}=11\ \mu\text{M})$, we can determine the critical ratio r_c, which we define as the value of r at the abrupt transition for the value of the persistence length. We then obtain the value $r_c = 0.248$.

Similarly, for EtBr, we use the parameters $n=2.5$, $K_i = 1.5\times 10^5 M^{-1}$,[21] and $C_E^{\text{critical}} = 3.1\ \mu\text{M}$ determined again from the abrupt change in persistence length. We obtain $r_c = 0.131$. In Sec. III D we compare the values obtained for r_c with those reported in the literature for a sedimentation experiment.

It is important to mention that K_i varies with the ionic strength of the solution. The values used here are the values for the ionic concentrations used in our experiments.

To study the variation of the contour length of the DNA-drug complexes when increasing the drug concentration, we plot the total EtBr concentration C_E as a function of the relative increase of the contour length $\Delta L/L_0$ for DNA-EtBr complexes (Fig. 5), where L_0 is the contour length for bare DNA molecules $(16.5\pm 1\ \mu\text{m})$. Observe that this curve does not exhibit any abrupt changes, indicating that the abrupt change of the persistence length [Fig. 2(a)] is not an artifact.

The relative increase of the contour length $(\Delta L/L_0 \equiv \ell)$ can be related to the parameter $r = C_b/C_{bp}$ from Eq. (2). To do this, we write $L_0 = N_{bp}\Delta$, where N_{bp} is the number of base pairs and Δ is the distance between two consecutive base pairs. For the bare λ-DNA, we have $N_{bp} = 48\,500$ and $\Delta = L_0/N_{bp} = 0.34$ nm. When N_b drug molecules intercalate the λ-DNA, the final resulting contour length can be written as

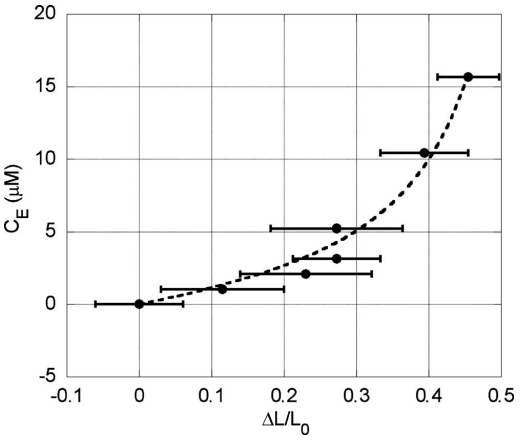

FIG. 5. Total drug concentration C_E as a function of relative increase of the contour length $\Delta L/L_0$ for DNA-EtBr complexes. Fitting this curve to the neighbor exclusion model (dashed line), Eq. (4), we determine the intrinsic binding constant $K_i = (1.4\pm 0.4)\times 10^5 M^{-1}$ and the exclusion parameter $n = 2.35\pm 0.15$.

$L = L_0 + N_b\delta$, where δ is the increase of the contour length caused by each intercalated molecule. From the literature, we know that $\delta = 0.34$ nm for EtBr (Ref. 11) and $\delta = 0.31$ nm for daunomycin.[8] We can then write $\ell = N_b\delta/N_{bp}\Delta$. The parameter r can be written as $r = C_b/C_{bp} = N_b M_b/N_{bp}M_{bp}$, where M_b and M_{bp} are, respectively, the molar weight of the drug and of a base pair. Finally, we can write $N_b/N_{bp} = rM_{bp}/M_b$ and $\ell = rM_{bp}\delta/M_b\Delta$. Defining $\gamma = M_{bp}\delta/M_b\Delta$ we write $r = \ell/\gamma$. Using $M_b = 394.3$ g/mol for EtBr, $M_b = 564$ g/mol for daunomycin, and $M_{bp} = 646.4$ g/mol, we determine $\gamma = 1.64$ for EtBr and $\gamma = 1.04$ for daunomycin.

Using Eqs. (2) and (3) and $r = \ell/\gamma$, one can show that

$$C_T = \frac{C_{bp}}{\gamma}\ell + \frac{\ell(\gamma - n\ell + \ell)^{n-1}}{K_i(\gamma - n\ell)^n}. \tag{4}$$

Since $C_{bp} = 11\ \mu\text{M}$ and $\gamma = 1.64$ for EtBr, we fit the data of Fig. 5 to Eq. (4) with two free parameters: K_i and n. From this fit (dashed line in Fig. 5), we determine the intrinsic binding constant K_i and the exclusion parameter n. We have found the values $K_i = (1.4\pm 0.4)\times 10^5 M^{-1}$ and $n = 2.35\pm 0.15$ for EtBr, where the error bars are given by the fit. The value determined for K_i is in good agreement with the result from Gaugain *et al.*[21] The value determined for n is in good agreement with the value estimated in Sec. III B, and in reasonable agreement with the value of 2.01 reported in Ref. 19.

For DNA-daunomycin complexes, we find similar results. The values of K_i and n determined from the fit to Eq. (4) are, however, affected by large error bars.

D. Interpretation and discussion of the results

For low drug concentrations, drug intercalation in the DNA molecule increases the rigidity of the complex [see Figs. 2(a) and 4(a)]. This is consistent with the results of Vladescu *et al.*,[22] which shows that EtBr stabilizes the DNA double helix for low drug concentrations. They have per-

Downloaded 14 Sep 2007 to 150.164.12.179. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jcp.aip.org/jcp/copyright.jsp

formed melting experiments with various EtBr concentrations, from 0 to 2.5 μM, showing that EtBr intercalation stabilizes the DNA double helix in this concentration range. Therefore, we expect an increase of the persistence length of DNA-drug complexes in this low concentration range, in agreement with our data. Figure 4(a) shows this increase for EtBr, and Fig. 2(a) shows similar result for daunomycin.

For high drug concentrations, i.e., above the critical concentration [peak of Figs. 2(a) and 4(a)], the persistence length of the complexes decays abruptly and remains approximately constant in the concentration range studied.

It is well known that intercalation unwinds the DNA double helix.[8] Due to unwinding and above some drug critical concentration, the complexes can have a helix-coil transition, which can cause DNA denaturing as the DNA is stretched, decreasing the persistence length of DNA-drug complexes, as seen in Figs. 2(a) and 4(a). The unwinding angle per intercalated EtBr drug molecule is approximately 1.7 times greater than that for daunomycin intercalation.[8] Therefore, we expect that the transition occurs for EtBr at a lower drug concentration as compared with daunomycin, if the same DNA concentration is used. This is confirmed experimentally in our data of Figs. 2(a) and 4(a). The persistence length of DNA-EtBr complexes increases more rapidly with concentration than the DNA-daunomycin complexes. This behavior reflects the fact that EtBr is the stronger intercalator. The maximum value reached for the persistence length, however, is greater for DNA-daunomycin complexes. This might be explained assuming that the maximum value obtained for the persistence length depends on the competition between two effects caused by the intercalator. While the number of intercalated molecules increases the value of A, the angle unwound by each intercalated molecules may decrease it.

Sedimentation experiments performed with circular DNA as a function of daunomycin and ethidium bromide concentrations display a minimum in the sedimentation coefficient S_{20} at r_c=0.192, for daunomycin and r_c=0.114 for ethidium bromide.[8] The minimum in the sedimentation coefficient S_{20} is associated with a helix-coil transition, due to unwinding of the DNA double helix by the intercalating drugs.[8] These numbers agree within 15%–30% with the values of r_c determined from our DNA persistence length measurements. This indicates that the abrupt change of the DNA persistence length for both drugs might be also caused by a helix-coil transition due to the unwinding of the DNA double helix as the drugs intercalate into it.

In addition, it is known that EtBr (and also most intercalating drugs) exhibits multimodality at their interaction with DNA.[23,24] The kind of interaction varies with the drug concentration. The abrupt transition shown in Figs. 2(a) and 4(a) might as well be caused by different ways of drug binding to DNA. If this is true, we should see a variation on the persistence length of the complex for concentrations above the critical value. In our data [Figs. 2(a) and 4(a)], the persistence length appears to remain constant in the concentration range used, but perhaps it will not remain at this value if we continue to increase the drug concentration. This may explain the difference observed in our value of the persistence length at this concentration range and some values reported in the literature, while in most cases the ratio C_T/C_{bp} is much higher than our ratio for the critical concentration of the drugs.

The abrupt change in the persistence length observed here depends on the ratio used for the drug concentration and base pair concentration C_T/C_{bp}. In our experiments, we use a constant base pair concentration C_{bp}=11 μM to study the persistence length as a function of total drug concentration. However, if we change C_{bp}, we will get other values for the critical concentrations of each studied drug, because the binding depends on both DNA and drug concentrations.

In the works cited in the Introduction (Sec. I), for example, Smith *et al.*[2] use typical ratios C_T/C_{bp} from 0.403 to 8.07, which are above the critical ratio $C_E^{\mathrm{critical}}/C_{\mathrm{bp}}$=0.282 determined for DNA-EtBr complexes from our data, at the critical concentration. These authors report that EtBr does not modify the elasticity of the DNA molecule, only increasing its contour length by ~40%. Since their C_T/C_{bp} ratio is above the critical one, we can conclude that their results agree with ours because the value obtained for the persistence length of DNA-EtBr complexes above the critical concentration is very close to the value for bare DNA molecules. Also, the increase for the contour length determined from our data is about 39%, in agreement with Ref. 2. Tessmer *et al.*[10] use a C_T/C_{bp} ratio of ~169.5, while Sischka *et al.*[11] use a C_T/C_{bp} ratio of ~1.37 for DNA-EtBr complexes. In these two works, this ratio is well above the value at the critical concentration we measured, therefore, both groups worked at a concentration range above the critical transition. The values obtained for the persistence length in the two works are lower than those for the bare DNA, which suggest that A should decrease if we continue to increase the drug concentration in the region with concentrations greater than the critical one. Our data do not show this effect probably because we use a maximum concentration value of approximately three times the critical one for both drugs. Recently, Vladescu *et al.*[12] reported the value of 5.7 nm for the persistence length of saturated DNA-EtBr complexes. These authors work in a much higher force regime than ours (~100 pN) and use a much higher drug concentration. The results reported by these authors also indicate that A may decrease if we continue to increase the drug concentration above the critical one. Also, the values of A may depend on the force regime used to stretch the DNA molecules. The authors have shown in Ref. 12 that parameters such as the exclusion number n and the binding constant K_i depend on the force used to stretch the molecule. Then, it is reasonable to suppose that A also depend on the force used because the characteristics of the drug intercalation are changed.

In our work, we perform the experiments in a low-force regime (~2–3 pN), i.e., the values reported in our work correspond approximately to the zero-force intercalation situation.

Because most authors uses a C_T/C_{bp} ratio greater than the value determined from our data for the critical concentration, they have missed the transition of the persistence length which we report in this work.

Downloaded 14 Sep 2007 to 150.164.12.179. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jcp.aip.org/jcp/copyright.jsp

IV. CONCLUSION

We have made systematic measurements of the entropic elasticity variation of a λ-DNA molecule when interacting with two drugs, daunomycin and ethidium bromide, as a function of their concentrations. Our results show that the persistence length of the DNA-drug complexes increases strongly as the drug concentration increases, for low concentrations. Above certain critical drug concentration the persistence length decreases abruptly and remains approximately constant for the range of drug concentrations used above the critical concentration. This behavior is quite similar for both daunomycin and EtBr, as shown in Figs. 2(a) and 4(a). Our results suggests that the abrupt transition observed in the persistence length might be due to a helix-coil transition and denaturing of DNA-drug complexes above the critical concentration, resulting in a decrease of the persistence length. The measured results of the contour length for both DNA-drug complexes fits well to the neighbor exclusion model and do not exhibit any abrupt changes as the drug concentration is varied.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Brazilian agencies: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), FAPEMIG, FINEP-PRONEX, Instituto do Milênio de Nanotecnologia e Instituto do Milênio de Óptica Não-linear, and Fotônica e Biofotônica-MCT. One of the authors (M.S.R.) acknowledges support by LNLS.

[1] A. Ashkin, Phys. Rev. Lett. **24**, 156 (1970).
[2] S. B. Smith, L. Finzi, and C. Bustamante, Science **258**, 1122 (1992).
[3] M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, and S. M. Block, Biophys. J. **72**, 1335 (1997).
[4] G. V. Shivashankar, M. Feingold, O. Krichevsky, and A. Libchaber, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **96**, 7916 (1999).
[5] C. G. Baumann, V. A. Bloomfield, S. B. Smith, C. Bustamante, M. D. Wang, and S. M. Block, Biophys. J. **78**, 1965 (2000).
[6] D. G. Grier, Nature (London) **424**, 810 (2003).
[7] M. S. Rocha, N. B. Viana, and O. N. Mesquita, J. Chem. Phys. **121**, 9679 (2004).
[8] H. Fritzsche, H. Triebel, J. B. Chaires, N. Dattagupta, and D. M. Crothers, Biochemistry **21**, 3940 (1982).
[9] J. B. Chaires, N. Dattagupta, and D. M. Crothers, Biochemistry **21**, 3933 (1982).
[10] I. Tessmer, C. G. Baumann, G. M. Skinner, J. E. Molloy, J. G. Hoggett, S. J. B. Tendler, and S. Allen, J. Mod. Opt. **50**, 1627 (2003).
[11] A. Sischka, K. Toensing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Rios, and D. Anselmetti, Biophys. J. **88**, 404 (2005).
[12] I. D. Vladescu, M. J. McCauley, M. E. Nunez, I. Rouzina, and M. C. Williams, Nat. Methods **4**, 517 (2007).
[13] N. B. Viana, R. T. S. Freire, and O. N. Mesquita, Phys. Rev. E **65**, 041921 (2002).
[14] G. V. Shivashankar, G. Stolovitzky, and A. J. Libchaber, Appl. Phys. Lett. **73**, 291 (1998).
[15] J. F. Marko and E. D. Siggia, Macromolecules **28**, 8759 (1995).
[16] T. Strick, J. F. Allemand, V. Croquette, and D. Bensimon, Prog. Biophys. Mol. Biol. **74**, 115 (2000).
[17] J. C. Neto, R. Dickman, and O. N. Mesquita, Physica A **345**, 173 (2005).
[18] A. Mihailovic, I. Vladescu, M. McCauley, E. Ly, M. C. Williams, E. M. Spain, and M. E. Nunez, Langmuir **22**, 4699 (2006).
[19] J. E. Coury, L. McFail-Isom, L. D. Williams, and L. A. Bottomley, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **93**, 12283 (1996).
[20] J. D. McGhee and P. H. von Hippel, J. Mol. Biol. **86**, 469 (1974).
[21] B. Gaugain, J. Barbet, N. Capelle, B. P. Roques, and J. L. Pecq, Biochemistry **17**, 5078 (1978).
[22] I. D. Vladescu, M. J. McCauley, I. Rouzina, and M. C. Williams, Phys. Rev. Lett. **95**, 158102 (2005).
[23] P. O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, G. A. Manukyan, and A. T. Karapetyan, Exp. Mol. Med. **33**, 205 (2001).
[24] A. Arabzadeh, S. Z. Bathaie, H. Farsam, M. Amanlou, A. A. Saboury, A. Shockravi, and A. A. Moosavi-Movahedi, Int. J. Pharm. **237**, 47 (2002).

Downloaded 14 Sep 2007 to 150.164.12.179. Redistribution subject to AIP license or copyright, see http://jcp.aip.org/jcp/copyright.jsp

Referências Bibliográficas

[1] **J. D. Watson e F. H. C. Crick** 1953 The structure of DNA *Cold spring harbor symposia on quantitative biology* **18** 123-131

[2] **J. D. Watson e A. Berry** 2005 DNA O segredo da vida *Companhia das Letras*

[3] **F. Ritort** 2006 Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications *J. Phys.: Condens. Matter* **18** R531-R583

[4] **N. P. Sharova** 2005 How does a cell repair damaged DNA? *Biochemistry (Moscow)* **70** 275-291

[5] **A. O. Urrutia e L. D. Hurst** 2003 The signature of selection mediated by expression on human genes *Genome Research* **13** 2260-2264

[6] **E. Schroedinger** 1944 What is life? with Mind and Matter and Autobiographical Sketches *Cambridge University Press*

[7] **E. F. Keller** 2007 A clash of two cultures *Nature* **445** 603

[8] **U. Alon** 2007 Simplicity in biology *Nature* **446** 497

[9] **F. Ritort** 2005 Work fluctuations, second law and free energy recovery methods: perspectives in theory and experiments 2004 *Anée Mondiale de la Physique* Seminaire Poincare 193-226

[10] **C. Bustamante, J. Liphardt e F. Ritort** 2005 The nonequilibrium thermodynamics of small systems *Physics Today* **7** 43-48

[11] **L. H. Hurley** 2002 DNA and its associated processes as targets for cancer therapy *Nature* **2** 188-200

[12] **J. F. Marko** 1997 Stretching must twist DNA *Europhysics Letters* **38** 183-188

[13] **Xiaochun Shi e J. B. Chaires** 2006 Sequence and structural selective nucleic acid binding revealed by the melting of mixtures *Nucleic Acids Research* **34** 2

[14] **J. F. Marko e E. D. Siggia** 1995 Stretching DNA *Macromolecules* **28** 8759-8770

[15] **N. B. Viana, R. T. S. Freire e O. N. Mesquita** 2002 Dynamic light scattering from an optically trapped microsphere *Phys. Rev. E* **65** 041921

[16] **A. Zaha, H. Ferreira, A. Schrank e L. Passaglia** 2003 A estrutura dos Ácidos Nucléicos *Biologia Molecular Básica* **3** 33-58

[17] **D. G. Grier** 2003 A revolution in optical manipulation *Nature* **424** 810

[18] **C. G. Baumann, V. A. Bloomfield, S. B. Smith, C. Bustamante, M. D. Wang, Block SM** 2000 Stretching of single collapsed DNA molecules *Biophysical Journal* 78 (4) 1965-1978

[19] **G. V. Shivashankar, M. Feingold, O. Krichevsky, A. Libchaber** 1999 RecA polymerization on double-stranded DNA by using single-molecule manipulation: The role of ATP hydrolysis *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA* 96 (14) 7916-7921

[20] **M. D. Wang, H. Yin, R. Landick, J. Gelles, S. M. Block** 1997 Stretching DNA with optical tweezers *Biophysical Journal* 72 (3) 1335-1346

[21] **S. B. Smith, L. Finzi, C. Bustamante** 1992 Direct mechanical measurements of the elasticity of single DNA molecules by using magnetic beads *Science* 258 (5085) 1122-1126

[22] **A. Zaha, H. Ferreira, A. Schrank e L. Passaglia** 2003 A estrutura dos Ácidos Nucléicos *Biologia Molecular Básica* **3** 33-58

[23] **I. Rouzina, M. C. Williams e J. Wenner** Effect of on on the overstretching transition of double-stranded DNA: Evidence of force-induced DNA melting 2001 *Biophysical Journal* **80** (2) 874-881

[24] **I. Rouzina, M. C. Williams, J. Wenner e V. A. Bloomfield** 2001 DNA melting by mechanical force *Biophysical Journal* **80** (1) 338A-339A 1417

[25] **N. R. Cozzarelli, T.C. Boles e J. C. Wang** 1990 DNA topology and its biological effects *Cold Spring Harbor:Cold Spring Harbor Press* **4**

[26] **J. F. Marko e E. D. Siggia** 1995 Statistical mechanics of supercoiled DNA *Physical Review E* **52** 2912-2938

[27] **L. Oroszi, P. Galajda, H. Kirei, S. Bottka e P. Ormos** 2006 Direct measurement of torque in an optical trap and its application to double-strand DNA *Physical Review Letters* **97** (5) 058301

[28] **M. Doi, S. F. Edwards** The theory of polymer Dynamics 1986 *Oxford University Press, New York*

[29] **C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia e S. Smith** 1994 Entropic elasticity of λ-phage DNA *Science* **265** 1599

[30] **T. Strick, J.-F. Allemand, V. Croquette e D. Bensimon** 2000 Twisting and stretching single DNA molecules *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **74** 115-140

[31] **J. B. Chaires, N. Dattagupta e D. M. Crothers** 1982 Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyridonucleic acid: equilibrium binding studies on interaction of daunomycin with deoxyribonucleic acid *Biochemistry* **21** 3933-3940

[32] **A. T. Karapetian, N. M. Mehrabian, G. A. Terzikian, P. O. Vardevanian, A. P. Antonian, O. S. Borisova e M. D. Frank-Kamenetskii** 1996 *Journal of of Biomolecular Structure and Dynamics* **14** 275-283

[33] **J. D. McGhee e P. H. von Hippel** 1974 Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice *J. Mol. Biology* **86** 469-489

[34] **M. S. Rocha, N. B. Viana e O. N. Mesquita** 2004 DNA-Psoralen Interaction: A single molecule experiment *Journal of Chemical Physics* **121** 19 9679-9683

[35] **Ph. Wahl, J. Paoletti, J. -B. Le Pecq** 1970 Decay of fluorescence emission anisotropy of the ethidium bromide-DNA complex evidence for an internal motion of DNA *Proceedings of National Academy of Sciences* **65** 417-421

[36] **P.O. Vardevanyan, A. P. Antonyan, G. A. Manukyan e A. T. Karapetian** 2001 Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA *Experimental and Molecular Medicine* **33** 205-208

[37] **A. Sischka, K. Toensing, R. Eckel, S. D. Wilking, N. Sewald, R. Rios e D. Anselmetti** 2005 Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands *Biophysical Journal* **88** 404-411

[38] **J. E. Coury, L. McFail-Isom, L. D. Willians e L. A. Bottomley** 1996 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** 12283

[39] **H. Fritzsche, H. Tribel, J. B. Chaires, N. Dattagupta e D. M. Crothers** 1982 *Biochemistry* **21** 3940

[40] **B. Gaugain, J. Barbet, N. Capelle, B. P. Roques e J. L. Pecq** 1978 *Biochemistry* **17** 5078

[41] **J. B. Chaires, N. Dattagupta e D. M. Crothers** 1982 Self-association of daunomycin *Biochemistry* **21** 3927-3932

[42] **J. B. Chaires, N. Dattagupta, D. M. Crothers** 1985 Kinetics of the daunomycin-DNA interaction *Biochemistry* **24** 260-267

[43] **J. -F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bnsimon e V. Croquette** 1997 pH-Dependent specific binding and combing DNA *Biophysical Journal* **73** 2064-2070

[44] **A. Ashkin** 1970 Acceleration and trapping of particles by radiation pressure *Phys. Rev. Lett.* **24** 156

[45] **A. Ashkin** 1971 Optical levitation by radiation pressure *Appl. Phys. Lett.* **19** 283-85

[46] **A. Ashkin** 1978 Trapping of atoms by resonance radiation pressure *Phys. Rev. Lett.* **40** 729-32

[47] **A. Ashkin** 1980 Applications of Laser Radiation Presure *Science* **210** 4474

[48] **A. Ashkin e J. M. Dziedzic** 1975 Optical levitation of liquid drops by radiation pressure *Science* **187** 1073-75

[49] **A. Ashkin e J. M. Dziedzic** 1987 Optical levitationin high vacuum *Appl. Phys. Lett.* **28** 333-35

[50] **A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Björkholm e S. Chu** 1986 Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles *Opt. Lett.* **11** 288-90

[51] **A. Ashkin e J. M. Dziedzic** 1987 Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria *Science* **235** 1517

[52] **A. Ashkin, J. M. Dziedzic e Yamane** 1987 Optical trapping and manipulation of single cells using infrared laser beams *Nature* **330** 769

[53] **A. Ashkin** 1970 Atomic-beam deflection by resonance-radiation pressure *Phys. Rev. Lett.* **25** 1321

[54] **A. Ashkin** 1992 Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime *Biophys. J.* **61** 569

[55] **A. Ashkin** 1997 Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** 4853

[56] **K. Kohn** 1996 Beyond DNA cross-linking: History and prospects of DNA-targeted cancer treatment *Cancer Res.* bf 56 5533-5546

[57] **J. F. Marko** 1997 Stretching must twist DNA *Europhys. Lett.* **38** 183-188

[58] **M. S. Rocha e O. N. Mesquita** 2007 New tools to study biophysical properties of single molecules and single cells *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **79** 17-28

[59] **N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazolli, P. A. Maia Neto e H. M. Nussenzveig** 2006 Absolute calibration of optical tweezers *Appl. Phys. Lett.* **88** 131110

[60] **N. B. Viana, M. S. Rocha, O. N. Mesquita, A. Mazzoli, P. A. Maia Neto e H. M. Nussenzveig** 2007 Towards Absolute calibration of optical tweezers *Physical Review E* **75**

[61] **J. C. Neto, R. Dickman, O. N. Mesquita** 2005 Recoiling DNA molecule: simulation and experiment *Physica A* **345** 173

[62] **M. I. M. Feitosa e O. N. Mesquita** 1991 Wall-drag effect on diffusion of colloidal particles near surfaces: A photon correlation study *Phys. Rev. A* **44** 6677-6685

[63] **A. Mazolli** 2003 Tese de Doutorado UFRJ

[64] **N. B. Viana** 2002 Pinças Ópticas e Aplicações *Tese de Doutorado* UFMG

[65] **M. S. Rocha** 2004 Pinças Ópticas: Experimento e Teoria *Dissertação de Mestrado* UFMG

[66] **N. B. Viana, A. Mazzoli, e O. N. Mesquita** 2002 In situ measurement of laser power at the focus of a high numerical aperture objective using a microbolometer *Appl. Phys. Lett.* **81** 10 1765

[67] **M. S. Rocha, M. C. Ferreira, e O. N. Mesquita** 2007 Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules *The Journal of Chemical Physics* **127** 105108

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo