
**Estudo da interação DNA-ciclodextrina com a técnica
de pinçamento óptico com aplicação em terapia gênica**

Lívia Siman Gomes

Estudo da interação
DNA-ciclodextrina com a técnica
de pinçamento óptico com
aplicação em terapia gênica

Livia Siman Gomes

Orientador: Prof. Oscar Nassif de Mesquita

Co-orientador: Prof. Márcio Santos Rocha

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências – Física**.

Belo Horizonte

Março de 2009

Aos meus pais

Sumário

Agradecimentos	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
1 Introdução	1
2 Amostras	4
2.1 Terapia gênica e a ciclodextrina	4
2.2 DNA	10
2.2.1 A estrutura do DNA	10
2.2.2 O DNA como um polímero	18
3 Teoria de pinças ópticas e procedimento experimental	39
3.1 Pinça Óptica	39
3.1.1 Princípio de funcionamento da pinça óptica	40
3.2 Montagem Experimental	46
3.3 Preparação das amostras	49
3.4 Medidas Experimentais	52
4 Resultados e Discussão	63
4.1 Comportamento do comprimento de persistência do complexo DNA-CD	63
4.2 Descrição qualitativa dos resultados	66
4.3 Contribuição das repulsões interfosfatos para o comprimento de persistência do DNA	70

SUMÁRIO **vi**

4.4 Terapia gênica	72
Lista de Figuras	73
Lista de Tabelas	78
Referências Bibliográficas	79

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais pelos ensinamentos, apoio e carinho indispensáveis. Às minhas irmãs, pelo incentivo e principalmente pela ajuda na reta final. Aos amigos pelas farras, alegrias, conversas, apoio e principalmente pela compreensão durante meu mestrado. Aos meus amigos de trabalho pela prazerosa convivência. Ao meu co-orientador Márcio pelos ensinamentos no laboratório, à professora Mônica Cristina pela oportunidade e à Sônia pelos experimentos. Agradeço ao meu orientador, Oscar, pelos ensinamentos, confiança no meu trabalho e principalmente pela liberdade, o que tornaram possível a realização deste trabalho. Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa concedida e às outras agências de financiamento: FAPEMIG, Instituto Milênio de Nanotecnologia e Instituto Milênio de Óptica Não-Linear, Fotônica e Biofotônica.

Resumo

A terapia gênica consiste no tratamento de doenças baseado na transferência de DNA de células saudáveis para células defeituosas. Um dos métodos de transferência gênica possui como idéia básica construir lipossomas (vesículas lipídicas) e injetar no seu interior o DNA a ser transferido. No entanto, a quantidade de DNA puro possível de ser inserida em lipossomas de tamanho típico em torno de fração de micron é muito pequena. Uma solução para esse problema é formar complexos de DNA com fármacos que induzem a sua condensação e compactação sem que ele perca suas funções básicas. Nesta dissertação testamos a possibilidade do fármaco ciclodextrina (CD) em formar complexos com moléculas de DNA, visando uma condensação da molécula. O experimento consiste basicamente em promover estiramentos de moléculas únicas de DNA (no limite de forças entrópicas) usando pinçamento óptico e medir o comprimento de persistência da molécula de DNA puro e complexada com a CD. Realizamos medidas para diferentes concentrações de ciclodextrina e como resultado obtivemos curvas de força x extensão do complexo DNA-ciclodextrina. Analisamos estas curvas com o modelo Worm-Like Chain (WLC) de Marko e Siggia, que permite obter o comprimento de persistência, um parâmetro relacionado à rigidez da molécula. Verificamos um comportamento não usual para o comprimento de persistência do complexo em função da concentração de CD. Como resultado prático imediato chegamos, a partir dos nossos dados, a um valor ideal para a concentração de ciclodextrina a ser utilizada em terapia gênica. Este trabalho foi realizado em colaboração com a Professora Mônica Cristina de Oliveira da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Abstract

In one of the methods of gene therapy, DNA of normal cells are encapsulated inside liposomes (lipids vesicles) which are transferred by endocytosis into the unhealthy cells. However, the amount of pure DNA that may be absorbed by liposomes of typical dimensions of tenths of microns is small. One solution to this problem is to promote the condensation of the DNA by drugs in complexes DNA- drugs where the DNA keeps its functions of conserving and transferring genetic information.

The aim of the research described here was to test the formation of complexes of DNA with the drug cyclodextrin (CD). In our experiments single DNA molecules were stretched (in the limit of entropic forces) by optical tweezers and their length measured for several DNA- CD concentrations. The corresponding forces x extension curves were analyzed according to the Worm-Like Chain (WLC) model of Marko and Siggia to obtain the persistence lengths which is related to the DNA molecule rigidity. An unusual behavior for the persistence length as a function of CD concentration was obtained. As a practical outcome of this work is the prediction of the best CD concentration to be used in gene therapy.

This work was developed in collaboration with Dr. Mônica C. de Oliveira from the School of Pharmacy at UFMG.

Capítulo 1

Introdução

As células são as unidades funcionais básicas da vida. Sejam células únicas ou células integradas em comunidade (organismos), individualmente cada célula exerce um conjunto de atividades e apesar de existirem atividades particulares para cada tipo de célula, podemos afirmar que as todas células são semelhantes. A arquitetura interna principal das células também é semelhante já que a maioria possui um conjunto de estruturas quasipermanentes idêntico, várias dessas visíveis em microscópio óptico.

O tipo de célula mais simples e antiga é denominada procariota, que inclui a família das bactérias. Plantas, fungos e animais pertencem a um tipo de célula denominada eucariota. A presença do núcleo é uma característica das células eucariotas e é dentro dele que está contido todo o material genético celular. O material genético consiste basicamente de proteínas e de moléculas de DNA, sendo o DNA responsável por conservar e transferir toda a informação genética armazenada na célula. O DNA possui comprimentos que vão desde milímetros até metros e é armazenado em núcleos com tamanho da ordem de micrômetros. Isto impõe severas restrições sobre as propriedades elásticas do DNA, cujo estudo é um dos objetivos desta dissertação. Estas importantes características do DNA possibilitaram o surgimento de um novo tratamento contra uma vasta gama de doenças, denominado terapia gênica [1].

A terapia gênica é o tratamento de doenças baseado na transferência de material genético de células sadias para células defeituosas. Basicamente

ela consiste na inserção de genes funcionais em células com genes defeituosos, para substituir ou complementar os genes causadores de doenças. A maioria das tentativas clínicas de terapia gênica são para o tratamento de doenças adquiridas, como AIDS, câncer e doenças cardiovasculares, mais do que para doenças hereditárias como o mal Alzheimer e mal de Parkinson. A tecnologia básica envolvida em qualquer aplicação da terapia gênica é a transferência gênica. Esta transferência depende da introdução de genes (ou DNAs) saudáveis nas células doentes, permitindo que o gene defeituoso seja substituído, e conseqüentemente ocorra a restauração das funções normais da célula. A transferência de DNA vem sendo realizada utilizando vetores virais e não virais, sendo os não virais mais vantajosos. Os vetores não virais são basicamente vesículas lipídicas que transportam moléculas de DNA para dentro das células doentes. No entanto, devido ao tamanho do DNA em relação ao tamanho das vesículas, que possuem tamanho típico em torno de fração de microm, a quantidade de DNA puro possível de ser inserida nessas vesículas é muito pequena. Uma solução para esse problema é a possibilidade de se formar complexos de DNA com fármacos capazes de induzir a condensação e compactação do DNA, sem que ele perca suas funções básicas [2].

A motivação da minha dissertação foi testar a possibilidade do fármaco ciclodextrina (CD) em formar complexos com moléculas de DNA, visando uma condensação da molécula. O experimento realizado para testar esta interação consiste basicamente em promover estiramentos de moléculas únicas de DNA (no limite de forças entrópicas) usando pinçamento óptico e medir o comprimento de persistência da molécula de DNA puro e complexada com a CD. Realizamos medidas para diferentes concentrações de ciclodextrina e como resultado obtivemos curvas de força x extensão do complexo DNA-ciclodextrina. Analisamos estas curvas com o modelo Worm-Like Chain (WLC) de Marko e Siggia [3], que permite obter o comprimento de persistência que está relacionado à rigidez da molécula. Verificamos um comportamento não usual para o comprimento de persistência do complexo em função da concentração de CD, para o qual estamos criando uma teoria e cujos resultados preliminares estão contidos na dissertação. Como resultado prático imediato chegamos, a partir dos nossos dados, a um valor ideal para a concentração de ciclodextrina a ser utilizada em terapia gênica. Este trabalho

foi realizado em colaboração com a professora Mônica Cristina de Oliveira da Faculdade de Farmácia da UFMG.

A dissertação está organizada em cinco capítulos, a serem descritos a seguir:

Capítulo 1: Introdução

Capítulo 2: Amostras

Na primeira seção do capítulo irei discutir brevemente sobre terapia gênica e a ciclodextrina. Em seguida, na segunda seção, farei um revisão sobre a estrutura da molécula de DNA, bem como a interpretação deste como um polímero. Ao final irei expor o modelo Worm-Like Chain (WLC) de Marko e Siggia, utilizado para a análise dos nossos dados.

Capítulo 3: Teoria de pinças ópticas e procedimento experimental

Neste capítulo irei tratar exclusivamente da parte experimental do nosso estudo. Na primeira seção deste capítulo irei tratar da técnica de pinça óptica, focando principalmente no seu princípio de funcionamento. Na segunda seção irei narrar detalhadamente o arranjo experimental do nosso laboratório, bem como a preparação das amostras. A seguir, na seção de medidas experimentais, irei descrever como são realizados os nossos experimentos e o método de análise de dados utilizado.

Capítulo 4: Resultados e Discussões

Neste capítulo irei expor os resultados obtidos e as nossas interpretações dos dados. A parte de interpretações dos resultados ainda não está concluída, porém, apresento aqui os resultados preliminares. Por fim, chegaremos a um valor ideal para a concentração de ciclodextrina a ser utilizada em terapia gênica.

Capítulo 5: Conclusões e perspectivas

Capítulo 2

Amostras

2.1 Terapia gênica e a ciclodextrina

Terapia gênica é um procedimento médico que envolve a modificação genética de células como forma de tratar doenças. O procedimento foi originalmente direcionado para doenças hereditárias causadas normalmente por defeitos em um único gene*, como as hemofilias, distrofias musculares, Mal de Alzheimer, Mal de Parkinson, entre outras. Entretanto, a maioria dos experimentos atuais estão direcionados para o tratamento de doenças adquiridas como AIDS, câncer, entre outras.

O princípio da terapia gênica é introduzir no paciente portador de doenças os genes responsáveis por proteínas que poderão ser benéficas. Idealmente, teríamos a substituição do gene defeituoso por um gene normal. No entanto, a remoção de um gene defeituoso do organismo é muito difícil e desnecessário na maioria das vezes. O gene a ser introduzido, denominado gene de interesse ou transgene, é contido em uma molécula de DNA ou RNA que carrega ainda outros elementos genéticos importantes para a sua manutenção e expressão. As formas de transferência do transgene para o corpo são muito variadas e o processo é denominado transferência gênica.

O desenvolvimento de métodos seguros e eficientes de transferência gênica para células humanas é um dos pontos mais importantes na terapia gênica.

*Genes: seqüência de nucleotídeos do DNA que correspondem a proteínas.

Apesar do grande esforço dirigido na última década para o aperfeiçoamento dos protocolos de terapia gênica e dos avanços importantes na pesquisa básica, as aplicações terapêuticas da tecnologia de transferência genética continuam ainda em grande parte teóricas. Para maiores informações sobre a terapia gênica, sugiro as referências [1,2,4,5].

Transferência gênica

Transferência gênica é um termo que inclui todos os procedimentos que visam à entrada de algum material genético (na forma de DNA, RNA ou oligonucleotídeos) em células-alvo. Os agentes utilizados para esta entrada são conhecidos como vetores * que possuem características desejáveis, entre elas a capacidade de acomodação de um transgene de tamanho ilimitado, a baixa toxicidade e estabilidade para o material genético transportado.

Os métodos de transferência gênica são geralmente divididos em três categorias: métodos físicos (o transgene é introduzido de maneira mecânica nas células), métodos químicos (o vetor é uma substância de origem química) e métodos biológicos (emprego de organismos que naturalmente possuem capacidade de transferir material genético, como os vírus ou algumas bactérias). Na seção seguinte faremos uma breve discussão sobre um tipo específico de método químico, projetado a ser utilizado na terapia gênica para o tratamento de câncer de próstata.

Transferência gênica por métodos químicos

Os métodos químicos de transferência gênica utilizam características do DNA e das membranas celulares e a interação destes com compostos químicos para garantir a entrada de material genético nas células. A maioria dos compostos químicos utilizados são catiônicos † de forma a possibilitar a interação eletrostática destes com os grupamentos fosfatos do DNA que possuem carga

*Vetores: palavra que vem do latim vector - aquele que entrega.

†Compostos catiônicos são compostos com carga total positiva.

negativa. O intuito desta interação é formar complexos DNA-composto que apresentem algumas vantagens frente ao DNA puro.

Está representado na figura 2.1 um esquema de transferência gênica por método químico, proposto pela Prof. Mônica de Oliveira [1] e o qual motivou nosso trabalho.

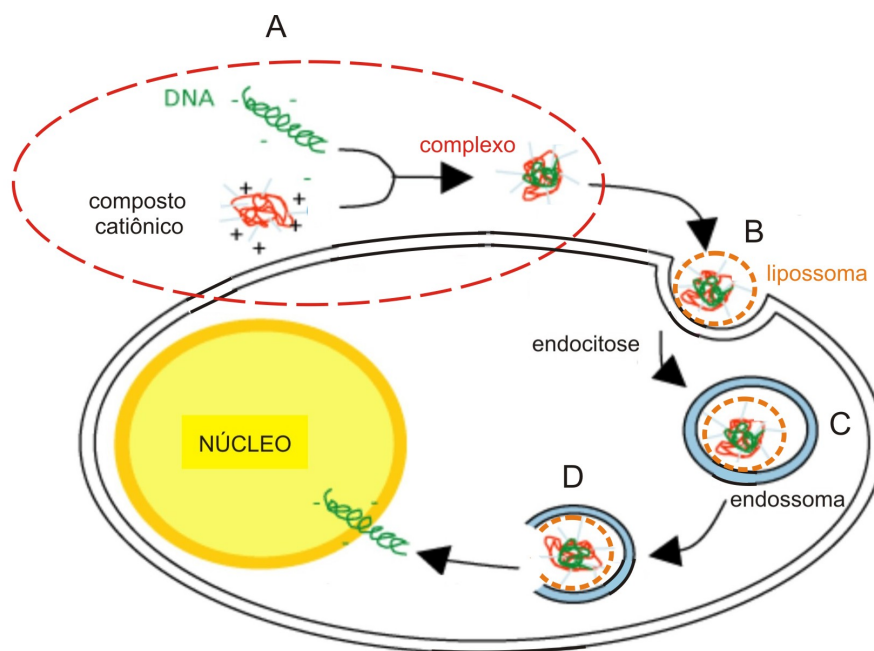


Figura 2.1: (a) Desenho esquemático mostrando um método químico de transferência gênica. Na figura, temos a formação de um complexo resultante da interação DNA-composto catiônico. O complexo é introduzido dentro de um lipossoma aniônico sensível ao pH. Esse lipossoma entra dentro da célula pelo processo de endocitose. Dentro da célula forma-se um endossoma que sob algumas condições é rompido liberando o material genético para o núcleo.

Pela figura, podemos destacar as etapas:

- (a) o DNA e o composto catiônico são colocados para interagir e ocorre a formação de um complexo DNA-composto catiônico que tem como objetivo condensar o DNA. O DNA adquire uma forma mais compacta e permite que um maior volume de material seja transferido para dentro da célula alvo;
 - (b) o complexo DNA-composto é encapsulado dentro de um vetor denomi-
-

nado lipossoma. Os lipossomas são nanopartículas lipídicas*, semelhantes às células, em geral produzidos com matéria-prima de origem sintética ou extraída de soja ou ovo. Os lipossomas podem transportar fármacos e entregá-los preferencialmente na região de células acometida pela doença. O lipossoma utilizado é aniônico† e sensível ao pH ‡. Na figura 2.2 temos representado um lipossoma carregando fármacos;

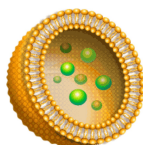


Figura 2.2: (a) Desenho esquemático de um lipossoma.

(c) o lipossoma entra na célula pelo processo de endocitose. Na endocitose o material extracelular é transportado para dentro da célula através de invaginações da membrana. Essas invaginações progridem para o interior e separam-se da membrana, constituindo vesículas endocíticas, ou endossomas. Na figura 2.3 mostramos uma representação desse processo;

(d) o lipossoma sofre uma ruptura devido à mudança de pH dentro do endossoma permitindo a liberação do complexo DNA-composto dentro da célula.

Nesta dissertação estudaremos a etapa A do método descrito acima, ou seja, o estudaremos a interação DNA-composto catiônico. O composto catiônico que nos foi proposto a ser estudado foi um derivado da ciclodextrina, que será discutida na próxima seção. Para maiores informações consultar as referências [1,2,4,5].

*Lipídios: classe de moléculas orgânicas que são insolúveis em água. Fosfolipídios e colesterol são os principais constituintes de membranas celulares [14].

†Composto aniônico é um composto com carga total negativa.

‡pH é o símbolo para a grandeza físico-química 'potencial hidrogeniônico'. Essa grandeza indica se uma solução líquida é ácida ($\text{pH} < 7$), neutra ($\text{pH} = 7$), ou básica/alcalina ($\text{pH} > 7$). Matematicamente, o "p" equivale ao simétrico do logaritmo (cologaritmo) de base 10 da atividade dos íons a que se refere. Para íons H^+ , $\text{pH} = -\log[\text{H}^+]$.

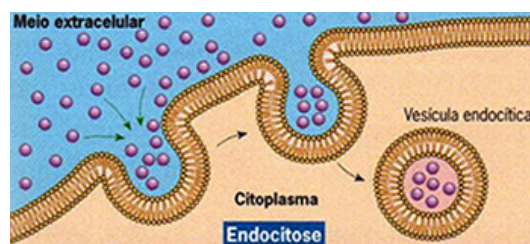


Figura 2.3: (a) Desenho esquemático mostrando o processo da endocitose. O material extracelular é transportado para dentro da célula através de invaginações da membrana.

Ciclodextrina

As ciclodextrinas (CD) são carboidratos complexos compostos por unidades de glicose unidas por ligações do tipo $\alpha - 1,4$ (ligação entre o carbono 1 de uma glicose e o carbono 4 da outra). Os compostos podem ser formados por 6 (α -ciclodextrina), 7 (β -ciclodextrina) ou 8 (γ -ciclodextrina) unidades de glicose, organizadas em uma estrutura cíclica. Essa estrutura possui exterior hidrofílico* e uma cavidade central hidrofóbica[†], conforme ilustrado na figura 2.4.

As ciclodextrinas α , β e γ são denominadas ciclodextrinas naturais. No entanto, os radicais hidroxila (OH^-) podem ser facilmente modificados quimicamente para obter derivados iônicos e neutros. Neste trabalho, utilizamos uma ciclodextrina modificada denominada 6-*monodeoxy-6-monoamino-beta-ciclodextrina* (*Am-beta-CD*), fornecida pela Faculdade de Farmácia. Esse derivado, representado esquematicamente na figura 2.5, é formado pela substituição de um radical hidroxila por um grupamento amino (NH_2), de forma que a molécula possui uma carga positiva (+1) quando imersa em solução com pH 7,4.

Portanto, a motivação deste estudo foi testar a possibilidade da *Am-beta-CD*

*Hidrofílico: designação de um grupo de colóides que mostram afinidades com a água. Designa também um agrupamento atômico dentro de uma molécula que apresenta as características de afinidade com a água. Por exemplo, a molécula de álcool etílico ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$), possui a extremidade $-\text{OH}$ hidrofílica, enquanto o restante da molécula é hidrofóbica.

[†]Hidrofóbico: designação de um grupo de colóides que não mostra muita afinidade com a água. Designa também um agrupamento atômico dentro de uma molécula, ou uma molécula inteira.

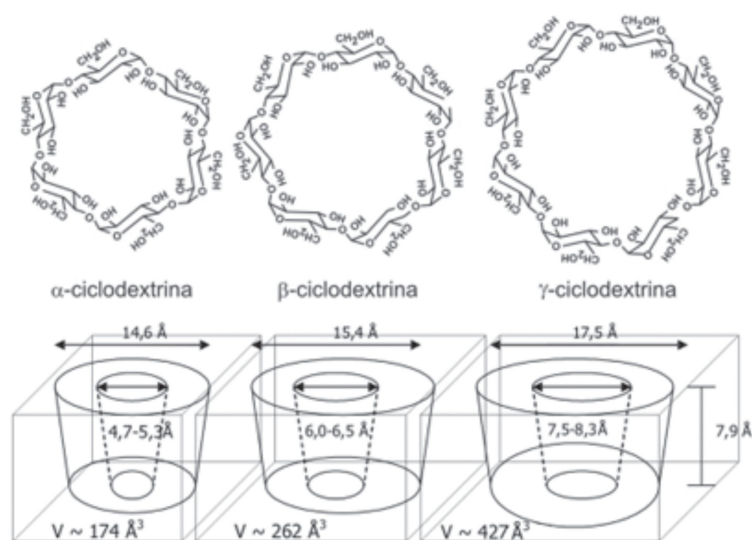


Figura 2.4: (a) Ciclodextrina naturais e suas características [6]

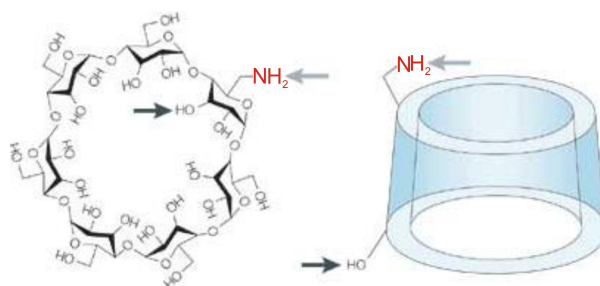


Figura 2.5: Desenho esquemático da ciclodextrina modificada denominada 6 – monodeoxy – 6 – monoamino – β – ciclodextrina (*Am – beta – CD*). O derivado é formado pela substituição de um radical hidroxila por um grupoamino (NH_2).

em formar complexos com moléculas de DNA, visando uma condensação do DNA. Conforme discutido acima, a condensação do DNA é de grande importância para a terapia gênica. Existem na literatura relatos sobre a capacidade de derivados catiônicos da ciclodextrina em formar complexos com moléculas de DNA [1,4,38]. No entanto, não existe nenhum estudo sistemático sobre variações das propriedades elásticas do DNA quando interage

com a CD. Como resultado final, chegaremos no capítulo 4 à melhor concentração de ciclodextrina a ser utilizada em terapia gênica.

2.2 DNA

O DNA (ácido desoxirribonucléico) é uma das moléculas biológicas mais interessantes. A molécula é classificada como um polímero pertencente à subclasse de biopolímeros e sua função biológica é conservar e transferir informação genética.

Os polímeros são moléculas grandes (macromoléculas) formadas pela repetição de unidades estruturais denominadas monômeros e os biopolímeros são uma subclasse dos polímeros, que se diferenciam por serem produzidos por organismos vivos e por possuírem estrutura bem definida. A composição química exata e a seqüência na qual os monômeros são arranjados em um biopolímero é denominada estrutura primária. No entanto, os biopolímeros espontaneamente se dobram e adquirem formas mais compactas atingindo as formas secundária e terciária, que por sua vez determinam suas funções biológicas.

Sobre o ponto de vista da Física o DNA é um sistema dinâmico complexo formado por vários átomos, com muitos graus de liberdade, ligados por forças específicas. Faremos a seguir uma breve discussão sobre as características estruturais do DNA, incluindo uma descrição dos fenômenos de desnaturação e renaturação do DNA.

2.2.1 A estrutura do DNA

Composição química e estrutura primária do DNA

O ácido desoxirribonucléico (DNA) é formado pela junção de dois polímeros

lineares*. Estes polímeros são macromoléculas que possuem como monômero uma unidade denominada nucleotídeo. Cada nucleotídeo consiste de três componentes: um açúcar (desoxirribose), uma base heterocíclica (5 carbonos) e um fosfato (PO_4), conforme ilustrado na figura 2.6.

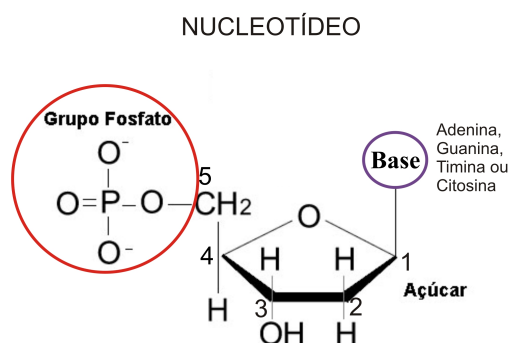


Figura 2.6: Cada nucleotídeo consiste de três componentes: um açúcar, uma base e um fosfato.

A desoxirribose é uma pentose, ou seja, um monossacarídeo (carboidrato [†]) com 5 átomos de carbono. A base heterocíclica é uma cadeia fechada composta por carbonos e hidrogênios e por pelo menos um átomo diferente de carbono e hidrogênio que esteja localizado entre átomos de nitrogênio. Existem quatro tipos diferentes de bases, sendo duas purinas - adenina (A) e guanina (G)- e duas pirimidinas - timina (T) e citosina (C), representadas na figura 2.7 abaixo.

O nucleotídeo é formado quando o carbono 1' da pentose se liga por uma ligação glicosídica β [‡] a uma das quatro bases, e o fosfato se liga ao grupo hidroxila /footnoteEm química, uma hidroxila ou hidroxilo é um grupo funcional representado pelo radical OH^- e formado por um átomo de hidrogênio e

*Polímeros lineares são polímeros sem ramificações.

[†]Os carboidratos são as biomoléculas mais abundantes na natureza e apresentam como fórmula geral: $[\text{C}(\text{H}_2\text{O})]_n$, daí o nome "carboidrato", ou "hidratos de carbono".

[‡]A ligação glicosídica ocorre entre o carbono anomérico de um monossacarídeo e qualquer outro carbono do monossacarídeo seguinte, através de suas hidroxilas e com a saída de uma molécula de água. O tipo de ligação glicosídica é definido pelos carbonos envolvidos e pelas configurações de suas hidroxilas.

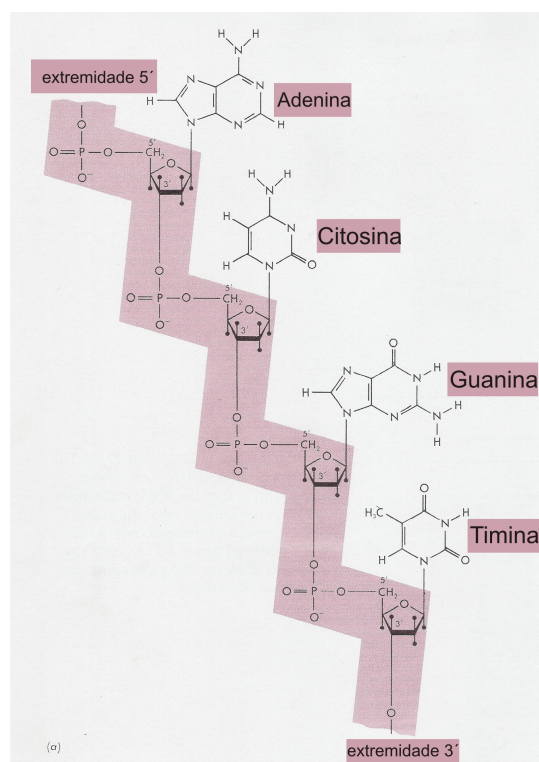


Figura 2.7: Representação de uma fita de DNA.

um de oxigênio. 3' – ou 5' – da pentose por meio de uma ligação fosfodiéster*, conforme ilustrado na figura 2.7.

Cada um dos polímeros lineares descritos acima é denominado uma fita do DNA. As fitas são caracterizadas pela sua polaridade, já que elas possuem uma extremidade formada por um grupo OH na extremidade 3' – e um grupo fosfato na extremidade 5' –, conforme figura 2.7. Duas fitas se associam e formam um DNA apresentando as seguintes características (figura 2.8):

- (a) as fitas permanecem paralelas mas têm polaridade oposta;
- (b) as bases ficam para dentro e se conectam por pontes de hidrogênio;
- (c) duas bases conectadas formam um par de base e existem somente dois tipos de pares de base no DNA: A-T pares e G-C pares.

Devido a essas características, dizemos que a molécula de DNA possui

*Ligação fosfodiéster é um tipo de ligação covalente produzida entre dois grupos hidroxila (-OH) de um grupo fosfato e duas hidroxilas de outras moléculas através de dupla ligação éster.

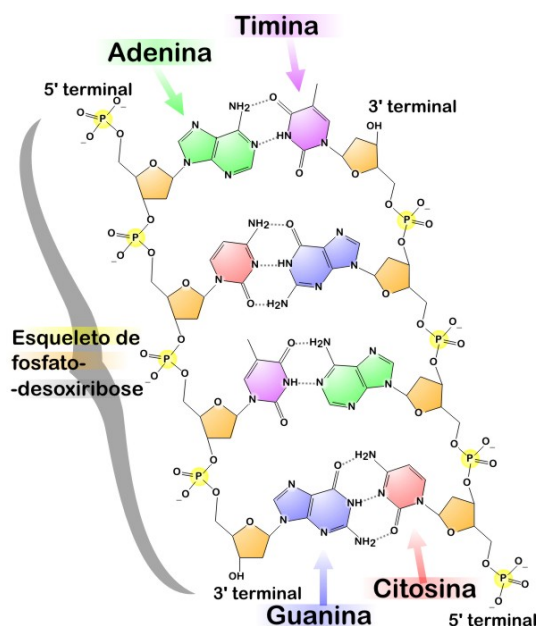


Figura 2.8: Representação das duas fitas de DNA. As ligações de hidrogênio entre as bases A,T,G e C são representadas pelas linhas pontilhadas.

uma estrutura química quase regular. A parte regular, denominada backbone (esqueleto), é formada por alternações do açúcar e do grupo fosfato ligadas por ligações fosfodiéster. A parte irregular é formada pelas bases ligadas aos açúcares e forma uma seqüência ao longo da cadeia (figura 2.8). Esta seqüência das bases determina a chamada estrutura primária. A seqüência de bases no biopolímero é única para cada organismo, e mudanças nessa seqüência podem provocar mudanças cruciais nas propriedades e funcionamento dos organismo [7].

Estrutura secundária do DNA: As diferentes formas do DNA

A forma como as duas fitas de DNA se mantêm unidas é denominada estrutura secundária do DNA. Ela foi proposta por Watson e Crick em 1953 e lhes rendeu o Prêmio Nobel de Medicina de 1962. As fitas se enrolam ao redor de um eixo comum formando uma estrutura de dupla hélice, conforme representado na figura 2.9. Essa estrutura se mantém estável devido a três tipos básicos de interações: ligações de pontes de hidrogênio entre bases pareadas;

interações de stacking (empilhamento) entre as bases vizinhas ao longo da fita de DNA e forças de longo alcance intra e inter backbone. Faremos a seguir uma breve discussão sobre esses tipos de força.

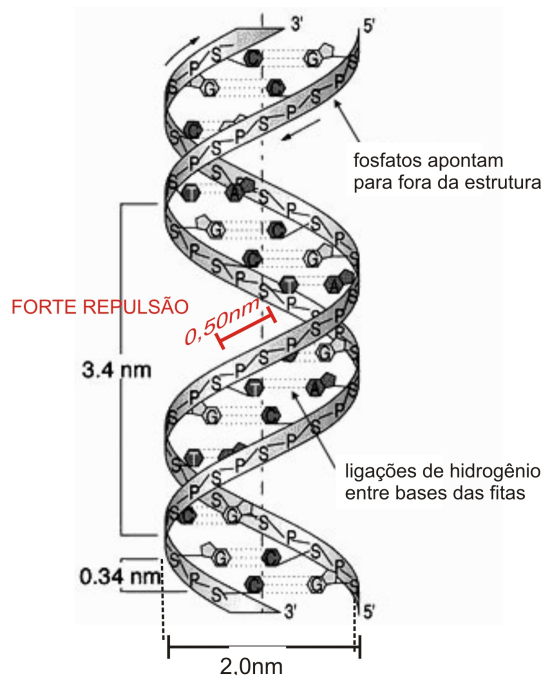


Figura 2.9: Esquema da estrutura de dupla hélice do DNA na forma B. A distância interfosfatos ao longo da hélice é de aproximadamente 0,5 nm, e entre as fitas é de 2,0 nm. A distância entre os pares de base ao longo da hélice é de 0,34 nm.

As ligações de hidrogênio são responsáveis por manterem as duas fitas unidas (figura 2.8). As bases se ligam em pares de forma que uma única base de uma fita se liga a uma única base da outra fita, nas combinação AT e CG. Entre as bases A e T são formadas duas pontes de hidrogênio e entre C e G são formadas três pontes. As ligações são do tipo



e por elas serem fracas (quando comparadas a ligações covalentes, por exemplo, as ligações de hidrogênio são 20 ou 30 vezes mais fracas)*elas podem ser facilmente quebradas por vários fármacos a temperaturas fisiológicas.

*A energia de uma ligação C-C é 83.1kcal/mol e de uma ligação C-H é 98.8 kcal/mol,

As interações de empilhamento são responsáveis por manter uma base próxima da outra, na direção do eixo da hélice, e são da mesma ordem de grandeza das ligações de hidrogênio.

As forças de longo alcance dependem principalmente da presença dos grupos fosfatos nas fitas de DNA. A distância entre fosfatos de duas fitas é de 2,0 nm (figura 2.9), e portanto, a interação entre eles é fraca. No entanto, ao longo da mesma fita a distância entre fosfatos é da ordem de 0,5 nm, o que causaria uma forte repulsão eletrostática já que em solução os fosfatos têm carga -1 . Para minimizar esta repulsão, o DNA na sua forma nativa deve ser mantido imerso em um meio com pH ideal, que é o pH 7,4. Esse meio deve fornecer cátions para que os grupos fosfatos sejam suficientemente blindados de forma a manter a estrutura de dupla hélice estável. Dependendo do meio no qual o DNA está imerso esta blindagem é modificada, interferindo diretamente nas distâncias inter fosfatos e provocando transições estruturais da dupla hélice.

Observando a figura 2.9 vemos que a distância entre bases adjacentes ao longo do eixo de rotação comum é de 0,34 nm de forma que o ângulo de rotação entre elas é de 36 graus. Notamos também que as bases são localizadas dentro da estrutura de dupla hélice enquanto os fosfatos e os açúcares ficam localizados fora da estrutura. Como cada grupo fosfato possui carga -1 (caso não esteja blindada), a molécula de DNA possui caráter predominantemente negativo e portanto, é capaz de fazer ligações do tipo eletrostática com fármacos carregados positivamente.

É importante dizer que todos os parâmetros da dupla hélice descritos acima podem sofrer modificações. Estudos cristalográficos [7] mostram que esses parâmetros dependem da umidade relativa do ambiente, da espécie de cations dissolvidos na solução no qual o DNA esta imerso, entre outros. Sendo assim, é plausível dizer que existe mais de uma forma estável para a estrutura de dupla hélice. De fato, existem três formas principais: A, B e Z. A forma B é aquela mais comum na natureza e foi a forma descrita por Watson e Crick. Ela é caracterizada por possuir pares de base quase perpendiculares ao eixo da hélice. A forma A possui pares de base não perpendiculares ao eixo da hélice que são ligações covalentes. Já uma ligação de hidrogênio do tipo O-H...O tem energia de $3 - 6$ kcal/mol [7].

hélice. A forma Z, diferentemente das formas A e B, tem hélice crescente no sentido anti-horário. As formas estão representadas na figura 2.10 abaixo [7].

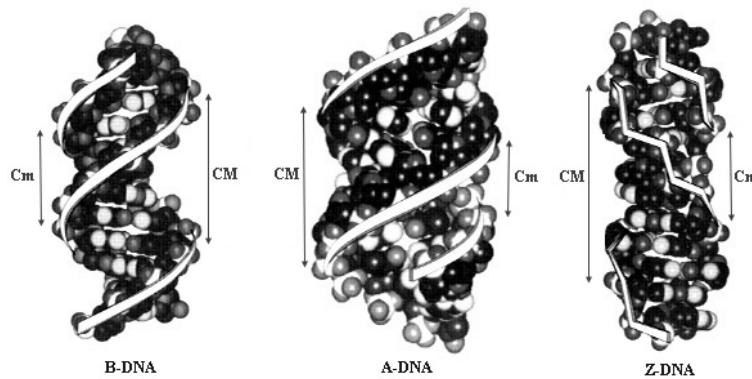


Figura 2.10: Esquema das formas B, A e Z do DNA. Observamos tamanhos diferentes de cavidades entre as duas hélices para cada tipo de DNA. Na figura C_m representa a cavidade menor e CM a cavidade maior do DNA.

Estrutura terciária do DNA

As cadeias de DNA em condições fisiológicas são bastantes flexíveis devido à blindagem dos fosfatos. Por causa desta flexibilidade, a dupla hélice do DNA pode adquirir várias formas terciárias, entre elas a super-hélice ou superenrolamento. Esta conformação é definida como sendo o enrolamento da dupla-hélice sobre si mesma e um dos papéis desta forma é possibilitar o empacotamento do DNA dentro das células. Isto porque o comprimento do DNA em organismos vivos varia de vários micrômetros até vários centímetros e o tamanho típico do núcleo de células é da ordem de 0.5 micrômetros. O superenrolamento reduz o espaço ocupado pelo DNA na sua forma natural e permite que maior quantidade de DNA seja empacotada dentro do núcleo. Nas células, este superenrolamento é possível graças à presença de proteínas chamadas histonas, que se ligam às moléculas de DNA formando complexos denominados nucleossomas. Na figura 2.11 vemos diferentes graus de superenrolamento que o DNA pode adquirir.

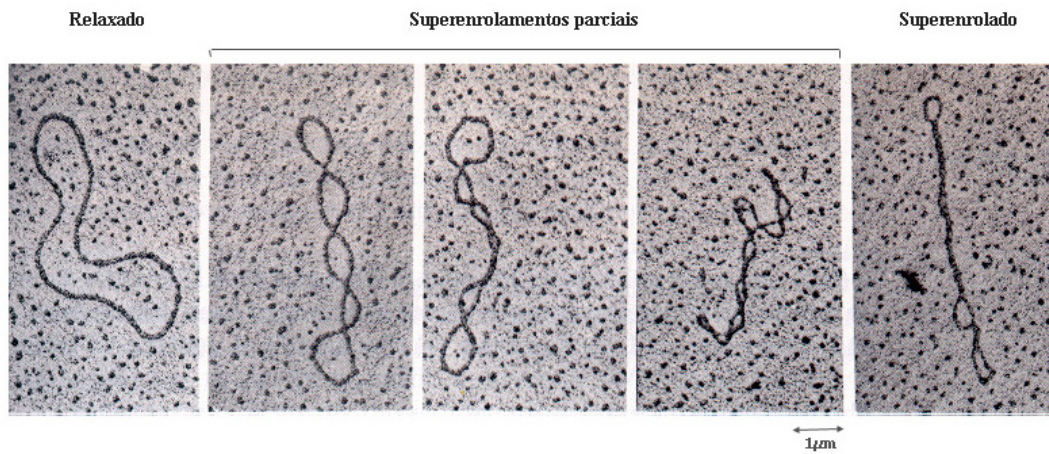


Figura 2.11: Imagem de microscopia eletrônica de diferentes graus de superenrolamento do DNA. Da esquerda para direita observa-se um grau de superenrolamento crescente. O primeiro encontra-se relaxado, o último totalmente superenrolado e os intermediários apresentam níveis parciais de superenrolamento.

Desnaturação e Renaturação do DNA

Os fenômenos de desnaturação e renaturação são fenômenos físicos fundamentais para os processos biológicos executados pelo DNA. A desnaturação caracteriza-se pelo rompimento das pontes de hidrogênio levando à separação das fitas complementares do DNA e o inverso deste processo é a renaturação. No processo de replicação o DNA deve ser localmente desnaturado por proteínas especializadas, para ser copiado.

A desnaturação do DNA pode ser provocada por diversos fatores, entre eles o aumento da temperatura, a titulação com ácidos e o estiramento da molécula na presença de substâncias intercalantes [8,9]. Uma das maneiras de se medir a desnaturação da molécula de DNA é através da medida da absorvância da luz ultravioleta (UV). As bases do DNA são as maiores responsáveis pela absorção de luz - a absorção é máxima para $\lambda = 260nm$ - de forma que quando as fitas da dupla-hélice do DNA estão completamente separadas, a absorvância é 37% maior do que aquela obtida para o DNA em sua forma nativa.

2.2.2 O DNA como um polímero

Conforme já discutido, o DNA possui estrutura polimérica na qual o monômero é uma unidade denominada nucleotídeo. Como o tipo de monômero tem pouca influência no comportamento macroscópico de um polímero, podemos estudar o comportamento da molécula da DNA tratando-o como um polímero semi-flexível, utilizando o modelo Worm-Like Chain (WLC) [3,10–12]. No entanto, antes de apresentar este modelo iremos trabalhar com o modelo de sistemas mais simples e a seguir, com algumas generalizações, chegaremos ao WLC. Além disso, durante as deduções, discutiremos os conceitos de comprimento de persistência e entropia para um polímero semi-flexível.

Cordas "biológicas"

Inicialmente iremos considerar os polímeros e filamentos celulares como cordas e varas "biológicas", compostas por monômeros que se ligam formando cadeias não ramificadas. As cordas e varas biológicas podem sofrer uma variedade de deformações, dependendo das forças aplicadas e das propriedades mecânicas do filamento. No entanto, independentemente do tipo de deformação, é necessária energia para distorcer o filamento/polímero da sua forma natural. Esta energia é denominada energia de curvatura e é ela que iremos discutir.

Para calcular a energia de curvatura começamos descrevendo uma corda "biológica" como uma curva contínua, ignorando o material e a forma de sua área transversal. Como mostrado na figura 2.12, cada ponto da curva corresponde a um vetor posição \vec{r} . É conveniente escrever \vec{r} e outras características da curva em uma representação parametrizada, em função do tamanho do arco s . Desta forma teremos $\vec{r}(s)$ onde s segue o contorno da curva de zero até L_c , o comprimento de contorno total da corda *. O vetor tangente unitário \hat{t} caracteriza a direção da curva e é dado por:

*Comprimento de contorno: comprimento total de um filamento medido ao longo do seu contorno [14].

$$\hat{t}(s) = \frac{\partial \vec{r}}{\partial s}, \quad (2.1)$$

Notamos que o vetor $\Delta \hat{t} = \hat{t}_2 - \hat{t}_1$ é perpendicular ao vetor \vec{r} no limite em que as posições 1 e 2 são infinitesimalmente próximas. Sendo assim, a taxa de variação de \hat{t} com s é proporcional ao vetor unitário normal à curva \hat{n} a menos de uma constante de proporcionalidade. Podemos definir essa constante de proporcionalidade como a curvatura C , que possui como unidade o inverso de comprimento. Utilizando a equação 2.1, temos que a curvatura será dada por:

$$C = \left| \frac{\partial^2 \vec{r}}{\partial s^2} \right| = \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|. \quad (2.2)$$

O recíproco da curvatura C é o raio local de curvatura do arco, que está representado na figura 2.12 extrapolando os vetores unitários normais \hat{n}_1 e \hat{n}_2 até o ponto de intersecção. Se as posições 1 e 2 se aproximam (segundo o contorno da curva), o arco pode ser aproximado por um segmento de círculo de raio R_c , definindo um ângulo $\Delta\theta = \Delta s / R_c$, onde Δs é o tamanho do segmento, conforme ilustrado na figura 2.12 letra b). No entanto, $\Delta\theta$ também é o ângulo entre $\hat{t}(1)$ e $\hat{t}(2)$, isto é $\Delta\theta = \Delta(|\hat{t}|) / t = \Delta(|\hat{t}|)!$ Igualando as duas expressões para $\Delta\theta$ e utilizando a equação 2.2, chegamos a conclusão que:

$$C = 1/R_c. \quad (2.3)$$

Além disso, o vetor unitário \hat{n} , pode ser reescrito utilizando $\Delta\theta = \Delta(|\hat{t}|)$, de forma que:

$$\hat{n} = \frac{\partial \hat{t}}{\partial \theta}. \quad (2.4)$$

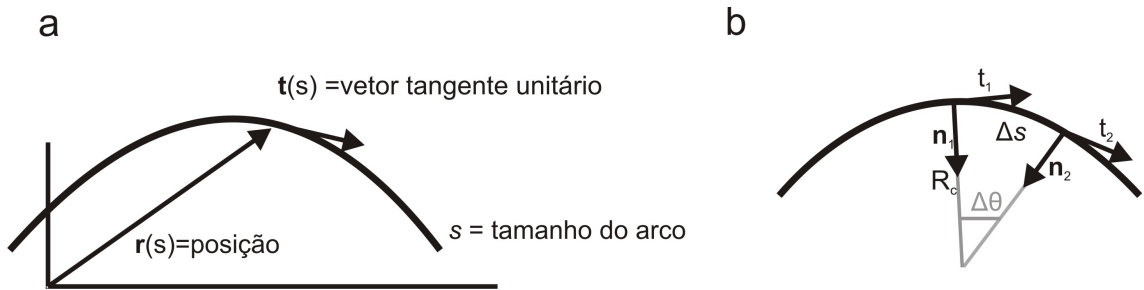


Figura 2.12: a) Esquema mostrando a variação do vetor posição e do vetor tangente unitário ao longo de uma curva arbitrária. Estes vetores estão parametrizados pelo comprimento s ao longo da curva. b) Entre as posições \hat{t}_1 e \hat{t}_2 o arco é aproximado por um segmento de círculo de raio R_c , definindo um ângulo $\Delta\theta = \Delta s / R_c$, onde Δs é o tamanho do segmento.

Energia de curvatura de uma corda "biológica"

Suponhamos agora que a corda "biológica"/polímero/filamento, descrita pelos parâmetros da seção anterior, está em uma configuração esticada e possui comprimento de contorno L_c , e densidade e seção transversal uniformes. Se deformo esta corda em um arco de raio R_c , como na figura 2.13, qual será o valor da energia elástica associada a esta deformação?



Figura 2.13: A corda de comprimento L_c e momento de inércia da seção transversal I encontra-se inicialmente esticada. A corda sofre uma deformação e adquire a forma de um círculo de raio R_c . A energia de curvatura é dada por $E_f = \kappa_f L_c / 2R_c^2$.

Este cálculo pode ser encontrado na referência [13] e é dado por

$$E_{curvatura} = \frac{\kappa_f L_c}{2R_c^2}, \quad (2.5)$$

onde κ_f é a rigidez flexural da corda (unidade de energia x comprimento), dada por

$$\kappa_f = YI, \quad (2.6)$$

onde Y é o módulo de Young da corda e I é o momento de inércia da seção reta. O módulo de Young aparece em expressões do tipo: [tensão = $Y \times$ deformação] e possui a mesma unidade de pressão ($N/m = Pa$), já que deformação é adimensional. O momento de inércia da seção transversal é definido como:

$$I_y = \int_a x^2 dA \quad (2.7)$$

onde a é a área da seção e o plano xy é perpendicular ao comprimento da corda e dA é o elemento de área neste plano, conforme representado na figura 2.14.

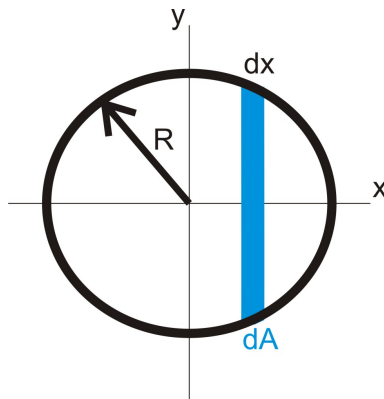


Figura 2.14: O momento de inércia da seção transversal de uma corda cilíndrica. Para uma corda cilíndrica, $I = \frac{\pi R^4}{4}$ [14].

Faremos agora algumas generalizações na equação 2.5. Primeiro, notamos que a energia de deformação por unidade de comprimento do arco é

inversamente proporcional ao quadrado do raio de curvatura ou proporcional ao quadrado da curvatura C (definida na equação 2.3) de forma que esta energia pode ser reescrita como:

$$E_{curvatura} = \frac{\kappa_f L_c \left(\frac{\partial \hat{t}}{\partial s}\right)^2}{2}. \quad (2.8)$$

Além disso, não há necessidade da curvatura ser constante ao longo do filamento, e portanto, chegamos uma expressão geral para a energia total de deformação para uma corda "biológica", denominada energia de Kratky-Porod:

$$E_{KP} = \frac{1}{2} \kappa_f \int_0^{L_c} \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds, \quad (2.9)$$

Comprimento de persistência

Suponhamos agora que nossa corda "biológica"/filamento/polímero seja colocada em um sistema com temperatura próxima a zero. No equilíbrio, o filamento adotará uma configuração que minimiza a sua energia de curvatura e se esta energia é dada pela equação 2.9, esta configuração corresponde a uma corda esticada. No entanto, se a temperatura do sistema começa a aumentar, o polímero passa a trocar energia com o ambiente, permitindo que sua forma flutue e adquira várias configurações, assim como ilustrado na figura 2.15.a

A probabilidade $\wp(E)$ que o filamento seja encontrado em uma configuração específica com energia E é proporcional ao fator de Boltzmann * $\exp(-\beta E)$ onde $\beta = 1/k_B \dagger T$. O fator de Boltzmann nos diz quanto maior

*Fator de Boltzmann $\exp(-\beta E)$: probabilidade relativa de um sistema a temperatura T , com energia total E , ocupar um estado específico [14].

†Constante de Boltzmann: constante fundamental da Física igual a $1,38 \times 10^{-23} J/K$. Classicamente, $k_B T/2$ é a energia térmica média para cada grau de liberdade [14]

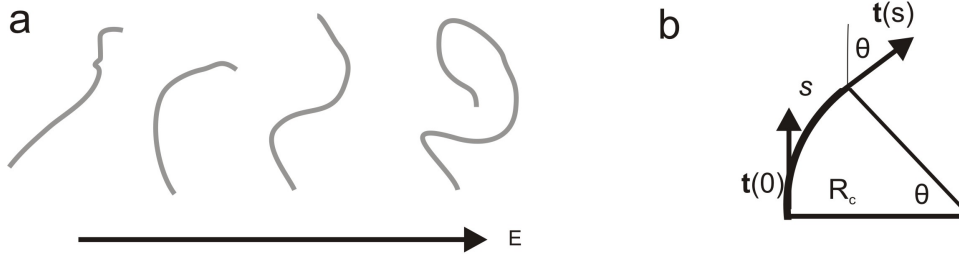


Figura 2.15: a) Conjunto de configurações para um filamento flexível. Para um dado k_f a energia de curvatura do filamento aumenta a medida que sua forma se torna mais contorcida. b) Se o filamento é a seção de um círculo, o ângulo subtendido pelo arco de tamanho s é o mesmo que o ângulo de mudança de direção do vetor tangente t ao longo do arco.

a energia necessária para deformar o filamento em uma configuração específica, menor a probabilidade do polímero ser encontrado nesta configuração (ignorando agentes externos).

Vamos assumir que nosso polímero possa sofrer somente deformações leves e que ele tenha curvatura constante. A forma do filamento pode ser parametrizada unicamente pelo ângulo θ formado entre os dois vetores unitários das extremidades do filamento, conforme ilustrado na figura 2.15.b. A energia de curvatura deste polímero será dado pela equação 2.5 e para um arco de círculo de raio R_c temos que $\theta = s/R_c$ e portanto:

$$E_{\text{arco}} = \frac{\kappa_f s}{2R_c^2} = \frac{\kappa_f \theta^2}{2s}. \quad (2.10)$$

(O resultado que iremos obter a seguir também se aplica a pequenos segmentos de filamentos que possuem curvatura constante e portanto, usamos s ao invés de L_c .)

O ângulo θ oscila conforme o polímero "balança" pra frente e para trás e para caracterizar a magnitude desta oscilação podemos calcular o valor

médio de θ^2 , dado por $\langle \theta^2 \rangle^*$.

Definindo uma extremidade do polímero como sendo a origem do sistema (x,y,z), a outra extremidade será descrita pelo ângulo polar θ e pelo ângulo azimutal ϕ , conforme ilustrado na figura 2.16.

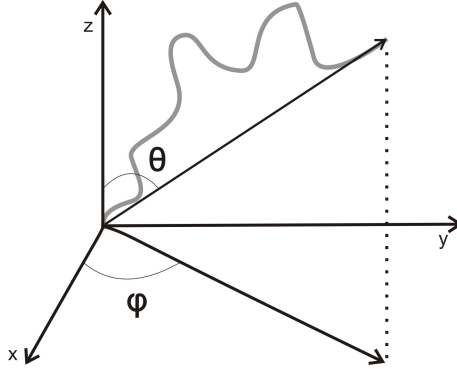


Figura 2.16: Representação dos eixos x, y, z e dos ângulos θ e ϕ .

Assumindo que as configurações no ensemble são arcos de círculos, a probabilidade de cada configuração será dada por $\wp(E_{arc})$ e o valor médio de θ^2 será dado por:

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

substituindo $\wp(E_{arc})$, temos:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{\int \theta^2 \exp(-\beta E_{arc}) d\Omega}{\int \exp(-\beta E_{arc}) d\Omega}, \quad (2.12)$$

onde $d\Omega = \sin\theta d\theta d\phi$ é o elemento de ângulo sólido da integração. A energia de curvatura é independente de ϕ e portanto:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{\int \theta^2 \exp(-\beta E_{arc}) \sin\theta d\theta}{\int \exp(-\beta E_{arc}) \sin\theta d\theta}. \quad (2.13)$$

Vamos trabalhar agora com estas integrais. Assumindo que o polímero é

*Valor médio: matematicamente, para um conjunto de N elementos x_i , o valor médio é $\frac{1}{N} \sum_i x_i$ [14].

rígido o suficiente de forma que E_{arc} aumenta rapidamente com θ , ou seja, assumindo somente pequenas oscilações na forma do filamento, teremos um fator de Boltzmann que decai rapidamente com θ . Isto significa que $\sin \theta$ será significativo somente para θ pequeno e portanto a aproximação

$$\sin \theta \sim \theta \quad (2.14)$$

é válida. Além disso, fazendo a seguinte mudança de variáveis:

$$x^2 = \beta E_{arc} = \frac{\beta \kappa_f \theta^2}{2s}, \quad (2.15)$$

temos que

$$\theta^2 = \frac{2sx^2}{\beta \kappa_f}, \quad (2.16)$$

$$d\theta = \sqrt{\frac{2s}{\beta \kappa_f}} dx, \quad (2.17)$$

substituindo na equação para $\langle \theta^2 \rangle$ (equação 2.13), temos que:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{\beta \kappa_f} \frac{\int_0^\infty x^3 \exp(-x^2) dx}{\int_0^\infty \exp(-x^2) dx}. \quad (2.18)$$

Estas integrais podem ser avaliadas de zero a infinito com pequeno erro pois as flutuações são muito pequenas. As duas integrais são iguais a $1/2$ e se cancelam. O resultado nos dá que:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{\beta \kappa_f} \frac{\int_0^\infty x^3 \exp(-x^2) dx}{\int_0^\infty \exp(-x^2) dx} = \frac{1/2}{1/2} \frac{2s}{\beta \kappa_f} = \frac{2s}{\beta \kappa_f}. \quad (2.19)$$

A combinação $\beta \kappa_f$ possui unidade de comprimento e é denominada comprimento de persistência A do filamento:

$$A = \beta \kappa_f \quad (2.20)$$

e portanto:

$$\langle \theta^2 \rangle = \frac{2s}{A} \quad (2.21)$$

Notamos que o parâmetro A é diretamente proporcional à rigidez flexural κ_f e inversamente proporcional à temperatura T .

A definição física do comprimento de persistência de um polímero é o comprimento de correlação da cadeia polimérica. Ou seja, A é uma medida do alcance de perturbações locais na conformação da molécula. Sendo assim, o parâmetro nos dá informação sobre a rigidez/elasticidade da molécula. Quanto maior o valor de A , mais rígido é o polímero, apresentando poucas dobras. Por outro lado, quando menor o valor de A , mais flexível é o polímero, apresentando muitas dobras. A figura 2.17 ilustra esses dois casos.

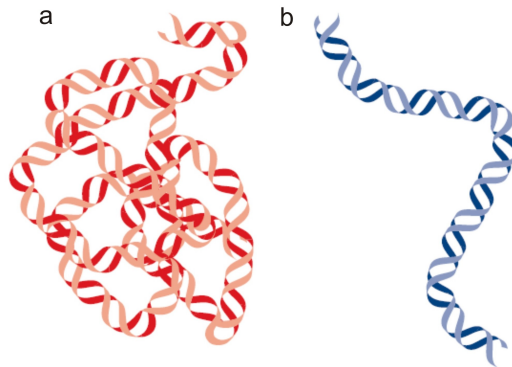


Figura 2.17: Esquema representando moléculas de DNA com diferentes comprimentos de persistência. Em (a) temos uma molécula flexível e em (b) temos uma molécula mais rígida, com comprimento de persistência maior do que a molécula (a). Figura tirada do [16]

Para uma outra interpretação do comprimento de persistência podemos analisar o produto escalar $\hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s)$. Em temperaturas diferentes de zero, o polímero assume uma variedade de orientações e a média deste produto escalar é dada por:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \langle \cos \theta \rangle, \quad (2.22)$$

para qual o valor máximo é 1. A quantidade $\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle$ é a função correlação do vetor tangente e é ela que descreve a correlação entre a direção dos vetores tangentes em diferentes posições ao longo da curva. A baixas temperaturas, onde θ é pequeno, pois as flutuações são pequenas, podemos fazer a aproximação $\cos \theta \sim 1 - \theta^2/2$. Desta forma, podemos escrever a função correlação como:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \cong 1 - \frac{\langle \theta^2 \rangle}{2}. \quad (2.23)$$

Além disso, a média de θ para pequenas oscilações é dada pela equação 2.19 de forma que:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle \cong 1 - \frac{s}{A}, \quad (2.24)$$

Portanto, o comprimento de persistência mede a distancia ao longo do polímero a partir da qual a orientação da curva se torna descorrelacionada. É importante lembrar que a equação 2.24 é válida para o limite de pequenas oscilações. Para obter uma equação geral, notamos que a equação 2.24 é a expansão em primeira ordem da função exponencial. Considerando os outros termos da expansão temos a forma geral para a função correlação:

$$\langle \hat{t}(0) \cdot \hat{t}(s) \rangle = \exp\left(-\frac{s}{A}\right). \quad (2.25)$$

Esta é a função de autocorrelação especial para os vetores tangentes $\hat{t}(s)$. Notamos que a função de autocorrelação espacial de um polímero exibe um decaimento exponencial.

Distância quadrática média entre as extremidades de um polímero

Podemos utilizar a equação 2.25 para estimar a distância quadrática média $\langle r_{ee}^2 \rangle$ entre as extremidades de um polímero. O vetor $r_{ee}^{\vec{}}$ é dado por:

$$\vec{r}_{ee} = \vec{r}(L_c) - \vec{r}(0), \quad (2.26)$$

onde $\vec{r}(s)$ denota a posição do filamento no comprimento de arco s , e r_{ee} representa a distância entre as extremidades do polímero, conforme ilustrado na figura 2.18.

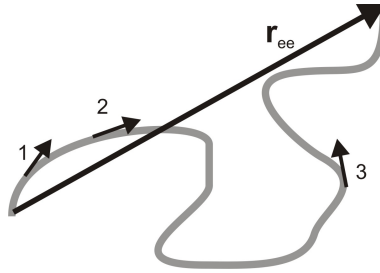


Figura 2.18: Esquema representando um filamento com comprimento de contorno muito maior do que o comprimento de persistência. As posições 1 e 2 são separadas por um comprimento de arco s , com $s < A$ e as posições 1 e 3 possuem $s \gg A$. O vetor \vec{r}_{ee} representa o deslocamento entre as extremidades do polímero.

Sendo assim, $\langle r_{ee}^2 \rangle$ será dado por:

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = \langle [\vec{r}(L_c) - \vec{r}(0)]^2 \rangle \quad (2.27)$$

Integrando o vetor tangente unitário \hat{t} , dado pela equação 2.1:

$$\vec{r}(s) = \vec{r}(0) + \int_0^s \hat{t}(u) du \quad (2.28)$$

teremos:

$$\vec{r}(s=0) = \vec{r}(0) \quad (2.29)$$

e

$$\vec{r}(L_c) = \vec{r}(0) + \int_0^{L_c} \hat{t}(u) du. \quad (2.30)$$

Utilizando como variáveis de integração as variáveis u e v , temos $\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle$:

$$\begin{aligned} \langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle &= \langle [\vec{r}(0) + \int_0^{L_c} \hat{t}(u) du - \vec{r}(0)]^2 \rangle = \langle [\int_0^{L_c} \hat{t}(u) du]^2 \rangle \\ &= \int_0^{L_c} du \int_0^{L_c} dv \langle \hat{t}(u) \cdot \hat{t}(v) \rangle. \end{aligned} \quad (2.31)$$

Utilizando a equação 2.25 temos:

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = \int_0^{L_c} du \int_0^{L_c} dv \exp\left(-\frac{(u-v)}{A}\right) \quad (2.32)$$

onde s da função correlação é substituído por $(u-v)$. A condição de que o argumento da exponencial deve ser negativo pode ser garantida dividindo a integral acima em duas integrais idênticas, onde uma variável de integração é mantida menor do que a outra:

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle = 2 \int_0^{L_c} du \int_0^u dv \exp\left(-\frac{(u-v)}{A}\right). \quad (2.33)$$

Esta integral é resolvida efetuando algumas mudanças de variáveis e o resultado nos dá:

$$\begin{aligned} \langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle &= 2 \int_0^{L_c} du \int_0^u dv \exp\left(-\frac{(u-v)}{A}\right) \\ &= 2AL_c - 2A^2 \left[1 - \exp\left(-\frac{L_c}{A}\right)\right]. \end{aligned} \quad (2.34)$$

Esta equação se torna mais simples quando analisada em dois casos limites. No limite flexível ($L_c \gg A$), $\exp(-L_c/A) \rightarrow 0$ e

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \simeq 2AL_c \quad (2.35)$$

e no limite rígido ($L_c \ll A$), $\exp(-L_c/A) \rightarrow 1$

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \simeq 2AL_c - 2A^2 \left[1 - \left(1 - \frac{L_c}{A} + \frac{L_c^2}{2A^2} \right) \right] \quad (2.36)$$

$$\langle \vec{r}_{ee}^2 \rangle \simeq L_c^2 \quad (2.37)$$

Para maiores detalhes das deduções das últimas quatro seções, sugiro as referências [11,14].

Maximização da Entropia e a Elasticidade Entrópica

Quando um polímero ou filamento é colocado numa solução aquosa ele se choca com as moléculas do meio e entre si de forma que suas extremidades se aproximam ou se afastam, adquirindo as configurações possíveis para as características daquele polímero. Cada configuração corresponde a uma determinada energia e uma mesma energia pode corresponder a várias configurações. Para um sistema de N polímeros e uma dada energia total, a distribuição de equilíbrio (a uma temperatura T) dos polímeros do sistema entre as configurações possíveis corresponde ao valor máximo da entropia:

$$S = k_B \ln \Omega, \quad (2.38)$$

onde Ω é o número de máximo de configurações do sistema para aquelas condições.

Quando o polímero atinge o equilíbrio termodinâmico com o meio, se quisermos esticá-lo, devemos aplicar uma força às extremidades, afastando-as uma da outra, conforme ilustrado na figura 2.19. Estas forças são denominadas forças entrópicas, pois são forças capazes de estirar o polímero, mas não

a ponto de deformar as ligações químicas. Neste regime de forças, denominado regime entrópico, a elasticidade do polímero é chamada de elasticidade entrópica.

Em nossos experimentos realizamos estiramento de moléculas únicas de DNA no regime de forças entrópicas. Tipicamente este é o regime para $F < 10$ pN, no caso do DNA. O modelo WLC de Marko e Siggia [11] propõe uma equação para a força aplicada em função do estiramento da molécula de DNA e é a equação utilizada para o tratamento dos nossos dados experimentais. O desenvolvimento desta equação é o tópico da próxima seção.

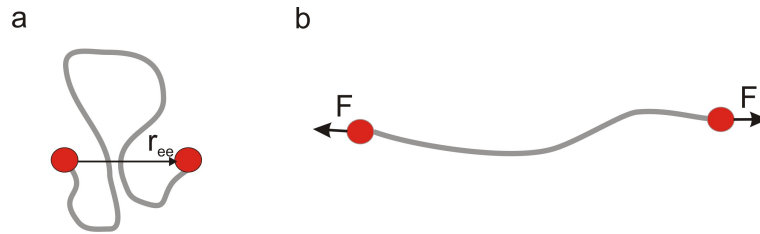


Figura 2.19: Duas representações do conjunto de configurações disponíveis para um filamento flexível. Se quisermos esticar o polímero, de forma que ele passe da configuração a) para a configuração b), devemos realizar um trabalho no sistema de forma que sua entropia diminua. Definindo $\Delta E = \Delta Q + \Delta W$, onde ΔW é o trabalho realizado sobre o sistema e para processos reversíveis, $\Delta Q = T\Delta S$, temos que $\Delta E = T\Delta S + \Delta W$ para processos reversíveis. Para T constante e no caso entrópico onde as ligações químicas são pouco deformadas ($\Delta E \simeq 0$) e portanto, $\Delta W = -T\Delta S$, ou seja, o trabalho realizado sobre o sistema diminui sua entropia.

O modelo de Worm-Like Chain (WLC)

De acordo com Bustamante [15], o modelo WLC possibilita uma descrição excelente da elasticidade do DNA quando este é submetido a forças de estiramento de até $10pN$ (regime de forças entrópicas) [15]. Macroscopicamente, o modelo trata o DNA como uma vara flexível que sofre deformações suaves devido a flutuações térmicas e possui energia de curvatura dada pela equação de Kratky-Porod (equação 2.9) [11]. Microscopicamente, o modelo assume

que cada segmento da molécula obedece a lei de Hooke. Isto significa que ao aplicarmos uma força entrópica em uma das extremidades da molécula de DNA (figura 2.19), cada segmento é sujeito a uma força elástica restauradora que é proporcional ao tanto que a molécula está dobrada [15,16].

Dentro do intervalo de forças até 10 pN, o modelo descreve o comportamento elástico do DNA tanto para estiramentos pequenos (molécula próxima à sua conformação de equilíbrio) quanto longos (molécula próxima à conformação retilínea). Para explicar o comportamento elástico para estiramentos realizados próximo à conformação superenrolada do DNA, o modelo ainda é discutível. Alguns pesquisadores argumentam que nesse limite o DNA é muito mais flexível do que previsto pelo modelo WLC e propõem um novo modelo (Sub-elastic Chain model) no qual a elasticidade não segue a Lei de Hooke [16]. No entanto, o modelo WLC propõe uma expressão válida para qualquer estiramento e tem sido utilizada com sucesso por diversos autores [8,9,11,15]. Neste trabalho nos limitamos ao regime de forças baixas ($F < 10$ pN) e utilizamos o modelo WLC para a análise dos nossos resultados.

A seguir faremos a dedução da equação que o modelo WLC propõe para estiramentos da molécula de DNA. Nas primeiras seções faremos os casos limites e na última seção chegaremos a uma expressão válida para qualquer estiramento. Todas as deduções serão para polímeros flexíveis para os quais a relação $L_c \gg A$ é válida [11].

Estiramentos próximos da conformação de equilíbrio

Para um estiramento deste tipo a força aplicada e o estiramento resultante são pequenos, e portanto, a relação linear entre a força aplicada \vec{F} e o estiramento causado \vec{d} é válida. Desta forma teremos uma força de Hooke, dada por:

$$\vec{F} = -k\vec{d}. \quad (2.39)$$

onde k é a constante de mola. Como o estiramento resultante é pequeno, ele pode ser aproximado pela distância quadrática média entre as duas extremi-

dades do DNA,

$$d \cong \sqrt{\langle r_{ee}^2 \rangle}. \quad (2.40)$$

Para o caso de polímeros flexíveis, em que ($L \gg A$), utilizamos a equação 2.35 para escrever:

$$d \cong \sqrt{2AL}. \quad (2.41)$$

A energia potencial elástica associada ao estiramento será dada por:

$$E_{potencial} = \frac{1}{2}kd^2 = \frac{1}{2}kr_{ee}^2 \quad (2.42)$$

e pelo princípio da equipartição da energia, teremos para a energia potencial elástica do DNA a relação:

$$\frac{1}{2}k\langle r_{ee}^2 \rangle = \frac{3K_B T}{2}. \quad (2.43)$$

No entanto, a distância quadrática média entre as extremidades é um vetor em três dimensões, tal que

$$\langle r_{ee}^2 \rangle = \langle x_{ee}^2 \rangle + \langle y_{ee}^2 \rangle + \langle z_{ee}^2 \rangle = 3\langle z_{ee}^2 \rangle \quad (2.44)$$

Usando a equação 2.43, temos que

$$\frac{1}{2}k(3\langle z_{ee}^2 \rangle) = \frac{3K_B T}{2}. \quad (2.45)$$

Desse modo obtemos a constante de mola k , sabendo que $\langle r_{ee}^2 \rangle = 2AL = 3\langle z_{ee}^2 \rangle$,

$$k = \frac{3K_B T}{2AL}. \quad (2.46)$$

Utilizando agora a equação 2.39, obtemos a equação de força:

$$F = -\frac{3K_B T}{2A} \frac{z}{L}. \quad (2.47)$$

Este resultado também pode ser obtido por uma análise de energia do polímero [11]. Assim como para qualquer polímero flexível, uma separação das extremidades do DNA por uma distância $z \ll L$ demanda uma energia livre E dada por:

$$E = \frac{3K_B T z^2}{2R^2} \quad (2.48)$$

e portanto requer uma força dada por:

$$F = \frac{\partial E}{\partial z} = \frac{3K_B T z}{2AL} \quad (2.49)$$

Como a extensão z é pequena, essa força obedece a uma equação de força linear, dada pela força de Hooke 2.49 e o resultado para a constante de mola é a mesma da obtida anteriormente.

Estiramentos longe da conformação de equilíbrio

Para estiramentos deste tipo a molécula de DNA está inicialmente esticada. Neste caso, podemos descrever a energia do DNA como sendo a energia de curvatura do modelo de Kratky-Porod (equação 2.9, excluindo o trabalho necessário para manter a molécula nesta configuração. Teremos então para a energia do DNA:

$$E_{WLC} = \frac{1}{2} \kappa_f \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - Fz. \quad (2.50)$$

onde a força F aparece como um multiplicador de Lagrange para deixar fixa a extensão $\vec{z} \equiv \hat{z}[\vec{r}] - \vec{0}$. Como a molécula está esticada, e o eixo z está ao longo da molécula do DNA, temos $z \sim L_c$ e t_z muito maior que t_x e t_y . Decompondo o vetor unitário \hat{t} :

$$\hat{t} = t_x \hat{i} + t_y \hat{j} + t_z \hat{k} \quad (2.51)$$

e para o módulo quadrático:

$$|\hat{t}|^2 = |t_x|^2 + |t_y|^2 + |t_z|^2 = |t_z|^2 + |t_\perp|^2 = 1, \quad (2.52)$$

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

Portanto, podemos dizer que:

$|t_z| = \sqrt{1 - |t_\perp|^2}$ e como $|t_\perp|^2 \ll 1$, podemos fazer uma aproximação em primeira ordem:

$$|t_z| \cong 1 - \frac{|t_\perp|^2}{2}. \quad (2.53)$$

Devido à mesma aproximação, podemos ainda escrever $z = \int_0^{L_c} |t_z| ds$. Substituindo estas relações na equação 2.50, obtemos

$$\begin{aligned} E_{WLC} &= \frac{1}{2} k_B T A \int_0^L \left| \frac{\partial \hat{t}}{\partial s} \right|^2 ds - F \int_0^L \left(1 - \frac{|t_\perp|^2}{2} \right) ds \\ &\simeq \frac{1}{2} k_B T \int_0^L \left[A \left| \frac{\partial t_\perp}{\partial s} \right|^2 + \frac{F}{k_B T} |t_\perp|^2 \right] ds - FL, \end{aligned} \quad (2.54)$$

onde usamos $\partial \hat{t} / \partial s \cong \partial t_\perp / \partial s$ pois t_z é praticamente constante ao longo da molécula. Usando a transformada de Fourier ($\tilde{t}_\perp(q) = \int ds \exp(iqs) t_\perp(s)$) podemos decompor a energia em modos normais. Tomando a transformada inversa temos:

$$t_{\perp}(s) = \frac{1}{2\pi} \int dq \exp(-iqs) \tilde{t}_{\perp}(q), \quad (2.55)$$

$$\frac{\partial t_{\perp}(s)}{\partial s} = \frac{1}{2\pi} \int dq (-iq) \exp(-iqs) \tilde{t}_{\perp}(q). \quad (2.56)$$

A equação para a energia será:

$$\begin{aligned} E_{WLC} &= \frac{k_B T}{2} \int_0^L ds \left\{ A \frac{1}{4\pi^2} \left| \int dq (-iq) \exp(-iqs) \tilde{t}_{\perp}(q) \right|^2 \right. \\ &\quad \left. + \frac{F}{\kappa_B T} \frac{1}{4\pi^2} \left| \int dq \exp(-iqs) \tilde{t}_{\perp}(q) \right|^2 \right\} - FL \end{aligned} \quad (2.57)$$

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

Pela definição de delta de Dirac:

$$\frac{1}{2\pi} \int ds \exp i(q' - q)s = \delta(q - q') \quad (2.58)$$

A expressão para a energia se torna:

$$E_{WLC} = \frac{k_B T}{2} \int \frac{dq}{2\pi} \left[Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right] |\tilde{t}_{\perp}(q)|^2 - FL \quad (2.59)$$

Escrevendo a energia para cada modo normal, temos:

$$E_{WLC(i)} = \frac{k_B T}{2} \left(Aq^2 + \frac{F}{k_B T} \right) |\tilde{t}_i(q)|^2 \quad (2.60)$$

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

$$\begin{aligned}
Z &= \int \exp\left(-\frac{E_i}{k_B T}\right) d|\tilde{t}_i(q)| \\
&= \int \exp\left[-\frac{1}{2}\left(Aq^2 + \frac{F}{k_B T}\right)|\tilde{t}_i(q)|^2\right] d|\tilde{t}_i(q)| \\
&= \sqrt{\frac{2\pi k_B T}{Aq^2 k_B T + F}} \tag{2.61}
\end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned}
\langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle &= \frac{1}{Z} \int |\tilde{t}_i(q)|^2 \exp\left[-\frac{1}{2}\left(Aq^2 + \frac{F}{k_B T}\right)|\tilde{t}_i(q)|^2\right] d|\tilde{t}_i(q)| \\
&= \frac{k_B T}{Aq^2 k_B T + F} \tag{2.62}
\end{aligned}$$

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

$$\langle |t_\perp|^2 \rangle = 2 \int \frac{dq}{2\pi} \langle |\tilde{t}_i(q)|^2 \rangle = \sqrt{\frac{\kappa_B T}{FA}} \tag{2.63}$$

No limite de grandes estiramentos, temos que:

$$z/L \cong |t_z| \cong 1 - |t_\perp|^2/2 = 1 - \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\kappa_B T}{A}} \tag{2.64}$$

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

$$F = \frac{\kappa_B T}{A} \frac{1}{4} \left[\frac{1}{(1 - z/L)^2} \right] \tag{2.65}$$

Esta equação descreve a força para o regime de grandes estiramentos.

Estiramentos arbitrários

Se a equação 2.65 fosse válida também para pequenos estiramentos ($z \sim 0$), deveríamos recuperar a equação 2.47 fazendo a sua expansão em primeira ordem. No entanto, a expansão em primeira ordem da equação 2.65 nos dá

$$F^{(1)} \cong \frac{k_B T}{A} \left(\frac{1}{4} + \frac{z}{2L} \right), \quad (2.66)$$

Para contornar este problema, Marko e Siggia [11] acrescentaram dois termos de correção na expressão para grandes estiramentos. Esses termos são desprezíveis quando $z \sim L$, mas garantem que a expansão em primeira ordem da equação 2.65 seja dada pela equação 2.47. A correção consiste em somar o termo $z/L - 1/4$ dentro do colchete da equação 2.65. Com isso, obtemos finalmente a expressão de Marko e Siggia [11] para a força entrópica aplicada a um DNA:

$$F = \frac{k_B T}{A} \left[\frac{z}{L} + \frac{1}{4 \left(1 - \frac{z}{L}\right)^2} - \frac{1}{4} \right]. \quad (2.67)$$

A equação de força é dada em termos do comprimento de persistência A , do comprimento de contorno L , da distância média entre as extremidades da molécula z , da temperatura T e da constante de Boltzmann k_B .

Capítulo 3

Teoria de pinças ópticas e procedimento experimental

Neste capítulo apresento a parte experimental do estudo da interação da molécula de DNA com a ciclodextrina catiônica $\text{Am}-\beta\text{-CD}$. Neste trabalho realizamos experimentos de moléculas únicas de DNA [15] utilizando a técnica de pinçamento óptico. O experimento consiste basicamente em promover estiramentos de moléculas únicas de DNA com a pinça óptica e será explicado em detalhes nas seções seguintes. Realizamos medidas no equilíbrio para diferentes concentrações da ciclodextrina, observando a variação na elasticidade entrópica da molécula de DNA após a interação com a CD. Como resultado, obtivemos curvas de força x extensão DNA-ciclodextrina que analisamos com o modelo Worm-Like Chain (WLC) de Marko e Siggia [3].

3.1 Pinça Óptica

Em 1873 Maxwell demonstrou em sua teoria do eletromagnetismo que a luz pode exercer pressão de radiação, ou seja, força óptica devido a absorção, espalhamento ou emissão de luz na matéria. No entanto, esta força é muito fraca (alguns miliwatts de potência produzem força da ordem de piconewtons!) e foi por volta de 1960, com a descoberta do laser (uma fonte de luz intensa e colimada), que pesquisadores passaram a estudar de forma efetiva e

sistematicamente a pressão de radiação [17]. Em 1970 Arthur Ashkin demonstrou que forças ópticas poderiam deslocar e levitar partículas dielétricas micrométricas. Em seu artigo de 1970, "*Acceleration and trapping of particle by radiation pressure*", Ashkin escreve: "Micron-sized particles have been accelerated and trapped in a stable potential well using only the force of radiation pressure from a continuous laser" [18]. Este trabalho eventualmente levou ao desenvolvimento de forças ópticas formadas por um feixe único de luz, atualmente conhecido como pinça óptica. Ashkin e seus colaboradores utilizaram a pinça óptica em vários experimentos, desde o resfriamento e aprisionamento de átomos neutros até a manipulação de vírus e bactérias vivas. Hoje em dia a pinça óptica continua a ter aplicações em física e em biologia, sendo empregada no estudo de motores moleculares no nível de molécula-única, na física de colóides e sistemas mesoscópicos, além do estudo de propriedades mecânicas de polímeros e biopolímeros [19]. Com a possibilidade de se aplicar forças da ordem de piconewtons, podemos esticar, dobrar ou distorcer macromoléculas únicas como DNAs ou componentes do citoesqueleto celular (como microtúbulos e filamentos de actina) simulando a ação de enzimas mecânicas como a miosina, que também produz forças dessa ordem de grandeza [17].

3.1.1 Princípio de funcionamento da pinça óptica

Uma pinça óptica consiste basicamente em um feixe de laser focalizado com uma objetiva de grande abertura numérica. Quando um feixe deste tipo incide em uma pequena esfera dielétrica, cada pincel de luz do feixe dará origem a um pincel refletido e um pincel refratado. Sendo assim a esfera experimentará uma força óptica que pode ser decomposta em duas componentes: 1) uma força de espalhamento devido à reflexão e à absorção, na direção de propagação da luz e, 2) uma força de gradiente devido à refração. Apesar dessas duas forças serem originadas do mesmo fenômeno físico é conveniente separá-las para explicar a origem do pinçamento óptico. Para que haja pinçamento óptico a força de gradiente deve ser maior que a força de espalhamento e para que isso ocorra o índice de refração da esfera deve ser

*Pincel de luz é um conjunto de raios provenientes de um mesmo feixe de luz.

maior que o do meio que a circunda. Faremos a seguir uma análise das forças ópticas sob o ponto de vista da óptica geométrica e portanto, válida apenas para o limite em que o raio da esfera é muito maior do que o comprimento de onda do laser usado na pinça óptica.

Óptica geométrica

1. Força de espalhamento

A força de espalhamento é uma força devido a reflexão e absorção da luz pela esfera. Como sabemos a luz transporta momento em seus fótons e portanto, quando um feixe de luz incide em um objeto podemos ter transferência de momento linear para o objeto. Por exemplo, consideremos um único fóton carregando momento linear \vec{p} , tal que:

$$|\vec{p}| = \frac{h\nu}{c} = \frac{E}{c}$$

onde h é a constante de Planck, c a velocidade da luz, ν a frequência da onda eletromagnética e E a energia do fóton. Para o caso de incidência com direção paralela à normal, e considerando que o fóton seja totalmente refletido ao incidir em uma microesfera, a variação do momento linear será dada por:

$$|\Delta \vec{p}| = |\vec{p}_f - \vec{p}_i| = \frac{2E}{c}$$

O momento máximo transferido à esfera será igual a $|\Delta \vec{p}|$. Considerando N fótons por segundo e pela segunda Lei de Newton sabemos que a microesfera sofrerá uma força, denominada força de espalhamento, dada por:

$$|\vec{F}| = \left| \frac{dp}{dt} \right| = \frac{2}{c} \frac{dE_{total}}{dt} = \frac{2}{c} P_{total} \quad (3.1)$$

onde P_{total} é a potência total do feixe incidente. Para se ter uma idéia da magnitude dessa força, se utilizarmos um feixe de laser com uma potência de 1mW teremos uma força total com módulo dado por:

$$F_{total} = \frac{2 \times 10^{-3}}{3 \times 10^8} \simeq 1 \text{ pN}.$$

De fato, as forças típicas obtidas com uma pinça óptica estão na faixa de pico-Newton. Na figura abaixo temos esquematizado a força de espalhamento sob ponto de vista da óptica geométrica.

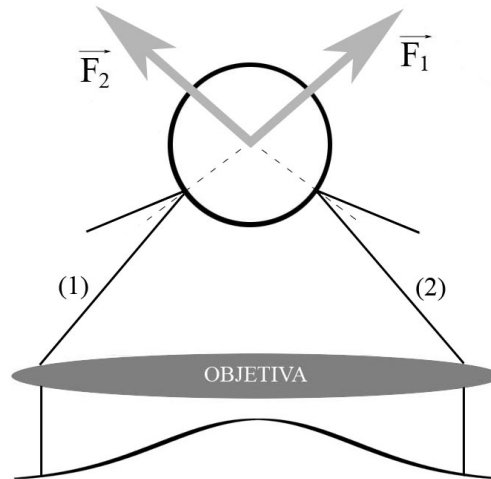


Figura 3.1: Força de espalhamento: parte da luz incidente é refletida na superfície da microesfera. Neste caso a força resultante tende a empurrar a microesfera para cima, ou seja, na direção de propagação da luz.

Na figura temos dois pincéis de luz de extremidade opostas de um feixe de laser gaussiano incidindo sobre uma esfera dielétrica. Os pincéis são refletidos na superfície da esfera e por conseqüência temos o aparecimento das forças \vec{F}_1 e \vec{F}_2 . Fazendo-se a soma de \vec{F}_1 e \vec{F}_2 , temos uma força resultante que neste caso tende a empurrar a esfera pra cima, ou seja, na direção de propagação da luz.

2. Força de gradiente

A outra componente responsável pelo pinçamento é uma força devido à refração da luz no objeto. Quando um pincel de luz incide em uma pequena esfera com índice de refração diferente do meio de incidência, o pincel é desviado da sua trajetória inicial. Este desvio provoca uma variação no

momento linear do pincel de luz e o objeto sofre uma força dada por:

$$|\vec{F}| = \left| \frac{dp}{dt} \right|$$

onde $|\Delta \vec{p}|$ é variação do momento linear da esfera. Na figura 3.2 temos esquematizado a força devido a refração sob ponto de vista da óptica geométrica:

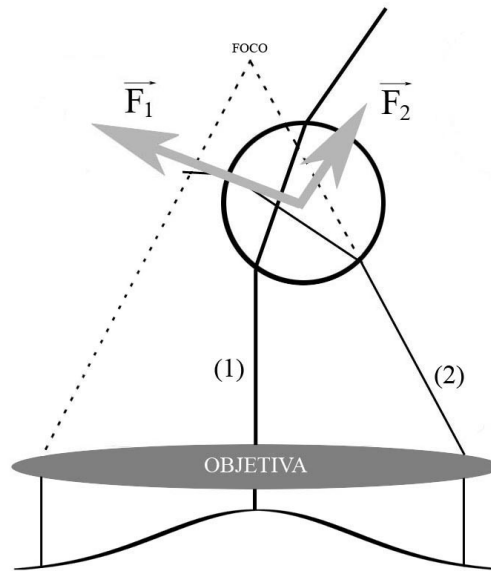


Figura 3.2: Força de gradiente atuando em microesfera situada abaixo do foco e na metade direita do perfil de intensidades do laser. A força resultante tende a empurrar a esfera para a região do foco do laser.

Na figura 3.2 temos uma esfera fora do centro do perfil gaussiano do laser e abaixo do foco. O pincel de luz 1 incide na microesfera e uma parte é refletida e outra a refratada. A parte refletida, como já dissemos, provocará o surgimento de uma força de espalhamento que tenderá a empurrar a esfera na direção de propagação feixe. A parte refratada sofrerá um desvio de sua trajetória inicial provocando uma variação do seu momento linear dado por $\Delta \vec{p}$. Pela segunda e terceira Leis de Newton, a esfera sofrerá uma variação do momento linear $|\Delta \vec{p}|$ e uma força \vec{F}_1 . Conforme a equação 1, essa força é proporcional à intensidade da luz e quando o índice de refração da esfera é maior que o índice de refração do meio, a força óptica resultante tem sentido e direção do gradiente de intensidade. O mesmo acontece com o pincel de

luz 2 proveniente da extremidade direita do feixe. No entanto, como o perfil de intensidade do laser é gaussiano, o pincel 1 proveniente da parte central do feixe possui intensidade maior do que o pincel 2, de forma que $|\vec{F}_1| > |\vec{F}_2|$ e a força resultante apontará para cima e para a esquerda, deslocando a microesfera para a região do foco do feixe.

Caso a microesfera esteja no centro do perfil gaussiano, porém acima do foco do laser, teremos a situação ilustrada na figura 3.3:

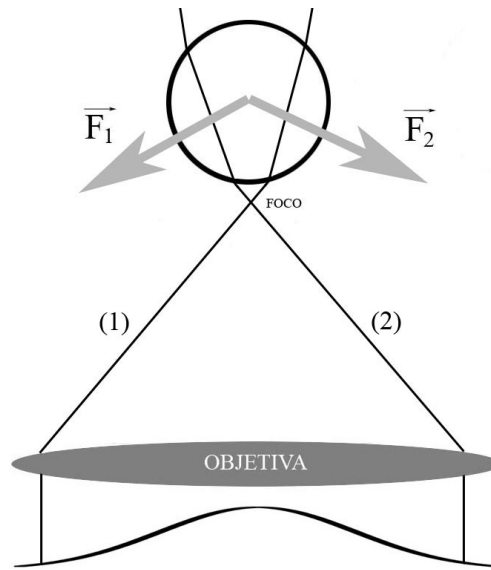


Figura 3.3: Força de gradiente atuando em microesfera situada no centro do perfil gaussiano, porém acima do foco do laser. Novamente a força resultante tende a empurrar a esfera para a região do foco do laser.

Fazendo mesmo raciocínio anterior vemos que agora a força resultante aponta para baixo, novamente na direção do foco do laser. Esta análise simplificada nos permite entender o porquê da microesfera ficar aprisionada próxima a região do foco do laser. Resumindo, sob o ponto de vista da óptica geométrica, cada pincel de luz incidente na microesfera dá origem a um pincel transmitido e um outro refletido, cujas intensidades dependem dos coeficientes de reflexão e de transmissão na interface meio-esfera. O efeito da refração é deslocar o centro a esfera para o foco do feixe (força de gradiente), enquanto o efeito da reflexão é empurrar a esfera no sentido da incidência do feixe (força de espalhamento) [8]. Para um pinçamento estável nas três

dimensões a força de gradiente deve ser maior que a força de espalhamento na direção axial da microesfera. Para que isso ocorra, o gradiente da luz incidente deve ser consideravelmente grande, o que é alcançado focalizando fortemente o feixe de laser com o uso de uma objetiva de grande abertura numérica. Como resultado desse balanço entre as forças de gradiente e de espalhamento, a posição de equilíbrio axial da esfera aprisionada é localizada levemente acima ou abaixo do foco, de forma que para pequenos deslocamentos (~ 150)nm a força restauradora (força de gradiente) é simplesmente proporcional ao deslocamento em relação à posição de equilíbrio. Sendo assim, o aprisionamento óptico funciona como uma mola que obedece a Lei de Hooke*, com constante elástica proporcional à intensidade do laser [19]. Ou seja, o perfil de luz perto do foco se torna um poço potencial harmônico, confinando a microesfera, que realiza pequenos movimentos aleatórios em torno da sua posição de equilíbrio. Neste limite $k \propto 1/r$ onde r é o raio da microesfera e k é a constante de força da pinça [14].

Espalhamento Rayleigh

Quando o raio da microesfera é muito menor do que o comprimento de onda do laser a análise das forças sob o ponto de vista da óptica geométrica não é mais válida. Nesse caso as condições para espalhamento Rayleigh são satisfeitas e as forças ópticas podem ser calculadas tratando a partícula como um dipolo elétrico induzido. A força para uma esfera com momento de dipolo elétrico \vec{m} em um campo elétrico \vec{E} , não uniforme, é dada por:

$$|\vec{F}| = \nabla(\vec{m} \cdot \vec{E})$$

sendo o momento de dipolo dado por:

$$\vec{m} \propto Cr^3 \nabla \vec{E}$$

*Lei de Hooke: comportamento de materiais para os quais a deformação é linearmente proporcional à tensão aplicada. Quando uma força \vec{F} é aplicada a uma mola de Hooke, ela obedece à seguinte equação: $\vec{F} = -k\vec{x}$, onde k é um parâmetro elástico e \vec{x} é o deslocamento do equilíbrio [14].

onde C é uma constante e r é o raio da esfera. A força de gradiente é dada por:

$$|\vec{F}| \propto Cr^3 \nabla E^2.$$

Portanto, no limite Rayleigh a microesfera pode ser tratada como um dipolo induzido e tenderá a ser levada para a região onde o gradiente da intensidade de luz $I \propto |E|^2$ for maior, ou seja, para a região onde o laser está focalizado. A constante de força da pinça para este limite será do tipo:

$$\kappa \propto r^3$$

em que a constante κ será proporcional ao cubo do raio da esfera [9].

Teoria MDSA

Quando o raio da esfera tem dimensão comparável ao comprimento de onda do laser incidente não podemos usar a óptica geométrica nem a aproximação de Rayleigh. Para esse caso uma teoria eletromagnética mais completa é necessária para a descrição do fenômeno no pinçamento. Infelizmente, a maioria dos objetos que são interessantes de serem pinçados caem na faixa de 0.1 a 10λ , onde λ é o comprimento de onda do laser. As microesferas dielétricas usadas sozinhas ou para manipular outros objetos são tipicamente do tamanho de 0.2 a $5\mu\text{m}$ que também é o mesmo tamanho de amostras biológicas que podem ser pinçadas diretamente. Recentemente, Mazolli, Maia Neto e Nussenzeig [22] calcularam teoricamente as forças axial e transversa que uma pinça óptica exerce em uma microesfera com raio e índice de refração arbitrários. O nome da teoria é Teoria MDSA (iniciais de Mie-Debye Spherical Aberration) e é a mais geral que existe na atualidade. Nos limites assintóticos (óptica geométrica para microesferas com raios grandes e Rayleigh para microesferas pequenas) a teoria MDSA se reduz aos casos anteriores. Maiores detalhes da teoria podem ser encontrados nas referências [21,22].

3.2 Montagem Experimental

Temos na figura 3.4 uma representação da montagem experimental utilizada para a realização das medidas.

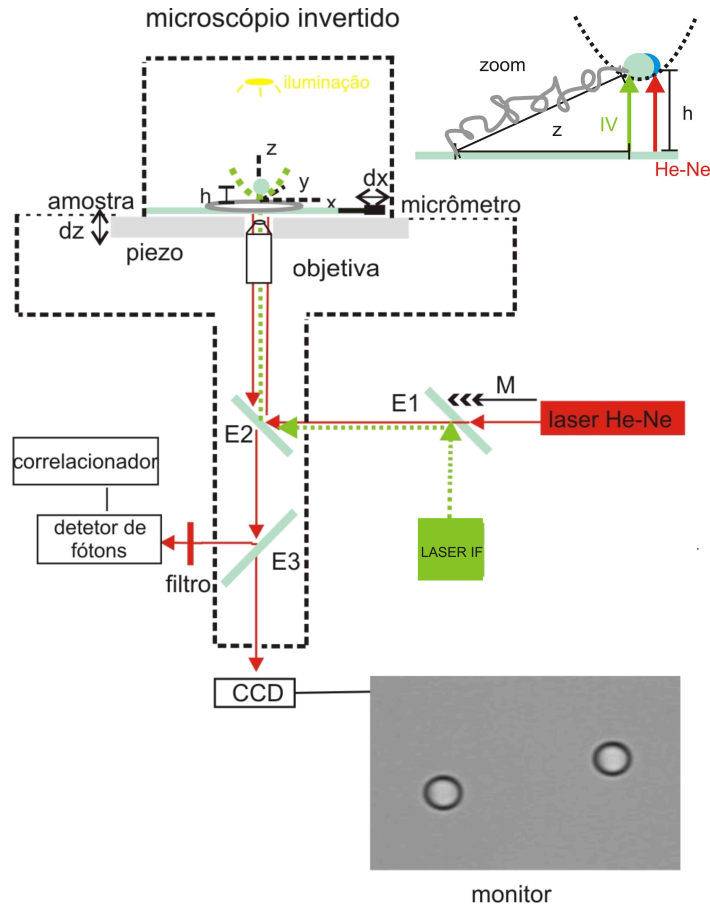


Figura 3.4: (a) Desenho esquemático mostrando a montagem experimental do Laboratório de Física aplicada a sistemas biológicos. O microscópio e seus componentes estão contidos dentro da linha pontilhada.

A montagem utilizada consiste basicamente na associação de um microscópio óptico invertido Nikon (modelo *TE300*, objetiva de óptica corrigida no infinito, aumento de $100X$, e abertura numérica de 1.4) e dois lasers. Um deles é um laser infravermelho IV (modelo *YLR-S-1064-LP*, potência máxima = 5,00 W e comprimento de onda = 1020 – 1120 nm) de perfil gaussiano e o outro é um laser visível de He-Ne (modelo *SP-127*, $\lambda = 632,8$ nm). Os dois lasers percorrem caminhos ópticos ligeiramente distintos até atingir a amostra, localizada na lamínula do microscópio, que é o nosso porta-amostra.

Na figura representamos uma microesfera (contida na amostra) aprisionada no poço potencial da pinça, indicado pela parábola côncava pontilhada. No centro da microesfera encontra-se o sistema de referência utilizado para as medidas e a indicação da distância entre o centro da bolinha e a lamínula dado por h . Abaixo da lamínula temos um deslocador piezoelétrico acoplado ao microscópio, que possibilita que a amostra seja deslocada com precisão nanométrica.

O laser infravermelho (IV), representado pelo traço verde, é a nossa pinça óptica e percorre o seguinte caminho óptico:

fonte → espelho E1 → espelho E2 → objetiva → amostra

O laser de He-Ne, representado pelo traço vermelho, é utilizado para informar a posição relativa da microesfera no poço potencial da pinça e percorre o seguinte caminho óptico:

fonte → espelho E1 → espelho E2 → objetiva → amostra → espelho E2 → espelho E3 → filtro → detector de fótons e correlacionador

O espelho E1 é um espelho dicróico* transparente ao laser de He-Ne e refletor ao laser IV. Acoplado a este espelho temos um motor de passo, representado pela letra M, que permite um ajuste fino na sua inclinação.

O espelho E2 é composto por um espelho dicróico e um semi-espelho de forma a refletir o feixe IV para a objetiva e transmitir o feixe He-Ne.

O espelho E3 é um espelho refletor para o laser de He-Ne. Após este espelho o feixe de luz retroespalhada passa por um filtro passa faixa centrado em 632 nm de 20 nm de largura. Esse garante que a luz coletada no detector seja exclusivamente aquela proveniente do laser de He-Ne.

A objetiva utilizada nos experimentos é uma objetiva com aumento de 100X e abertura numérica de 1.4. A objetiva é a responsável por focalizar o feixe de IV na amostra, originando a pinça óptica. Para o laser de He-Ne ela

*Espelhos dicróicos são espelhos com um tipo de revestimento que possibilita a reflexão de comprimentos de onda de um determinado intervalo e a transmissão de comprimentos de onda de outro intervalo.

possui a função de coletar a luz retroespalhada pela amostra. Vemos pela figura que uma parte desta luz retroespalhada vai para uma saída, na qual está localizada a câmera de vídeo EPIX e a outra parte desta luz vai para uma outra saída do microscópio, no qual está acoplado o detector de fótons e um correlacionador.

O detector de fótons (EGG-Photo Counting Module, SPCM-200 – PQ – F500), possui abertura de 150 micrômetros de diâmetro e fica montado em um deslocador XY para ser posicionado no local de melhor sinal. Para cada fóton que chega ao detector, um pulso elétrico (circuito TTL*) de 25 ns de largura é enviado ao correlacionador digital (Brookhaven BI9000AT). O correlacionador nos fornece funções de autocorrelação temporal das flutuações de intensidade de luz retroespalhada pela microesfera da amostra.

3.3 Preparação das amostras

A seguir irei descrever o método utilizado para a preparação das amostras, da construção do porta-amostras até a amostra final a ser medida. Todas as amostras são preparadas dentro de uma capela, previamente limpa com álcool e esterilizada com luz ultra-violeta por 20 minutos. Essa limpeza é importante para evitar a proliferação de bactérias em nossas amostras.

Porta Amostras

Utilizamos uma lamínula para cada amostra, e para cada experimento fazemos duas amostras idênticas. Limpamos inicialmente as lamínulas de vidro a serem utilizadas. Em seguida, utilizando parafina derretida, colamos um *o-ring* sobre cada lamínula e nos certificamos que a interface vidro/*o-ring* foi bem vedada. Antes do uso, os porta-amostras são levados novamente à capela e esterelizados com luz ultra-violeta durante 10 minutos.

*TTL: Transistor-transistor Logic é uma classe de circuito construídos com transistores de junção bipolar e resistores.

Solução tampão

Todas as amostras consistem de uma mistura de DNA, bolinhas de poliestireno e Ciclodextrina imersa em um meio aquoso. Esse meio aquoso é uma solução tampão denominada 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 estágio inicial de preparo das amostras. Ele garante a aderência das microesferas de poliestireno à uma das extremidades do DNA e a aderência da outra extremidade do DNA à lamínula [40]. Para que isso ocorra, o DNA e as bolinhas permanecem no pH 5.5 por um período de 4 a 24 horas. Depois desse tempo a amostra é lavada com o PBS pH 7,4, que é o pH fisiológico do DNA.

Preparo do PBS (Phosphate-Buffered Saline)

Os PBS pH 5,5 e PBS pH 7,4 são preparados a partir de misturas de duas soluções bases: solução doadora (D) e solução aceitadora (A).

A solução aceitadora é preparada da seguinte forma: misturamos 5mM de Na_2HPO_4 (Fosfato de Sódio Dibásico Anidro) em 600mL de H_2O deionizada (DI). Como um mol de Na_2HPO_4 corresponde a $m = 141,96g$, então a massa correspondente a 5mM será $m = 426mg$.

A solução doadora é preparada da seguinte forma: Misturar 10mM de NaH_2PO_4 (Fosfato de Sódio Monobásico Anidro) em 500mL de H_2O DI. Como um mol de NaH_2PO_4 corresponde a $m = 119,98g$, então a massa correspondente a 10mM será $m = 600mg$.

Para o PBS de pH 5,5 misturamos 363,6 mL da solução doadora em 36,4 mL da solução aceitadora. No entanto, a concentração de Na desta solução é de 10 mM e devemos aumentá-la para 150 mM, acrescentando 140 mM 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. A osmolaridade desta solução é aproximadamente 0.14M.

Para o PBS de pH 7,4 misturamos 355,4mL da solução aceitadora em

44,6mL da solução doadora. Em seguida acrescentamos 3,27g de *NaCl* como no caso anterior. Novamente, o pH deverá ser medido para a confirmação após o acréscimo de *NaCl*, pois este altera levemente o pH da solução. A osmolaridade desta solução é aproximadamente 0.14M.

Preparo da Amostra de DNA

A amostra é preparada de acordo com o seguinte protocolo:

1. Separamos dois microtubos (1 e 2) previamente limpos. No tubo 1 coloca-se 1,0 mL da solução de PBS pH 5,5 e 1 μL da solução de microesferas de poliestireno com 2,8 μm de diâmetro. O conteúdo do tubo é agitado para homogeneizar a solução.
2. No tubo 2, coloca-se 136 μl PBS pH 5,5 mais 180 μl da solução do tubo 1. O tubo 1 é descartado.
3. No tubo 2 adiciona-se 5 μl da solução de DNA previamente descongelada em banho térmico a 54°C, durante 10 minutos.

O DNA utilizado é o DNA do fago λ , um vírus que infecta a bactéria *E. Coli.*. O λ -DNA possui aproximadamente 48.000 pares de base que resulta em um comprimento de contorno médio de 17,0 μm . Nas amostras a concentração de DNA é de $C = 6,81\mu\text{g/ml}$ que corresponde a uma concentração de pares de base de 11 μM .

4. Deixamos a solução (DNA+microesferas+PBS) descansar por um período de 20 minutos para garantir a aderência das microesferas de poliestireno à uma das extremidade do DNA [40].
 5. Colocamos o conteúdo do tubo 2 cuidadosamente nos 2 porta-amostras (aproximadamente 150 μl para cada uma delas). Tampamos o porta-amostra com outra lamínula, somente para evitar a evaporação da solução.
 6. Deixamos a solução descansar por um período mínimo de 4 horas sem ultrapassar muito este valor, para minimizar a contaminação bacteri-
-

ana. Neste período, garantimos que as extremidades livres do DNA irão aderir à superfície da lamínula.

Lavagem da amostra

1. Descongela-se, à temperatura ambiente, dentro da capela, a solução de CD. Coloca-se a concentração desejada de CD em um microtúbulo contendo PBS pH 7,4.
2. Retiramos a tampa do porta-amostra. Com uma pipeta, coloca-se $50\mu\text{l}$ da solução de CD preparada 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. Descreveremos a seguir como são realizadas as medidas experimentais.

3.4 Medidas Experimentais

Medida do comprimento de persistência do DNA

A medida do comprimento de persistência do DNA, ou da flexibilidade entrópica do DNA, é feita a partir de estiramentos de moléculas únicas de DNA. Para entendermos como este estiramento é realizado devemos primeiro retornar ao protocolo de preparação das nossas amostras. Conforme narrei na seção anterior, este protocolo inclui uma etapa em que o DNA e as microesferas permanecem na solução de PBS com pH 5.5 durante um período mínimo de 4 horas. Esta etapa permite que as moléculas de DNA prendam uma das suas extremidades uma à bolinha de poliestireno e a outra extremidade à lamínula. No entanto, a maioria dos DNA não adquire esta configuração com as duas extremidades presas, e em nossa amostra temos DNA em todas as configurações ilustradas na figura 3.5.a.

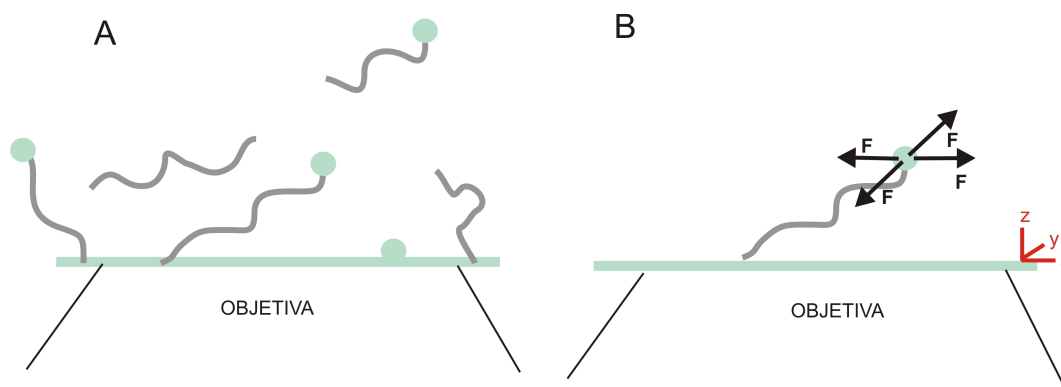


Figura 3.5: a) Configurações possíveis para as moléculas de DNA da amostra e b) Configuração desejada: uma das extremidades do DNA presa à microesfera e a outra presa à lamínula do microscópio. Nesta configuração a molécula é esticada para todas as direções da mesma forma, o que é um forte indício de que há apenas uma molécula presa à microesfera.

Somente a configuração em que as duas extremidades do DNA estão presas (uma extremidade presa à microesfera e outra à lamínula do microscópio) nos interessa, pois é aquela possível de ser esticada. Irei agora narrar as etapas a serem seguidas para o estiramento, coleta e análise do dados. Para realizar o estiramento seguimos os seguintes passos:

1) Após colocar a amostra no microscópio ligamos o laser IV (pinça) na amostra e procuramos com a pinça óptica bolinhas de poliestireno que estejam executando movimento browniano. Esta procura é monitorada pela imagem fornecida pela câmera CCD, acoplada ao microscópio, conforme ilustrado na figura 3.4. Para descobrir se a bolinha encontrada está na configuração desejada (uma extremidade presa à microesfera e outra à lamínula do microscópio), utilizamos a pinça para capturar a bolinha e em seguida puxá-la no plano xy da amostra, conforme ilustrado na figura 3.5.b. Se durante o estiramento a bolinha se desloca junto à pinça por uma distância maior do que $17\mu\text{m}$ (comprimento de contorno típico do λ -DNA) então a microesfera não possui a configuração desejada. No entanto, se a bolinha pinçada desloca uma certa distância e repentinamente volta à sua posição inicial, então encontramos uma microesfera com a configuração desejada.

Neste momento realizamos estiramentos nas direções x e y para garantir que há somente um único DNA preso à bolinha, conforme ilustrado na figura 3.5. Se o estiramento é idêntico para todos os lados, temos um forte indício que realmente só existe uma molécula de DNA presa à bolinha. No procedimento utilizado para preparar as amostras apenas 5% a 10% dos DNAs encontram-se na configuração desejada (uma extremidade presa à microesfera e outra à lamínula do microscópio). Após encontrar configuração desejada deixamos a microesfera presa no potencial da pinça. O próximo passo é realizar a calibração da pinça óptica, ou seja, medir a constante de força da pinça. Esta etapa é realizada em todos os experimentos.

2) Para medir a constante de força da pinça, deixamos inicialmente a microesfera capturada confinada no poço potencial da pinça, realizando somente pequenas oscilações em torno do seu ponto de equilíbrio, de forma a garantir que o DNA preso à bolinha não está estirado. Ligamos então o laser de He-Ne e incidimos o feixe sobre a microesfera pinçada. Em seguida, ligamos o detector de fótons acoplado à outra saída do microscópio, (conforme ilustrado na figura 3.4), e coletando a luz retroespalhada do laser He-Ne pela bolinha, podemos determinar as características do seu movimento browniano, como o tempo característico e amplitude. A partir daí, conhecendo o atrito entre o meio e a microesfera, podemos determinar a constante de força da pinça. A constante de força será uma função do raio da microesfera a e da altura h da qual ela se encontra da lamínula.

Para determinar os parâmetros do movimento browniano da bolinha citados acima devemos fazer uma medida do perfil de retroespalhamento. Este perfil é obtido medindo a intensidade do feixe de He-Ne retroespalhada enquanto a microesfera pinçada se move em relação ao feixe do He-Ne.

Para mover a microesfera sem mover o feixe de He-Ne utilizamos o espelho dicróico E_1 , ilustrado na figura 3.4. Conforme já dito, esse espelho é transparente para o comprimento de onda do He-Ne, e portanto, nos permite movimentar o laser IV sem mover o He-Ne. Para mover a microesfera de maneira controlada utilizamos o motor de passo M acoplado ao espelho E_1 . Em seguida, utilizando a câmera CCD, ligamos o motor M a uma dada velocidade v , e filmamos o deslocamento da microesfera, incluindo a posição

inicial P_i e a posição final P_f da microesfera. A velocidade do motor será determinada analisando o filme e será dada pela diferença entre P_f e P_i (dadas em pixels) dividida pelo intervalo de tempo Δt e pelo número de pixels por micrômetro:

$$\Delta x(\mu m) = \frac{\Delta x(px)}{15,87(px/\mu m)} \quad (3.2)$$

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

$$v = \frac{\Delta x}{\Delta t} \quad (3.3)$$

O centro do perfil, na qual a intensidade de retroespalhamento é máxima, representa a posição de equilíbrio da microesfera pinçada. A partir dele movemos o espelho $E1$ e enquanto a bolinha se desloca, obtemos a curva de *Intensidade* \times *Posição* ou perfil de retroespalhamento da microesfera, conforme ilustrado na figura 3.6.

Após medida, a curva do perfil é normalizada dividindo-se a intensidade a cada ponto pela intensidade máxima ($I = I(x)/I_{max}$). Em seguida, ajustamos a curva por uma gaussiana:

$$I = I_0 \exp \left[-\frac{(x - x_0)^2}{2\sigma^2} \right] \quad (3.4)$$

onde I_0 vale 1, x_0 é o valor médio e σ é a largura da gaussiana. Após a medida do perfil de retroespalhamento, precisamos fazer medidas da função de autocorrelação da bolinha no poço potencial para determinar os parâmetros do movimento browniano da bolinha capturada, conforme descrito a seguir.

3) A curva da função de autocorrelação temporal (ACF) é obtida colocando a microesfera na posição de derivada máxima do perfil da luz retroespalhada (posição de melhor relação sinal-ruído) e ligando o correlacionador.

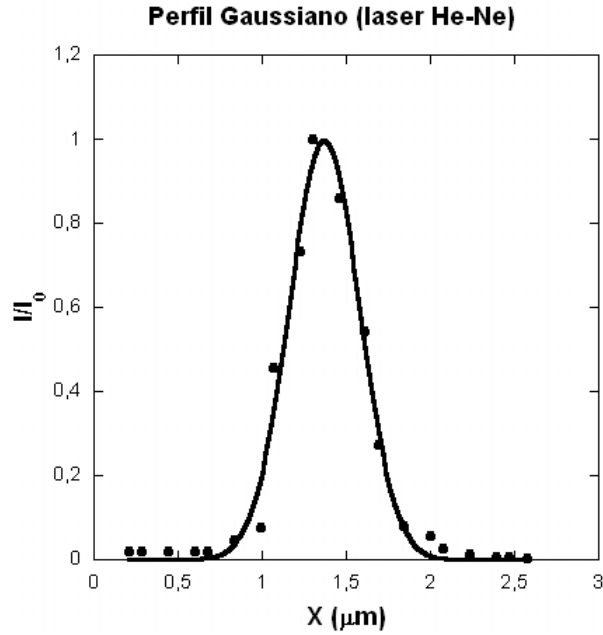


Figura 3.6: Perfil de retroespalhamento: o perfil é obtido movendo a microesfera pinçada em relação ao feixe de He-Ne e capturando a intensidade de luz retroespalhada pelo feixe de He-Ne.

O correlacionador nos fornece a curva de autocorrelação temporal* (figura 3.7), que é ajustada com a curva de decaimento exponencial:

$$\langle I(\vec{r}_0(0))I(\vec{r}(t)) \rangle = C + Ae^{\frac{-t}{\tau_{\perp}}} + A_z e^{\frac{-t}{\tau_z}} \quad (3.5)$$

onde $\tau_{\perp} < \tau_z$, pois a constante de força transversal κ_{\perp} é maior do que a constante axial κ_z . A partir do ajuste, finalmente extraímos os valores do tempo característico τ_{\perp} do movimento no plano xy , que é o que nos interessa. Para

*Função de autocorrelação temporal:

$$C(t)e = \frac{1}{T} \int_0^T I(t')I(t'+T)dt'$$

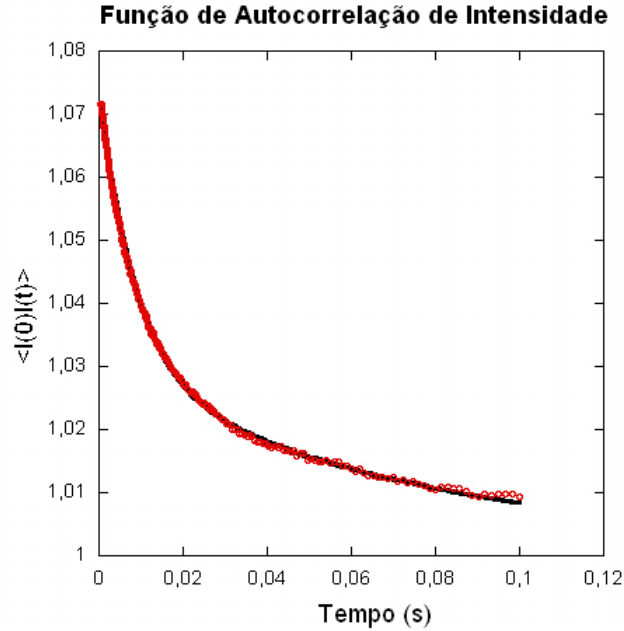


Figura 3.7: Curva de Autocorrelação de Intensidades: para cada bolinha capturada fazemos três medidas de autocorrelação.

cada bolinha capturada realizamos três medidas de autocorrelação e fazendo a média aritmética dos valores encontrados para τ_{\perp} , podemos calcular a constante da pinça, κ_{\perp} , através de :

$$\overline{\tau_{\perp}} = \frac{\gamma_{\parallel}}{\kappa_{\perp}} \quad (3.6)$$

onde γ_{\parallel} é o coeficiente de arraste sobre a esfera. O próximo passo é calcular este coeficiente de arraste.

A equação para γ_{\parallel} é da forma [23]:

$$\gamma_{\parallel} = \gamma_0 \left[1 - \frac{9}{16} \left(\frac{r}{h} \right) + \frac{1}{8} \left(\frac{r}{h} \right)^3 - \frac{45}{254} \left(\frac{r}{h} \right)^4 - \frac{1}{16} \left(\frac{r}{h} \right)^5 \right]^{-1} \quad (3.7)$$

onde

$$\gamma_0 = 6\pi\eta_a r \quad (3.8)$$

e r é o raio da esfera, h é a altura na qual ela se encontra da lamínula e η_a é a viscosidade da água, dada por:

$$\bar{\eta} = 0,26 + 1,51e^{-\frac{T}{29}}. \quad (3.9)$$

onde T é a temperatura ambiente em graus Celsius.

Uma vez calculado o valor de γ_{II} , podemos determinar o valor da constante de força da pinça, através da equação 3.6. Os valores para esta constante utilizada em nosso laboratório são da ordem de dezenas de nanoNewtons por centímetro.

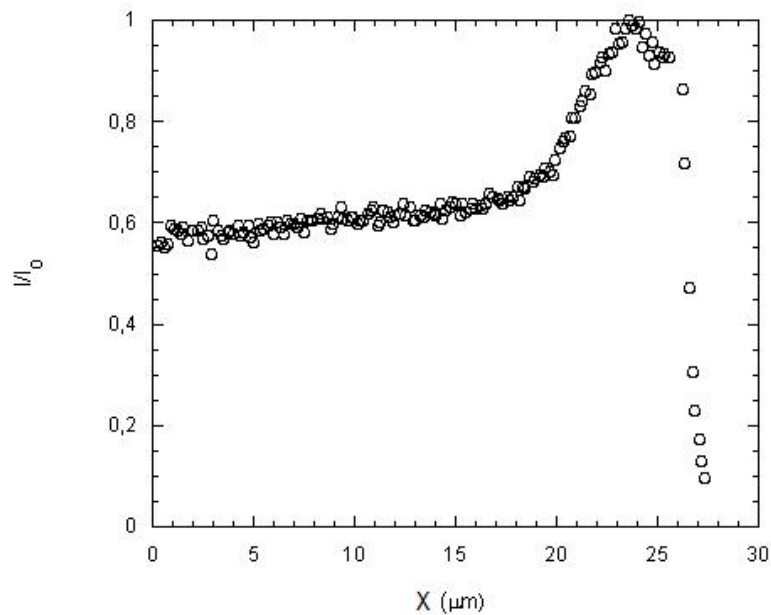


Figura 3.8: Intensidade versus Estiramento

4) O próximo passo no procedimento experimental é determinar a curva de intensidade versus estiramento para as moléculas de DNA. Para realizar o estiramento de forma controlada utilizamos o deslocador piezoelétrico acoplado ao microscópio, conforme ilustrado na figura 3.4. A curva é obtida coletando-se a luz retroespalhada pela microesfera (em função do tempo) enquanto esticamos o DNA e é feita pelo ou menos 4 vezes para cada DNA encontrado. Um esquema da medida está ilustrado na figura 3.9.

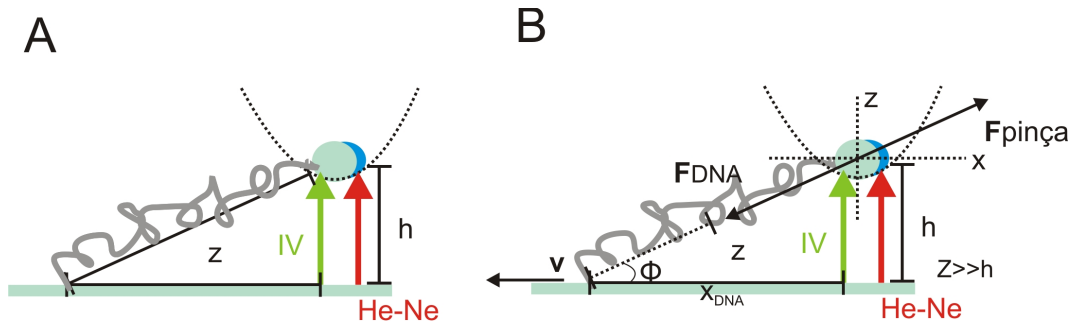


Figura 3.9: Esquema mostrando como são realizadas as medidas de estiramento de moléculas únicas de DNA. É importante notar que denotamos x como a posição do centro da microesfera no poço potencial e por x_{DNA} o estiramento da molécula de DNA. $F_{pinça}$ é a força que a pinça óptica exerce sobre a microesfera quando esta é afastada de sua posição de equilíbrio. No entanto, esta força é igual em módulo à força exercida pela molécula de DNA para afastar a bolinha da posição de equilíbrio.

A extensão do DNA ao ser esticado pode ser encontrada já que conhecemos a velocidade do estágio (piezoelétrico) do microscópio ($v = 58 \text{ nm/s}$). Esta velocidade é baixa o suficiente para garantir que o DNA passe pelas configurações de equilíbrio e de forma que a força de Stokes sobre a microesfera pode ser desprezada. Além disso, é importante dizer que a microesfera de poliestireno é mantida a uma distância fixa do estágio do microscópio ($h = 3,5 \mu\text{m}$) durante todo o experimento.

Para tratar a curva de intensidade versus estiramento começamos transformando a coordenada x (tempo) em extensão absoluta ao longo do eixo x (paralelo ao estágio do microscópio), o qual denominamos x_{DNA} . A distância entre as extremidades da molécula de DNA z é relacionada ao x_{DNA} através de:

$$z = \sqrt{x_{DNA}^2 + h^2} \quad (3.10)$$

Teremos portanto a curva intensidade *versus* extensão, característica deste tipo de medida, como vemos na figura 3.8.

O próximo passo é obter a curva de força *versus* estiramento para a molécula de DNA e para os complexos DNA-CD.

5) Para obter a curva de força *versus* extensão devemos converter a intensidade de luz retroespalhada em força já que o tempo já foi convertido na extensão da molécula (ao longo do eixo x). Para isso, primeiro invertamos a equação 3.4, e escrevemos a posição x em função da intensidade I :

$$x = x_0 \pm \sigma \sqrt{2 \ln \left(\frac{I_0}{I} \right)}. \quad (3.11)$$

Desta forma determinamos a posição da microesfera em cada instante no perfil de estiramento. Em seguida determinamos a posição inicial x_0 (correspondente à intensidade inicial no perfil de estiramento) e a variação de posição para cada ponto, dada por:

$$\Delta x = x - x_0. \quad (3.12)$$

Finalmente, a força na direção x é determinada multiplicando-se a variação de posição pela constante de força da pinça óptica, ou seja:

$$F_x = k \Delta x. \quad (3.13)$$

É importante notar que denotamos x como a posição do centro da microesfera no poço potencial e por x_{DNA} o estiramento da molécula de DNA. Esta é a força que a pinça óptica exerce sobre a microesfera quando esta é afastada de sua posição de equilíbrio. No entanto, assim como ilustrado a figura 3.9, esta força é igual em módulo à força exercida pela molécula de DNA para afastar a bolinha da posição de equilíbrio. Desta forma, obtemos uma curva que mostra a força em função da extensão para a molécula de DNA.

A figura 3.10 mostra uma curva típica obtida com o procedimento narrado acima. Fazemos o ajuste desta curva com a expressão teórica de Marko e Siggia [11] (eq. 2.67) para obtemos o comprimento de contorno L e o comprimento de persistência A da molécula de DNA e dos complexos DNA-CD.

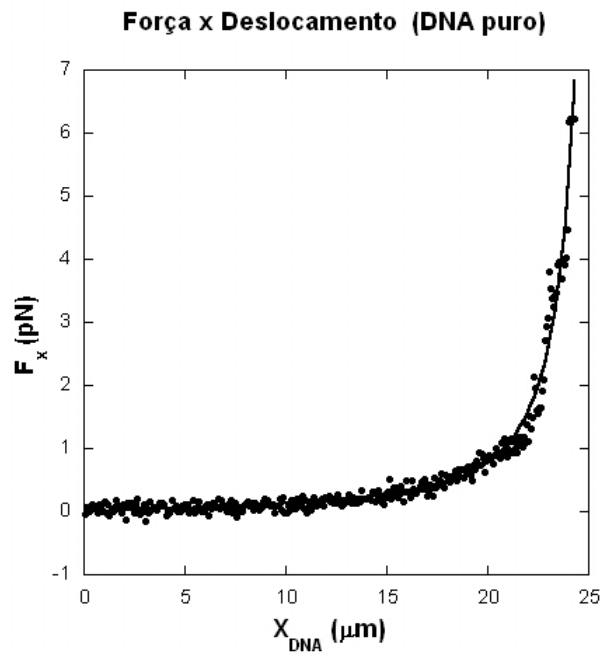


Figura 3.10: Força versus Estiramento

Na verdade, como trabalhamos experimentalmente na direção x , é mais conveniente usar a componente x para fazer o ajuste. Esta componente é determinada conhecendo-se a altura fixa da microesfera em relação à lamínula. Na figura 3.9 a extensão do DNA é dada pela equação 3.10 e

$$F_x = F \cos \phi = F \left(\frac{x_{DNA}}{z} \right) \quad (3.14)$$

Fazendo estas considerações, a expressão final da componente x da força é:

$$F_x = \frac{\kappa_B T}{A} \left[\frac{(x_{DNA}^2 + h^2)^{\frac{1}{2}}}{L_c} + \frac{1}{4(1 - \frac{(x_{DNA}^2 + h^2)^{\frac{1}{2}}}{L_c})^2} - \frac{1}{4} \right] \frac{x_{DNA}}{(x_{DNA}^2 + h^2)^{\frac{1}{2}}}, \quad (3.15)$$

Na equação, F_x é a componente x da força, κ_B a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, A o comprimento de persistência do DNA, L_c o seu comprimento de contorno, h a altura da microesfera em relação ao estágio do microscópio. No capítulo a seguir discutiremos os experimentos realizados.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Neste capítulo apresentamos os resultados dos experimentos realizados. Ao longo do trabalho foram realizadas medidas para diferentes concentrações de ciclodextrina e como resultado final obtivemos um gráfico para o comprimento de persistência do complexo em função da concentração de CD. O gráfico apresenta um comportamento não usual e expomos aqui nossas interpretações. Primeiro faremos uma interpretação fenomenológica e em seguida iremos discutir qual a contribuição das repulsões interfosfatos para o comprimento de persistência do DNA segundo Manning e Podestá [24,25]. Além disso, como resultado prático imediato chegamos, a partir dos nossos dados, ao melhor valor para a concentração de ciclodextrina a ser utilizada em terapia gênica. Tal resultado será apresentado ao final deste capítulo.

4.1 Comportamento do comprimento de persistência do complexo DNA-CD

Ao longo do trabalho realizamos medidas de estiramento para concentrações fixas de DNA e diferentes concentrações de ciclodextrina. Analisamos as curvas com modelo Worm-Like Chain (WLC) de Marko e Siggia e para cada curva de força \times extensão extraímos o valor para o comprimento de persistência do complexo. No gráfico final (4.1) plotamos os valores de A

ponto experimental	C_{CD} / C_{pb}	razão das cargas (r)	A (nm)
1°	0	0	50 ± 3
2°	0,50	$0,25 \pm 1$	29 ± 4
3°	1,00	$0,50 \pm 1$	19 ± 5
4°	1,50	$0,75 \pm 1$	14 ± 3
5°	2,00	$1,00 \pm 1$	24 ± 3
6°	3,00	$1,50 \pm 1$	61 ± 4
7°	4,00	$2,00 \pm 1$	81 ± 8
8°	5,00	$2,50 \pm 1$	157 ± 50
9°	6,00	$3,00 \pm 1$	7 ± 6
10°	7,00	$3,50 \pm 1$	10 ± 2

Tabela 4.1: Tabela com detalhes das medidas experimentais: C_{CD} / C_{pb} (concentração de ciclodextrina / concentração de pares de base do DNA), razão das cargas para cada concentração e comprimento de persistência do complexo.

do complexo para cada concentração de ciclodextrina em função da razão C_{CD} / C_{pb} (concentração de ciclodextrina / concentração de pares de base do DNA).

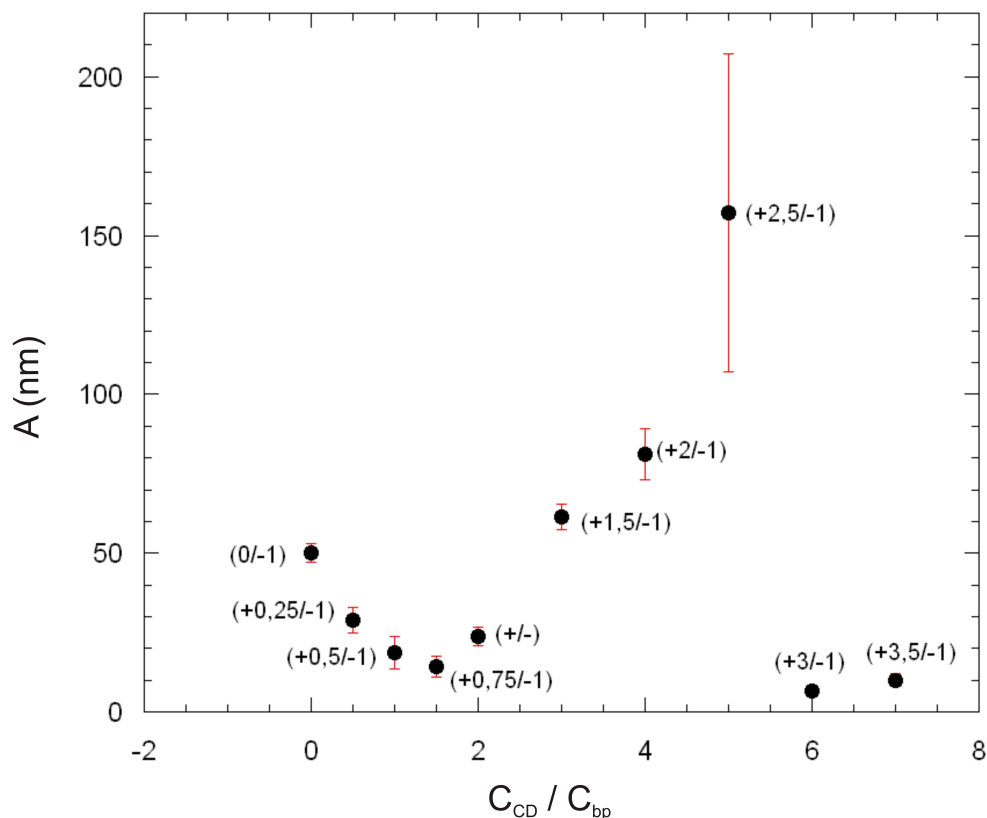
Conforme mencionado no capítulo anterior, nossas amostras possuem como solução base um solução tampão com pH 7,4. Nesta condição, a ciclodextrina ($\text{Am}-\beta\text{-CD}$) possui carga (+1) e cada grupo fosfato do DNA possui carga (-1). No entanto, cada par de base do DNA possui dois grupos fosfatos (ver figura 2.6) e, por consequência, cada par de base possui carga (-2). A tabela 4.1 mostra as concentrações utilizadas nos experimentos e a razão das cargas para cada concentração de ciclodextrina. A razão das cargas (r) indica a quantidade de carga total presente na solução e é dada por:

$$r = \frac{\text{conc. de ciclodextrina}}{\text{conc. de pares de base} \times 2}. \quad (4.1)$$

A concentração de pares de base do DNA utilizada em nossa amostra é tipicamente $C_{pb} = 11 \mu\text{M}$.

Analisando o gráfico final podemos destacar três regiões bem caracterís-

Complexo DNA - CD



Razão das cargas: (carga positiva total (CD) / carga negativa total (DNA))

Figura 4.1: Gráfico final: comprimento de persistência do complexo $\times C_{CD}/C_{pb}$. Para concentração nula de ciclodextrina, ou seja, para o DNA livre, obtivemos $A = 50 \pm 3\text{nm}$ que está em perfeita concordância com o valor encontrado na literatura para o λ -DNA [10,15,32].

ticas:

1^a) no intervalo de $C_{CD}/C_{pb} = [0 - 1, 5]$ o comprimento de persistência do complexo sofre uma queda e o valor de A passa de $50 \pm 3\text{nm}$ para $14 \pm 3\text{nm}$ - o que corresponde a uma variação de 72% em relação ao valor de A para o DNA puro;

2^a) no intervalo de $C_{CD}/C_{pb} = [1, 5 - 5, 0]$, o comprimento de persistência

do complexo apresenta um aumento acentuado e passa de $14 \pm 3\text{nm}$ para $157 \pm 50\text{nm}$;

3ª) no intervalo de $C_{CD}/C_{pb} = [5, 0 - 7, 0]$, o comprimento de persistência do complexo apresenta uma queda abrupta e passa de $157 \pm 50\text{nm}$ para $10 \pm 2\text{nm}$.

Como ainda não conseguimos uma interpretação que consiga explicar as três regiões em conjunto faremos a seguir uma análise qualitativa destas três regiões separadamente.

4.2 Descrição qualitativa dos resultados

Primeira região $C_{CD}/C_{pb} = [0 - 1, 5]$

Nesta região temos uma queda no comprimento de persistência de $50 \pm 3\text{nm}$ para $14 \pm 3\text{nm}$. Acreditamos que esta queda é devido às ligações entre as ciclodextrinas catiônicas diluídas em solução e os grupos fosfatos carregados da molécula de DNA. Para entender melhor estas ligações e a relação destas com o comprimento de persistência do complexo analisemos a figura 4.2.

Na letra A temos representado de maneira simplificada uma molécula de ciclodextrina catiônica e uma de DNA. No DNA ressaltamos que a distância, ao longo da molécula, entre as cargas negativas dos fosfatos é aproximadamente $0,50\text{nm}$. Para a ciclodextrina as dimensões ressaltadas são o diâmetro externo, de $1,50\text{nm}$ e a sua altura, de $0,80\text{nm}$.

Quando colocamos as concentrações de ciclodextrina e de DNA em solução acreditamos que as moléculas de CD são atraídas pelas cargas negativas dos fosfatos por forças eletrostáticas. No entanto, é importante notar que nem todos os fosfatos possuem a mesma probabilidade de se ligar a uma CD. Isto ocorre porque o diâmetro da molécula de CD é três vezes maior do que a distância entre fosfatos de forma que, para cada ciclodextrina ligada, os dois fosfatos vizinhos têm probabilidade menor de fazerem ligações do que os fosfatos afastados (figura 4.2.B).

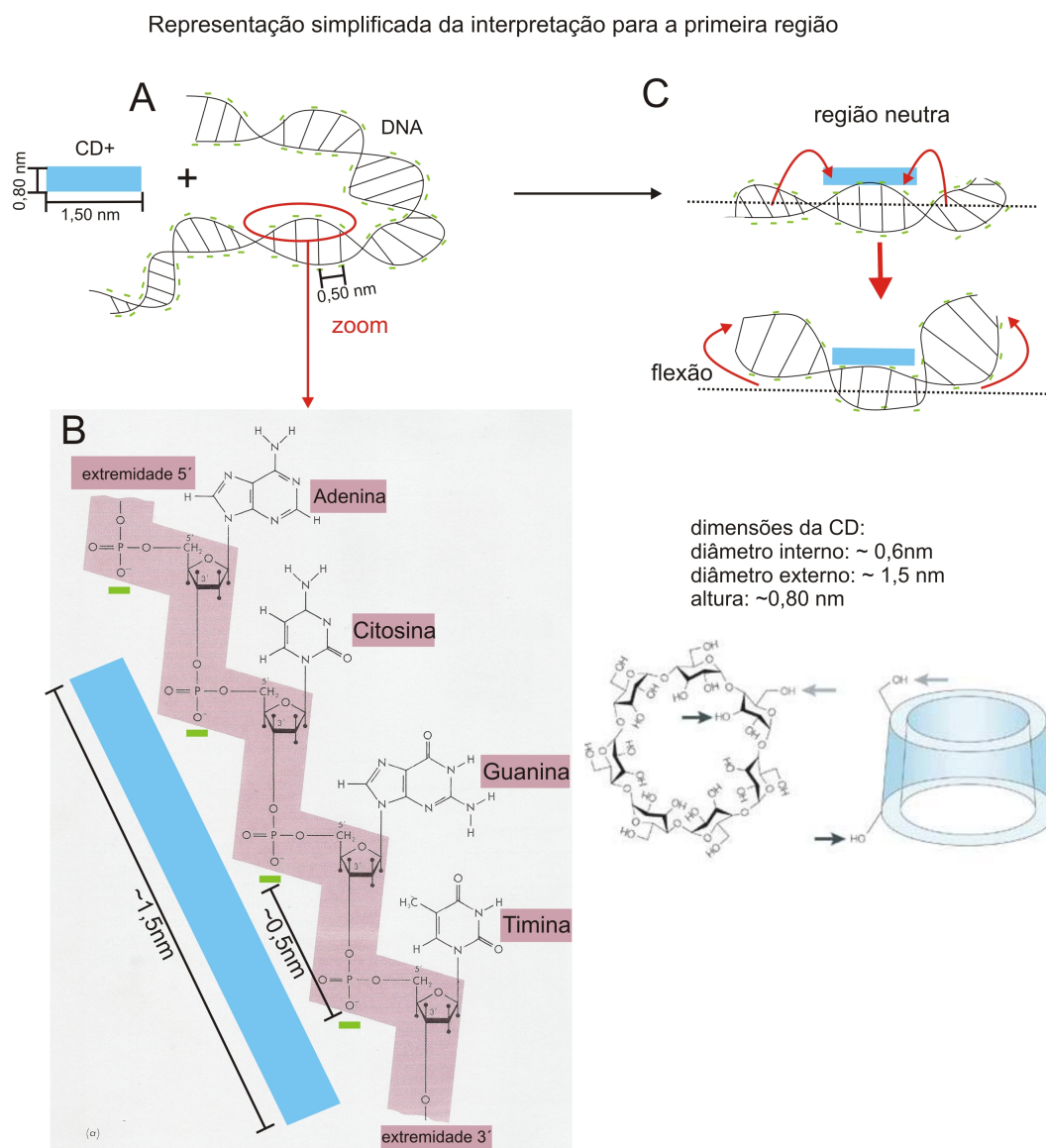


Figura 4.2: Representação das interações para a primeira região. A ilustração não é fiel à verdadeira estrutura do DNA pois estamos interessados somente nas dimensões das moléculas de CD e DNA e os efeitos de sua interação.

Para cada ciclodextrina que se liga a um fosfato, uma carga negativa do DNA é neutralizada, formando uma região neutra, conforme ilustrado na letra C da figura 4.2. Esta região causa uma diminuição local da repulsão interfosfatos, provocando uma deformação de flexão em direção à região e,

conseqüentemente, diminuindo o comprimento de persistência da molécula de DNA [24,25]. No entanto, este comportamento só é válido para os três primeiros pontos, para os quais a razão das cargas ainda é menor do que 1.

Segunda região $C_{CD}/C_{pb} = [1, 5 - 5, 0]$

Quando a razão das cargas passa a ser maior do que 1, ou seja, quando passa a existir em solução pelo menos uma ciclodextrina para cada fosfato, o comprimento de persistência passa a aumentar. Nesta região temos um aumento no comprimento de persistência de $14 \pm 3\text{nm}$ para $157 \pm 50\text{nm}$. Na nossa interpretação este aumento ocorre devido à conjugação de dois fatores. Primeiro, acreditamos que o número de ligações entre as ciclodextrinas catiônicas diluídas em solução e os grupos fosfatos carregados da molécula de DNA aumenta, diminuindo a repulsão interfosfatos localmente através da formação de novas regiões neutras. No entanto, junto a essas novas ligações e regiões neutras, começamos a ter um efeito de exclusão de volume entre as CDs ligadas, impedindo as flexões do DNA e provocando um aumento do comprimento de persistência. Para entender melhor a conjugação entre estes dois fatores (diminuição da repulsão interfosfatos e exclusão de volume) e a relação destas com o comprimento de persistência do complexo analisemos a figura 4.3.

Na letra A da figura 4.3 temos ilustrado várias CDs ligadas a uma única molécula de DNA. Com o aumento de concentração de CD em solução ocorre também um aumento na quantidade de CDs ligadas à um mesmo DNA. No entanto, enquanto novas CDs se ligam aos fosfatos, começamos a ter uma disputa de espaço entre as CDs adjacentes ligadas. Esta disputa gera um efeito de exclusão de volume entre as CDs e é capaz de inibir os efeitos de flexão que deveriam ocorrer devido à diminuição da repulsão interfosfatos. A consequência deste efeito é que a molécula de DNA começa a ficar enrijecida localmente, aumentando o seu comprimento de persistência. Para a concentração $C_{CD}/C_{pb} = 5,0$, a quantidade de moléculas de CDs ligadas ao DNA chega ao máximo e nesta situação acreditamos que o DNA assume a configuração ilustrada na letra B da figura 4.3. O efeito de exclusão de volume

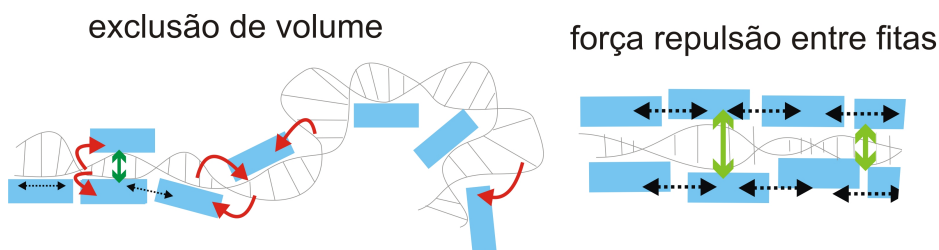


Figura 4.3: Representação das interações para a segunda e terceira região. A ilustração não é fiel à verdadeira estrutura do DNA pois estamos interessados somente nas dimensões das moléculas de CD e DNA e os efeitos de sua interação. Na figura, as setas vermelhas indicam deformações de flexão, as pretas indicam a competição de espaço entre as CDs adjacentes ligadas e o consequente efeito de exclusão de volume e as setas verdes indicam uma possível força entre as duas fitas de DNA (no sentido de soltar as fitas) devido à presença de CDs ligadas em ambos os lados das fitas.

entre as CDs adjacentes é potencializado e a molécula adquire uma rigidez elevada. Para as concentrações seguintes o DNA apresenta uma queda brusca no comprimento de persistência.

Terceira região $C_{CD}/C_{pb} = [5, 0 - 7, 0]$

Nesta região o comprimento de persistência diminui abruptamente de $157 \pm 50 \text{ nm}$ para $10 \pm 2 \text{ nm}$. Ainda não temos um modelo físico para explicar o que ocorre nesta região. No entanto, sabemos que os valores de comprimento de persistência encontrados são valores típicos para fitas simples de DNA. Tal fato sugere uma possível desnaturação do DNA. Uma hipótese para esta desnaturação poderia ser o aparecimento de uma força de repulsão entre as duas fitas devido ao fato que CDs em segmentos opostos tendem a fazer o DNA entortar em torno de si [24,25], cada segmento sendo puxado em direções opostas.

4.3 Contribuição das repulsões interfosfatos para o comprimento de persistência do DNA

De acordo com os nossos dados da região 1 de concentração de CD, a repulsão interfosfatos na molécula de DNA é um elemento que possui forte contribuição na rigidez da molécula. No entanto, segundo Williams em [26], a questão fundamental sobre o que deve ser levado em conta quando se discute a rigidez do DNA permanece não resolvida e, portanto, estimar a contribuição relativa das forças de empilhamento das bases e da repulsão eletrostática dos fosfatos para a rigidez e deformação do DNA continua sendo uma área de pesquisa importante e ativa. Várias possibilidades sobre essas contribuições podem ser consideradas. Apresentamos aqui discussões de Manning e Podestà que reforçam nossos resultados para os quais a repulsão interfosfatos é um fator de grande relevância para rigidez da molécula de DNA.

Segundo Manning [24], para entender melhor o efeito da eletrostática na rigidez do DNA podemos definir DNA* como uma estrutura hipotética que resultaria de um DNA caso seus grupos fosfatos não fossem carregados. A partir desta idéia, Manning deduz uma relação não aditiva entre o comprimento de persistência A do DNA e o comprimento de persistência A^* do DNA*, denominado isômero nulo do DNA. A relação é dada por:

$$A = \left(\frac{\pi}{2}\right)^{2/3} R^{4/3} (A^*)^{2/3} Z^{-2} l_B^{-1} \left[(2Z\xi - 1) \frac{\kappa b e^{-\kappa b}}{1 - e^{-\kappa b}} - 1 - \ln(1 - e^{-\kappa b}) \right] \quad (4.2)$$

onde $\xi = l_B/b$ é a densidade de carga dimensional da molécula, $l_B = q^2/DK_B T$ é o comprimento de Bjerrum para o solvente puro *, b é a distância entre as cargas no DNA, $1/\kappa$ é o comprimento de Debye † e R é o raio do DNA.

* Comprimento de Bjerrum: distância para a qual duas unidades de cargas $\pm q$ possuem energia de Coulomb igual a $K_B T$ se o solvente possui constante dielétrica D .

† Comprimento de Debye: o comprimento de Debye fornece uma medida da distância na qual a influência de um campo elétrico perturbativo é sentida no interior do plasma.

fração de cargas neutralizadas	A (nm)
0,0	56,5
0,3	33,2
0,4	21,2
0,5	14,9
0,6	11,1
0,7	8,6
1,0	7,0

Tabela 4.2: Comprimento de persistência versus fração das cargas neutralizadas.

De acordo com a equação de Manning, para o B-DNA ($b = 0,17\text{nm}$, $R = 1\text{nm}$, $\xi = 4,2$ e $A = 50\text{nm}$) o valor A^* para o comprimento de persistência do DNA* é 7nm . Este valor previsto para A^* é consistente com a idéia de que uma neutralização eficiente das cargas dos fosfatos de moléculas de DNA leva a valores muito baixos de comprimento de persistência, indicando que a repulsão interfosfatos é um fator de grande relevância para a rigidez do DNA.

Além de Manning podemos citar também Podestà em seu artigo "Positively charged surfaces increase the flexibility of DNA" [25]. Neste trabalho Podestà realizou medidas de flexibilidade para DNAs em contato com diferentes tipo de moléculas carregadas e observou um aumento de cinco vezes da flexibilidade do DNA. Para explicar teoricamente a relação entre o comprimento de persistência e os grupos fosfatos da molécula de DNA, Podestà utilizou a equação de Manning (equação 4.2) e, a partir desta, previu que as repulsões interfosfatos para o DNA de maior flexibilidade foram atenuadas em 50%. Além disso, Podestà tabelou os valores calculados para P em função da fração x das cargas dos fosfatos neutralizadas mostrados na tabela 4.3.

A teoria de Manning, que prevê a diminuição do comprimento de persistência com a neutralização dos fosfatos, pode então explicar nossos dados da região 1 de concentração de CD, onde nosso valor mínimo de $A = 14,3\text{nm}$ é possível dentro desta teoria.

4.4 Terapia gênica

Ao fim da discussão apresentamos um resultado imediato para aplicação em terapia gênica. Segundo os nossos dados experimentais, o melhor valor para a concentração de ciclodextrina a ser utilizada em terapia gênica é de $C_{CD}/C_{pb} = 1,50$. Esta concentração corresponde ao menor comprimento de persistência com o DNA, sem perder as características de fita dupla, e ao maior nível de condensação da molécula de DNA, e portanto, é a configuração na qual o DNA ocupa o menor volume possível. Para esta concentração, o valor para o comprimento de persistência da molécula de DNA é de aproximadamente 14 nm. Além disso, acreditamos que para $C_{CD}/C_{pb} > 5$ o DNA se desnatura e deixa de ser funcional. Assim, concentrações acima destas devem ser evitadas para o sucesso da terapia gênica.

Capítulo 5

Conclusões e perspectivas

Esta dissertação foi um trabalho realizado em colaboração com o Departamento de Produtos Farmacêuticos da Universidade Federal de Minas Gerais. O objetivo deste trabalho foi o estudo experimental da interação DNA-composto catiônico visando uma maior condensação da molécula de DNA com aplicação em terapia gênica. O composto catiônico que nos foi proposto a ser testado foi um derivado da ciclodextrina, denominado 6 – *monodeoxy* – 6 – *monoamino* – β – *ciclodextrina* (*Am* – *beta* – *CD*). Para estudar a interação DNA-CD realizamos estiramentos de moléculas únicas de DNA (no limite de forças entrópicas) usando a técnica de pinçamento óptico. Medimos o comprimento de persistência da molécula de DNA puro e complexada com a CD, que nos fornece informação sobre a flexibilidade da molécula. Realizamos medidas para diferentes concentrações de ciclodextrina e como resultado obtivemos curvas de força x extensão do complexo. Analisamos estas curvas com o modelo Worm-Like Chain (WLC) de Marko e Siggia e verificamos um comportamento não usual para o comprimento de persistência do complexo em função da concentração de CD.

Ao final deste trabalho experimental atingimos o objetivo de estudo proposto e concluímos que a (*Am*-*beta*-*CD*) é uma alternativa para a condensação da molécula de DNA. A melhor concentração do fármaco capaz de promover o empacotamento da molécula, sem perder as características de fita dupla, é de $C_{CD}/C_{pb} = 1,50$. Para esta concentração, o complexo DNA-CD

possui comprimento de persistência $A = 14 \pm 3\text{nm}$. Além disso, mostramos que concentrações $C_{CD}/C_{pb} > 5$ devem ser evitadas pois há indicações de que nestas concentrações o DNA se desnatura e deixa de ser funcional.

Além deste resultado prático e imediato com aplicação em terapia gênica, esta dissertação fornece novos dados experimentais que poderão auxiliar na discussão da contribuição das repulsões interfosfatos para o comprimento de persistência do DNA. Nossos dados para a região 1 de concentração de CD indicam que estas repulsões na molécula de DNA contribuem fortemente para a sua rigidez. Tal resultado reforça o modelo de Manning acerca da contribuição das repulsões interfosfatos para o comprimento de persistência do DNA. Os comportamentos para o comprimento de persistência nas regiões 2 e 3 de concentração de CD aguardam uma teoria que leve em conta a neutralização dos fosfatos conjuntamente com o efeito de exclusão das moléculas de CD, além da possível desnaturação do DNA. Sendo assim, as perspectivas deste trabalho são desenvolver uma teoria que explique o comportamento observado para o comprimento de persistência, com a realização de novas medidas para a determinação de parâmetros a serem usados na teoria. Além disso, pretendemos realizar medidas de absorção óptica afim de comprovar a possível desnaturação do DNA durante o experimento.

Lista de Figuras

2.1	(a) Desenho esquemático mostrando um método químico de transferência gênica. Na figura, temos a formação de um complexo resultante da interação DNA-composto catiônico. O complexo é introduzido dentro de um lipossoma aniônico sensível ao pH. Esse lipossoma entra dentro da célula pelo processo de endocitose. Dentro da célula forma-se um endossoma que sob algumas condições é rompido liberando o material genético para o núcleo.	6
2.2	(a) Desenho esquemático de um lipossoma.	7
2.3	(a) Desenho esquemático mostrando o processo da endocitose. O material extracelular é transportado para dentro da célula através de invaginações da membrana.	8
2.4	(a) Ciclodextrina naturais e suas características [6]	9
2.5	Desenho esquemático da ciclodextrina modificada denominada <i>6-monodeoxy-6-monoamino-β-ciclodextrina</i> (<i>Am-beta-CD</i>). O derivado é formado pela substituição de um radical hidroxila por um grupamento amino (NH_2).	9
2.6	Cada nucleotídeo consiste de três componentes: um açúcar, uma base e um fosfato.	11
2.7	Representação de uma fita de DNA.	12
2.8	Representação das duas fitas de DNA. As ligações de hidrogênio entre as bases A,T,G e C são representadas pelas linhas pontilhadas.	13

- 2.9 Esquema da estrutura de dupla hélice do DNA na forma B. A distância interfosfatos ao longo da hélice é de aproximadamente 0,5 nm, e entre as fitas é de 2,0 nm. A distância entre os pares de base ao longo da hélice é de 0,34 nm. 14
- 2.10 Esquema das formas B, A e Z do DNA. 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 do DNA. 16
- 2.11 Imagem de microscopia eletrônica de diferentes graus de superenrolamento do DNA. Da esquerda para 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. . . 17
- 2.12 a) Esquema mostrando a variação do vetor posição e do vetor tangente unitário ao longo de uma curva arbitrária. Estes vetores estão parametrizados pelo comprimento s ao longo da curva. b) Entre as posições \hat{t}_1 e \hat{t}_2 o arco é aproximado por um segmento de círculo de raio R_c , definindo um ângulo $\Delta\theta = \Delta s / R_c$, onde Δs é o tamanho do segmento. 20
- 2.13 A corda de comprimento L_c e momento de inércia da seção transversal I encontra-se inicialmente esticada. A corda sofre uma deformação e adquire a forma de um círculo de raio R_c . A energia de curvatura é dada por $E_f = \kappa_f L_c / 2R_c^2$ 20
- 2.14 O momento de inércia da seção transversal de uma corda cilíndrica. Para uma corda cilíndrica, $I = \frac{\pi R^4}{4}$ [14]. 21
- 2.15 a) Conjunto de configurações para um filamento flexível. Para um dado k_f a energia de curvatura do filamento aumenta a medida que sua forma se torna mais contorcida. b) Se o filamento é a seção de um círculo, o ângulo subtendido pelo arco de tamanho s é o mesmo que o ângulo de mudança de direção do vetor tangente t ao longo do arco. 23
- 2.16 Representação dos eixos x, y, z e dos ângulos θ e ϕ 24
-

2.17	Esquema representando moléculas de DNA com diferentes comprimentos de persistência. Em (a) temos uma molécula flexível e em (b) temos uma molécula mais rígida, com comprimento de persistência maior do que a molécula (a). Figura tirada do [16]	26
2.18	Esquema representando um filamento com comprimento de contorno muito maior do que o comprimento de persistência. As posições 1 e 2 são separadas por um comprimento de arco s , com $s < A$ e as posições 1 e 3 possuem $s \gg A$. O vetor \vec{r}_{ee} representa o deslocamento entre as extremidades do polímero.	28
2.19	Duas representações do conjunto de configurações disponíveis para um filamento flexível. Se quisermos esticar o polímero, de forma que ele passe da configuração a) para a configuração b), devemos realizar um trabalho no sistema de forma que sua entropia diminua. Definindo $\Delta E = \Delta Q + \Delta W$, onde ΔW é o trabalho realizado sobre o sistema e para processos reversíveis, $\Delta Q = T\Delta S$, temos que $\Delta E = T\Delta S + \Delta W$ para processos reversíveis. Para T constante e no caso entrópico onde as ligações químicas são pouco deformadas ($\Delta E \simeq 0$) e portanto, $\Delta W = -T\Delta S$, ou seja, o trabalho realizado sobre o sistema diminui sua entropia.	31
3.1	Força de espalhamento: parte da luz incidente é refletida na superfície da microesfera. Neste caso a força resultante tende a empurrar a microesfera para cima, ou seja, na direção de propagação da luz.	42
3.2	Força de gradiente atuando em microesfera situada abaixo do foco e na metade direita do perfil de intensidades do laser. A força resultante tende a empurrar a esfera para a região do foco do laser.	43
3.3	Força de gradiente atuando em microesfera situada no centro do perfil gaussiano, porém acima do foco do laser. Novamente a força resultante tende a empurrar a esfera para a região do foco do laser.	44

3.4	(a) Desenho esquemático mostrando a montagem experimental do Laboratório de Física aplicada a sistemas biológicos. O microscópio e seus componentes estão contidos dentro da linha pontilhada.	47
3.5	a) Configurações possíveis para as moléculas de DNA da amostra e b) Configuração desejada: uma das extremidades do DNA presa à microesfera e a outra presa à lamínula do microscópio. Nesta configuração a molécula é esticada para todas as direções da mesma forma, o que é um forte indício de que há apenas uma molécula presa à microesfera.	53
3.6	Perfil de retroespalhamento: o perfil é obtido movendo a microesfera pinçada em relação ao feixe de He-Ne e capturando a intensidade de luz retroespalhada pelo feixe de He-Ne. . . .	56
3.7	Curva de Autocorrelação de Intensidades: para cada bolinha capturada fazemos três medidas de autocorrelação.	57
3.8	Intensidade versus Estiramento	58
3.9	Esquema mostrando como são as realizadas as medidas de estiramento de moléculas únicas de DNA. É importante notar que denotamos x como a posição do centro da microesfera no poço potencial e por x_{DNA} o estiramento da molécula de DNA. F_{pinca} é a força que a pinça óptica exerce sobre a microesfera quando esta é afastada de sua posição de equilíbrio. No entanto, esta força é igual em módulo à força exercida pela molécula de DNA para afastar a bolinha da posição de equilíbrio.	59
3.10	Força versus Estiramento	61
4.1	Gráfico final: comprimento de persistência do complexo $\times C_{CD}/C_{pb}$. Para concentração nula de ciclodextrina, ou seja, para o DNA livre, obtivemos $A = 50 \pm 3\text{nm}$ que está em perfeita concordância com o valor encontrado na literatura para o λ -DNA [10,15,32].	65

4.2 Representação das interações para a primeira região. A ilustração não é fiel à verdadeira estrutura do DNA pois estamos interessados somente nas dimensões das moléculas de CD e DNA e os efeitos de sua interação. 67

4.3 Representação das interações para a segunda e terceira região. A ilustração não é fiel à verdadeira estrutura do DNA pois estamos interessados somente nas dimensões das moléculas de CD e DNA e os efeitos de sua interação. Na figura, as setas vermelhas indicam deformações de flexão, as pretas indicam a competição de espaço entre as CDs adjacentes ligadas e o conseqüente efeito de exclusão de volume e as setas verdes indicam uma possível força entre as duas fitas de DNA (no sentido de soltar as fitas) devido à presença de CDs ligadas em ambos os lados das fitas. 69

Lista de Tabelas

- 4.1 Tabela com detalhes das medidas experimentais: C_{CD} / C_{pb} (concentração de ciclodextrina / concentração de pares de base do DNA), razão das cargas para cada concentração e comprimento de persistência do complexo. 64
 - 4.2 Comprimento de persistência versus fração das cargas neutralizadas. 71
-

Referências Bibliográficas

- [1] **Guilherme D.Tavares et al.** 2006 Development and physico-chemical characterization of cyclodextrin -DNA complexes loaded liposomes *Chemical Physics Letters* **429** 507-512
 - [2] **K. Renault et al.** 2007 Nucleic acid delivery, where material sciences and bio-sciences meet *Material Science and Engineering R* **58** 117-161
 - [3] **J.F. Marko et al.** 1994 Bending and Twisting Elasticity of DNA *Macromolecules* **27** 981-988
 - [4] **C. O'Driscoll et al.** Cyclodextrin Constructs for Delivery of Genotherapeutic Agents *Pharmacy Advisory Committee*
 - [5] **N.B. Nardi, L.A.K. Teixeira e E.F.A. Silva** 2002 Gene therapy *Ciência e Saúde Coletiva* **7(1)** 109-116
 - [6] **M. Pascoli** Ciclodextrina: Características e Aplicações *Cultura de T. A. L. Americanas, cap. 17*
 - [7] **L. V. Yakushevich** 1998 Nonlinear physics of DNA *Jonh Wiley and Sons, England*
 - [8] **M. S. Rocha** 2008 Pinças ópticas: experimento, teoria e aplicação no estudo da interação DNA-fármacos. *Tese de doutorado DF UFMG*
 - [9] **M. C. Ferreira** 2007 Estudo da Transição Entrópica do DNA Induzida por Intercalantes Utilizando a Técnica de Pinçamento Óptico e Espectroscopia de Autocorrelação de Intensidades *Dissertação de Mestrado DF UFMG*
-

-
- [10] **C. Bustamante, J. F. Marko, E. D. Siggia e S. Smith** 1994 Entropic elasticity of λ -phage DNA *Science* **265** 1599-1600
- [11] **Jonh F.Marko et al.** 1995 Stretching DNA *Macromolecules* **28** 8759-8770
- [12] **J. Hoon Kim et al.** 2007 Stretching and immobilization of DNA for studies of protein- DNA interactions at the single-molecule level *Nanoscale Res Lett* **2** 185-201
- [13] **A. Ashkin** 1997 Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94** 4853
- [14] **D. Boal** Mechanics of the Cell 2002 *Cambridge University Press*
- [15] **C. Bustamante et al.** 2000 Single-molecule studies of DNA mechanics *Nucleic Acid* **10** 279-285
- [16] **Rudolf Podgornik** 2006 DNA off the Hooke *Nature Nanotechnology* **1** 100-101
- [17] **P. Nelson** 2004 Biological Physics - Energy, information, life. *W. H. Freeman and Company, New York*
- [18] **A. Ashkin** 1970 Acceleration and trapping of particles by radiation pressure *Phys. Rev. Lett.* **24** 156
- [19] **K. C. Neumann et al.** 2004 Optical trapping *Rev. Sci. Instrum.* **75(9)** 2787-2809
- [20] **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
- [21] **N. B. Viana et al.** 2007 Towards absolute calibration of optical tweezers *Phy. Rev. E* **75(2)** 021914
- [22] **A. Mazolli et al.** 2003 Theory of trapping forces in optical tweezers *Proc. R. Soc. Lon. A* **459(2040)** 3021-3041
-

-
- [23] **H. Faxen** 1922 *Ann. Physik* **68**89-119
- [24] **Gerald S. Manning** 2006 The Persistence Length of DNA Is Reached from the Persistence Length of Its Null Isomer through an Internal Electrostatic Stretching Force *Biophysical Journal* **91** 3607-3616
- [25] **A. Podestà et al.** 2005 Positively Charged Surfaces Increase the Flexibility of DNA *Biophysical Journal* **89** 2558-2563
- [26] **L.D. Williams et al.** 2000 Electrostatic Mechanisms of DNA Deformation *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29** 497-521
- [27] **J. D. Watson e F. H. C. Crick** 1953 The structure of DNA *Cold spring harbor symposia on quantitative biology* **18** 123-131
- [28] **Antoine M. van Oijen et al** 2003 Single-Molecule Kinetics of λ Exonuclease Reveal Base Dependence and Dynamic Disorder *Science* **301** 1235-1238
- [29] **N.Jessel, M.Oulad-Abdeighani, F. Meyer, P.Lavalle, Y.Haikel, P.Schaaf e J.-C.Voegel** 2006 Multiple and time scheduled in situ DNA delivery mediated by β - cyclodextrin embedded in a polyelectrolyte multilayer *PNAS* **103** 8618-8621
- [30] **Virginie Burckbuchier et al.** 2008 Development and Characterization of New Cyclodextrin Polymer-Based DNA Delivery Systems *Bioconjugate Chem.* **19** 2311-2320
- [31] **L.F. Fraceto et al.** 2007 Caracterização do complexo de inclusão Ropivacaína: β - Ciclodextrina *Quim. Nova* **30** 1203-1207
- [32] **Antoine M. van Oijen** 2007 Honey, I Shrunk the DNA: DNA Length as a Probe for Nucleic-Acid Enzyme Activity *Biopolymers* **85** 144-153
- [33] **Sudhir Husale et al.** 2008 Interaction of cationic surfactants with DNA: a single-molecule study *Nucleic Acids Research* **36** 1443-1449
- [34] **J. Wang et al.** 2004 Polyphosphoramidate gene carriers: effect of charge group on gene transfer efficiency *Gene Therapy* **11** 1001-1010
-

-
- [35] **Christoph G. Baumann et al.** 1997 Ionic effects on the elasticity of single DNA molecules *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** 6185-6190
- [36] **Alexey V. Eliseev et al.** 1994 Molecular Recognition of Nucleotides, Nucleosides, and sugars by Aminocyclodextrins *J. Am. Chem. Soc.* **116** 6081-6088
- [37] **I. Rouzina et al.** 1998 DNA Bending by Small, Mobile Multivalent Cations *Biophysical Journal* **74** 3152-3164
- [38] **S.J. Hwang et al.** 2001 Effects of structure of β - cyclodextrin - containing polymers on gene delivery. *Bioconjugate Chem.* **12** 280-290
- [39] **Paul J. Hagerman** 1988 Flexibility of DNA *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* **17** 265-86
- [40] **J. -F. Allemand, D. Bensimon, L. Jullien, A. Bensimon e V. Croquette** 1997 pH-Dependent specific binding and combing DNA *Biophysical Journal* **73** 2064-2070
-