

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FÍSICA

Tese de Doutorado

**Um modelo físico para a associação de espécies ao  
DNA e desnaturação ‡**

Cíntia Barbosa Passos

Tese de Doutorado realizada sob a orientação da Dra. Márcia Cristina Bernardes Barbosa e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em preenchimento parcial dos requisitos para a obtenção do título de Dra em Física.

Porto Alegre

27 de janeiro de 2015

‡Trabalho financiado pela CAPES

Ao meu avô, Vanderlei Foster Passos,  
*in memoriam.*

## Agradecimentos

- ✓ À minha família.
- ✓ À minha orientadora Marcia Barbosa pela dedicação e confiança demonstradas.
- ✓ Aos demais integrantes do Grupo de Fluidos Complexos pelo acompanhamento.
- ✓ Ao querido amigo e professor Eduardo Henriques pelo incentivo.
- ✓ Aos amigos da M04, de valor inestimável neste processo, que desejo manter como companheiros para a vida.
- ✓ A quem se tornou um grande incentivador e companheiro, Alexandre Furlan, pelo carinho e apoio permanentes. E por mais.
- ✓ Aos professores e funcionários do IF, que de alguma forma contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Com o intuito de compreender a natureza da variação conformacional em polieletrólitos, que leva ao importante fenômeno da desnaturação do DNA, propomos um conjunto de modelos complementares para a descrição das principais interações entre as espécies envolvidas. Investigamos, primeiramente, a ocorrência de desnaturação como função da densidade de sal em solução, aumento da temperatura e da constituição específica da cadeia de DNA em termos da concentração de pares de base Guanina e Citosina (GC). O modelo é construído a partir das teorias de Debye-Hückel, Bjerrum, Manning e Flory, com a interação atrativa entre as fitas que formam a dupla hélice descrita como função da densidade de pares de base GC. Um modelo semelhante foi empregado para o estudo das interações entre cadeias de DNA e moléculas de Ciclodextrina, que vem, ultimamente, sendo investigada para transporte de fármacos no interior das células. Ainda com interesse em propriedades físicas de polieletrólitos, propomos uma análise do efeito de associação de moléculas intercalantes em políons.

## ABSTRACT

In this work, we propose a model to describe some relevant physical transitions observed experimentally in solutions containing polyelectrolytes and others molecules. Our focus is the DNA denaturation phenomena, that is studied using an analytic model based on Debye-Hückel, Bjerrum, Manning and Flory theories. The attractive interaction between the double strands that form the double helix structure is written as a function of salt density, temperature changes and the Guanine-Cytosine concentration. A similar model was employed to study the interaction between DNA chains and Cyclodextrin molecules, that has been investigated to drug delivery to into the cells. Concerned about polyelectrolytes physical properties, we propose an analysis of intercalating molecules association to DNA that causes interesting conformational effects including the denaturation.

# Índice

<b>1</b>	<b>Introdução</b>	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Um modelo físico para a desnaturação do DNA</b>	<b>8</b>
2.1	O processo de desnaturação do DNA . . . . .	8
2.2	O modelo . . . . .	10
2.3	A energia livre de Helmholtz . . . . .	12
2.3.1	A energia livre ideal ( $F_{id}$ ) . . . . .	13
2.3.2	A energia livre interna ( $F_{int}$ ) . . . . .	14
2.3.3	A energia livre eletrostática ( $F_{elet}$ ) . . . . .	19
2.3.4	A energia livre atrativa ( $F_a$ ) . . . . .	24
2.3.5	Resumo . . . . .	25
<b>3</b>	<b>A desnaturação do DNA como função da variação da concentração salina e temperatura</b>	<b>27</b>
3.1	Ajuste do parâmetro atrativo $\chi$ de acordo com resultados experimentais . .	27
3.2	Confirmação do modelo teórico via comparação com o experimento . . . .	30
3.3	Resumo . . . . .	33
<b>4</b>	<b>Um modelo para a conformação do complexo de DNA com outras moléculas</b>	<b>36</b>
4.1	A associação de Ciclodextrina ao DNA . . . . .	36
4.2	Componentes do sistema . . . . .	37

4.2.1	A Ciclodextrina . . . . .	37
4.2.2	O sistema físico: DNA mais Ciclodextrina . . . . .	39
4.3	O modelo . . . . .	41
4.3.1	A energia livre ideal ( $F_{id}$ ) . . . . .	43
4.3.2	A energia livre elástica ( $F_d$ ) . . . . .	44
4.3.3	Interação eletrostática entre políons e microíons ( $F_{pc}$ ) . . . . .	47
4.3.4	A energia livre interna ( $F_{int}$ ) . . . . .	48
4.4	Resultados . . . . .	62
4.5	Resumo . . . . .	66
<b>5</b>	<b>O efeito de associação de moléculas intercalantes ao DNA</b>	<b>67</b>
5.1	Efeitos de intercalação da molécula de DNA por um fármaco . . . . .	67
5.2	O modelo . . . . .	69
5.2.1	A energia livre . . . . .	72
5.3	Resultados . . . . .	73
5.4	Resumo . . . . .	76
<b>6</b>	<b>Conclusões</b>	<b>77</b>
<b>A</b>	<b>A teoria de condensação de Manning</b>	<b>79</b>
<b>B</b>	<b>Artigo publicado em anexo</b>	<b>86</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>96</b>

# Capítulo 1

## Introdução

Polieletrólitos são polímeros cujas unidades, os monômeros, podem ser ionizadas quando em solução aquosa. Nesta espécie todos os monômeros possuem a mesma carga e o políon, como também é conhecido este arranjo, pode ser catiônico ou aniônico de acordo com a sua valência. O exemplo mais importante de biopolímero é o DNA, que é um polieletrólito aniônico [1]. Fluidos poliméricos simples não iônicos tem uma termodinâmica bem conhecida que obedece leis de escala bem definidas e governadas por interações de curto alcance [2]-[4]. Os polieletrólitos, no entanto, devido às interações coulombianas obedecem a uma termodinâmica e dinâmica mais complexas e que dependem do meio eletrolítico no qual estão inseridos. Dentre as dificuldades envolvidas estão a flexibilidade e a alta valência das cadeias, o longo alcance da interação eletrostática e a assimetria de tamanho entre políons e microíons. Entretanto, alguns polieletrólitos são moléculas de elevada rigidez, facilitando a análise estatística da distribuição de configurações.

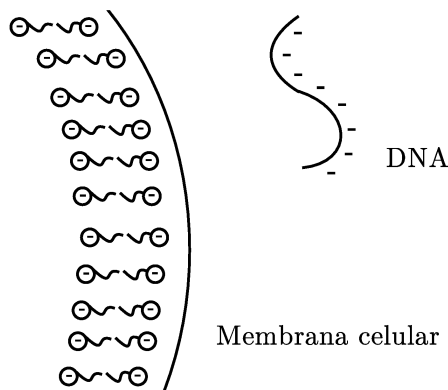
O estudo das propriedades físicas de macromoléculas, como o DNA, vem se tornando intenso nos últimos anos, tanto com a abordagem experimental, quanto com teorias de campo médio e simulação computacional. Um dos temas, recentemente estudados sob a perspectiva da modelagem computacional, envolve o transporte de fármacos e material genético para o interior de membranas celulares, em processos como a endocitose [5]. A transferência de material genético como forma terapêutica tem se revelado potencialmente capaz de tratar uma série de doenças [6]-[15]. Esta forma de terapia consiste na inserção de



um gene terapêutico no tecido alvo, com o propósito de prevenir ou curar certa enfermidade. No caso de enfermidades genéticas, nas quais um gene está defeituoso ou ausente, a terapia gênica consiste em transferir a versão funcional do gene para o organismo portador da doença, de modo a reparar o defeito.

A inserção de um gene terapêutico é feita através de um vetor<sup>1</sup> que pode ser classificado como físico, químico ou biológico. Dentre os processos que envolvem vetores físicos e químicos, estão a transfecção de DNA e a injeção direta de DNA, por exemplo. A expressão de genes introduzidos por esses métodos ocorre por um período transiente de tempo e, com o avanço científico neste campo, têm sido noticiados protocolos para o desenvolvimento de vacinas de DNA [16].

O grande obstáculo neste procedimento é que, em solução fisiológica, a cadeia de DNA, que contém o material genético a ser transferido, torna-se negativamente carregada, assim como a membrana celular, que é aniônica, como mostra a Figura 1.1. A barreira eletrostática repulsiva deve ser superada para que a aproximação entre estas espécies ocorra e a transferência seja possível.



**Figura 1.1:** Representação esquemática da interação entre a membrana celular e uma cadeia DNA, negativamente carregada.

Dentre os vetores biológicos, a maior parte dos procedimentos em terapia gênica “in

---

<sup>1</sup>Em genética, um vetor é um agente que que transfere informação genética de um organismo a outro.

vivo”<sup>2</sup> faz uso de reagentes à base de lipídios catiônicos, isto é, moléculas anfífilas ionizadas positivamente<sup>3</sup> [17]-[19] para reverter a carga negativa do DNA em solução fisiológica. Estas moléculas são capazes de alterar características físicas, como a valência e/ou o tamanho, de sequências de DNA que serão introduzidas em vetores virais. Isto porque, uma vez que a membrana celular é ionizada negativamente, assim como os segmentos do DNA, o efeito de repulsão iônica entre a membrana e estes segmentos não permite a sua aproximação, a menos que a carga do DNA seja renormalizada - o que ocorre com a associação de reagentes lipídicos.

Neste modelo, além do efeito eletrostático, a hidrofobicidade das caudas<sup>4</sup>, uma característica especial de moléculas anfífilas, é capaz de provocar a compactação do complexo e sua aproximação da membrana celular; este é o efeito associado à configuração mais energeticamente favorável, a que protege a maior parte das caudas do contato com a solução aquosa e facilita o processo de terapia gênica [20]. A Figura 1.2 ilustra este fenômeno.

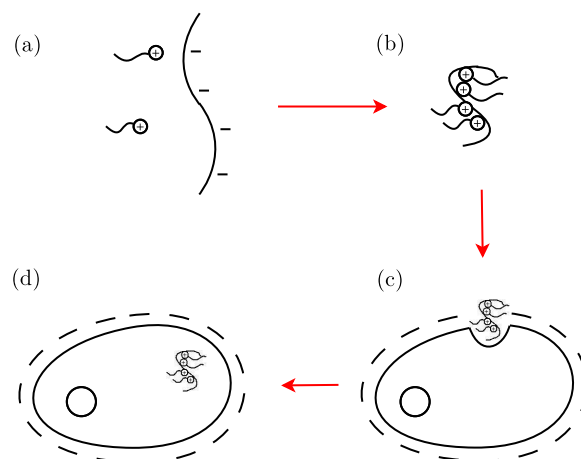
Com o intuito de descrever este processo, uma série de modelos foram propostos. Existem, por exemplo, modelos para DNA circular e altas quantidades de surfactantes [7, 10, 11], que levam à formação de um complexo DNA+surfactante de alta toxicidade. Para contornar este problema, foram sugeridos modelos para soluções de DNA linear e baixa quantidade de surfactantes. Estes modelos foram testados experimentalmente [21] e apresentaram uma redução da negatividade da carga expressiva e boa compatibilidade em termos da transmissão do DNA [22]. No entanto, o trabalho experimental do grupo de Ravazzolo usa DNA longo e flexível incompatível com o modelo rígido proposto, originalmente, por Kuhn [23]-[31]. Para compreender o efeito da flexibilidade do DNA algumas propostas foram feitas [32, 33]. Além de surfactantes catiônicos, outros meios podem ser usados para blindar a carga do DNA. Recentemente experimentos com o objetivo de analisar propriedades físicas do DNA foram realizados com Ciclodextrina [34] e Brometo de Etídio [35]. Estes

---

<sup>2</sup>Consiste na injeção de vetores diretamente na corrente sanguínea.

<sup>3</sup>São moléculas constituídas de uma estrutura principal polar e por uma cauda apolar, que formam os surfactantes.

<sup>4</sup>Característica de estruturas que não tem afinidade com a água.



**Figura 1.2:** Representação de possível mecanismo para transferência genética. Em (a) a cadeia de DNA é representada como uma linha de cargas negativas. A associação de reagentes lipídicos catiônicos é capaz de neutralizar a até reverter a carga da cadeia e ainda provocar uma compactação do complexo formado (b). Em (c) e (d) esta estrutura penetra a membrana celular através do processo de endocitose.

compostos apresentaram resultados bastante interessantes, diferentes dos observados para surfactantes.

No entanto, a cadeia de DNA, diferentemente do considerado na maioria dos modelos teóricos, é formada como duas fitas conectadas pelos aminoácidos através de ligações de Hidrogênio. A adição de macromoléculas hidrofóbicas, como a Ciclodextrina, ou de moléculas intercalantes, como o Brometo de Etídio, levam ao rompimento destas ligações e à separação total ou parcial das fitas que formam o DNA em dupla hélice. Como este fenômeno não é desejável para a transmissão do DNA através da membrana, especialmente para a Ciclodextrina, potencialmente útil para o transporte de fármacos, este problema torna-se bastante relevante.

Sobre o processo de desnaturação, é reportado experimentalmente que a constituição específica dos segmentos do DNA, em termos dos seus pares de base, define o grau de estabilidade da formação em fita dupla. Esta característica tem origem tanto no número de ligações de Hidrogênio associadas aos pares de base como na distribuição de carga parcial

que difere de acordo com cada grupo. A presença de pares de base Guanina e Citosina é a mais relevante para a manutenção da estabilidade da dupla hélice [36, 37]. Isto ocorre pelo seguinte motivo: os dois tipos de pares de base (Guanina-Citosina e Adenosina-Timina) são formados por números distintos de ligações de Hidrogênio. A dupla de pares de base Adenosina e Timina (AT) forma duas ligações de Hidrogênio enquanto que o par de bases Guanina-Citosina (GC) forma três ligações de Hidrogênio. Desta forma a interação entre os pares de base GC é mais forte que os pares de base do tipo AT. Como resultado, a fração de pares de base GC numa fita dupla de DNA determina a força de interação entre as duas cadeias [38]. Uma parte da dupla cadeia de DNA, como a a sequência TATAAT presente em promotores bacterianos, que precisa ser separada facilmente, tende a ter sequências com maior predomínio de AT para facilitar a abertura da dupla cadeia quando ocorre a transcrição [39]. No experimento, a intensidade desta interação pode ser medida encontrando a temperatura necessária para quebrar as ligações de Hidrogênio. Quando todos os pares de base numa dupla hélice de DNA quebram as suas ligações, as duas cadeias separam-se e resultam como duas moléculas completamente independentes. Acreditamos, portanto, que a descrição de características especiais dos segmentos do DNA desempenha papel importante em modelos de associação e conformação de moléculas que incorporam a desnaturação.

Neste trabalho, analisamos três aspectos que podem afetar o processo de transmissão do DNA através da membrana celular: o processo de desnaturação, a associação com grandes moléculas, como a Ciclodextrina, e com agentes intercalantes, como o Brometo de Etídio.

Na primeira etapa, nos Caps. 2 e 3, descrevemos o processo de desnaturação da dupla hélice do DNA dentro um modelo de dois estados para uma solução de polieletrólitos rígidos. Como parâmetros relevantes neste processo descrevemos a desnaturação como função da temperatura do sistema, densidade da espécie redutora de carga e da constituição física do DNA em termos da densidade de pares de base Guanina-Citosina, importantes para a estabilidade da formação em fita dupla.

No Cap. 4, apresentamos um modelo para a conformação de polieletrólitos, como o

DNA, incluindo a descrição da flexibilidade da cadeia, ingrediente fundamental para a o estudo dos efeitos da associação de Ciclodextrina. Testamos o modelo para esta molécula hidrofóbica, de dimensões e rigidez bastante superiores se comparadas com um sítio do DNA. Ainda com interesse em efeitos sobre a extensão de cadeias de DNA, no Cap. 5 analisamos o efeito de associação de moléculas intercalantes, como o Brometo de Etídio. Assim, estabelecemos um modelo para o processo de extensão. Apresentamos no Cap. 6 nossas conclusões e perspectivas associadas a este trabalho.

## Capítulo 2

### Um modelo físico para a desnaturação do DNA

Neste capítulo apresentamos a construção de um modelo baseado em teorias de campo médio para uma solução de DNA e sal, com interesse no fenômeno da desnaturação. O balanço energético entre a interação entre fitas que formam o DNA em dupla hélice e as forças de natureza eletrostática é definido como o principal mecanismo associado à desnaturação.

#### 2.1 O processo de desnaturação do DNA

O processo de desnaturação, ou *melting*, é aquele que implica na modificação da estrutura terciária regular de uma macromolécula<sup>1</sup>, desde que não afete as ligações covalentes entre os átomos que a constituem. Esta estrutura terciária é mantida por interações fracas como ligações de hidrogênio e ligações eletrostáticas tipo dipolo-dipolo ou dipolo-dipolo induzido, cuja intensidade pode variar consideravelmente com pequenos deslocamentos ou mudanças de orientação dos átomos interagentes [40]. Por este motivo, a indução de algum tipo de estresse, como intensa agitação e aquecimento, é suficiente para comprometer a estabilidade das ligações de Hidrogênio e, como consequência, provocar a redução da intensidade das interações responsáveis pela estrutura da molécula. A desnaturação do DNA, especificamente, é o fenômeno em que o ácido desoxirribonucleico da cadeia de fita

---

<sup>1</sup>seja esta uma proteína, um ácido nucleico ou um polissacarídeo

dupla de DNA separa-se em duas cadeias de fitas simples através da quebra de ligações de Hidrogênio entre os pares de base que a formam [41, 42].

Importantes fenômenos estão relacionados à ocorrência de desnaturação [43]-[47], seja ela resultado de aquecimento ou provocada por mudanças nas condições iniciais do sistema. A associação de íons e outras espécies sobre a macromolécula, que resulta na formação de complexos [36, 37, 48]-[50], são relevantes não apenas para a compreensão de processos biológicos, mas também para aplicações como a solubilização de compostos químicos e o transporte e a distribuição de fármacos [51, 52], fenômenos para os quais a compreensão das causas e controle do processo de desnaturação é essencial.

Como mencionado anteriormente, o aumento da temperatura de um sistema é um dos fatores que podem induzir a desnaturação. A presença de sal e de outras macromoléculas também podem afetar a transição. Espécies catiônicas em alta e suficiente concentração podem estabilizar a formação em fita dupla segundo a literatura [36, 37, 43, 53]. Intercalantes como Brometo de Etídio e Daunomicina na presença de sal monovalente são capazes de induzir a desnaturação [35, 54, 55], o que sugere que este fenômeno não depende apenas de interações do tipo eletrostática. Como resultado, o balanceamento entre a concentração de sal e a temperatura de *melting* ( $T_m$ ) do DNA fita dupla é proposto como o mecanismo para o controle do processo de desnaturação [56]-[59]. Ainda, de acordo com a literatura [34, 53, 60]-[66], a transição entre estas duas configurações pode, em princípio, ser modelada entre sistemas de dois estados. Um certo número de modelos focaram-se no processo local da desnaturação como consequência da competição entre as energias eletrostática e entrópica locais. Em alguns casos, o mecanismo foi descrito através da flexibilidade e o conhecimento específico da estrutura do DNA onde a associação de sal é importante para a blindagem local das interações tipo mola. Nestes modelos a condensação de sal e de contraíons ao DNA como função da temperatura não tem papel relevante neste processo.

Nas próximas seções desenvolvemos um modelo para a desnaturação do DNA como função da temperatura e da concentração de sal que contabiliza a influência das energias de ligação entre os pares de base do tipo Guanina-Citosina e como estas são afetadas pela

blindagem advinda da associação de sal [36, 37]. O DNA é tratado no contexto do Modelo Primitivo para Polieletrólitos (PMP) [49, 67], teoria dentro da qual o DNA desnaturado surge da competição entre os efeitos eletrostático e entrópico. A temperatura de *melting*  $T_m$  é obtida como função da concentração de sal e da densidade de pares de base Guanina-Citosina.

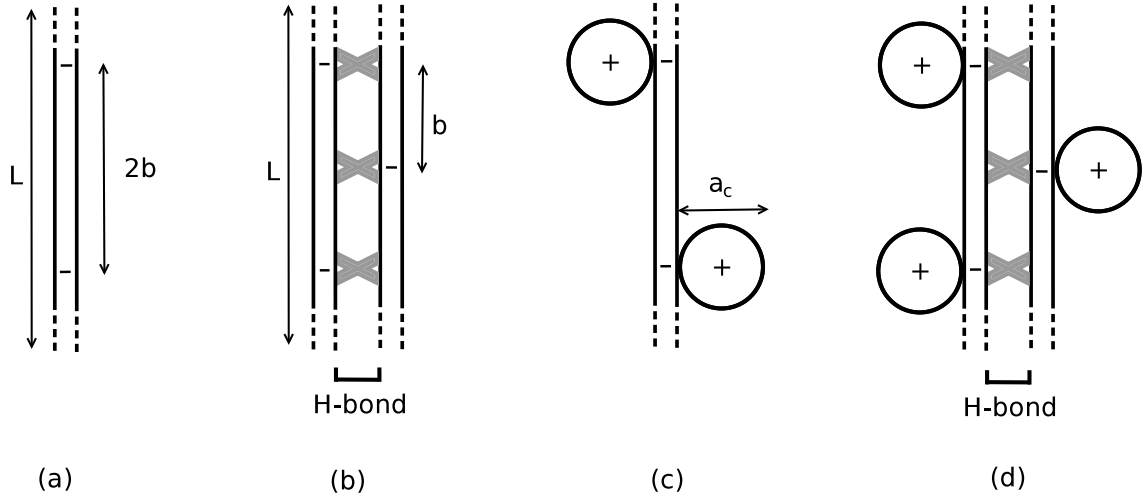
## 2.2 O modelo

Estudamos uma mistura de fitas simples e duplas de DNA que, em solução salina, resultam ionizadas com cargas distribuídas ao longo das suas estruturas. Os grupos carregados são modelados como monômeros em uma longa cadeia polimérica. As moléculas de DNA são, por simplicidade, representadas como cilindros carregados, como mostram as Figuras 2.1(a) e 2.1(b). A hélice individual, ou *single stranded DNA* (ssDNA), é representada como um cilindro rígido com os grupos fosfato uniformemente distribuídos e separados por uma distância  $2b$ . A dupla hélice, ou *double stranded DNA* (dsDNA), aparece como dois cilindros rígidos conectados por ligações de Hidrogênio. Neste caso, os grupos fosfato são separados por uma distância  $b$ .

Os parâmetros relevantes representados na Figura 2.1 são os espaçamentos  $b$  entre os monômeros carregados na fita dupla e  $2b$  entre as fitas simples ( $b = 1.7\text{\AA}$ ), o número  $Z$  e  $Z/2$  de sítios carregados nas fitas duplas e simples, respectivamente, e o comprimento  $L$  da cadeia de DNA. Além da concentração  $\rho_p$  de cadeias de DNA, a solução também apresenta uma concentração  $\rho_s$  de sal e  $Z\rho_p$  de contraíons. Ambas as espécies, sal e contraíons, apresentam diâmetro  $\sigma_c$ . Por simplicidade, o diâmetro do DNA em fita dupla ou simples é definido como  $\sigma_p$  e as densidades dos números de polieletrólitos correspondente e de sal monovalente são denotadas por  $\rho_p = N_p/V$  e  $\rho_s$ , respectivamente.

No processo de desnaturação cada cadeia de DNA em fita dupla se dissocia em duas fitas simples, de forma que, se o sistema está em equilíbrio químico,





**Figura 2.1:** Representação esquemática de (a) uma fita simples de DNA, (b) uma fita dupla de DNA, (c) um complexo formado a partir da associação em uma fita simples e (d) um complexo formado a partir da associação em uma fita dupla.

$$\rho_p = \rho_2 + \frac{\rho_1}{2}, \quad (2.1)$$

onde

$$\rho_1 = \frac{N_1}{V}, \quad (2.2)$$

e

$$\rho_2 = \frac{N_2}{V}, \quad (2.3)$$

são as densidades de cadeias dos tipos fita simples e fita dupla, respectivamente. Assim, temos

$$N_p = N_2 + \frac{N_1}{2}. \quad (2.4)$$

Os dois tipos de cadeia têm o mesmo comprimento total mas o espaçamento entre as cargas e o número de monômeros são diferentes. Devido à neutralidade global das cargas existem

íons livres positivos e negativos em solução cujas densidades são representadas por

$$\rho_+ = Z \rho_p + \rho_s - \frac{Z}{2} m_1 \rho_1 - Z m_2 \rho_2, \quad (2.5)$$

$$\rho_- = \rho_s, \quad (2.6)$$

onde  $m_1 = 2N_1/Z$  e  $m_2 = N_2/Z$  são as frações de associação de sal para as cadeias em fita simples e dupla, respectivamente. Uma vez que  $\rho_1$  e  $\rho_2$  não são independentes, podemos definir o grau de dissociação  $\alpha$ , usando a Eq. 2.1,

$$\rho_1 = 2\alpha \rho_p, \quad (2.7)$$

$$\rho_2 = (1 - \alpha) \rho_p. \quad (2.8)$$

Quando  $\alpha = 0$ ,  $\rho_1 = 0$  e  $\rho_2 = \rho_p$ , identificando um sistema no qual todas as cadeias são do tipo fita dupla. Se  $\alpha = 1$  tem-se que  $\rho_1 = 2\rho_p$ , e  $\rho_2 = 0$ , gerando um estado correspondente ao de completa dissociação, isto é, todas as cadeias estão na configuração tipo fita simples. Definimos o sistema em estado desnaturado se  $\alpha \geq 1/2$ .

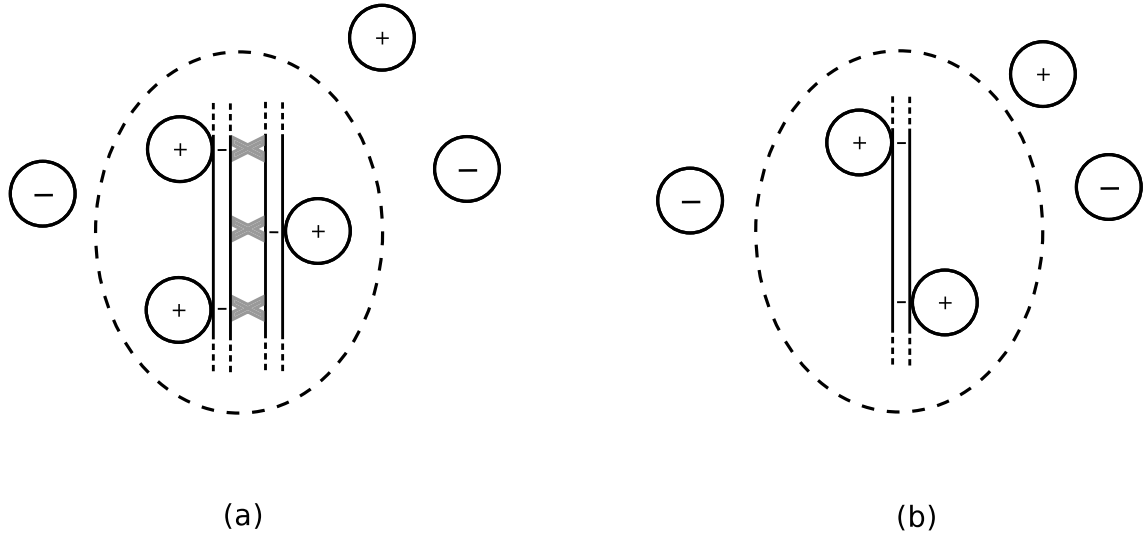
### 2.3 A energia livre de Helmholtz

O sistema em equilíbrio apresenta complexos formados pela associação de sal em DNA tipo fita dupla e fita simples e íons livres como ilustra a Figura 2.2. O modelo que propomos consiste na construção da energia livre de Helmholtz para este sistema como uma soma aproximada das contribuições relevantes [23].

$$\begin{aligned} F_{tot}(m_1, m_2, \alpha) = & F_{id}(m_1, m_2, \alpha) + F_{int}(m_1, m_2, \alpha) \\ & + F_{elet}(m_1, m_2, \alpha) + F_a(m_1, m_2, \alpha), \end{aligned} \quad (2.9)$$

onde o primeiro termo ( $F_{id}(m_1, m_2, \alpha)$ ) representa a contribuição entrópica de todas as espécies: complexos em fitas duplas e simples e íons livres. O segundo termo descreve a energia livre de cada complexo ( $F_{int}(m_1, m_2, \alpha)$ ) enquanto o terceiro termo corresponde à interação eletrostática entre os complexos e os íons livres na solução ( $F_{elet}(m_1, m_2, \alpha)$ ). A

última contribuição corresponde à interação atrativa entre as fitas simples que formam a estrutura em fita dupla ( $F_a(m_1, m_2, \alpha)$ ). Existe um número adicional de contribuições que não incluímos, propositalmente, por acreditar que não desempenham papel relevante no processo de desnaturação.



**Figura 2.2:** Representação esquemática de um complexo formado pela associação de contraíons em (a) DNA tipo fita dupla e em (b) DNA tipo fita simples.

### 2.3.1 A energia livre ideal ( $F_{id}$ )

O primeiro termo na Eq. 2.9 advém da aproximação de gás ideal para as diferentes espécies de íons livres [2, 68],

$$\beta F_{id}(m_1, m_2, \alpha) = \sum N_j [\ln \rho_j^* - 1], \quad (2.10)$$

onde  $\rho_j^* = \rho_j \sigma^3$  representa a densidade reduzida de uma espécie arbitrária em solução em termos de seu diâmetro  $\sigma$ . Considerando que o sistema em questão apresenta complexos com fitas simples e duplas e íons livres catiônicos e aniônicos, a energia livre ideal pode ser escrita como segue,

$$\begin{aligned}\beta F_{id} &= N_1 [\ln \rho_1 \sigma^3 - 1] + N_2 [\ln \rho_2 \sigma^3 - 1] \\ &+ N_+ [\ln \rho_+ \sigma^3 - 1] + N_- [\ln \rho_- \sigma^3 - 1].\end{aligned}\quad (2.11)$$

Na Eq. 2.11,  $\sigma = (\sigma_c + \sigma_p)/2$  é o diâmetro médio de um contraíon de diâmetro  $\sigma_c$  associado à uma única cadeia de DNA de diâmetro  $\sigma_p$ . As densidades  $\rho_+$  e  $\rho_-$  foram previamente apresentadas em 2.5. A quantidade  $\beta$ , por definição, é dada por

$$\beta \equiv \frac{1}{k_B T}, \quad (2.12)$$

onde  $k_B = 1,38 \times 10^{-23}$  J/K é a conhecida constante de Boltzmann e  $T$  é a temperatura do sistema.

Definindo como densidade reduzida a quantidade  $\rho_j^* = \rho_j \sigma^3$ , onde  $j$  representa cada uma das espécies, a energia livre ideal para as espécies em solução reduz-se a

$$\begin{aligned}\beta F_{id} &= N_1 [\ln \rho_1^* - 1] + N_2 [\ln \rho_2^* - 1] \\ &+ N_+ [\ln \rho_+^* - 1] + N_- [\ln \rho_-^* - 1].\end{aligned}\quad (2.13)$$

Esta energia livre resulta da aproximação de gás ideal para as espécies presentes no sistema. Os termos de energia livre que serão apresentados na sequência descrevem as particularidades do sistema em estudo como as interações eletrostáticas e a energia de formação e estabilidade da estrutura em fita dupla.

### 2.3.2 A energia livre interna ( $F_{int}$ )

A energia livre que descreve a interação das partículas dentro do complexo  $F_{int}$  inclui contribuições eletrostática e entrópica,

$$F_{int}(m_1, m_2, \alpha) = F_{ent}(m_1, m_2, \alpha) + F_{ion}(m_1, m_2, \alpha), \quad (2.14)$$

que serão apresentadas em detalhe nas subseções seguintes.

### 2.3.2.1 A energia livre entrópica ( $F_{ent}$ )

A energia livre entrópica  $F_{ent}$  presente na Eq. 2.14 representa o gasto energético associado aos diferentes arranjos possíveis de um sistema [2] e que pode ser obtida a partir do número de configurações acessíveis  $\Omega$ . Escrevemos esta contribuição levando em consideração o número de sítios disponíveis para associação de contraíons sobre uma cadeia de DNA. O número de configurações acessíveis é obtido através de

$$\Omega = \frac{Z!}{n_c!(Z - n_c)!}, \quad (2.15)$$

onde  $Z$  representa o número de sítios carregados de um polieletrólito arbitrário e  $n_c$  é o número de contraíons associados. Assim, para a obtenção da energia livre de Helmholtz a partir da entropia do sistema, escrevemos o logaritmo natural do número  $\Omega$ ,

$$\ln \Omega = \ln \left[ \frac{Z!}{n_c!(Z - n_c)!} \right]. \quad (2.16)$$

Rearranjando a expressão anterior obtemos

$$\ln \Omega = -Z [m_c \ln m_c + (1 - m_c) \ln(1 - m_c)], \quad (2.17)$$

onde a fração de contraíons associados  $m_c$  corresponde à razão  $\frac{n_c}{Z}$ .

Assim, a entropia resulta em

$$\begin{aligned} S &= k_B \ln \Omega \\ S &= -Z k_B [m_c \ln m_c + (1 - m_c) \ln(1 - m_c)], \end{aligned} \quad (2.18)$$

e a energia livre de Helmholtz, aqui denominada energia livre entrópica, ou de mistura, assume a forma

$$\begin{aligned}
f_{ent} &= -TS \\
\beta f_{ent} &= Z[m_c \ln m_c + (1 - m_c) \ln(1 - m_c)].
\end{aligned}
\tag{2.19}$$

Considerando  $N_p$  polieletrólitos obtemos

$$\beta F_{ent} = N_p Z [m_c \ln m_c + (1 - m_c) \ln(1 - m_c)],
\tag{2.20}$$

como a energia livre referente ao gasto entrópico associado aos diferentes arranjos permitidos para as espécies sobre o complexo. Mais especificamente, considerando cadeias de fitas duplas e simples e as relações entre as respectivas densidades apresentadas em 2.1, temos que

$$\begin{aligned}
\beta F_{ent}(m_1, m_2, \alpha) &= 2m_1 Z^2 [m_1 \ln m_1 + (1 - m_1) \ln(1 - m_1) \\
&\quad + m_2 Z^2 [m_2 \ln m_2 + (1 - m_2) \ln(1 - m_2)],
\end{aligned}
\tag{2.21}$$

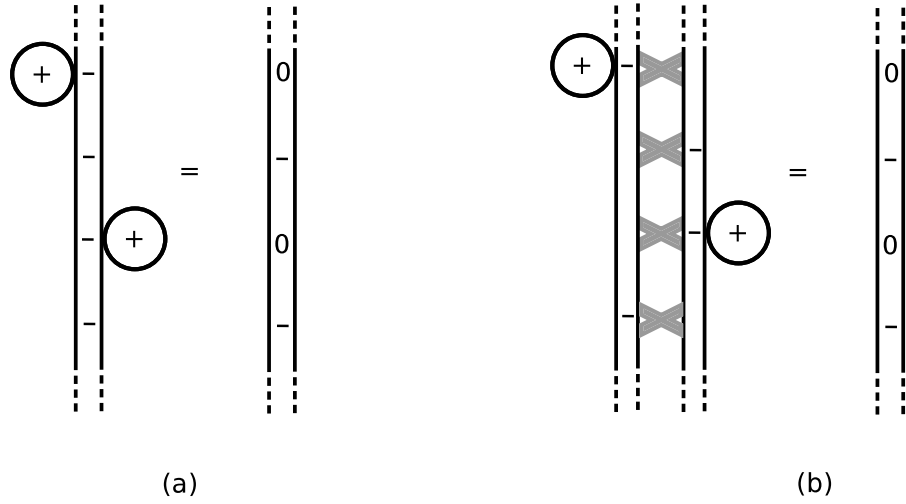
onde  $m_1$  e  $m_2$  são as frações de contraíons associados às fitas simples e duplas, respectivamente.

### 2.3.2.2 A energia livre iônica ( $F_{ion}$ )

A energia  $F_{ion}$  na Eq. 2.14 descreve a interação eletrostática entre os sítios carregados do complexo. A Figura 2.3 ilustra o efeito da associação de contraíons que, associados, neutralizam a carga local. Assim, apenas sítios onde não há associação contribuem efetivamente para a energia eletrostática do complexo [32, 33].

A interação eletrostática entre os  $Z$  sítios ionizados da cadeia, de natureza puramente coulombiana, pode ser expressa na forma

$$U = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^Z \frac{q_i q_j}{D r_{ij}},
\tag{2.22}$$



**Figura 2.3:** Representação esquemática da associação de contraíons ao DNA e de partículas de sal em solução. A carga efetiva em um sítio em que há associação torna-se nula.

onde o símbolo  $\prime$  indica que na soma dupla sobre os índices  $i$  e  $j$  devemos omitir o caso em que  $i = j$ ;  $r_{ij}$  é a distância entre dois sítios interagentes  $i$  e  $j$  consecutivos e  $D$  é a constante dielétrica do meio. A quantidade de carga  $q_i$  é correspondente a

$$q_i = -q(1 - m_c), \quad (2.23)$$

$$q_i = pq, \quad (2.24)$$

onde  $p$  é a valência de cada sítio,  $q$  o valor da carga elementar ( $q = -1,60217653 \times 10^{-19} \text{C}$ ) e  $m_c$  é a fração de contraíons associados. Assim, a equação anterior pode ser reescrita como segue,

$$U = \frac{(pq)^2}{D\sigma} \left\{ \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^Z \frac{1}{|i-j|} \right\}. \quad (2.25)$$

Com o propósito de transformar a soma dupla em uma soma simples, consideremos a soma abaixo,

$$\frac{1}{2} \sum'_{i,j=1}^Z f(|i-j|) = \sum_{i=1}^{Z-1} f(i) (Z-i). \quad (2.26)$$

Uma vez que

$$f(|i-j|) = (|i-j|)^{-1}, \quad (2.27)$$

de acordo com Eq. 2.25, temos que  $f(i) = (i)^{-1}$  e, assim, a Eq. 2.26 resulta em

$$\frac{1}{2} \sum'_{i,j=1}^Z \frac{1}{|i-j|} = \sum_{i=1}^{Z-1} \frac{Z-i}{i}. \quad (2.28)$$

Aproximando o somatório em uma integral através da soma de Euler, escrevemos

$$S = \sum_{i=1}^{Z-1} f(i) \cong \int_1^{Z-1} dx F(x) + \frac{1}{2}F(1) - \frac{1}{12}F'(1) + \frac{1}{720}F^{(3)}(1). \quad (2.29)$$

Com base na nova função  $f(i)$ ,  $F(x)$  deve ter a seguinte forma,

$$F(x) = \frac{Z-x}{x}. \quad (2.30)$$

Calculadas as respectivas derivadas de  $F(x)$ , a soma apresentada na Eq. 2.29 é equivalente à seguinte equação

$$S = Z [\psi(Z) - \psi(1)] - Z + 1, \quad (2.31)$$

onde a função digama  $\psi(n)$  é definida como

$$\psi(n+1) = -C + \sum_{k=1}^n \frac{1}{k}, \quad C = 0.577215\dots \quad (2.32)$$

Reunindo as Eqs. 2.25, 2.26 e 2.31, obtemos que



$$U = \frac{(pq)^2}{D\sigma} S, \quad (2.33)$$

e, portanto, que

$$\beta F_{ion} = N_p \frac{\lambda_B}{b} p^2 S, \quad (2.34)$$

onde  $\lambda_B$  é o comprimento de Bjerrum, definido como

$$\lambda_B = \frac{\beta q^2}{4\pi D}. \quad (2.35)$$

Considerando tanto as cadeias estruturadas em fitas simples e duplas e as particularidades de cada uma como o distinto número de sítios e os diferentes espaçamentos entre os monômeros, escrevemos

$$\beta F_{ion}(m_1, m_2, \alpha) = 2 Z m_1 \frac{\lambda_B}{b_1} p_1^2 S_1 + Z m_2 \frac{\lambda_B}{b_2} p_2^2 S_2, \quad (2.36)$$

onde as valências dos dois tipos de cadeia são  $p_1 = -1 + m_1$  e  $p_2 = -1 + m_2$  e

$$S_1 = Z_1 [\psi(Z_1) - \psi(1)] - Z_1 + 1, \quad (2.37)$$

$$S_2 = Z_2 [\psi(Z_2) - \psi(1)] - Z_2 + 1, \quad (2.38)$$

são as somas equivalentes.

### 2.3.3 A energia livre eletrostática ( $F_{elet}$ )

Apresentamos, nesta subseção, os efeitos da interação eletrostática entre poliíons e microíons baseada na teoria de condensação de Manning [1, 69] para polieletrólitos rígidos de comprimento infinito, apresentada em detalhes no Apêndice A. O sistema que estamos analisando é constituído de polieletrólitos carregados negativamente como as moléculas de

DNA e microíons positivos (contraíons) provenientes da dissociação do DNA e da adição de sal à solução, como ilustra a Figura 2.3.

Para determinar o potencial eletrostático ao qual estão sujeitos as espécies em solução, faremos uso da teoria de Debye-Hückel [70, 71], que constitui a base para o tratamento de soluções de eletrólitos fortes. A primeira aproximação presente na teoria de Debye-Hückel consiste em assumir que a densidade de carga no sistema  $\rho_i^j(r)$  pode ser determinada por um fator de Boltzmann,

$$\rho_i^j = \rho_i e^{-z_i q \phi_j(r)/k_B T}, \quad (2.39)$$

onde  $z_i$  é valência de cada espécie,  $q$  é a carga do elétron em módulo,  $r$  é a distância que separa duas espécies interagentes e  $\phi_j(r)$  é o potencial eletrostático a uma distância  $r$  do íon  $j$ . O sistema apresentado pode ser descrito através da equação de Poisson,

$$\nabla^2 \phi^{(n)} = -\frac{4\pi \rho_q^{(n)}}{D}. \quad (2.40)$$

onde  $D$  é a constante dielétrica do meio. A substituição da Eq. 2.39 em 2.40 leva à uma equação diferencial não-linear de difícil resolução, ainda que com o emprego de métodos numéricos. Consideremos apenas os casos em que  $z_i q \phi_j(r)/k_B T \ll 1$ , para importantes valores de  $r$ , para os quais a distribuição exponencial de carga pode ser linearizada sem prejuízo de generalidade se o sistema está no limite da diluição infinita.

Assim, com a linearização da distribuição de carga e considerando que  $q_j = z_j q$ , a Eq. 2.39 assume a forma abaixo,

$$\rho_q^{(n)} = \sum_j (z_j q) \rho_j (-\beta z_j q \phi^{(n)}), \quad (2.41)$$

$$\rho_q^{(n)} = -\beta q^2 \phi^{(n)} \sum_j z_j^2 \rho_j. \quad (2.42)$$

Definindo  $\rho_1 = \sum_j z_j^2 \rho_j$ , a equação anterior pode ser escrita como segue,

$$\rho_q^{(n)} = -\beta q^2 \phi^{(n)} \rho_1, \quad (2.43)$$

e, portanto, a Eq. 2.40 resulta em

$$\nabla^2 \phi^{(n)} = \kappa^2 \phi^{(n)}, \quad (2.44)$$

onde

$$\kappa^2 \equiv \frac{4\pi \beta q^2 \rho_1}{D}. \quad (2.45)$$

Da teoria de Debye-Hückel, a quantidade  $\kappa$  corresponde ao inverso do comprimento de blindagem iônica, e é dada por

$$\kappa \equiv \sqrt{\frac{4\pi}{Dk_B T} \sum_i \rho_i q_i^2}, \quad (2.46)$$

denotando a concentração em número da espécie  $i$  por  $\rho_i$ . Uma vez que  $\phi = \phi(r)$ , escrevemos

$$\nabla^2 \phi = \frac{1}{r^2} \frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{d\phi}{dr} \right) = \kappa^2 \phi_{ext}, \quad (2.47)$$

$$\frac{d}{dr} \left( r^2 \frac{d\phi}{dr} \right) = \kappa^2 r^2 \phi_{ext}. \quad (2.48)$$

Para um elemento infinitesimal de carga, a solução desta equação diferencial tem a seguinte forma:

$$d\phi = \frac{e^{-\kappa r}}{Dr} dq. \quad (2.49)$$

Usando a definição da densidade linear de carga,

$$\sigma_0 = \frac{pq}{b}, \quad (2.50)$$

obtemos

$$d\phi = \frac{\sigma_0 e^{-\kappa r}}{Dr} ds, \quad (2.51)$$

com  $\sigma_0 = (-1+m)\frac{q}{b}$ , onde  $m$  representa a fração de íons associados que reduzem a valência líquida da cadeia. Assim, o potencial eletrostático num ponto P, ao redor do polieletrólito, será dado por

$$\phi = \frac{\sigma_0}{D} \int_0^L \frac{e^{-\kappa r}}{r} ds. \quad (2.52)$$

Já o potencial eletrostático, no mesmo ponto, devido somente à molécula, na ausência de íons, é obtido no limite em que  $\kappa \rightarrow 0$ , resultando no potencial próprio  $\phi_{pr}$ , na forma

$$\phi_{pr}(x, y, z) = \frac{\sigma_0}{D} \int_0^L \frac{1}{r} ds. \quad (2.53)$$

A energia potencial eletrostática para um conjunto de elementos  $dq$ , sob a ação de um potencial conhecido, é dada por

$$dU = \psi dq, \quad (2.54)$$

onde  $\psi$  corresponde ao potencial eletrostático gerado pelo polieletrólito sobre os íons<sup>1</sup> na solução, ou seja,

$$\psi = \phi - \phi_{pr}. \quad (2.55)$$

---

<sup>1</sup>Para avaliar o potencial é necessário negligenciar a contribuição da própria molécula ( $\phi_{pr}$ ).

Assim, a energia potencial eletrostática  $U$  é obtida através de

$$U = \frac{1}{2} \int \psi(x, y, z) dq(x, y, z). \quad (2.56)$$

Com (2.50) em (2.56),

$$U = \frac{\sigma_0^2}{2D} \int_0^L ds \int_0^L ds' \frac{e^{-\kappa r} - 1}{r}. \quad (2.57)$$

A energia livre de Helmholtz associada à interação eletrostática é obtida através do processo de carregamento de Debye, no qual todas as partículas são carregadas simultaneamente desde 0 até a sua carga final [71, 72]. Carregando apenas a cadeia, obtemos

$$F_{elet} = \int \frac{2U(\xi)}{\xi} d\xi, \quad 0 < \xi < 1, \quad (2.58)$$

$$F_{elet} = \frac{\sigma_0^2}{2D} \int_0^L ds \int_0^L ds' \frac{e^{-\kappa r} - 1}{r}. \quad (2.59)$$

Por definição,  $L = \int_0^L ds$ , assim, substituindo-se  $ds$  por  $b dt$  onde  $dt$  varia de 0 até  $Z$ , que corresponde ao número de sítios do polieletrólito, obtemos

$$L = \int_0^L ds = \int_0^Z b dt. \quad (2.60)$$

Portanto, a equação anterior assume a seguinte forma,

$$F_{elet} = \frac{\sigma_0^2 b^2}{2D} \int_0^Z dt \int_0^Z dt' \frac{e^{-\kappa r(t-t')} - 1}{r(t-t')}. \quad (2.61)$$

Definindo  $x = t - t'$ , com  $dx = -dt'$ , escrevemos

$$F_{elet} = \frac{\sigma_0^2 b^2}{D} \int_0^Z dx (Z - x) \frac{e^{-\kappa r(x)} - 1}{r(x)}, \quad (2.62)$$

e considerando que  $\xi = \frac{\beta q^2}{D b}$  e  $\sigma_0 = \frac{p q}{b}$ , temos que

$$\beta F_{elet} = \xi p^2 b \int_0^Z dx (Z - x) \frac{e^{-\kappa r(x)} - 1}{r(x)}. \quad (2.63)$$

Considerando que a quantidade  $b$  é equivalente a dimensão  $\sigma$  de cada sítio, de valência  $p$  unitária, e a definição do parâmetro de carga em termos do comprimento de Bjerrum  $\lambda_B$ ,

$$\xi = \frac{\lambda_B}{\sigma}, \quad (2.64)$$

a equação anterior pode ser escrita como segue,

$$\beta F_{elet} = N_p \lambda_B \int_0^Z dx (Z - x) \frac{e^{-\kappa r(x)} - 1}{r(x)}. \quad (2.65)$$

Uma vez que  $r(x)$  é função do número de sítios do políon, como mostra a Eq. 2.60, a integral presente em 2.65 resulta na equação abaixo, escrita em termos das funções de Bessel modificadas  $K_0(\kappa r)$  e  $K_1(\kappa r)$ . Assim, somando a contribuição para cada uma das estruturas em fita simples e dupla, é possível escrever

$$\beta F_{elet}(m_1, m_2, \alpha) = \left\{ Z^2 m_1 p_1^2 \frac{\lambda_B}{L_1} + Z^2 m_2 p_2^2 \frac{\lambda_B}{L_2} \right\} \frac{K_0(\kappa r)}{\kappa r K_1(\kappa r)}, \quad (2.66)$$

onde  $L_1$  e  $L_2$  correspondem às extensões das cadeias. Esta é uma expressão aproximada para a energia livre de interação eletrostática entre os polieletrólitos e os microíons em solução, dependente da fração de íons associados.

### 2.3.4 A energia livre atrativa ( $F_a$ )

A energia livre atrativa  $F_a$  presente na Eq. 2.9 é relativa à associação de moléculas de DNA de fita única que formam moléculas em dupla fita. Esta associação é descrita através de uma energia de interação atrativa  $\chi$  entre os monômeros de distintas cadeias. A energia

livre correspondente é proposta através de uma aproximação de campo médio na seguinte forma:

$$\beta F_a(m_1, m_2, \alpha) = -m_2 \frac{Z^2}{2} \chi, \quad (2.67)$$

onde  $\chi$  é o parâmetro que define o grau de atração entre as fitas do DNA neste modelo. Considerando que a temperatura de *melting* é função da densidade de sal e da fração de pares de base do tipo Guanina-Citosina ( $n_{GC}$ ) [36, 37], propomos a seguinte expressão para  $\chi$ ,

$$\chi(n_{GC}, \rho_s) = f_1(n_{GC}) - f_2(n_{GC}) \log \rho_s^*, \quad (2.68)$$

onde  $n_{GC}$  representa a fração de pares de base GC no segmento da cadeia de DNA e  $\rho_s^* = \rho_s a_c^3$  é a densidade de sal em unidades reduzidas. As duas funções  $f_1(n_{GC})$  e  $f_2(n_{GC})$  são definidas lineares em termos de  $n_{GC}$  como segue

$$f_1(n_{GC}) = a_{11} - a_{12} n_{GC}, \quad (2.69)$$

$$f_2(n_{GC}) = a_{21} + a_{22} n_{GC}. \quad (2.70)$$

Os coeficientes  $a_{11}$ ,  $a_{12}$ ,  $a_{21}$  e  $a_{22}$  são apresentados na próxima seção, obtidos através do ajuste de resultados apresentados para a desnaturação [36] para três diferentes densidades  $n_{GC} = N_{GC}/Z$  de pares de base Guanina-Citosina. Assumimos que a dependência da densidade de pares tem efeito tipo zíper, de forma que  $f_1$  e  $f_2$  são funções lineares de  $n_{GC}$ .

Nossa hipótese é a de que a interação atrativa entre os aminoácidos é mediada tanto pela densidade de sal em solução, que favorece a formação estável em dupla hélice quanto pela densidade de pares de base GC, que tem o mesmo efeito. Assim, com o aumento destas quantidades num sistema observa-se experimentalmente que a desnaturação ocorre a maiores temperaturas.

### 2.3.5 Resumo

Neste capítulo apresentamos nossa proposta de uma energia livre de Helmholtz para uma solução de DNA e sal, baseada em teorias de campo médio. Este sistema é basicamente uma

mistura de macromoléculas estruturadas em fitas simples e em fitas duplas, porém o mesmo modelo também pode ser empregado para uma mistura de fitas de DNA parcialmente desnaturadas. O sistema é composto por íons livres e fisicamente associados ao DNA. O modelo é fundamentado na competição entre o ganho entrópico associado aos íons livres e o ganho eletrostático relativo à associação. Em paralelo, as fitas simples ou duplas são resultado da competição entre a repulsão entre os grupos fosfato e a atração através das ligações de Hidrogênio entre os pares de base. Neste sentido, a associação física de íons ao DNA blinda a repulsão entre os sítios carregados favorecendo a formação e estabilidade da estrutura em fita dupla. Por outro lado, o aumento da temperatura do sistema favorece o termo entrópico, levando à desnaturação. Os parâmetros deste sistema são as concentrações de sal e de DNA, tanto em fita simples quanto em fita dupla, o tamanho das macromoléculas e a temperatura. No capítulo que segue apresentaremos detalhes sobre a dependência da sequência específica do DNA e sua correlação com a temperatura de desnaturação, comparando nossos resultados com medidas experimentais.



## Capítulo 3

# A desnaturação do DNA como função da variação da concentração salina e temperatura

Neste capítulo, o modelo apresentado anteriormente para a solução de DNA e sal será empregado para a estimativa da temperatura em que a desnaturação ocorre como função da concentração salina que, a partir de certa densidade, favorece a estabilidade da estrutura em dupla fita. Como ingrediente adicional, incluiremos a energia atrativa entre as fitas simples que formam a molécula de DNA como função das particularidades da sua constituição, como a densidade de pares de base do tipo Guanina-Citosina, em termos do parâmetro de ajuste  $\chi$ , apresentada na Eq. 2.67.

### 3.1 Ajuste do parâmetro atrativo $\chi$ de acordo com resultados experimentais

No capítulo anterior apresentamos uma proposta de energia livre, na Eq. 2.9, como função das densidades de contraíons que associam nas estruturas tipo fita simples e dupla de DNA. Em adição,  $F_{tot}$  é também uma função da fração de moléculas de DNA tipo fita simples ( $2\alpha$ ) e fita dupla ( $1 - \alpha$ ) em solução. A configuração de equilíbrio do sistema é obtida pela minimização de  $F_{tot}$  em termos de  $m_1$ ,  $m_2$  e  $\alpha$ , como segue

$$\left. \frac{\partial F_{tot}(m_1, m_2, \alpha)}{\partial m_1} \right|_{m_1=m_1^*, m_2=m_2^*, \alpha=\alpha^*} = 0,$$

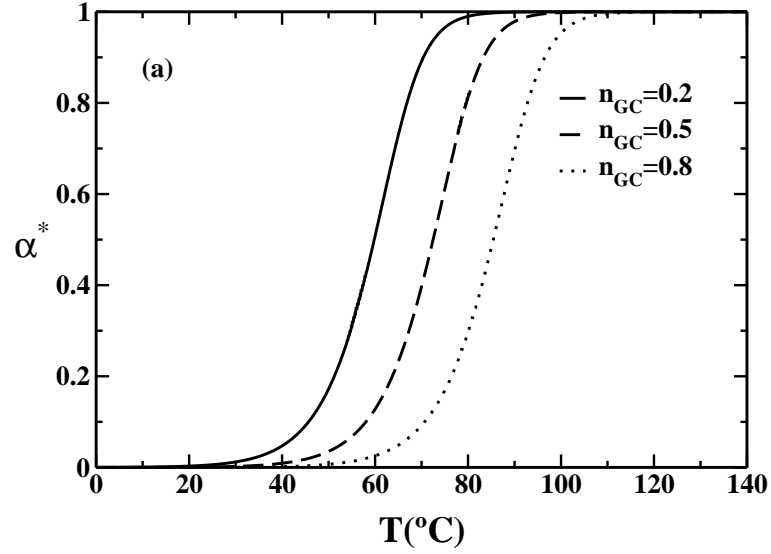
$$\begin{aligned} \left. \frac{\partial F_{tot}(m_1, m_2, \alpha)}{\partial m_2} \right|_{m_1=m_1^*, m_2=m_2^*, \alpha=\alpha^*} &= 0, \\ \left. \frac{\partial F_{tot}(m_1, m_2, \alpha)}{\partial \alpha} \right|_{m_1=m_1^*, m_2=m_2^*, \alpha=\alpha^*} &= 0. \end{aligned} \quad (3.1)$$

Como forma de verificar se nossa descrição do comportamento de  $\chi$ , na Eq. 2.68, em termos das densidades de sal e de pares de base do tipo GC, apresentada na Eq. 2.68, representa uma boa aproximação realizamos o seguinte procedimento: para densidades fixas de sal ( $\rho_s = 220mM$ ) e de DNA ( $\rho_{DNA} = 2\mu M$ ) e para três distintas concentrações de pares de base  $n_{GC} = 0, 2, 0, 5, 0, 8$ , o parâmetro  $\chi$  foi ajustado de forma a obterem-se, através da minimização de  $F_{tot}$ , as temperaturas de *melting*  $T = 77, 8^\circ C, 81, 6^\circ C$  e  $84, 6^\circ C$ , obtidas experimentalmente para as densidades de pares de base GC apresentadas acima [36].

As Figuras 3.1, 3.2(a) e 3.2(b) mostram o comportamento de  $\alpha$ ,  $m_1$  e  $m_2$  em função das densidades de pares de base mencionadas acima como função da temperatura do sistema. O parâmetro de ordem  $\alpha$  apresenta uma transição entre seus valores limite (0 e 1) enquanto as quantidades  $m_1$  e  $m_2$  não são afetadas pela variação de  $n_{GC}$ . Os valores das temperaturas de desnaturação aumentam com o aumento da densidade de pares de base GC, como observado experimentalmente.

Assim, como forma de verificar se a Eq. 2.68 representa uma boa aproximação, testamos o nosso modelo para diversas concentrações de sal, como indica a Tabela 3.1. Neste caso, os valores das densidades de pares de base e de DNA utilizadas foram  $n_{GC} = 0, 2, 0, 5, 0, 8$  e  $\rho_{DNA} = 2\mu M$ . Os valores de  $\chi$  foram novamente fitados de forma a obterem-se os valores experimentais das temperaturas de desnaturação apresentados na Tabela 3.1 [36, 37]. A Figura 3.3(a) ilustra o comportamento de  $\chi$  em termos da densidade de sal como uma função logarítmica como sugere a Eq. 2.68. Neste caso, a temperatura de *melting* aumenta para maiores densidades de sal em solução.

Na sequência o mesmo procedimento de ajuste foi realizado para diferentes densidades de sal  $\rho_s = 69\mu M, 119\mu M$  e  $220\mu M$  com a variação de  $n_{GC}$ , de acordo com os valores apresentados na Tabelas 3.1 e 3.2. A Figura 3.3(b) mostra o comportamento linear de  $\chi$

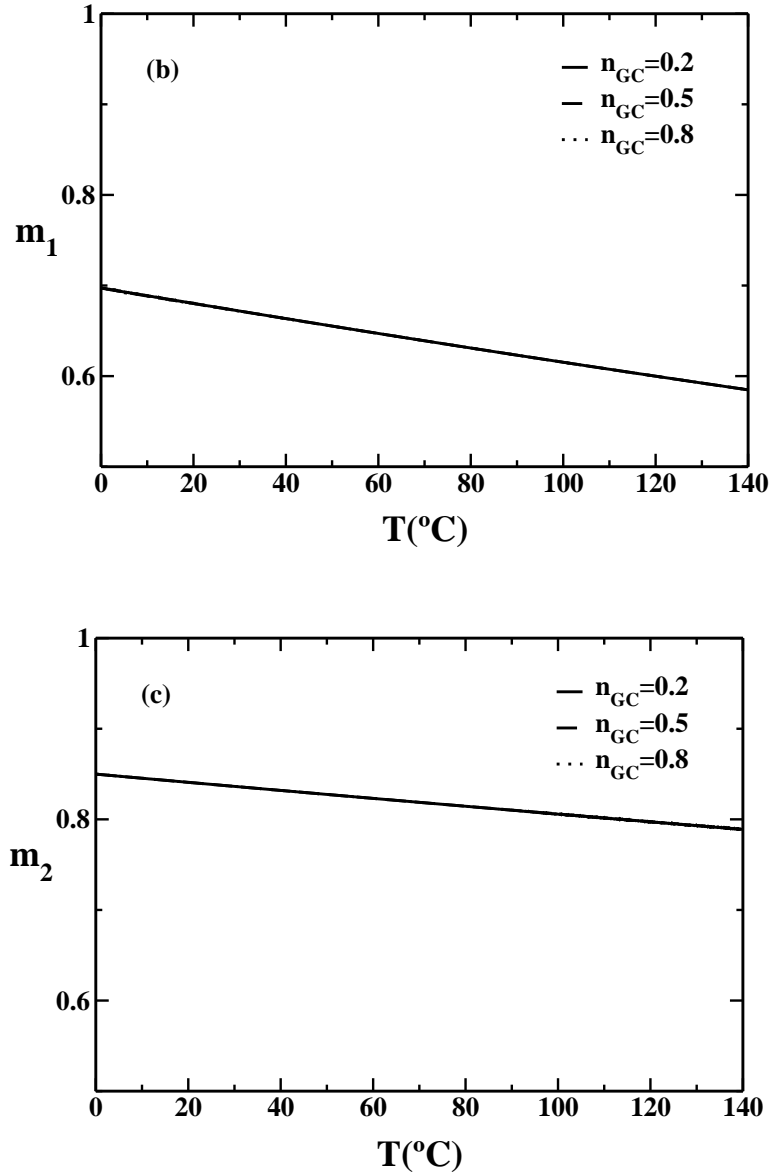


**Figura 3.1:**  $\alpha^*$  como função da temperatura para distintas densidades de pares de base  $n_{GC}$  e para densidades de sal e polieletrólitos iguais a  $\rho_s = 220mM$  e  $\rho_p = 2\mu M$ .

em termos da densidade  $n_{GC}$  como proposto pela Eq. 2.68.

Com a validação da expressão para  $\chi$  de forma que possa ser empregada em casos mais gerais, é necessário encontrar os coeficientes  $a_{11}$ ,  $a_{12}$ ,  $a_{21}$  and  $a_{22}$ . Para este propósito, ajustamos o valor de  $\chi$  de acordo com os valores experimentais das temperaturas de *melting* para diferentes concentrações de sal e de densidades  $n_{GC}$ , de onde resultam os seguintes coeficientes:

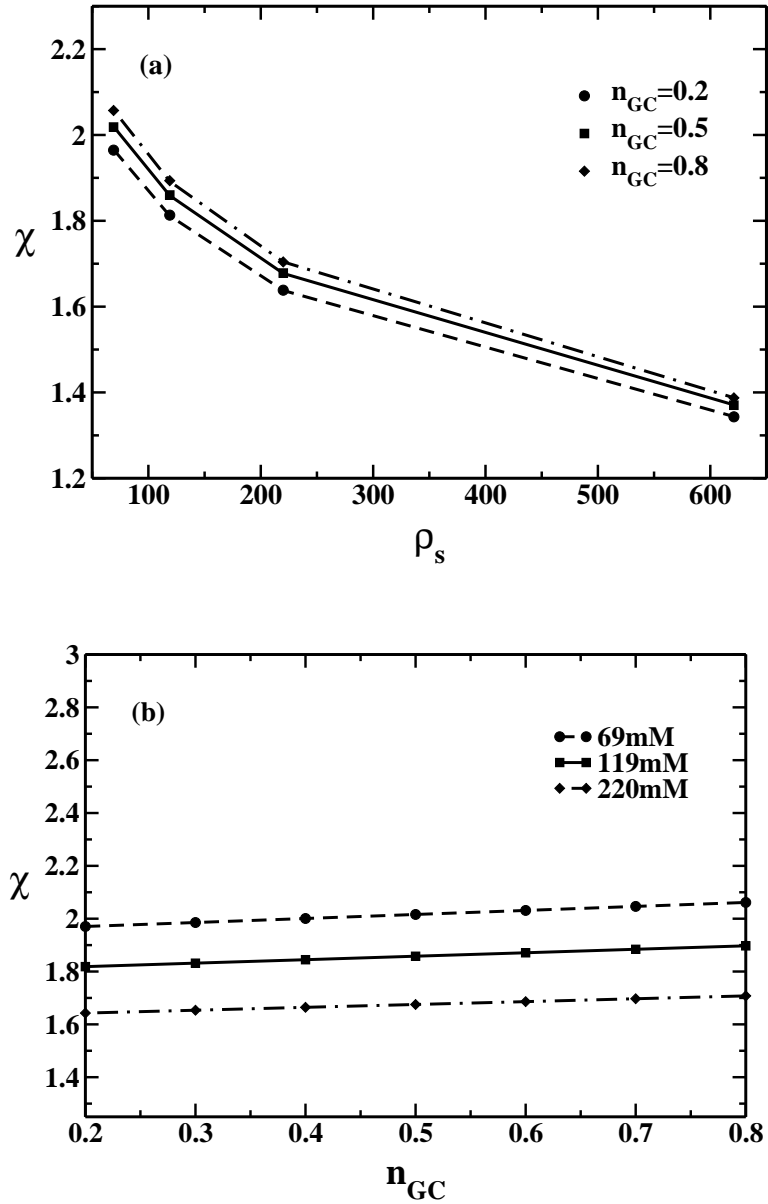
$$\begin{aligned}
 a_{11} &= 0,021412, \\
 a_{12} &= 0,00096406, \\
 a_{21} &= 0,27611, \\
 a_{22} &= 0,000368.
 \end{aligned}
 \tag{3.2}$$



**Figura 3.2:** (a)  $m_1$  e (b)  $m_2$  como função da temperatura para distintas densidades de pares de base  $n_{GC}$  e para densidades de sal e polieletrólitos iguais a  $\rho_s = 220\text{mM}$  e  $\rho_p = 2\mu\text{M}$ .

### 3.2 Confirmação do modelo teórico via comparação com o experimento

Com o intuito de confirmar se o ajuste apresentado em 3.2 é suficientemente robusto, testamos os valores destes coeficientes para um conjunto distinto de parâmetros constantes



**Figura 3.3:** (a)  $\chi$  como função da densidade de sal para  $n_{GC} = 0, 2, 0, 5, 0, 8$  e (b)  $\chi$  como função da densidade  $n_{GC}$  fixadas as seguintes concentrações de sal  $\rho_s = 69mM$ ,  $\rho_s = 119mM$ ,  $\rho_s = 220mM$  e  $\rho_s = 621mM$ . Estes resultados foram obtidos através do ajuste do parâmetro atrativo  $\chi$  baseado em dados experimentais [36].

na Tabela 3.2.

A Figura 3.4 apresenta o comportamento do parâmetro de ordem  $\alpha^*$  como função

da temperatura obtido pela minimização da Eq. 3.1 com a expressão para  $\chi$  dada pela Eq. (2.68) e pelos coeficientes apresentados na Eq. 3.2. Os valores de  $\alpha^*$  são computados para  $n_{GC} = 0, 3, 0, 4, 0, 6, 0, 7$  e  $\rho_s = 69mM$ ,  $\rho_s = 119mM$ ,  $\rho_s = 220mM$  e  $\rho_s = 621mM$ . A curva mostra a ocorrência de desnaturação ( $\alpha^* \geq 0,5$ ) à temperaturas equivalentes às apresentadas em resultado experimental [36], de acordo com a Tabela 3.2. Aqui nenhum ajuste foi empregado.

**Tabela 3.1:** *Temperaturas de desnaturação reportadas experimentalmente para os sistemas A, B, C e D. Os sistemas apresentam distintas concentrações de sal  $\rho_s$  e densidades de pares de base  $n_{GC}$  [36].*

	$\rho_s$ (mM)	$n_{GC}$	$T_{DEN}(^{\circ}C)$
Sistema A	69	0,2	50,7
		0,5	55,0
		0,8	59,3
Sistem B	119	0,2	66,3
		0,5	70,4
		0,8	74,5
Sistema C	220	0,2	77,8
		0,5	81,6
		0,8	84,6
Sistema D	621	0,2	65,1
		0,5	78,8
		0,8	87,7

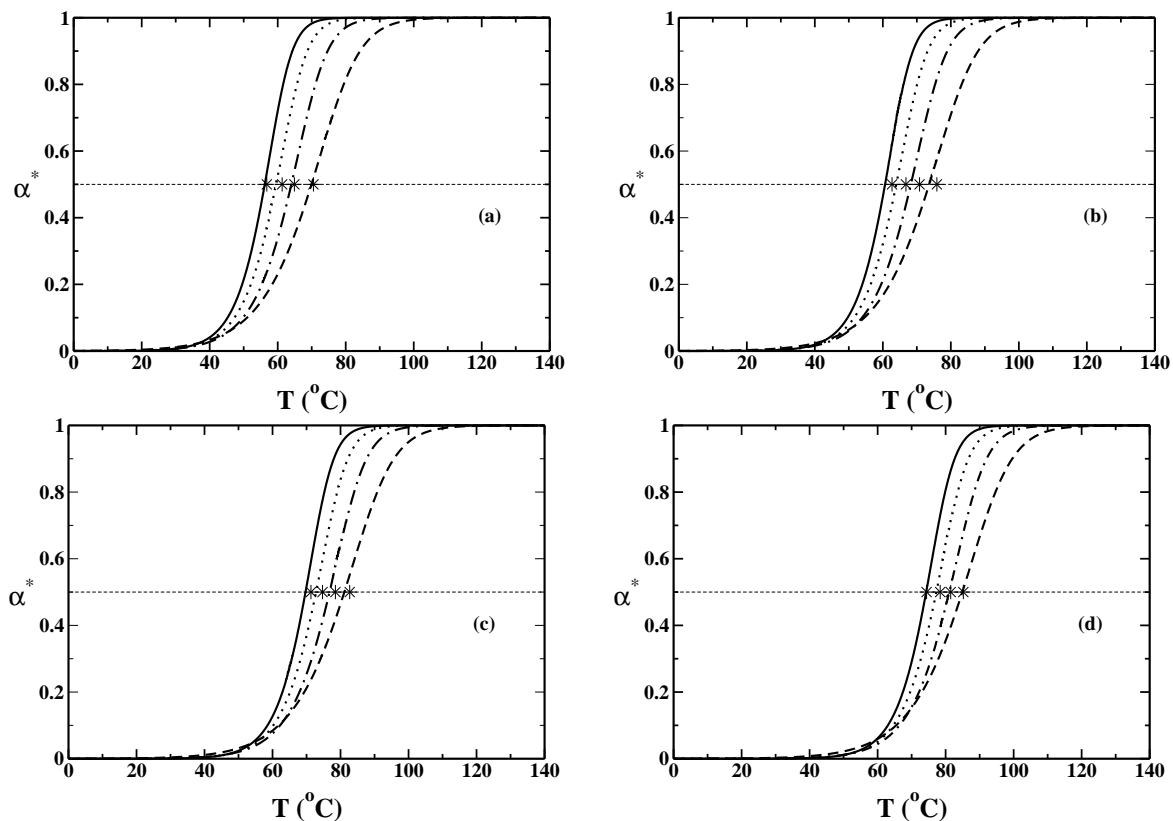
Os resultados apresentados foram publicados recentemente [73]. O artigo encontra-se em anexo.

**Tabela 3.2:** Temperaturas de desnaturação reportadas experimentalmente para os sistemas *E*, *F*, *G* e *H*. Os sistemas apresentam distintas concentrações de sal  $\rho_s$  e densidades de pares de base  $n_{GC}$  [36].

	$\rho_s$ (mM)	$n_{GC}$	$T_{DEN}(^{\circ}C)$
Sistema E	69	0,3	58,3
		0,4	62,7
		0,6	71,3
		0,7	74,4
Sistema F	119	0,3	61,9
		0,4	66,8
		0,6	74,7
		0,7	78,4
Sistema G	220	0,3	66,1
		0,4	70,8
		0,6	78,5
		0,7	81,5
Sistema H	621	0,3	71,3
		0,4	75,9
		0,6	82,7
		0,7	85,2

### 3.3 Resumo

Neste capítulo apresentamos nossa análise sobre o processo de desnaturação como resultado da competição entre as contribuições eletrostáticas, entrópica e a contribuição relativa



**Figura 3.4:**  $\alpha^*$  como função da densidade  $n_{GC}$  para diferentes concentrações de sal:  $\rho_s = 69mM$  (linha sólida),  $\rho_s = 119mM$  (linha pontilhada),  $\rho_s = 220mM$  (linha tipo traço-ponto),  $\rho_s = 621mM$  (linha tracejada),  $Z \rho_p = 2\mu M$  e (a)  $n_{GC} = 0,3$ , (b)  $n_{GC} = 0,4$ , (c)  $n_{GC} = 0,6$  e  $n_{GC} = 0,7$ .

à atração entre as fitas simples que formam a dupla hélice a partir do emprego de teorias de campo médio. Através da minimização da energia livre resultante com relação à densidade de fitas simples e duplas em solução e às frações de associação de sal obtivemos as respectivas temperaturas de desnaturação.

Para valores fixos do parâmetro atrativo  $\chi$  e da concentração de sal nosso modelo mostra que a temperatura de desnaturação cresce com o aumento da densidade de pares de base  $n_{GC}$ . Em adição, a temperatura de desnaturação cresce com o aumento da concentração salina se a densidade de pares de base  $n_{GC}$  é mantida fixa.

Nosso parâmetro livre, a energia livre entre as duas fitas, foi ajustado de acordo com um



conjunto de resultados experimentais para a temperatura de desnaturação. Na sequência a energia livre proposta foi empregada para a descrição de outro conjunto de resultados experimentais e apresentou boa concordância. Acreditamos que nossa aproximação pode ser utilizada sem parâmetros de ajuste adicionais para descrever o processo de desnaturação em outros sistemas independentemente do comprimento das cadeias de DNA, concentração salina ou densidade de pares de base do tipo GC.

Nos capítulos que seguem apresentamos dois casos em que esta modelagem para o fenômeno da desnaturação poderia ser empregada. O primeiro deles refere-se ao efeito de mudanças severas na conformação da cadeia de DNA com a associação de moléculas como Ciclodextrina, culminando na desnaturação da dupla fita. O segundo caso é relativo à associação de espécies intercalantes, como o Brometo de Etídio que também provoca interessantes mudanças físicas na cadeia. Uma versão resumida deste capítulo encontra-se resumida no artigo em anexo [73].

## Capítulo 4

# Um modelo para a conformação do complexo de DNA com outras moléculas

Neste capítulo apresentaremos um modelo para as interações entre cadeias de DNA em fita dupla e moléculas de Ciclodextrina (CD) em solução salina. Nosso propósito é o estudo dos efeitos da associação de moléculas de CD que provoca mudanças significativas no comprimento de persistência da cadeia levando à desnaturação.

### 4.1 A associação de Ciclodextrina ao DNA

Iniciamos o estudo do fenômeno de desnaturação, apresentado nos capítulos anteriores, com o objetivo de analisar distintas estruturas de um complexo formado por uma cadeia de DNA e outras moléculas. Resultados experimentais mostram que, quando em solução com DNA, certos tipos de moléculas, ao associarem-se, são responsáveis por fortes alterações em suas propriedades espaciais e de elasticidade [34, 74]; o presente estudo intenciona investigar a natureza destas alterações, propondo um modelo baseado em teorias de campo médio para descrever as principais interações entre as espécies no sistema com vistas a incluir o fenômeno da desnaturação.

O resultado experimental recente que serviu de motivação ao nosso estudo apresenta medidas do comprimento de persistência de complexos formados por DNA e macromoléculas de Ciclodextrina como função da concentração de Ciclodextrina nas suas formas neutra e

ionizada (com carga +1) [34]. O comprimento de persistência é definido como o comprimento de correlação da cadeia polimérica, capaz de informar sobre a elasticidade da molécula, de forma que quanto maior o seu valor, mais rígido deve ser o polímero e, conseqüentemente, maior a sua extensão. A variação catiônica da molécula de Ciclodextrina vem sendo utilizada para condensar cadeias de DNA de fita dupla de forma a introduzi-lo em pequenas vesículas para aplicação em terapia gênica [75]. O resultado experimental também mostra que, para alta concentração de Ciclodextrina, o fenômeno da desnaturação é observado, o que é, particularmente, o foco da nossa atenção.

Ainda que o modelo apresentado nos Caps. 2 e 3 descreva a desnaturação da uma solução de políons rígidos, nosso propósito é o da sofisticação da teoria de forma a descrever mudanças conformacionais de cadeias flexíveis, incluindo a desnaturação. Para tal, apresentamos nosso trabalho em andamento, referente à associação de moléculas de Ciclodextrina em DNA. Apresentamos na próxima subseção as particularidades da molécula de Ciclodextrina e na sequência o nosso modelo de associação.

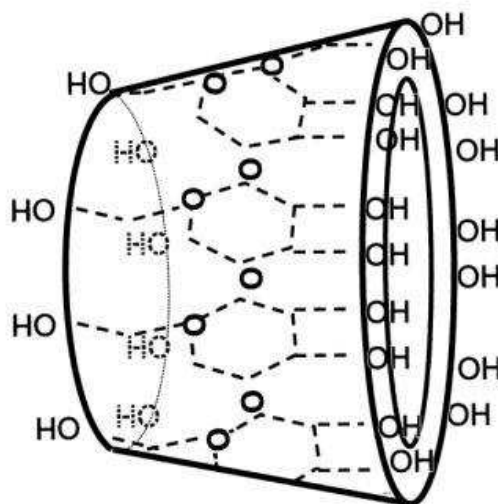
## 4.2 Componentes do sistema

### 4.2.1 A Ciclodextrina

As moléculas de Ciclodextrina (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, 7 ou 8 unidades de glicose, organizadas em uma estrutura cíclica, formando as espécies  $\alpha$ -Ciclodextrina,  $\beta$ -Ciclodextrina e  $\gamma$ -Ciclodextrina), respectivamente. As Ciclodextrinas  $\alpha$ ,  $\beta$ , e  $\gamma$  são denominadas Ciclodextrinas naturais, no entanto, os radicais hidroxila (OH-) podem ser facilmente modificados quimicamente para obter derivados iônicos e neutros [76]-[78].

A arquitetura de uma molécula de Ciclodextrina, ilustrada na Figura 4.1, corresponde a de um toróide delimitado por grupos hidroxila (OH-), com altura de aproximadamente  $0.79 \pm 0.01$  nm e é levemente mais largo em uma das faces. A cavidade possui as medidas

de 0,47-0,53 nm, 0,60-0,65 nm e 0,75-0,83 nm para as variações  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD, respectivamente, enquanto o diâmetro exterior das moléculas é aproximadamente de  $1.46 \pm 0.04$  nm,  $1.54 \pm 0.04$  nm e  $1.75 \pm 0.04$  nm, para a mesma ordem apresentada [77].



**Figura 4.1:** Representação esquemática da molécula de Ciclodextrina

Como resultado desta configuração, esta estrutura cíclica apresenta o exterior hidrofílico e uma cavidade central hidrofóbica capaz de alojar outras espécies, possibilitando que a molécula de CD se comporte como um agente carreador de outras moléculas em organismos. Esta força motriz para a inclusão de moléculas hóspedes em cavidades de CD vem sendo objeto de intensa investigação [79, 80], especialmente para aplicações farmacêuticas; isto porque complexos de inclusão de moléculas hidrofóbicas em Ciclodextrinas são capazes de penetrar tecido humano e podem ser utilizados para a liberação de compostos biologicamente ativos sob condições específicas, o que caracteriza a transfecção de fármacos [81].

O trabalho experimental que pretendemos modelar [34] faz uso de uma Ciclodextrina modificada denominada 6-monodeoxy-6-monoamino- $\beta$ -ciclodextrina (Am-beta-CD). Esse derivado é formado pela substituição de um radical hidroxila por um grupamento amino ( $\text{NH}_2$ ), de forma que a molécula possui uma carga positiva unitária (+1) quando imersa em solução com pH 7,4, resultando num derivado catiônico da Ciclodextrina, o qual

será referido no texto apenas como Ciclodextrina ou CD. Esta variação catiônica da CD vem sendo utilizada para condensar cadeias de DNA de fita dupla de forma a introduzi-lo em pequenas vesículas para aplicação em terapia gênica [75].

Esta variação conformacional em cadeias de DNA, provocada pela associação de moléculas de CD, é o fenômeno que intencionamos investigar. Apresentamos nas próximas seções a modelagem mecânico-estatística empregada na tentativa de descrever o fenômeno apresentado.

#### 4.2.2 O sistema físico: DNA mais Ciclodextrina

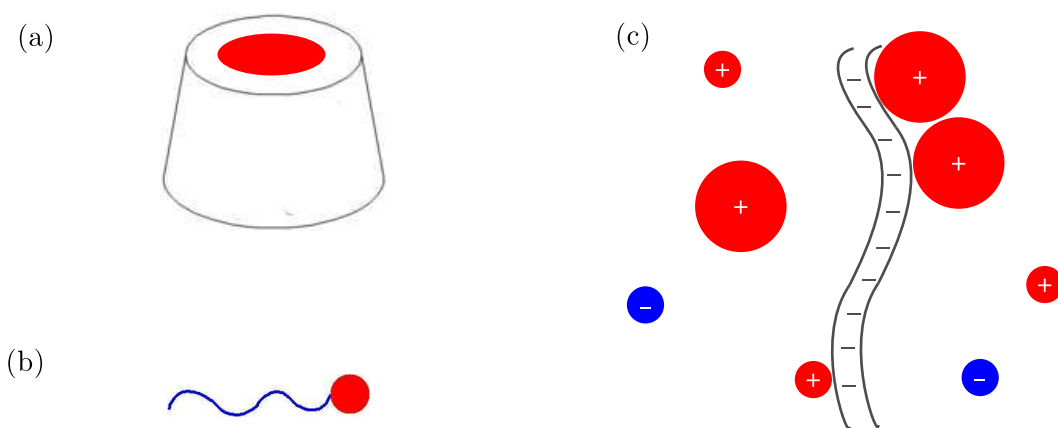
Os complexos formados pela associação de moléculas de Ciclodextrina em DNA podem resultar em uma excelente estratégia para a terapia gênica [82, 83]. A molécula de CD modificada, ao associar-se ao DNA, além de reduzir a carga líquida do complexo, torna-o adequado para este processo por conta de sua cavidade interna hidrofóbica. As vantagens do seu emprego, comparado ao uso de surfactantes<sup>1</sup>, consistem em sua elevada hidrofobicidade e tamanho, como representado nas Figuras 4.2(a) e 4.2(b), resultando em um complexo de maior dimensão, que pode ser mais facilmente absorvido por endocitose. A Figura 4.2(c) ilustra o sistema como o modelamos.

O resultado experimental recente que serviu de motivação ao nosso estudo apresenta medidas do comprimento de persistência de complexos DNA-CD à temperatura ambiente. O acréscimo de Ciclodextrina neutra não altera a conformação da cadeia de DNA, ao passo que a inclusão da sua variação iônica provoca, primeiramente, o colapso do complexo, registrado pela diminuição do comprimento de persistência  $A$  na Figura 4.3.

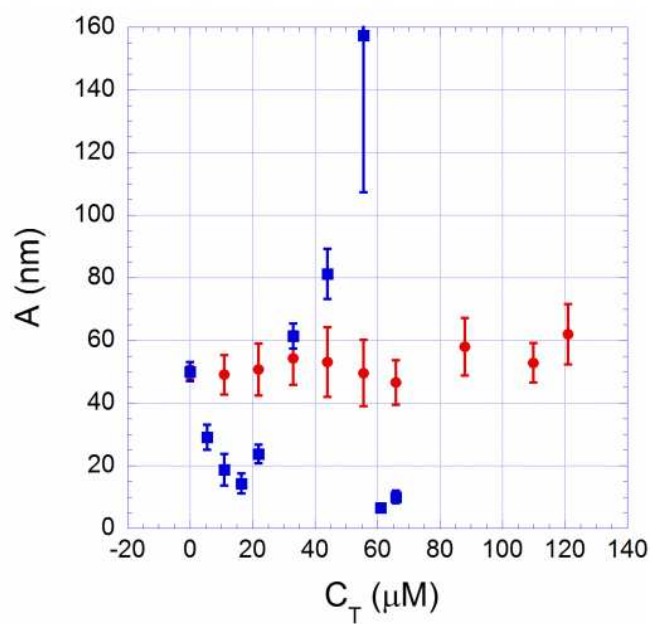
Acreditamos que a segunda transição conformacional, observada para uma concentração de Ciclodextrina a partir de  $C_T = 20\mu\text{M}$ , é resultado de efeitos de volume da molécula

---

<sup>1</sup>Os surfactantes são compostos de natureza anfifílica, isto é, apresentam uma cauda carbônica apolar, de comportamento hidrofóbico [84], agregada a uma cabeça polar, de natureza hidrofílica. Esta característica é tão forte em surfactantes que, em solução aquosa, a partir de uma certa concentração, as moléculas de surfactantes se agregam formando micelas, com o intuito de proteger as suas caudas do contato com a água, o que é um exemplo de ação cooperativa.



**Figura 4.2:** Representações esquemáticas da molécula de Ciclodextrina (a), de uma molécula de surfactante (b) e de como tratamos o sistema: um complexo formado pela associação de microíons e moléculas maiores, como Ciclodextrina (c).



**Figura 4.3:** Resultado experimental para o comportamento do comprimento de persistência como função da concentração total de Ciclodextrina; os pontos com círculos se referem a CD neutra, enquanto os quadrados representam os valores de  $A$  para a Ciclodextrina monovalente [34].

de CD, que tem aproximadamente 4,64 vezes o tamanho de um sítio do DNA; é esta a variação conformacional que intencionamos descrever neste momento. A terceira transição, registrada quando a concentração crítica  $C_T = 55\mu\text{M}$  é atingida, leva a um valor de  $A$  característico de DNA em fita simples. Este resultado é um indício da ocorrência de desnaturação na estrutura, equivalente ao desenovelamento das fitas simples que formam o DNA em fita dupla. Limitaremos-nos, neste momento, à discussão das duas primeiras transições conformacionais. Com o objetivo de compreender estas significativas variações na conformação do complexo formado, propomos um modelo para a descrição das principais interações entre polieletrólitos aniônicos e moléculas de Ciclodextrina monovalentes. O apresentamos na sequência, bem como nossos resultados e a comparação com os dados experimentais.

### 4.3 O modelo

Consideremos, inicialmente, uma solução composta apenas de polieletrólitos aniônicos e contraíons. Quando a macromolécula de Ciclodextrina ionizada é acrescida a esta solução, estas se associam aos poliíons reduzindo a sua carga líquida e diminuindo a repulsão entre os seus sítios carregados. Como efeito da hidrofobicidade, formam-se pequenos grupos moléculas de CD que, associadas, têm o propósito de reduzir o contato das suas cavidades com a solução. Num primeiro instante, observa-se o colapso do complexo, isto é, a distância entre as suas extremidades é reduzida. Na sequência, o complexo formado terá carga líquida menor que o poliíon puro e apresentará regiões hidrofóbicas; como que por efeito do volume da molécula de Ciclodextrina o comprimento de persistência aumenta e leva ao rompimento da dupla hélice. Na tentativa de descrever o fenômeno apresentado, construímos uma expressão para a energia livre que leva em consideração as diversas interações entre as espécies.

O modelo a ser empregado será construído a partir dos resultados já conhecidos para a interação entre cadeias de DNA e moléculas como os surfactantes [26, 24, 28]. Iniciaremos considerando a cadeia de DNA como uma cadeia livremente articulada em três dimensões e então incluiremos as demais características como a carga, o volume das espécies e demais

interações.

A energia livre total  $F_{tot}(\gamma, m_c, m_{CD})$ , à exemplo da Eq. 2.9, corresponde á soma das energias livres associadas á diversas contribuições:

$$F_{tot}(\gamma, m_c, m_{CD}) = F_{id}(\gamma, m_c, m_{CD}) + F_d(\gamma, m_c, m_{CD}) + F_{pc}(\gamma, m_c, m_{CD}) + F_{int}(\gamma, m_c, m_{CD}), \quad (4.1)$$

onde  $F_{int}$  contém os termos referentes à função de partição interna do complexo, formado pelo polieletrólito, moléculas de Ciclodextrina e contraíons:

$$F_{int} = F_{ent} + F_{ion} + F_{cs} + F_h, \quad (4.2)$$

Esta energia  $F_{tot}(\gamma, m_c, m_{CD})$  será definida em função de três parâmetros que determinam a conformação do complexo: o expoente  $\gamma$ , associado ao comprimento do polieletrólito, e as frações de contraíons  $m_c$  e moléculas de CD  $m_{CD}$  associadas ao complexo. Com o processo de minimização da energia livre  $F_{tot}(\gamma, m_c, m_{CD})$ ,

$$\left. \frac{\partial F_{tot}}{\partial \gamma} \right|_{\bar{\gamma}, \bar{m}_c, \bar{m}_{CD}} = \left. \frac{\partial F_{tot}}{\partial m_c} \right|_{\bar{\gamma}, \bar{m}_c, \bar{m}_{CD}} = \left. \frac{\partial F_{tot}}{\partial m_a} \right|_{\bar{\gamma}, \bar{m}_c, \bar{m}_{CD}} = 0, \quad (4.3)$$

serão determinados os valores de equilíbrio de  $\bar{\gamma}$ ,  $\bar{m}_c$  e  $\bar{m}_{CD}$ , para uma dada temperatura e concentração de sal. Estas serão as quantidades informativas sobre o estado do sistema.

Nesta abordagem, a cadeia polimérica é tratada como livremente articulada em três dimensões, nos moldes do caminho aleatório em que todas as direções são igualmente prováveis para um segmento do poliíon, de acordo com a teoria de Flory [2, 4], de onde obtem-se a energia livre elástica  $F_d$ . A energia livre eletrostática é descrita através de duas contribuições: a contribuição advinda da interação entre os sítios carregados do polieletrólito ( $F_{ion}$ ), puramente repulsiva, e a segunda proveniente da interação entre o polieletrólito e a solução ( $F_{pc}$ ), tratada com a teoria de Manning [1] para o fenômeno de



associação iônica em poliíons. Para este tratamento, a cadeia real é substituída por uma linha infinita de cargas com os segmentos de diferentes poliíons blindados uns dos outros. Surge, com a análise da integral de fase para esta contribuição, o parâmetro de carga  $\xi$  que leva à renormalização da carga do complexo a partir da condensação de microíons sobre o polieletrólito.

Uma das contribuições mais importantes advém da associação cooperativa entre as moléculas de Ciclodextrina ionizadas agregadas ao complexo, porque esta aumenta a associação das moléculas de CD quando comparada aos microíons, devido à hidrofobicidade das cavidades. Tratamos este fenômeno com base na teoria de van der Waals para esferas rígidas que interagem por um potencial atrativo de curto alcance [68]. Usualmente esta teoria é empregada para uma solução, entretanto, aqui, a utilizamos para estimar o termo hidrofóbico dentro do complexo polieletrólito-CD, resultando na energia livre hidrofóbica  $F_h$ . Obtemos ainda, a partir da mesma teoria, a energia livre de volume excluído  $F_{hc}$  para todas as partículas, bem como para as caudas das moléculas anfífilas associadas. Incluímos também uma energia livre de mistura  $F_{ent}$ , ou entrópica, referente aos distintos arranjos possíveis para as espécies condensadas no complexo. As expressões para as energias livres, bem como suas derivações, são apresentadas na sequência deste capítulo.

#### 4.3.1 A energia livre ideal ( $F_{id}$ )

A energia livre ideal  $F_{id}$ , a exemplo da Eq. 2.10, é dada por

$$\begin{aligned} \beta F_{id} = & N_p [\ln \rho_p \sigma^3 - 1] + N_+ [\ln \rho_+ \sigma^3 - 1] + N_- [\ln \rho_- \sigma^3 - 1] \\ & + N_{CD}^f [\ln \rho_{CD}^f \sigma^3 - 1], \end{aligned} \quad (4.4)$$

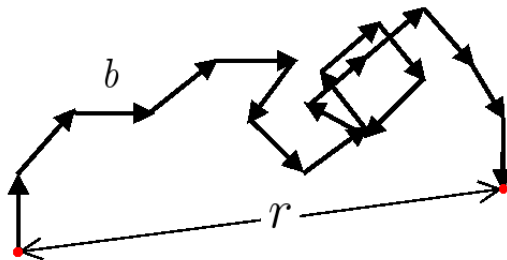
onde  $\sigma$  é o diâmetro dos sítios do polieletrólito e das partículas de sal e  $\sigma_{CD}$  é o diâmetro efetivo de uma molécula de Ciclodextrina. As quantidades  $N_p$ ,  $N_+$ ,  $N_-$  e  $N_{CD}^f$  referem-se aos números de poliíons, contraíons, coíons e moléculas de CD livres na solução, respectivamente.

### 4.3.2 A energia livre elástica ( $F_d$ )

Nesta seção apresentaremos uma revisão do tratamento dado a polímeros neutros, relativo à sua conformação espacial [2, 4]. É conveniente estabelecer a diferença fundamental entre *configuração* e *conformação* [40]: a configuração de uma espécie refere-se ao arranjo espacial de uma molécula, conferido pela presença de duplas ligações ou centros quirais. Assim, para variar a configuração de um grupo de moléculas, duplas ligações devem ser quebradas ou deve haver modificação dos centros quirais. Por sua vez, a conformação identifica o arranjo espacial de certos grupos que são livres para assumir diferentes posições, como as subunidades monoméricas de um polímero, por exemplo.

Polímeros e soluções de polímeros formam uma grande e importante classe da matéria condensada. Em geral, consistem em um conjunto de macromoléculas formadas de sucessivas unidades repetidas, os monômeros, e projetadas numa sequência colinear com grande versatilidade configuracional. Uma quase ilimitada variedade de estados são obtidos realizando-se rotações através das uniões dos monômeros, fazendo-se necessária uma abordagem estatística da distribuição de configurações para a análise das propriedades médias das moléculas.

Sejam consideradas  $N_p$  cadeias livremente articuladas no espaço, cada uma com  $Z$  segmentos de comprimento  $b$ , como na figura abaixo.



**Figura 4.4:** Representação de uma cadeia formada de sucessivas unidades de comprimento  $b$ .

Conhecido o número de configurações acessíveis a esta cadeia é possível obter a entropia e a energia livre de Helmholtz, ou energia livre de deformação elástica de Flory [2, 68],

$$\beta F_d = 3N_p \left[ \frac{1}{2}(\alpha^2 - 1) - \ln \alpha \right]. \quad (4.5)$$

A quantidade  $\alpha$  corresponde a deformação da cadeia,

$$\alpha = \frac{r}{r_0}, \quad (4.6)$$

onde  $r_0$  refere-se à cadeia no seu estado não-deformado e  $r$  é a distância entre as extremidades num instante arbitrário. Consideremos uma expressão genérica do tipo

$$r = b(Z - 1)^\gamma, \quad (4.7)$$

onde  $Z - 1$  representa a distância entre as extremidades de um polímero de  $n$  sítios de tamanho  $b$ , e  $\gamma$  é definido como o expoente de extensão da cadeia. Esta é uma expressão hipotética para a distância entre as extremidades da cadeia - para o caso de cadeias ideais,  $\gamma = 1/2$  e a Eq. 4.7 reduz-se basicamente ao cálculo do módulo do vetor deslocamento entre as extremidades. A relação entre a deformação da cadeia e o expoente de extensão  $\gamma$  pode ser obtida através da Eq. 4.6, considerando a razão entre as elongações de uma cadeia genérica e a cadeia ideal,

$$\alpha = Z^{\gamma-1/2}. \quad (4.8)$$

Retomando a Eq. 4.5 para a energia livre de deformação elástica, é possível mostrar que o estado de maior estabilidade implica em  $\alpha = 1$  (na ausência de deformação) e  $\gamma = \frac{1}{2}$  (o expoente para a cadeia ideal). Calculando  $\frac{\partial F_d}{\partial T}$ , obtemos o mínimo da função  $F_d$ ,

$$\frac{\partial F_d}{\partial T} = 3N_p k_B \left[ \frac{1}{2}(\alpha^2 - 1) - \ln \alpha \right] = 0. \quad (4.9)$$

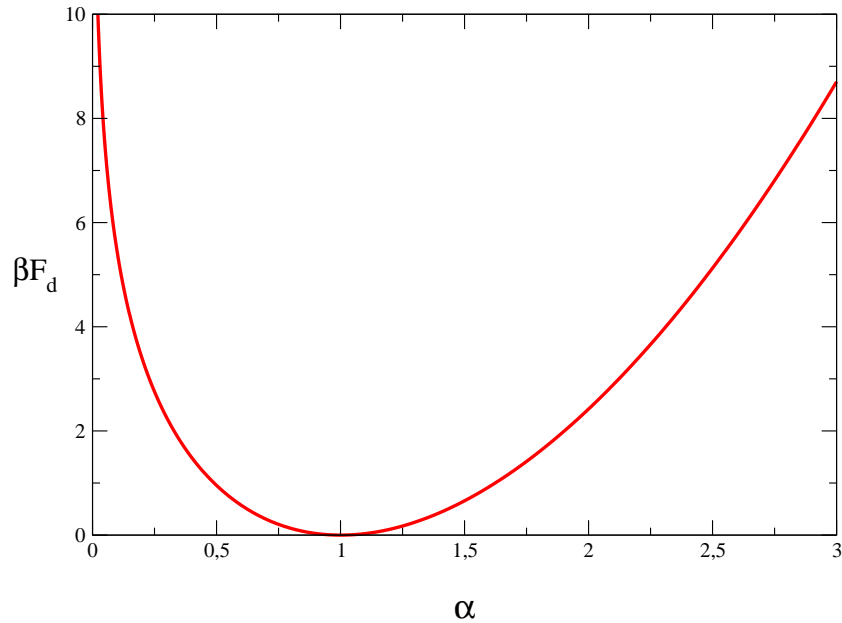
Para a validade da equação anterior é necessário que

$$\frac{1}{2}(\alpha^2 - 1) = \ln \alpha, \quad (4.10)$$

o que somente é verificado quando  $\alpha = 1$ . Assim, segundo a Eq. 4.8,

$$Z^{\gamma-1/2} = 1, \quad (4.11)$$

resultando em  $\gamma = \frac{1}{2}$  para quaisquer valores de  $Z$ . A Figura 4.5 ilustra o comportamento da energia livre de acordo com a deformação da cadeia, cujo mínimo é observado em  $\alpha = 1$  (estado não-deformado).



**Figura 4.5:** Comportamento da energia livre elástica em função da deformação da cadeia.

Esta descrição é válida apenas para cadeias ideais não carregadas. As subseções seguintes trazem a descrição das demais características deste sistema, como as interações de natureza eletrostática e o efeito de hidrofobicidade entre as moléculas de CD associados ao complexo, por exemplo.

### 4.3.3 Interação eletrostática entre poliões e microíons ( $F_{pc}$ )

Apresentamos, nesta seção, os efeitos da interação eletrostática entre poliões e microíons, a partir de uma aproximação realizada para sistemas de polieletrólitos flexíveis, baseada na teoria de condensação de Manning [1], apresentada em detalhes no Apêndice A.

A exemplo do apresentado na subseção 2.3.3, o tratamento para o cálculo da energia livre eletrostática é o mesmo a menos de uma importante consideração: da teoria de elasticidade de Flory, apresentada na seção 4.3.2, a quantidade  $r$  pode ser definida como  $r(x) = bx^\gamma$ , onde  $\gamma$  é o expoente de extensão da cadeia. Assim, retomando a Eq. 2.65,

$$\beta F_{pc} = \xi p^2 b \int_0^Z dx (Z - x) \frac{e^{-\kappa r(x)} - 1}{r(x)}. \quad (4.12)$$

tem-se que integral acima pode ser reescrita como segue,

$$\mathcal{I} = \int_0^Z dx Z \frac{e^{-\kappa r(x)}}{r(x)} - \int_0^Z dx x \frac{e^{-\kappa r(x)}}{r(x)} - \int_0^Z dx \frac{Z}{r(x)} + \int_0^Z dx \frac{x}{r(x)}. \quad (4.13)$$

Incluindo a nova variável  $g$  como  $g = kr = kbx^\gamma$ , temos que

$$x = \left( \frac{g}{kb} \right)^{\frac{1}{\gamma}}, \quad (4.14)$$

$$\frac{dx}{dg} = \frac{1}{\gamma (kb)^{\frac{1}{\gamma}}} g^{\frac{1}{\gamma}-1}. \quad (4.15)$$

Com as devidas substituições, obtemos

$$\begin{aligned} \mathcal{I} = & \frac{Z\kappa}{\gamma (kb)^{\frac{1}{\gamma}}} \int_0^{kbZ^\gamma} dg g^{-2+\frac{1}{\gamma}} e^{-g} + \frac{Z\kappa}{\gamma (kb)^{\frac{1}{\gamma}}} \int_0^{kbZ^\gamma} dg g^{-2+\frac{1}{\gamma}} \\ & + \frac{\kappa}{\gamma (kb)^{\frac{2}{\gamma}}} \int_0^{kbZ^\gamma} dg g^{-2+\frac{2}{\gamma}} e^{-g} + \frac{\kappa}{\gamma (kb)^{\frac{2}{\gamma}}} \int_0^{kbZ^\gamma} dg g^{-2+\frac{2}{\gamma}}. \end{aligned} \quad (4.16)$$

A segunda e a quarta integral presentes em (4.16) são solúveis exatamente. Para a primeira e a terceira integral, consideremos a função  $\gamma$  incompleta [85], definida por

$$\gamma_{inc}(\alpha, x) = \int_0^x dg e^{-g} g^{\alpha-1} \quad , \quad R_e \quad \alpha > 0, \quad (4.17)$$

de forma que  $\mathcal{I}$  resulta em

$$\mathcal{I} = \frac{Z^{2-\gamma}}{b(1-\gamma)} + \gamma_{inc}\left(-1 + \frac{1}{\gamma}, kbZ^\gamma\right) + \frac{Z^{2-\gamma}}{(2-\gamma)b} + \gamma_{inc}\left(-1 + \frac{2}{\gamma}, kbZ^\gamma\right). \quad (4.18)$$

Assim, a energia livre eletrostática, considerando a flexibilidade das moléculas, para  $N_p$  polieletrólitos terá a forma abaixo,

$$\beta F_{pc} = N_p \xi p^2 b \mathcal{I}. \quad (4.19)$$

Considerando que a quantidade  $b$  é equivalente a dimensão  $\sigma$  de cada sítio, de valência  $p$  unitária, e a definição do parâmetro de carga em termos do comprimento de Bjerrum  $\lambda_B$ ,

$$\xi = \frac{\lambda_B}{\sigma}, \quad (4.20)$$

a equação anterior pode ser escrita como segue,

$$\beta F_{pc} = N_p \lambda_B \mathcal{I}. \quad (4.21)$$

Esta é uma expressão aproximada para a energia livre de interação eletrostática entre os polieletrólitos e os microíons em solução, dependente da fração de íons associados e também do expoente de extensão  $\gamma$ , presente na integral representada por  $\mathcal{I}$ .

#### 4.3.4 A energia livre interna ( $F_{int}$ )

Nas subseções anteriores descrevemos as interações entre o polieletrólito, com a associação de sal ou moléculas de CD, e a solução através das contribuições entrópica e

eletrostática. Nesta subsecção descreveremos as interações relevantes para a formação do complexo DNA-sal-CD, representadas pela soma abaixo,

$$F_{int} = F_{ent} + F_{ion} + F_{cs} + F_h, \quad (4.22)$$

em que  $F_{ent}$  corresponde à energia livre entrópica, associada aos distintos arranjos possíveis para o complexo,  $F_{ion}$  é a energia livre de repulsão iônica entre os sítios carregados do polieletrólito,  $F_{cs}$  é a contribuição de volume excluído e  $F_h$  refere-se à interação hidrofóbica entre as moléculas de CD agregadas ao complexo e  $F_{cs}$  é a contribuição de volume excluído, apresentadas em detalhe na sequência.

Será incorporada uma das contribuições mais importantes para a transição conformacional observada experimentalmente, que é a interação hidrofóbica entre as moléculas de CD associadas ao complexo. Como forma de reduzir o gasto entrópico associado à sua posição espacial, estas moléculas mantêm-se próximas, de forma a proteger as suas cavidades hidrofóbicas do contato com a solução aquosa; este comportamento determina fortemente o colapso do complexo. A atração entre as moléculas de CD será representada de acordo com a teoria de van der Waals para energias de curto alcance [68].

#### 4.3.4.1 A energia livre entrópica ( $F_{ent}$ )

A energia entrópica  $F_{ent}$  é a mesma apresentada previamente na Eq. 2.20,

$$\begin{aligned} \beta F_{ent} = N_p Z [ & m_{CD} \ln m_{CD} + m_c \ln m_c \\ & + (1 - m_{CD} - m_c) \ln(1 - m_{CD} - m_c) ], \end{aligned} \quad (4.23)$$

onde  $m_c$  e  $m_{CD}$  são as frações de contraíons e de moléculas de Ciclodextrina associadas ao políon, respectivamente.

#### 4.3.4.2 A energia livre iônica ( $F_{ion}$ )

A energia livre iônica, relativa à repulsão entre os  $Z$  sítios carregados do complexo, é obtida de forma semelhante à apresentada na subseção 2.3.2.2,

$$U = \frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^Z \frac{q_i q_j}{D r_{ij}}, \quad (4.24)$$

em que a única diferença será a descrição da distância entre dois sítios consecutivos do complexo em termos do expoente de extensão  $\gamma$ , incluindo a flexibilidade da cadeia,

$$r_{ij} = \sigma |i - j|^\gamma. \quad (4.25)$$

Desta forma, aplicando o mesmo método apresentado na subseção 2.3.2.2, as funções  $f(|i - j|)$  e  $f(|i|)$  tem as formas

$$f(|i - j|) = (|i - j|^\gamma)^{-1}, \quad (4.26)$$

e

$$f(i) = (i^\gamma)^{-1}. \quad (4.27)$$

Assim, a Eq. 2.26 resulta em

$$\frac{1}{2} \sum_{i,j=1}^Z \frac{1}{|i - j|^\gamma} = \sum_{i=1}^{Z-1} \frac{Z - i}{i^\gamma}. \quad (4.28)$$

Aproximando o somatório em uma integral através da soma de Euler, escrevemos

$$S = \sum_{i=1}^{Z-1} f(i) \cong \int_1^{Z-1} dx F(x) + \frac{1}{2}F(1) - \frac{1}{12}F'(1) + \frac{1}{720}F^{(3)}(1). \quad (4.29)$$

Com base na nova função  $f(i)$ ,  $F(x)$  deve ter a seguinte forma,



$$F(x) = \frac{Z - x}{x^\gamma}. \quad (4.30)$$

Assim, a integral em (4.29) tem a forma e resultado apresentados abaixo,

$$\int_1^{Z-1} \frac{Z - x}{x^\gamma} dx = \frac{Z}{1 - \gamma} [(Z - 1)^{1-\gamma} - 1] - \frac{1}{2 - \gamma} [(Z - 1)^{2-\gamma} - 1]. \quad (4.31)$$

As funções  $F'(x)$  e  $F^{(3)}(x)$  resultam em

$$F'(x) = -\gamma (Z - x) x^{-(\gamma+1)} - x^{-\gamma}, \quad (4.32)$$

$$F^{(3)}(x) = -\gamma (Z - x) x^{-(\gamma+1)} - x^{-\gamma}, \quad (4.33)$$

e, portanto, para  $x = 1$ ,

$$F(1) = Z - 1, \quad (4.34)$$

$$F'(1) = \gamma - 1 - Z\gamma, \quad (4.35)$$

$$F^{(3)}(1) = \gamma(\gamma + 1) [\gamma - 1 - Z(\gamma + 2)]. \quad (4.36)$$

Com as Eq. 4.31, 4.34, 4.35 e 4.36, a soma  $S$  na Eq. 4.29 resulta em

$$\begin{aligned} S &= \frac{Z}{1 - \gamma} [(Z - 1)^{1-\gamma} - 1] - \frac{1}{2 - \gamma} [(Z - 1)^{2-\gamma} - 1] \\ &+ \frac{1}{2} (Z - 1) - \frac{1}{12} (\gamma - 1 - Z\gamma) \\ &+ \frac{1}{720} \gamma(\gamma + 1) [\gamma - 1 - Z(\gamma + 2)]. \end{aligned} \quad (4.37)$$

Substituindo  $Z - 1$  por  $Z$ ,

$$\begin{aligned} S &= \frac{Z}{1 - \gamma} [(Z)^{1-\gamma} - 1] - \frac{1}{2 - \gamma} [(Z)^{2-\gamma} - 1] \\ &+ \frac{1}{2} Z - \frac{1}{12} (\gamma - 1 - Z\gamma) \\ &+ \frac{1}{720} \gamma(\gamma + 1) [\gamma - 1 - Z(\gamma + 2)]. \end{aligned} \quad (4.38)$$

Reunindo as Eq. 2.25, 2.26 e 4.28, obtemos que

$$U = \frac{(pq)^2}{D\sigma} S, \quad (4.39)$$

e, portanto, que

$$\begin{aligned} U = \frac{(pq)^2}{D\sigma} & \left\{ \frac{Z}{1-\gamma} [(Z)^{1-\gamma} - 1] - \frac{1}{2-\gamma} [(Z^{2-\gamma}) - 1] \right. \\ & + \frac{1}{2} Z - \frac{1}{12} (\gamma - 1 - Z\gamma) \\ & \left. + \frac{1}{720} \gamma(\gamma + 1) [\gamma - 1 - Z(\gamma + 2)] \right\}. \end{aligned} \quad (4.40)$$

Assim, a energia livre eletrostática, ou iônica, em 4.40, considerando  $N_p$  polieletrólitos, assume a forma abaixo,

$$\begin{aligned} F_{ion} = N_p p^2 \frac{\lambda_B}{\sigma} & \left\{ \frac{Z}{1-\gamma} [(Z)^{1-\gamma} - 1] - \frac{1}{2-\gamma} [(Z^{2-\gamma}) - 1] \right. \\ & + \frac{1}{2} Z - \frac{1}{12} (\gamma - 1 - Z\gamma) \\ & \left. + \frac{1}{720} \gamma(\gamma + 1) [\gamma - 1 - Z(\gamma + 2)] \right\}, \end{aligned} \quad (4.41)$$

onde  $\lambda_B$  é o comprimento de Bjerrum. A contribuição eletrostática para a conformação do complexo reflete-se grandemente na determinação de uma estrutura linear, por conta da repulsão coulombiana entre os seus sítios carregados.

#### 4.3.4.3 A energia livre de volume excluído para esferas rígidas ( $F_{cs}$ )

Uma das correções mais importantes associadas ao modelo DNA-CD advêm do tamanho da molécula de Ciclodextrina em relação ao tamanho das demais espécies. A estrutura de uma molécula de Ciclodextrina, apresentada na Figura 4.2(a), é aproximadamente a de um cilindro com uma base de diâmetro de  $15\text{\AA}$  e altura de  $8\text{\AA}$ , o que a configura uma molécula de maior porte se comparada a um único sítio de uma cadeia de DNA,

com aproximadamente  $3\text{\AA}$  de diâmetro. Acreditamos que o efeito desta disparidade de volume entre as espécies associadas é de grande importância para o efeito na conformação e elasticidade do complexo formado com o DNA. Assim, toda molécula de CD associada, com diâmetro efetivo<sup>2</sup>  $\sigma_{\text{CD}} = 13,9245\text{\AA}$ , deve alterar diretamente o volume do complexo DNA-CD. Para tal descrição, o volume de uma esfera que contém o polieletrólito, representado na fig. 4.2(c), e as espécies associadas será definido como:

$$V'_{esf} = \frac{4}{3} \pi r_{ef}^3 = \frac{4}{3} \pi r^3 + \frac{4}{3} \pi m_c \sigma^3 + \frac{4}{3} \pi m_{\text{CD}} \sigma_{\text{CD}}^3, \quad (4.42)$$

onde  $r_{ef}$  corresponde ao raio efetivo de um esfera que contém o complexo. O primeiro termo na soma representa o volume de uma esfera de raio  $r$ , definido na Eq. 4.7, que contém apenas o polieletrólito; se  $m_c$  e  $m_{\text{CD}}$  são definidas como as frações de sal e CD associadas, respectivamente, os segundo e terceiro termos, nesta aproximação, correspondem ao volume destas quantidades agregadas ao polieletrólito.

A energia livre de volume excluído é associada a impossibilidade de duas ou mais espécies em solução ocuparem a mesma posição no espaço. O trabalho de Carnahan e Starling para o tratamento de fluidos densos [86] é derivado originalmente da observação de que valores numéricos dos coeficientes de virial poderiam ser aproximados e, através de um ajuste, resultar numa expressão algébrica simplificada para a equação de estado para um sistema de partículas semelhante ao sistema que estudamos.

Para um sistema de esferas rígidas não atrativas, consideremos a seguinte equação de estado, na forma de uma série de potências,

$$Z = 1 + 4y + 10y^2 + 18y^3 + 28y^4 + 40y^5, \quad (4.43)$$

em que a quantidade  $y$  é a fração de empacotamento para uma única espécie, e é definida como

---

<sup>2</sup>Este é o valor correspondente ao raio de uma esfera de volume equivalente ao de uma molécula de Ciclodextrina, considerando-a aproximadamente como um cilindro.

$$y = \frac{\pi \sigma^3}{6} \rho, \quad (4.44)$$

onde  $\sigma$  representa o diâmetro de cada esfera rígida e  $\rho$  a densidade desta espécie. Os coeficientes da Eq. 4.43 podem ser calculados a partir da relação abaixo,

$$B_n = (n^2 + n - 2) \quad , \quad n \geq 2, \quad (4.45)$$

de forma que a Eq. 4.43 pode ser expressa na seguinte forma:

$$Z = \frac{pV}{Nk_B T} = 1 + \sum_{n=2}^{\infty} (n^2 + n - 2) y^{n-1}, \quad (4.46)$$

equivalente a

$$Z = \frac{pV}{Nk_B T} = 1 + \sum_{n=0}^{\infty} (n^2 + 3n) y^n. \quad (4.47)$$

com a variação do limite inferior na soma.

Para o tratamento da Eq.4.47, consideremos uma função  $S$  na seguinte forma,

$$S \equiv \sum_{n=0}^{\infty} y^n, \quad (4.48)$$

de maneira que

$$S' = \sum_{n=0}^{\infty} n y^{n-1}, \quad (4.49)$$

$$S'' = \sum_{n=0}^{\infty} n(n-1) y^{n-2}. \quad (4.50)$$

Multiplicando a Eq. 4.49 pela quantidade  $3y$ , obtemos

$$3y S' = \sum_{n=0}^{\infty} 3n y^{n-1}, \quad (4.51)$$

e multiplicando a Eq. 4.50 pela quantidade  $y^2$  temos que

$$y^2 S'' = \sum_{n=0}^{\infty} n^2 y^n - \sum_{n=0}^{\infty} n y^n, \quad (4.52)$$

que recai em

$$\begin{aligned} y^2 S'' &= \sum_{n=0}^{\infty} n^2 y^n - y S', \\ y^2 S'' + y S' &= \sum_{n=0}^{\infty} n^2 y^n. \end{aligned} \quad (4.53)$$

Com as Eqs. 4.51 e 4.53 em (4.47), obtemos a equação abaixo,

$$Z = 1 + y^2 S'' + 4y S'. \quad (4.54)$$

Usando que

$$\sum_{k=1}^n a q^{k-1} = \frac{a(q^n - 1)}{q - 1}, \quad q \neq 1, \quad (4.55)$$

temos que

$$\sum_{k=1}^n a q^{k-1} = \frac{a}{1 - q}, \quad (4.56)$$

para  $q < 1$  e  $n \rightarrow \infty$ . Assim, se  $S$  pode ser aproximado como

$$S = \frac{1}{1 - y}, \quad (4.57)$$

obtemos que

$$S' = \frac{1}{(1 - y)^2}, \quad (4.58)$$

e que

$$S'' = \frac{2}{(1-y)^3}, \quad (4.59)$$

permitindo que a Eq. 4.54 pode ser escrita na forma abaixo,

$$Z = 1 + \frac{y(4-2y)}{(1-y)^3}. \quad (4.60)$$

Para o caso ideal  $Z = 1$ , de forma que o segundo termo à direita da igualdade na Eq. 4.60 está associado especificamente ao tratamento de esferas rígidas. A pressão correspondente a este termo pode ser obtida a partir de

$$\frac{pV}{N k_B T} = \frac{y(4-2y)}{(1-y)^3}, \quad (4.61)$$

resultando em

$$p_{cs} = k_B T \rho \frac{y(4-2y)}{(1-y)^3}. \quad (4.62)$$

De acordo com a definição da fração de empacotamento em 4.44, temos que  $\rho = \frac{6y}{\pi\sigma^3}$ , assim, a Eq. 4.62 pode ser escrita como

$$p_{cs} = 6 \frac{k_B T}{\pi \sigma^3} \frac{y^2(4-2y)}{(1-y)^3}. \quad (4.63)$$

Definindo a quantidade  $a \equiv \frac{\pi\sigma^3}{6}$ , temos, por consequência, que

$$y = \frac{Na}{V}, \quad (4.64)$$

e, portanto, a Eq. 4.63 toma a seguinte forma,

$$\beta p_{cs} = N^2 a \frac{4V - 2Na}{(V - Na)^3}. \quad (4.65)$$

A energia livre referente ao tratamento de esferas rígidas pode ser obtida a partir de

$$p = - \left. \frac{\partial F}{\partial V} \right|_{T,N}, \quad (4.66)$$

Faz-se, portanto, o cálculo da seguinte integral,

$$\beta p_{cs} = -4N^2 a \int \frac{V dV}{(V - Na)^3} + \int \frac{2N^3 a^2 dV}{(V - Na)^3}. \quad (4.67)$$

A primeira integral à direita da igualdade na Eq.4.67 tem solução do tipo

$$\int \frac{V dV}{(V - Na)^3} = \frac{Na - 2V}{2(V - Na)^2}, \quad (4.68)$$

e a segunda integral resulta em

$$\int \frac{dV}{(V - Na)^3} = -\frac{1}{2(V - Na)^2}. \quad (4.69)$$

Assim, a energia livre correspondente será dada por

$$\beta F = \frac{N^2 a}{V} \frac{4 - 3(Na)/V}{(1 - (Na)/V)^2}. \quad (4.70)$$

Por fim, com a definição de  $y$  em 4.64, a Eq. 4.70 pode ser escrita como

$$\beta F_{cs} = N y \frac{4 - 3y}{(1 - y)^2}. \quad (4.71)$$

Para o sistema em estudo, considerando os  $Z$  sítios do polieletrólito, os microíons e moléculas de CD, a energia livre de volume excluído terá a forma abaixo,

$$\beta F_{cs} = (N_Z + N_c + N_{CD}) g(y), \quad (4.72)$$

onde os termos  $N_Z$ ,  $N_c$  e  $N_{CD}$  representam as diferentes espécies que formam o complexo -  $N_Z$  é o número de sítios do polieletrólito e  $N_c$  e  $N_{CD}$  designam os números de contraíons e de moléculas de CD associadas, respectivamente; a função  $g(y)$  tem a seguinte forma:

$$g(y) = y \frac{(4 - 3y)}{(1 - y)^2}, \quad (4.73)$$

onde  $y$ , a fração de empacotamento, é definida em termos das densidades das espécies associadas,

$$y = \frac{\pi}{6} \frac{(N_Z + N_c)\sigma^3 + N_{CD}\sigma_{CD}^3}{V}, \quad (4.74)$$

em que  $\sigma$  é o diâmetro de um sítio do poliíon e das partículas de sal e  $\sigma_{CD}$  é diâmetro efetivo de uma molécula de Ciclodextrina.  $V$  corresponde ao volume ocupado por todas as espécies no sistema, obtido a partir da Eq. 4.42 quando  $m_c = m_{CD} = 1$ .

#### 4.3.4.4 A energia livre hidrofóbica ( $F_h$ )

Uma das contribuições mais importantes para o nosso sistema advém da associação cooperativa entre as moléculas de Ciclodextrina associadas ao polieletrólito. Esta interação atrativa aumenta a associação de CD ao poliíon, comparada à proporção de íons associados, devido à hidrofobicidade das cavidades.

Trataremos este fenômeno com base na teoria de van der Waals [68] para esferas rígidas que interagem por um potencial atrativo de curto alcance. Deve ser esclarecido que esta teoria será empregada para estimar o termo hidrofóbico dentro do complexo DNA-CD e incluiremos um potencial do tipo poço quadrado para representar a interação entre as moléculas de CD associadas.



Na sequência, apresentamos o potencial arbitrário  $\varepsilon$  para a intensidade da interação hidrofóbica dentro do complexo. Os cálculos que levam à equação de estado de van der Waals são apresentados para este novo potencial, resultando na nossa proposta de energia livre hidrofóbica para o sistema em estudo.

### O potencial poço quadrado

Uma vez que a interação hidrofóbica é tipicamente de curto alcance, o potencial tipo poço quadrado é uma escolha razoável para a representação da interação atrativa. Consideremos o potencial definido como

$$u = \begin{cases} +\infty & , & r < \sigma_{ef} \\ -\varepsilon & , & \sigma_{ef} < r < \lambda \sigma_{ef} \\ 0 & , & r > \lambda \sigma_{ef} \end{cases}$$

onde  $\sigma_{ef}$  corresponde ao diâmetro efetivo de uma esfera com o mesmo volume da molécula de CD,  $\varepsilon$  representa a intensidade da interação hidrofóbica, ou a profundidade do poço, e  $\lambda$  o seu alcance - fixado em 1.5 [72], que é referente à largura do poço quadrado. Assim, se

$$u(r) = -\varepsilon(\sigma_{ef} \rightarrow \lambda \sigma_{ef}), \quad (4.75)$$

a energia potencial  $\varphi$  neste intervalo pode ser escrita como

$$\varphi(r) = -\frac{4\pi N}{3 V} |\varepsilon| \sigma_{ef}^3 (\lambda^3 - 1), \quad (4.76)$$

onde  $N$  é o número de moléculas anfífilicas associadas e  $V$  o volume de uma esfera que contém o complexo. Por definição, a energia livre de Helmholtz  $F$ , para um sistema de  $N$  partículas em um volume  $V$ , é obtida de

$$F(N, V, T) = -k_B T \ln Q(N, V, T), \quad (4.77)$$

onde  $Q$  é a função de partição canônica dada por

$$Q = \frac{q_1^N}{N!}, \quad (4.78)$$

para um sistema sobre o qual não agem forças externas. A função de partição de partícula única, que se move num volume  $V$ , tem a forma

$$q_1 = \frac{V}{\Lambda^3}, \quad (4.79)$$

onde  $\Lambda$  é o comprimento de onda térmico de de Broglie, definido como

$$\Lambda = \frac{h}{\sqrt{2\pi m k_B T}}, \quad (4.80)$$

sendo  $h = 6.63 \times 10^{-34}$  J·s a constante de Planck e  $m$  a massa das moléculas.

Devem ser consideradas algumas correções na função de partição canônica  $q_1$ , dada a independência das moléculas:

- O volume disponível para cada molécula será denominado volume livre, e será representado por  $V_f$ ,

$$V_f = V - N\bar{\sigma}^3, \quad (4.81)$$

definido como a diferença entre o volume disponível e o volume ocupado por  $N$  moléculas esféricas de volume  $\bar{\sigma}^3$ . Esta aproximação para o volume livre é válida para baixas densidades e é importante porque evita a sobreposição de partículas no sistema.

- Incluiremos o potencial intermolecular que age sobre uma dada molécula em movimento;  $\varphi(N/V)$  será a energia potencial de interação entre qualquer molécula e todas as demais.

Assim, considerando a função de partição de partícula única dependente do potencial  $\varphi$ , a energia livre de Helmholtz terá a forma abaixo,

$$\beta f = N \ln [\rho \Lambda^3] - N \ln [1 - \bar{\sigma}^3 \rho] + \frac{N \varphi(r)}{2k_B T} - N. \quad (4.82)$$

onde  $\varphi(r)$  é definido na Eq. 4.76. A energia livre de interação hidrofóbica é descrita pelo termo da Eq. 4.82 que envolve esta energia potencial,

$$\beta f_h = \frac{N \varphi}{2k_B T}. \quad (4.83)$$

Com a expressão para  $\varphi$ , definida em 4.76, a equação anterior é escrita como

$$\beta f_h = \beta \frac{n_a}{2} \left[ -\frac{4\pi}{3} \frac{N}{V} |\varepsilon| \sigma_{ef}^3 (\lambda^3 - 1) \right]. \quad (4.84)$$

onde  $\lambda$  é o alcance da interação hidrofóbica e  $n_{CD}$  é o número de moléculas de Ciclodextrina no sistema. Reorganizando a equação anterior, obtemos

$$\beta f_h = -\beta \varepsilon n_a^2 \frac{2\pi}{3} (\lambda^3 - 1) \frac{\sigma_{ef}^3}{V_{esf}}, \quad (4.85)$$

onde volume  $V_{esf}$  é o volume da esfera que contém o polieletrólito e  $\sigma_{ef}$  corresponde ao diâmetro efetivo da molécula de CD. Considerando  $N_p$  polieletrólitos, a Eq. 4.85 resulta em

$$\beta F_h = -N_p \beta \varepsilon (Z m_{CD})^2 \frac{2\pi}{3} (\lambda^3 - 1) \frac{\sigma_{CD}^3}{V_{esf}}. \quad (4.86)$$

Existe uma grande dificuldade associada à representação do efeito hidrofóbico a partir de uma modelagem simples, uma vez que esta interação é fortemente dependente da água que não é explicitamente incluída neste modelo. No tratamento que propomos, a interação hidrofóbica é representada pelo parâmetro  $\varepsilon$ , associado à intensidade do efeito. Este será o nosso parâmetro de ajuste para a comparação com resultados experimentais para sistemas deste tipo. Uma outra possibilidade consiste em fixar a intensidade da interação e variar o seu alcance  $\lambda$ , que passa a ser tratado como o novo parâmetro de ajuste.

Como mencionado anteriormente, este efeito é um dos mais importantes na descrição do fenômeno de transição conformacional do complexo formado pelo poliíon, moléculas de CD e contraíons. Enquanto a associação de contraíons no complexo é capaz, apenas, de neutralizar a valência dos seus sítios, resultando numa menor ou maior extensão da cadeia, a interação atrativa entre as cavidades das moléculas determina fortemente a conformação, sobretudo o colapso do complexo.

## 4.4 Resultados

O estado de equilíbrio deste sistema, composto por moléculas de DNA e Ciclodextrina em solução salina, é obtido minimizando a energia livre apresentada na Eq. 5.1 em relação a três parâmetros que determinam fortemente a configuração do sistema,  $\gamma$ ,  $m_c$  e  $m_{CD}$ , conforme estabelecido pela Eq. 4.3,

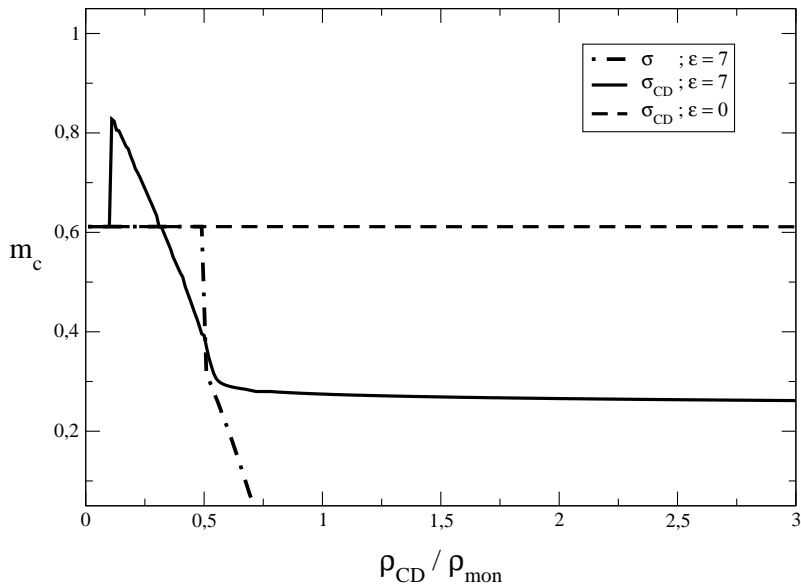
$$\left. \frac{\partial F_{tot}}{\partial \gamma} \right|_{\bar{\gamma}, \bar{m}_c, \bar{m}_{CD}} = \left. \frac{\partial F_{tot}}{\partial m_c} \right|_{\bar{\gamma}, \bar{m}_c, \bar{m}_{CD}} = \left. \frac{\partial F_{tot}}{\partial m_a} \right|_{\bar{\gamma}, \bar{m}_c, \bar{m}_{CD}} = 0, \quad (4.87)$$

As Figuras 4.6 e 4.7 apresentam o comportamento das frações de sal e moléculas de Ciclodextrina associadas ao complexo em três casos distintos. No primeiro caso, ilustrado pela linha ponto-tracejada, a molécula de Ciclodextrina tem o mesmo tamanho das moléculas de sal e a energia de interação  $\varepsilon$  com a cadeia de DNA, (ver Eq. 4.86), tem o valor de  $7K_B T$ . No segundo caso (linha tracejada), a molécula de CD tem tamanho maior que as partículas de sal ( $\sigma_{CD} = 4,64\sigma$ ) e não há interação hidrofóbica, restando apenas a contribuição elet-

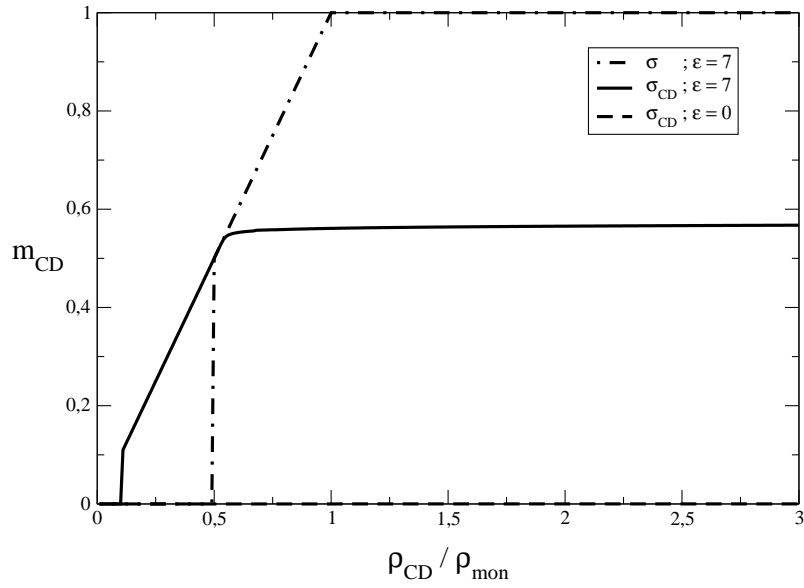
rostática para a associação, como no caso do sal. A descrição mais realista é representada pela linha cheia e corresponde ao caso da associação de moléculas de CD com seu tamanho real. Acreditamos que o inesperado aumento de  $m_c$ , apresentado na Figura 4.6, observado para  $\frac{\rho_{CD}}{\rho_{mon}}$  aproximadamente igual a 0,1 é resultado do acréscimo de sal à solução por conta da dissociação de sal advinda da inclusão de Ciclodextrina ao sistema.

O fato de que o limite de  $m_{CD}$  não é maior que 60%, como mostra a Figura 4.7, é consequência da dimensão da molécula de Ciclodextrina, uma vez que se considerarmos uma molécula de CD hipotética com dimensão inferior, como mostra a curva ponto-e-traço, a fração de associação pode chegar a 1, que corresponde 100% de cobertura do poliión.

Em ambos os gráficos, incluímos o caso em que a interação hidrofóbica é desprezada ( $\varepsilon = 0$ ), que resulta na não associação de moléculas de CD como indicam as linhas tracejadas.

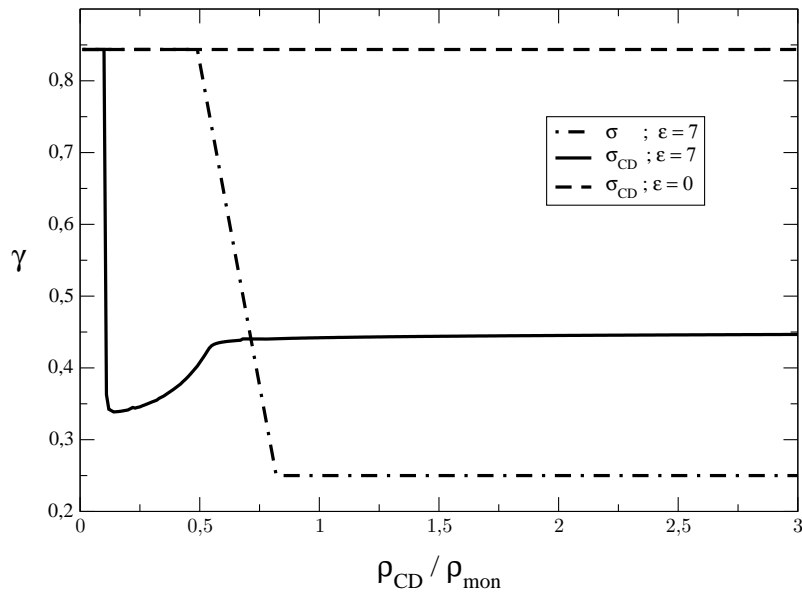


**Figura 4.6:** Fração de contraíons associados ao complexo como função da concentração de Ciclodextrina catiônica, para  $\rho_{mon} = 22\mu M$ ,  $Z = 200$ ,  $T = 25^\circ C$ . A linha ponto-tracejada representa o caso em que a molécula de CD tem, hipoteticamente, as mesmas dimensões de um sítio de DNA ( $\sigma = 3\text{\AA}$ ), com  $\varepsilon = 7$ ; a linha cheia corresponde ao tratamento da molécula de CD com seu tamanho real ( $\sigma_{CD} \simeq 4,64\sigma$ ) com  $\varepsilon = 7$ ; a linha tracejada ilustra o caso em que a interação hidrofóbica é desprezada ( $\varepsilon = 0$ ), com  $\sigma_{CD} \simeq 4,64\sigma$ .



**Figura 4.7:** Fração de moléculas de Ciclodextrina associadas ao complexo como função da concentração de Ciclodextrina catiônica, para  $\rho_{mon} = 22\mu M$ ,  $Z = 200$ ,  $T = 25^\circ C$ . A linha ponto-tracejada representa o caso em que a molécula de CD tem, hipoteticamente, as mesmas dimensões de um sítio de DNA ( $\sigma = 3\text{\AA}$ ), com  $\epsilon = 7$ ; a linha cheia corresponde ao tratamento da molécula de CD com seu tamanho real ( $\sigma_{CD} \simeq 4,64\sigma$ ) com  $\epsilon = 7$ ; a linha tracejada ilustra o caso em que a interação hidrofóbica é desprezada ( $\epsilon = 0$ ), com  $\sigma_{CD} \simeq 4,64\sigma$ .

Com o aumento da densidade de moléculas de Ciclodextrina na solução, verifica-se a variação conformacional do complexo, com exceção do caso em que a interação hidrofóbica é anulada, como ilustra a Figura 4.8. Vemos que a crescente associação de moléculas de CD provoca, neste modelo, além de um decréscimo abrupto de  $\gamma$ , também o seu crescimento. Ainda que esta primeira aproximação não represente numericamente os resultados experimentais, ela é capaz de reproduzir, ainda que qualitativamente, os efeitos da disparidade de volume entre as espécies do sistema. Para corroborar este resultado, consideremos a mesma modelagem para uma molécula de CD hipotética com dimensões reduzidas à do tamanho de um único sítio do polióion. Como mostra a curva ponto-tracejada na Figura 4.8, não verifica-se a distensão do polieletrólito, mesmo na menor escala.



**Figura 4.8:** Transição conformacional medida a partir do expoente  $\gamma$  como função da concentração de Ciclodextrina catiônica, para  $\rho_{mon} = 22\mu M$ ,  $Z = 200$ ,  $T = 25^\circ C$ . A linha ponto-tracejada representa o caso em que a molécula de CD tem, hipoteticamente, as mesmas dimensões de um sítio de DNA ( $\sigma = 3\text{\AA}$ ), com  $\varepsilon = 7$ ; a linha cheia corresponde ao tratamento da molécula de CD com seu tamanho real ( $\sigma_{CD} \simeq 4,64\sigma$ ) com  $\varepsilon = 7$ ; a linha tracejada ilustra o caso em que a interação hidrofóbica é desprezada ( $\varepsilon = 0$ ), com  $\sigma_{CD} \simeq 4,64\sigma$ .

Este resultado sugere que a intensa distensão, observada experimentalmente [34] e apre-

sentada na Figura 4.3, tenha forte correlação com o volume das moléculas de Ciclodextrina. Nosso modelo não recupera o rompimento da dupla hélice apresentado pelo resultado experimental [37] visto que não incluímos um termo que descreva as ligações de Hidrogênio entre fitas simples para obter este efeito.

## 4.5 Resumo

Neste capítulo apresentamos um modelo para a associação de moléculas de Ciclodextrina ao DNA. Para pequenas concentrações de Ciclodextrina mostramos que a cadeia de DNA inicialmente se compacta. Com a elevação da concentração de moléculas de CD observamos o aumento do comprimento de persistência do DNA como resultado da competição entre as contribuições de volume, eletrostática e da hidrofobicidade. Os resultados relativos a este modelo estão sendo otimizados e serão incluídos em um artigo em fase de redação.



## Capítulo 5

# O efeito de associação de moléculas intercalantes ao DNA

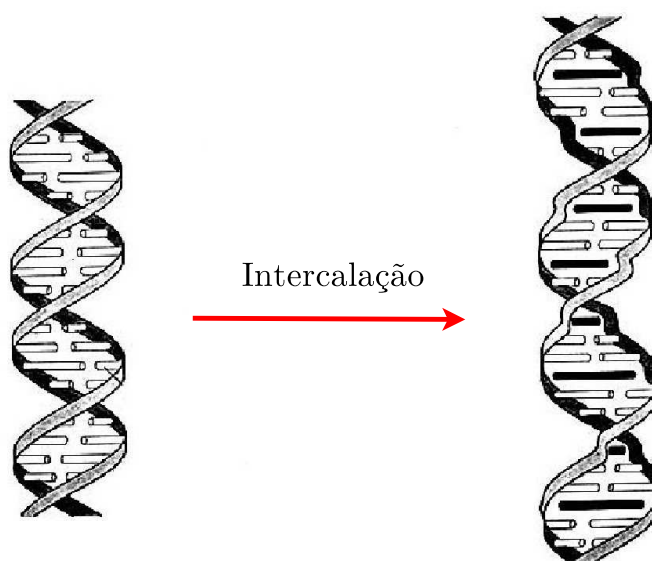
Na investigação de resultados experimentais para a análise da conformação de polieletrólitos, observamos que em diversos procedimentos experimentais faz-se uso de agentes auxiliares no mapeamento do sistema em estudo. Como exemplo, tem-se os marcadores fluorescentes, utilizados em eletroforese, como a Daunomicina e o Brometo de Etídio, agentes intercalantes que alteram propriedades físicas no processo de associação ao DNA. Acreditamos que as consequências provocadas pelo uso destes agentes na obtenção de resultados experimentais têm extrema relevância na construção de curvas de associação, e que seu efeito não deve ser desprezado. Neste capítulo, apresentamos nossa análise sobre o efeito da associação de moléculas intercalantes em DNA que, além de reduzir a valência do poliíon ao qual se associa, é capaz de alterar outras características físicas como a sua dimensão e o comprimento de persistência.

### 5.1 Efeitos de intercalação da molécula de DNA por um fármaco

Para identificar e visualizar cadeias de DNA em eletroforese e outros métodos de separação de ácidos nucleicos é necessário o uso de marcadores fluorescentes [87]. A associação deste marcador, bem como a sua dissociação, é capaz de informar sobre a natureza e quantidade de espécies agregadas ao polieletrólito. Esta técnica foi empregada na análise da

interação entre moléculas de Ciclodextrina e DNA (comunicação privada), e traz à tona o interesse na investigação dos efeitos de sua associação.

O fenômeno de intercalação é apenas uma das formas de ação de um fármaco sobre uma molécula de DNA, observada para espécies como a Daunomicina e o Brometo de Etídio (EtBr) [88, 89]. É caracterizado pelo empilhamento das moléculas do fármaco entre pares de base adjacentes da cadeia, como ilustrado na Figura 5.1.



**Figura 5.1:** Representação do mecanismo de intercalação. O processo de associação de moléculas intercalantes, e conseqüente afastamento dos pares de base, provoca um aumento no comprimento de contorno do DNA. Imagem adaptada [55].

Por conta da intercalação e conseqüente afastamento entre os pares de base da molécula de DNA, uma das principais alterações físicas provocadas é o aumento mecânico do seu comprimento de contorno<sup>1</sup>  $l_c$ ; este ocorre, de forma geral, simultaneamente a um giro da molécula de DNA em torno do seu próprio eixo, no sentido de desenrolar a dupla hélice [55, 90, 91].

Com o objetivo de compreender fisicamente este efeito de intercalação, realizamos algu-

---

<sup>1</sup>Distância entre as extremidades da cadeia estendida.

mas modificações na teoria apresentada no Cap. 4, de forma a propor um modelo similar para a descrição deste fenômeno.

## 5.2 O modelo

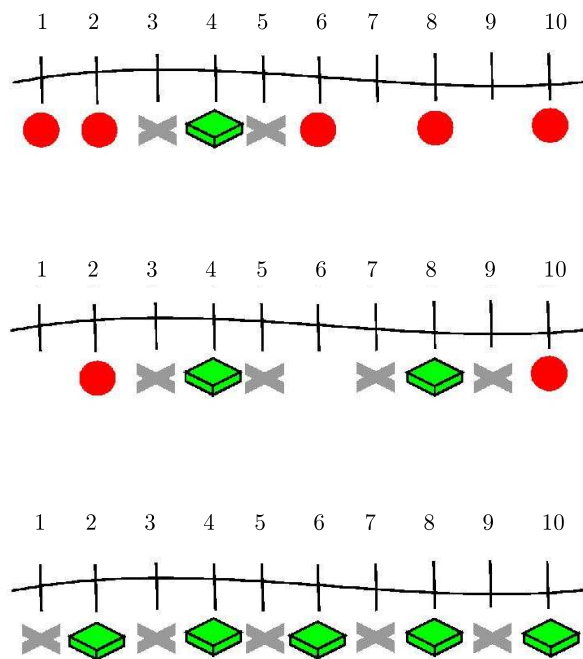
Na solução temos poliíons aniônicos, como as cadeias de DNA, partículas de sal e moléculas intercalantes. O modelo que empregamos na análise deste fenômeno é semelhante ao apresentado nos capítulos anteriores, a menos de duas importantes correções que caracterizam o processo de intercalação. A primeira baseia-se na regra de exclusão de vizinhos para espécies intercalantes, constatada por Crothers em 1968 [92]. Esta regra de exclusão, resultado de restrições estereoquímicas impostas pela estrutura das espécies envolvidas [93], estabelece que, pelo menos, dois sítios imediatamente vizinhos a um sítio ocupado por uma molécula intercalante devem permanecer desocupados; como resultado, a intercalação se torna um fenômeno não cooperativo para a associação em sítios adjacentes.

Para ilustrar este fenômeno, consideremos um curto segmento de polieletrólito com 10 sítios carregados, como mostra a Figura 5.2. A associação de uma molécula intercalante no sítio de número 4, por exemplo, deve imediatamente inutilizar os sítios vizinhos 3 e 5 (a), se esta espécie tem número de exclusão de vizinhos<sup>2</sup> igual a 2. A crescente associação, ao passo que expulsa as partículas de sal, resultará na ocupação máxima de 50% da cadeia, na melhor das hipóteses (c). Para o Brometo de Etídio, por exemplo, que tem número de exclusão de vizinhos aproximadamente igual a 2,5 [35, 94], estima-se que a cobertura do polieletrólito deva ser equivalente, no máximo, a 40% da cadeia.

O segundo efeito consiste na descrição do aumento mecânico do comprimento de contorno na cadeia, decorrente da associação de moléculas intercalantes. A literatura aponta, por exemplo, que a associação de moléculas de Brometo de Etídio provoca o aumento do comprimento de contorno da ordem de 0,34 nm, ou seja, duas vezes o valor de  $b$ , e desenrola a hélice em até 26° por cada molécula intercalada [90], enquanto a Daunomicina aumenta

---

<sup>2</sup>Número de sítios adjacentes que devem permanecer desocupados com a associação de uma molécula intercalante.



**Figura 5.2:** Representação do mecanismo de associação, considerando a regra da exclusão de vizinhos. Um segmento de DNA é ilustrado como uma linha com 10 sítios ionizados. A molécula intercalante é representada pelo paralelepípedo, enquanto as partículas de sal são representadas por círculos. O X indica que o sítio vizinho à molécula intercalante é bloqueado para futura associação.

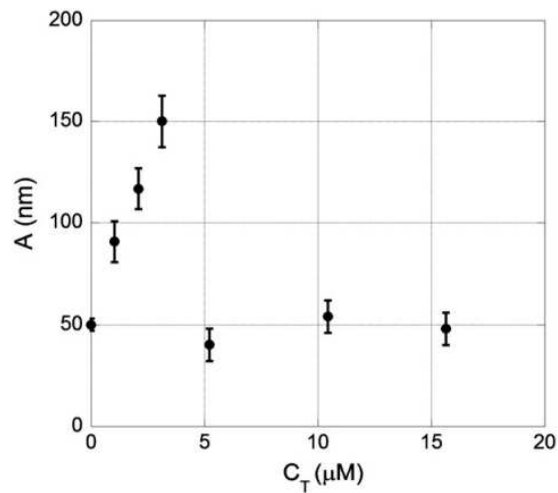
$l_c$  em média em 0,31 nm e desenrola a hélice em de  $15,4^\circ$  [88].

Para tal descrição, consideramos que para cada sítio ocupado por uma molécula intercalante a distância entre os sítios da cadeia deve sofrer a seguinte transformação:

$$b \rightarrow b(1 + x m_x),$$

onde  $m_x$  é a fração da espécie  $x$  intercalante associada e  $x$  o número que informará o aumento relativo da distância entre os sítios. Se  $m_x = 0$ ,  $b$  não sofrerá nenhuma alteração. Para o Brometo de Etídio, por exemplo, que provoca um aumento de até duas vezes a distância original  $b$ ,  $x$  deverá ser aproximadamente igual a 2,5, para que ao final, com a saturação do polieletrólito com moléculas de EtBr, limitada em 40%, o aumento no comprimento de contorno seja de até 2 vezes.

Dentre os resultados experimentais que têm motivado este estudo, destaca-se o comportamento do comprimento de persistência do DNA em uma solução com moléculas de Brometo de Etídio [35], apresentado na Figura 5.3.



**Figura 5.3:** Comportamento do comprimento de persistência para complexos DNA-EtBr como função da densidade de EtBr na solução [35].

Este resultado aponta, primeiramente, um sensível aumento do comprimento de persistência  $A$  da cadeia de DNA em função do aumento da densidade de moléculas de EtBr na solução. Para a concentração crítica em torno de  $4\mu\text{M}$ , o valor de  $A$  atinge um máximo correspondente a 3 vezes o valor do comprimento de persistência de uma cadeia de DNA puro. É este o fenômeno que, neste momento, desejamos compreender. A segunda transição conformacional, correspondente a uma diminuição abrupta do comprimento de persistência, provavelmente decorrente de um processo de desnaturação e formação de bolhas na cadeia, será objeto de futura investigação.

### 5.2.1 A energia livre

Para descrever o fenômeno apresentado, consideramos que as interações entre as espécies são semelhantes às apresentadas nos capítulos anteriores de forma que a energia livre total corresponde à seguinte soma, similar a Eq. 5.1,

$$F_{tot}(\gamma, m_c, m_{\text{EtBr}}) = F_{id}(\gamma, m_c, m_{\text{EtBr}}) + F_d(\gamma, m_c, m_{\text{EtBr}}) + F_{pc}(\gamma, m_c, m_{\text{EtBr}}) + F_{int}(\gamma, m_c, m_{\text{EtBr}}), \quad (5.1)$$

onde as energias livres ideal  $F_{id}$ , de deformação elástica  $F_d$  e de interação eletrostática entre os microíons e o poliíon  $F_{pc}$  são as mesmas apresentadas na Sec. 4.3, segundo as Eqs. 4.4, 4.5 e 4.21.  $F_{int}$  contém os termos referentes à função de partição interna do complexo,

$$F_{int}(\gamma, m_c, m_{\text{EtBr}}) = F_{ent}(\gamma, m_c, m_{\text{EtBr}}) + F_{ion}(\gamma, m_c, m_{\text{EtBr}}) + F_{cs}(\gamma, m_c, m_{\text{EtBr}}) + F_{inter}(\gamma, m_c, m_{\text{EtBr}}), \quad (5.2)$$

em que as energias entrópica  $F_{ent}$ , de repulsão iônica entre os sítios do poliíon  $F_{ion}$  e de volume excluído  $F_{cs}$  são as mesmas nas Eqs. 4.23, 4.41 e 4.71. Além das contribuições já apresentadas, incluímos uma energia atrativa  $F_{inter}$  entre os sítios do polieletrólito e as moléculas intercalantes, de forma a induzir a sua associação, somada à contribuição eletrostática,

$$F_{inter}(\gamma, m_c, m_{EtBr}) = -\eta m_{inter} Z . \quad (5.3)$$

Nesta equação,  $\eta$  é o parâmetro que intermedia a atração entre as espécies,  $m_{EtBr}$  é a fração de moléculas intercalantes associadas ao complexo e  $Z$  é o número de sítios do polieletrólito. Apresentamos, na próxima seção, os resultados da aplicação deste modelo.

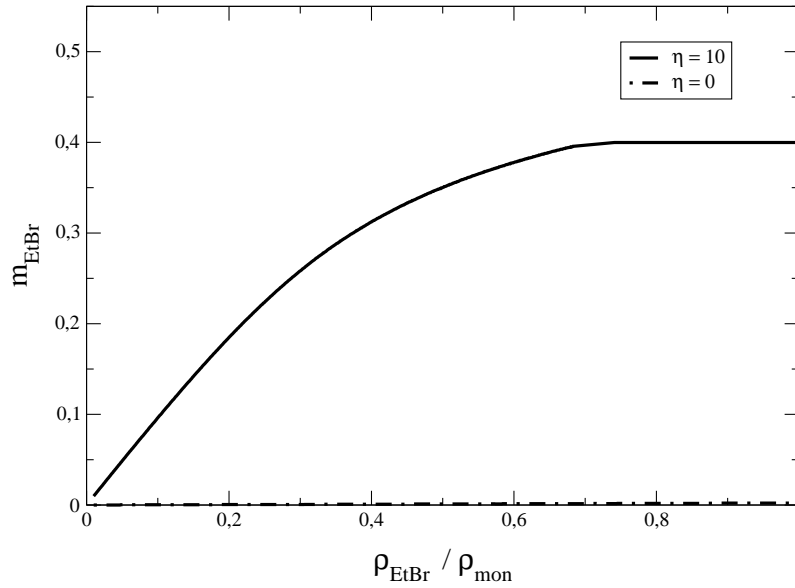
### 5.3 Resultados

Na tentativa de analisar a variação conformacional de polieletrólitos em solução com moléculas intercalantes aplicamos o modelo apresentado com o mesmo procedimento para a minimização da energia livre total apresentado nos capítulos anteriores. De forma a comparar nosso resultado teórico com o obtido experimentalmente, apresentado na Figura 5.3, utilizaremos parâmetros que descrevam espécies intercalantes como as moléculas de Brometo de Etídio.

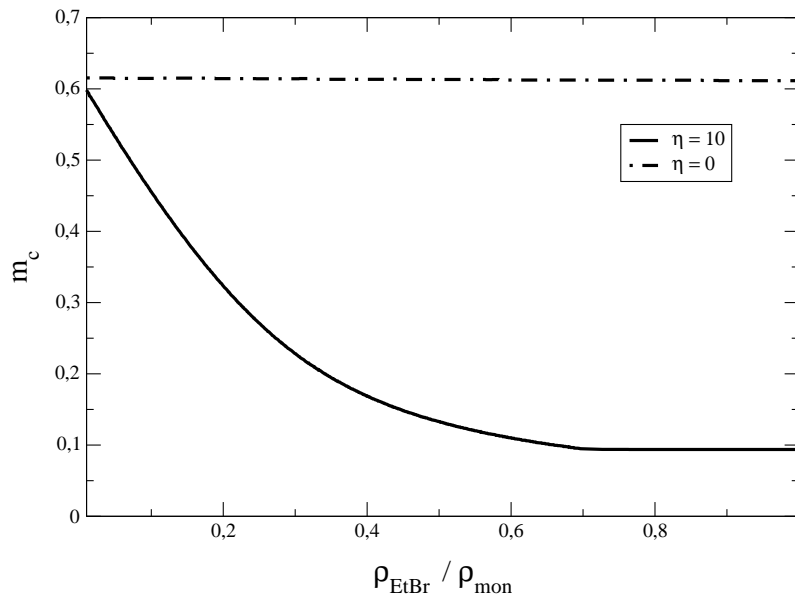
As curvas apresentadas na Figura 5.4 correspondem à fração de associação de moléculas de EtBr ao polieletrólito. O valor de  $\eta = 10$  ilustra o caso em que se considera a interação atrativa adicional entre as moléculas de Brometo de Etídio e o poliion, que intenciona reproduzir a afinidade entre estas espécies, enquanto que para  $\eta = 0$  esta atração é negligenciada. Neste caso, o efeito da associação de moléculas de Brometo de Etídio passa a somente seria notável quando sua densidade se aproximasse da densidade de sal na solução, espécie com a qual passaria a competir igualmente.

O máximo na associação é da ordem de 0,4, indicando que aproximadamente 40% dos sítios do poliion são ocupados pelas moléculas de EtBr, como previsto experimentalmente. Para o caso de  $\eta = 0$ , para baixa densidade de Etbr em solução praticamente não há associação, verificada apenas para uma densidade bastante superior. A Figura 5.5 apresenta a curva de dissociação de sal para os mesmos casos em que  $\eta = 10$  e  $\eta = 0$ .

A quantidade  $A$ , apresentada na Figura 5.6, é a medida do comprimento de persistência. É necessário salientar que para a associação de moléculas intercalantes o cálculo desta quan-



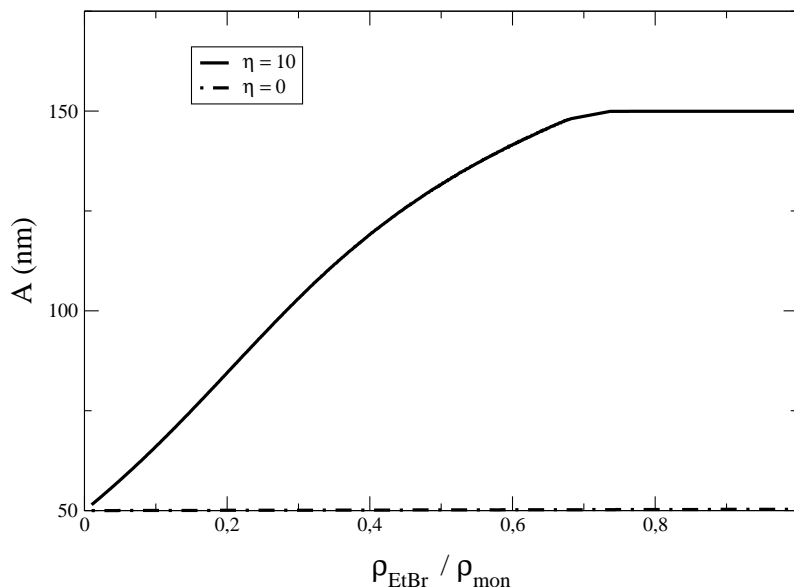
**Figura 5.4:** Fração de moléculas de EtBr associadas como função da densidade de EtBr na solução. São representados os casos em que  $\eta = 2$  e  $\eta = 0$ , em que a interação atrativa DNA-EtBr é anulada, para  $\rho_{\text{mon}} = 22\mu\text{M}$ ,  $\rho_{\text{sal}} = 140\text{mM}$ ,  $Z = 500$  e  $T = 25^\circ\text{C}$ .



**Figura 5.5:** Fração de contraíons associados como função da densidade de EtBr na solução. São representados os casos em que  $\eta = 10$  e  $\eta = 0$ , em que a interação atrativa DNA-EtBr é anulada, para  $\rho_{\text{mon}} = 22\mu\text{M}$ ,  $\rho_{\text{sal}} = 140\text{mM}$ ,  $Z = 500$  e  $T = 25^\circ\text{C}$ .



tidade é particularmente diferente e leva em conta o efeito de intercalação [95]. Verifica-se que o valor inicial obtido para o comprimento de persistência corresponde à aproximadamente 50 nm e que este aumenta até o valor final de 150 nm. Estes são os mesmo valores de  $A(\text{nm})$  obtidos no resultado experimental, ainda que para uma concentração de EtBr distinta.



**Figura 5.6:** Comportamento do comprimento de persistência para complexos DNA-EtBr como função da densidade de EtBr na solução. São representados os casos em que  $\eta = 10$  e  $\eta = 0$ , em que a interação atrativa DNA-EtBr é anulada, para  $\rho_{\text{mon}} = 22\mu\text{M}$ ,  $\rho_{\text{sal}} = 140\text{mM}$ ,  $Z = 500$  e  $T = 25^\circ\text{C}$ .

Ao incluir simples correções em modelos bem estabelecidos para a conformação de políons [28, 31]-[33], obtivemos o efeito de aumento do tamanho do complexo e de sua rigidez com a associação de moléculas intercalantes. Acreditamos que as consequências do emprego deste tipo de molécula para a obtenção de curvas de associação em ensaios experimentais, como por exemplo para o sistema DNA-Ciclodextrina, não devem ser negligenciadas, uma vez que sua associação modifica drasticamente a estrutura de uma cadeia de DNA. Desta forma, a construção de um modelo teórico para um sistema composto pelas três espécies (DNA, Ciclodextrina e Brometo de Etídio) pode resultar bastante interessante

na medida em que deve prevê a competição entre a associação de espécies de natureza tão distinta em poliíons, como o DNA.

## 5.4 Resumo

Neste capítulo analisamos os efeitos sobre a associação de sal e no comprimento de persistência ao incluir no sistema uma espécie monovalente e intercalante. Verificamos, para concentrações não muito elevadas desta molécula intercalante (escolhemos o Brometo de Etídio, especificamente), o aumento do comprimento de persistência da cadeia de DNA. Os resultados relativos a este modelo estão sendo otimizados de forma a reproduzirem quantitativamente os dados experimentais e serão incluídos em um artigo em fase de redação.

## Capítulo 6

### Conclusões

Neste trabalho apresentamos a construção da energia livre de Helmholtz, baseada em teorias de campo médio, para sistemas que envolvem a associação de diferentes espécies sobre cadeias de DNA e como esta associação modifica a sua estrutura e/ou conformação.

Em uma primeira etapa analisamos o fenômeno de desnaturação do DNA dada a associação de sal mudanças na temperatura. Este sistema é basicamente uma mistura de macromoléculas estruturadas em fitas simples e duplas, descritas como cilindros rígidos. O mesmo modelo também pode ser empregado para uma mistura de fitas de DNA parcialmente desnaturadas. O sistema é composto por íons livres e fisicamente associados ao DNA. O modelo é fundamentado na competição entre o ganho entrópico associado aos íons livres e o ganho eletrostático relativo à associação.

O balanço entre a densidade de fitas simples ou duplas é resultado da competição entre a repulsão entre os grupos fosfato e a atração através das ligações de Hidrogênio entre os pares de base. Neste sentido, a associação física de íons ao DNA blinda a repulsão entre os sítios carregados favorecendo a formação e estabilidade da estrutura em fita dupla. Por outro lado, o aumento da temperatura do sistema favorece o termo entrópico, levando à desnaturação. Os parâmetros deste sistema são as concentrações de sal e DNA, o tamanho das macromoléculas e a temperatura. Além do uso destes parâmetros, descrevemos o grau de atração entre as fitas simples que formam o DNA em dupla hélice como função da densidade de pares de base Guanina-Citosina que, segundo a literatura, são os mais

importantes para a formação e manutenção da estrutura em fita dupla. Nosso modelo apresenta um bom acordo com os resultados experimentais e encontra-se publicado [73].

Com vistas à inclusão da flexibilidade ao nosso modelo, investigamos o processo de associação de distintas espécies ao DNA. Apresentamos, primeiramente, nossos resultados preliminares para a descrição da variação conformacional observada em soluções de polieletrólitos flexíveis e moléculas de Ciclodextrina. Este tipo de molécula apresenta dimensões que influenciam a conformação do complexo. Como resultado da associação de moléculas de CD aos poliíons obtivemos a compactação do complexo e, em decorrência de seu elevado volume, quando comparado com partículas de sal, observamos pequeno aumento em sua dimensão e elasticidade. O nosso modelo ainda não é capaz de escrever o estiramento observado experimentalmente, bem como o rompimento parcial das fitas duplas do DNA [34]. A inclusão destes dois efeitos segue sendo o foco da nossa atenção para os próximos trabalhos.

Ainda associado a conformação de macromoléculas, apresentamos nossa investigação sobre a interação entre poliíons e moléculas intercalantes, como o Brometo de Etídio. Utilizamos um modelo semelhante ao apresentado nos capítulos anteriores, considerando características especiais de agentes intercalantes que aumentam o comprimento de contorno do DNA e provocam seu desenovelamento. Incluímos neste modelo o cálculo do comprimento de persistência, baseado no modelo de exclusão de vizinhos, e obtivemos boa comparação com parte do resultado experimental, em que se observa aumento da rigidez do poliíon com a associação de moléculas de Brometo de Etídio. O segundo efeito, caracterizado, provavelmente, pelo rompimento parcial das duplas fitas que formam o DNA é, naturalmente, a sequência deste estudo.

A partir da conjugação destes modelos complementares almejamos ainda a construção de um modelo completo que descreva a compactação do DNA, o processo de estiramento da cadeia e o conseqüente fenômeno de desnaturação, reportados experimentalmente.

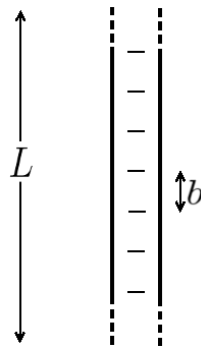
# Apêndice A

## A teoria de condensação de Manning

### O modelo

A teoria de condensação de Manning fornece funções termodinâmicas para soluções de polieletrólitos com e sem sal, considerando que contraíons condensam sobre poliíons até que a densidade de carga sobre o poliíon seja reduzida abaixo de um valor crítico [1].

Os segmentos da cadeia do poliíon têm uma estrutura determinada grandemente pela repulsão eletrostática dos grupos carregados e a cadeia estará, em geral, em uma configuração de máxima extensão. Consideremos uma cadeia de comprimento  $L$  com  $Z$  grupos carregados, de valência  $z_p$ .



**Figura A.1:** Cadeia de comprimento  $L$ , dividida em  $Z$  sítios carregados, distantes pela quantidade  $b \equiv L/Z$ .

A densidade linear uniforme de carga sobre a cadeia é dada por

$$\sigma_0 = \frac{z_p q}{b}, \quad (\text{A.1})$$

onde  $q$  corresponde à carga do elétron em módulo.

No modelo adotado por Manning [1], a cadeia real é substituída por uma cadeia infinita com densidade de carga uniforme, de forma que os segmentos locais de um políon são blindados de outros segmentos sobre o mesmo políon. Ocorre também que interações entre dois ou mais políons são desprezadas. Outra consideração importante é que, tomando o limite da diluição infinita, é possível considerar a solução como um meio contínuo, de constante dielétrica  $D$  - a constante dielétrica do próprio solvente.

Denotemos por  $r$  a distância de um microíon  $i$  à linha de carga. Assim, a energia eletrostática associada a um microíon  $i$ , de valência  $z_i$ , para  $r$  suficientemente pequeno, ( $r \leq r_0$ , onde  $r_0$  é a distância de referência) é dada por

$$U_i = -\frac{2\sigma_0 z_i q}{D} \ln r \quad , \quad r \leq r_0. \quad (\text{A.2})$$

Portanto, para a função de partição, a contribuição  $A_i(r_0)$  para a integral de fase tem a forma

$$A_i(r_0) = f(r_0) \int_0^{r_0} e^{-\beta U_i} 2\pi r \, dr. \quad (\text{A.3})$$

A exponencial pode ser reescrita como

$$e^{-U_i} = \exp\left(\frac{2\sigma_0 z_i q}{D} \ln r\right) = r^{2\sigma_0 z_i q/D}.$$

Assim, tem-se que

$$A_i(r_0) = 2\pi f(r_0) \int_0^{r_0} r^{1+2z_i z_p \xi} \, dr, \quad (\text{A.4})$$

onde a constante  $\xi$  corresponde ao parâmetro de carga, definido como

$$\xi \equiv \frac{q^2}{Dk_B T b}. \quad (\text{A.5})$$

Realizando a integral sobre  $r$ , obtemos como resultado

$$A_i(r_0) = 2\pi f(r_0) \frac{r^{2+2z_i z_p \xi}}{2 + 2z_i z_p \xi} \Big|_0^{r_0}. \quad (\text{A.6})$$

Se o íon  $i$  é um coíon, o produto entre as valências das espécies interagentes resulta em

$$z_i z_p \geq 0, \quad (\text{A.7})$$

e, portanto,  $A_i(r_0)$  é finita. Se o íon  $i$  é um contraíon, de carga oposta a do polieletrólito, então  $z_i z_p < 0$  e a integral diverge no limite inferior para todo  $\xi$ , tal que

$$\xi \geq |z_i z_p|^{-1}. \quad (\text{A.8})$$

Considerando grupos de carga sobre poliíons e microíons monovalentes, tem-se que  $\xi \geq 1$ . Para o caso em que  $\xi = 1$ , o espaçamento crítico de cargas é igual ao comprimento de Bjerrum. Considerando água à  $T = 25^\circ\text{C}$ , com  $D = 78,5$ , e o valor crítico  $\xi = 1$ , o espaçamento de cargas será  $b = 7,135\text{\AA}$ .

### Interpretação física

Sistemas caracterizados por  $\xi \geq 1$  são sistemas instáveis, de forma que contraíons irão condensar sobre poliíons até reduzir  $\xi$  para um valor igual a 1, segundo a teoria de condensação de Manning, tornando o sistema estável. Conforme ocorre a associação de contraíons no polieletrólito ( $n_c$  é o número de contraíons associados), a distância média entre os sítios carregados  $b_{ef}$  aumenta, pois

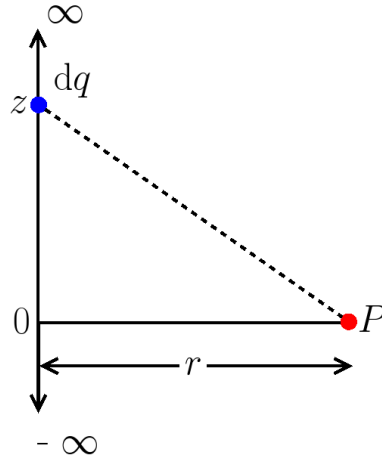
$$b_{ef} = \frac{L}{Z - n_c} = \frac{Zb}{Z - n_c}, \quad (\text{A.9})$$

de forma que  $\xi$  também é reduzido.

Faz-se necessária a discussão de cada um dos casos separadamente, dada a importância do valor de  $\xi$  em torno do valor crítico.

#### A.0.0.1 O caso $\xi < 1$

Considerando que a distribuição de carga ao redor do polieletrólito é dada de acordo com um fator de Boltzmann, segundo a teoria de Debye-Hückel [71] escrevemos o potencial  $\phi$  como uma soma de potenciais de Coulomb blindados dos segmentos infinitesimais de comprimento  $dz$ ,



**Figura A.2:** Representação de uma linha de cargas de comprimento infinito que interage com um microíon no ponto  $P$ .

$$\begin{aligned} \phi(r) &= \frac{\sigma_0}{D} \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{e^{-\kappa(r^2+z^2)^{\frac{1}{2}}}}{(r^2+z^2)^{\frac{1}{2}}} dz, \\ \phi(r) &= \frac{2\sigma_0}{D} \int_0^{+\infty} \frac{e^{-\kappa(r^2+z^2)^{\frac{1}{2}}}}{(r^2+z^2)^{\frac{1}{2}}} dz. \end{aligned} \quad (\text{A.10})$$



Definindo  $(r^2 + z^2)^{\frac{1}{2}} \equiv rt$ , com  $dz = \frac{rt}{\sqrt{t^2 - 1}} dt$ , temos que

$$\phi(r) = \frac{2\sigma_0}{D} \int_1^{+\infty} \frac{e^{-\kappa rt}}{\sqrt{t^2 - 1}} dt. \quad (\text{A.11})$$

A solução para esta integral é representada na forma de uma função de Bessel modificada de segunda espécie de ordem zero  $K_0(\kappa r)$ ,

$$\phi(r) = \frac{2\sigma_0}{D} K_0(\kappa r). \quad (\text{A.12})$$

Para  $\kappa r$  pequeno, a função  $K_0(\kappa r)$  tem a forma abaixo,

$$K_0(\kappa r) \sim -\ln \kappa r \quad , \quad \kappa r \rightarrow 0. \quad (\text{A.13})$$

Retornando à equação para o potencial eletrostático, no limite em que  $r \rightarrow 0$ , o potencial  $\phi(0)$  na posição da linha de carga devido aos íons livres tem a forma abaixo,

$$\phi(0) = -\frac{2\sigma_0}{D} \ln \kappa \quad , \quad \kappa r \rightarrow 0. \quad (\text{A.14})$$

A energia livre  $f^{ex} dz$ , devida às interações entre os segmentos  $dz$  e os microíons livres, pode ser obtida pelo processo de carregamento de Debye, no qual todas as partículas são carregadas simultaneamente desde a carga 0 até a sua carga final ( $\sigma_0$ ). Carregando apenas a cadeia, obtemos

$$f^{ex} dz = -\frac{\sigma_0^2}{D} \ln \kappa dz. \quad (\text{A.15})$$

A energia livre de excesso total para a solução será dada por

$$F^{ex} = N_p \int_{-\infty}^{+\infty} f^{ex} dz, \quad (\text{A.16})$$

onde  $N_p$  corresponde ao número de poliões na solução, que resulta em

$$F^{ex} = N_p \int_{-\infty}^{+\infty} \left( -\frac{\sigma_0^2}{D} \right) \ln \kappa \, dz. \quad (\text{A.17})$$

Substituindo a expressão para a densidade de carga, e considerando grupos de carga monovalentes, obtemos

$$F^{ex} = -N_p \int_{-\infty}^{+\infty} \left( \frac{q^2}{Db} \right) \frac{1}{b} \ln \kappa \, dz, \quad (\text{A.18})$$

que com a definição do parâmetro de carga em (A.5) toma a forma abaixo,

$$F^{ex} = -N_p \xi k_B T \ln \kappa \frac{1}{b} \int_{-\infty}^{+\infty} dz. \quad (\text{A.19})$$

O termo  $\frac{1}{b} \int_{-\infty}^{+\infty} dz$  resulta no número de sítios carregados  $Z$  sobre cada polião, assim a equação anterior resulta em

$$\beta F^{ex} = -N_p Z \xi \ln \kappa. \quad (\text{A.20})$$

Definindo a quantidade  $\frac{N_p Z}{V} = \rho_e$ , como a concentração equivalente, obtemos

$$\begin{aligned} \beta F^{ex}/V &= -\left( \frac{N_p Z}{V} \right) \xi \ln \kappa, \\ \beta F^{ex}/V &= -\rho_e \xi \ln \kappa, \quad \xi < 1. \end{aligned} \quad (\text{A.21})$$

que é aproximação de Manning para a energia livre de excesso para  $\xi < 1$ .

### A.0.0.2 O caso $\xi > 1$

Retomando a consideração de que sistemas caracterizados por  $\xi \geq 1$  são sistemas instáveis, Manning postula que, ainda que o valor real de  $\xi$  seja maior do que um, seu

valor efetivo será unitário. Assim, para tornar o sistema estável, contraíons irão condensar sobre poliíons neutralizando a fração  $1 - \xi^{-1}$  da carga do poliíon. É definido o parâmetro de carga efetivo  $\xi_{ef}$  na forma abaixo,

$$\xi_{ef} \equiv \frac{q^2}{Dk_B T b_{ef}} = 1, \quad (\text{A.22})$$

onde a quantidade  $b$ , que representa a distância entre as cargas, foi substituída pela distância efetiva  $b_{ef}$ , subtraindo de  $Z$  a fração de contraíons associados  $n_c$ ,

$$b_{ef} \equiv \frac{L}{Z - n_c}. \quad (\text{A.23})$$

O número de contraíons condensados  $n_c$  é obtido substituindo (A.23) em (A.22), resultando em

$$n_c = Z \left( 1 - \frac{1}{\xi} \right), \quad \xi > 1, \quad (\text{A.24})$$

onde  $\xi$  corresponde ao parâmetro de carga real. Se  $\xi$  fosse igual a 1, a fração de contraíons associados seria nula e assim, o valor efetivo  $b_{ef}$  tornar-se-ia novamente o valor real  $b$ .

## Apêndice B

Artigo publicado em anexo

## Referências Bibliográficas

- [1] MANNING, G. Limiting Laws and Counterion Condensation in Polyelectrolyte Solutions. *The Journal of Chemical Physics*, v. 51, n. 3, 1969.
- [2] FLORY, P. J. *Principles of Polymer Chemistry*. Ithaca, NY: Cornell University Press, 1953.
- [3] FLORY, P. J. *Statistical Mechanics of Chain Molecules*. New York: John Wiley & Sons, 1969.
- [4] DE GENNES, P.-G. *Scaling Concepts in Polymer Physics*. Cornell University Press, 1979.
- [5] GUYTON, A. C.; HALL, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 9. ed. Guanabara Koogan, 1997.
- [6] FRIEDMANN, T. Overcoming the obstacles to gene therapy. *Sci. Am.*, v. 276, n. 6, 1997.
- [7] FELGNER, P. L. Nonviral strategies for gene therapy. *Sci. Am.*, v. 276, n. 6, 1997.
- [8] VERMA, I. M.; SOMIA, N. Gene therapy: promises, problems and prospects. *Nature*, London, v. 389, n. 6648, 1997.
- [9] FELGNER, P. L.; RHODES, G. Gene therapeutics. *Nature*, London, v. 349, n. 6307, 1991.

- [10] FELGNER, P. L.; RINGOLD, G. M. CATIONIC LIPOSOME-MEDIATED TRANSFECTION. *Nature*, London, v. 337, 1989.
- [11] FELGNER, P. L. et al. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 84, n. 4, 1987.
- [12] BLAESE, R. M. et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science*, Washington, v. 270, n. 5342, 1995.
- [13] ANDERSON, W. F. Human gene therapy. *Science*, Washington, v. 256, n. 5058, 1992.
- [14] ANDERSON, W. F. Human gene therapy. *Nature*, London, v. 392, n. 6679, 1998.
- [15] O'DRISCOLL, C.; DARCY, R. Cyclodextrin Constructs for Delivery of Gene Therapeutic Agents. Technical report, Pharmacy Advisory Committee, 2002.
- [16] MODLIN, R. Immunology: A toll for DNA vaccines. *Nature*, London, v. 408, 2000.
- [17] HOPE, M. J.; MUI, B.; ANSELL, S.; AHKONG, Q. F. Cationic lipids, phosphatidylethanolamine and the intracellular delivery of polymeric, nucleic acid-based drugs. *Mol. Membr. Biol.*, v. 15, n. 8, 1998.
- [18] GAO, X.; HUANG, L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gen. Ther.*, v. 2, n. 4, 1995.
- [19] LASIC, D. D.; STREY, H.; STUART, M. C. A.; PODGORNIK, R.; FREDERIK, P. M. The structure of DNA-liposome complexes. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 119, n. 7, 1997.
- [20] KUHN, P. S. *Teoria de Polieletrólitos Rígidos com Aplicações em Bioquímica e Terapia Genética*. Dezembro 1999. Tese (Doutorado em Física) - UFRGS, Dezembro 1999.

- [21] GORELOV, A. V.; KUDRYASHOV, E. D.; JACQUIER, J. C.; MCLOUGHLIN, D. M.; DAWSON, K. A. Complex formation between DNA and cationic surfactant. *Physica A*, Amsterdam, v. 249, 1998.
- [22] VON GROLL, A.; LEVIN, Y.; BARBOSA, M. C.; RAVAZZOLO, A. P. Linear DNA low efficiency transfection by liposome can be overcome by the use of amphiphilic cationic lipid as charge neutralizer. *Biotechnology Progress*, v. 22, 2006.
- [23] KUHN, P. S.; LEVIN, Y.; BARBOSA, M. C. Rodlike Polyelectrolytes in Presence of Monovalent Salt. *Macromolecules*, Washington, v. 31, 1998.
- [24] KUHN, P. S.; LEVIN, Y.; BARBOSA, M. C. Complex Formation Between Polyelectrolytes and Ionic Surfactant. *Chem. Phys. Lett.*, v. 298, 1998.
- [25] KUHN, P. S.; LEVIN, Y.; BARBOSA, M. C. Polyelectrolyte Solutions with Monovalent Salt. *Physica A*, Amsterdam, v. 269, 1999.
- [26] KUHN, P. S.; BARBOSA, M. C.; LEVIN, Y. Complexation of DNA with cationic surfactant. *Physica A*, Amsterdam, v. 269, p. 278–284, 1999.
- [27] KUHN, P. S.; LEVIN, Y.; BARBOSA, M. C. Charge Inversion in DNA-amphiphile complexes: Possible application to gene therapy. *Physica A*, Amsterdam, v. 274, 1999.
- [28] KUHN, P. S.; BARBOSA, M. C.; LEVIN, Y. Effects of hydrophobicity in DNA surfactant complexation. *Physica A*, Amsterdam, v. 283, 2000.
- [29] SILVA, M. B. A.; LUCENA, L. S.; BARBOSA, M. C. Complexation in Polyelectrolyte Solution with Divalent Surfactants. *Physica A*, Amsterdam, v. 331, 2004.
- [30] SILVA, M. B. A.; LUCENA, L. S.; BARBOSA, M. C. Correlation induce Association in Polyelectrolyte Solutions. *Physica A*, Amsterdam, v. 342, 2004.
- [31] KUHN, P. S.; BARBOSA, M. C. Flexible polyelectrolytes with monovalent salt. *Physica A*, Amsterdam, v. 357, 2005.

- [32] DIEHL, A.; KUHN, P. S. Flexible polyelectrolyte conformation in the presence of oppositely charged surfactants. *Phys. Rev. E*, v. 76, n. 041807, 2007.
- [33] DIEHL, A.; KUHN, P. S. Effect of monovalent salt on the conformation of polyelectrolyte-surfactant complexes. *Phys. Rev. E*, v. 79, 2009.
- [34] SIMAN, L.; CARRASCO, I. S. S.; DA SILVA, J. K. L.; OLIVEIRA, M. C.; ROCHA, M. S.; MESQUITA, O. N. Quantitative assessment of the interplay between DNA-elasticity and cooperative binding of ligand. *Physical Review Letters*, Woodbury, v. 109, n. 24, 2012.
- [35] ROCHA, M. S.; MESQUITA, O. N. Transition on the entropic elasticity of DNA induced by intercalating molecules. *Journal of Chemical Physics*, Woodbury, v. 127, n. 10, 2007.
- [36] OWCZARZY, R.; YOU, Y.; MOREIRA, B. G.; MANTHEY, J. A.; HUANG, L.; BEHLKE, M. A.; WALDER, J. A. Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers. *Biochemistry*, v. 43, n. 12, 2004.
- [37] OWCZARZY, R.; MOREIRA, B.; YOU, Y.; BEHLKE, M. A.; WALDER, J. A. Predicting Stability of DNA Duplexes in Solutions Containing Magnesium and Monovalent Cations. *Biochemistry*, v. 47, n. 19, 2008.
- [38] CHALIKIAN, T. V.; VOLKER, J.; PLUM, G. E.; BRESLAUER, K. J. A more unified picture for the thermodynamics of nucleic acid duplex melting: A characterization by calorimetric and volumetric techniques. In: . c1999. v. 96.
- [39] c1975. v. 72.
- [40] NELSON, D. L.; COX, M. M. *Lehninger: Princípios de Bioquímica*. 4. ed. Sarvier, 2006.
- [41] CROTHERS, D. On the mechanism of deoxyribonucleic acid unwinding. *Accts. Chem. Res.*, v. 2, 1969.



- [42] WARTELL, R. M.; BENIGHT, A. S. Thermal denaturation of DNA molecules: A comparison of theory with experiment. *Physics Reports*, v. 126, n. 2, 1985.
- [43] DOVE, W. F.; DAVIDSON, N. Cation Effects on the Denaturation of DNA. *J. Mol. Biol.*, v. 5, 1962.
- [44] PATTARKINE, M.; GANESH, K. N. DNA-Surfactant Interactions: Coupled Cooperativity in Ligand Binding Leads to Duplex Stabilization. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v. 263, n. 1, 1999.
- [45] SCHILDKRAUT, C.; LIFSON, S. Dependence of The Melting Temperature of DNA on Salt Concentration. *Biopolymers*, New York, v. 3, 1965.
- [46] OWCZARZY, R.; MOREIRA, B.; YOU, Y.; BEHLKE, M. A.; WALDER, J. A. Predicting Stability of DNA Duplexes in Solutions Containing Magnesium and Monovalent Cations. *Biochemistry*, v. 47, 2008.
- [47] IZANLOO, C.; PARSAFAR, G. A.; ABROSHAN, H.; AKBARZADEH, H. Denaturation of Drew-Dickerson DNA in a High Salt Concentration Medium: Molecular Dynamics Simulations. *Journal of Computational Chemistry*, v. 32, n. 16, 2011.
- [48] IZANLOO, C.; PARSAFAR, G. A.; ABROSHAN, H.; AKBARZADEH, H. Denaturation of Drew–Dickerson DNA in a high salt concentration medium: Molecular dynamics simulations. *Journal of Computational Chemistry*, v. 32, 2011.
- [49] LEVIN, Y. Theory of Counterion Association in Rodlike Polyelectrolytes. *Europhys. Lett.*, v. 34, n. 405, 1996.
- [50] LEVIN, Y. Electrostatic correlations: from plasma to biology. *Reports on Progress in Physics*, v. 65, p. 1577–1632, 2002.
- [51] STUART, M. A. C.; HUCK, W. T. S.; GENZER, J.; MULLER, M.; OBER, C.; STAMM, M.; SUKHORUKOV, G. B.; SZLEIFER, I.; TSUKRUK, V. V.; URBAN,

- M.; F. Winnik; ZAUSCHER, S.; LUZINOV, I.; MINKO, S. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. *Nature Materials*, v. 93, 2010.
- [52] BOUDOU, T.; CROUZIER, T.; REN, K.; BLIN, G.; PICART, C. Multiple functionalities of polyelectrolyte multilayer films: new biomedical applications. *Advanced Materials*, v. 22, 2010.
- [53] LIFSON, S. Partition Functions of Linear Chain Molecules. *J. Chem. Phys.*, v. 40, 1964.
- [54] ROCHA, M. Modeling the entropic structural transition of DNA complexes formed with intercalating drugs. *Phys. Biol.*, v. 6, 2009.
- [55] ROCHA, M. S. *PINÇAS ÓPTICAS: EXPERIMENTO, TEORIA E APLICAÇÃO NO ESTUDO DA INTERAÇÃO DNA-FÁRMACOS*. 2008. Tese (Doutorado em Física) - UFMG, 2008.
- [56] FRANK-KAMENETSKII, M. D. Simplification of the empirical relationship between melting temperature of DNA, its GC content and concentration of sodium ions in solution. *Biopolymers*, New York, v. 106, 1971.
- [57] BLAKE, R. D.; DELCOURT, S. G. Thermal stability of DNA. *Nucleic Acids Res*, v. 26, 1998.
- [58] SANTALUCIA, J. J. et al. Improved Nearest-Neighbor Parameters for Predicting DNA Duplex Stability. *Biochemistry*, v. 35, 1996.
- [59] c1998. v. 95.
- [60] HILL, T. L. Generalization of the OneDimensional Ising Model Applicable to Helix Transitions in Nucleic Acids and Proteins. *J. Chem. Phys.*, v. 30, 1959.
- [61] POLAND, D.; SCHERAGA, H. A. Phase transitions in one dimension and the helix-coil transition in polyamino acids. *J. Chem. Phys.*, v. 45, p. 1456, 1966.

- [62] POLAND, D.; SCHERAGA, H. A. Occurrence of a phase transition in nucleic acid models. *J. Chem. Phys.*, v. 45, p. 1464, 1966.
- [63] FISHER, M. E. Effect of excluded volume on phase transitions in biopolymers. *J. Chem. Phys.*, v. 45, 1966.
- [64] PEYRARD, M.; BISHOP, A. R. Statistical mechanics of a nonlinear model for DNA denaturation. *Phys. Rev. Lett.*, v. 62, 1989.
- [65] DAUXOIS, T.; PEYRARD, M.; BISHOP, A. R. Entropy-driven DNA denaturation. *Phys. Rev. Lett.*, v. 47, 1993.
- [66] PEYRARD, M. Nonlinear Dynamics and Statistical Physics of DNA. *Nonlinearity*, v. 17, 2004.
- [67] LEVIN, Y.; BARBOSA, M. C. Thermodynamic Theory of Counterion Association in Rigid Polyelectrolytes. *J. Phys. II*, v. 7, 37, n. 37, 1997.
- [68] HILL, T. L. *An Introduction to Statistical Thermodynamics*. New York: Dover Publications, 1986.
- [69] MANNING, G. Polyelectrolytes. *Annu. Rev. Phys. Chem.*, v. 23, 1972.
- [70] BJERRUM, N. *Mat.-Fys. Medd.*, v. 7, n. 1, 1926.
- [71] DEBYE, P. W.; HÜCKEL, E. *Phys. Zeits.*, n. 24, p. 185–206, 1923.
- [72] MCQUARRIE, D. A. *Statistical Mechanics*. USA: Viva Books Private Limited, 2005.
- [73] PASSOS, C. B.; BARBOSA, M. C.; KUHN, P. S. DNA denaturation in the rodlike polyelectrolyte model. *Physica A*, Amsterdam, v. 413, 2014.
- [74] GOMES, L. S. *Estudo da interação DNA-Ciclodextrina com a técnica de pinçamento óptico com aplicação em terapia gênica*. Março 2009. Dissertação (Mestrado em Física) - UFMG, Belo Horizonte, Março 2009.

- [75] TAVARES, G. D.; VIANA, C. M.; ARAUJO, J. G.; RAMALDES, G. A.; CARVALHO, W. S.; PESQUERO, J. L.; VILELA, J. M.; Margareth S. Andrade; DE OLIVEIRA, M. C. Development and physico-chemical characterization of cyclodextrin–DNA complexes loaded liposome. *Chemical Physics Letters*, Amsterdam, v. 429, 2006.
- [76] VILLIERS, A. *Compt. Rend.*, v. 112, p. 536–539, 1891.
- [77] DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. CYCLODEXTRIN-BASED PHARMACEUTICS: PAST, PRESENT AND FUTURE. *Nature Reviews*, v. 3, 2004.
- [78] BILENSOY, E. *Cyclodextrins in Pharmaceuticals, Cosmetics, and Biomedicine*. Wiley, 2011.
- [79] REKHARSKY, M. V.; INOUE, Y. Complexation Thermodynamics of Cyclodextrins. *Chem. Rev.*, v. 98, 1998.
- [80] TROTTA, F.; ZANETTI, M.; CAVALLI, R. Cyclodextrin-based nanosponges as drug carriers. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v. 8, 2012.
- [81] BECKET, G.; SCHEP, L. J.; TANB, M. Y. Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics*, v. Volume 179, n. 1, 1999.
- [82] BURCKBUCHIER, V. et al. Development and Characterization of New Cyclodextrin Polymer-Based DNA Delivery Systems. *Bioconjugate Chem.*, v. 19, 2008.
- [83] SAWARKAR, H. CYCLODEXTRINES - A MULTIDIMENSIONAL PHARMACEUTICAL TOOL. *International Journal of Herbal Drug Research*, v. I, n. 2, 2011.
- [84] STRYER, L. *Biochemistry*. 4. ed. Freeman, 1995.
- [85] ARFKEN, G. *Mathematical Methods for Physicists*. 3. ed. Academic Press, Inc., 1985.
- [86] CARNAHAN, N. F.; STARLING, K. E. Equation of State for Nonattracting Rigid Spheres. *The Journal of Chemical Physics*, v. 51, n. 2, 1969.

- [87] ZIMM, B. H.; LEVENE, S. D. PROBLEMS AND PROSPECTS IN THE THEORY OF GEL-ELECTROPHORESIS OF DNA. *QUARTERLY REVIEWS OF BIOPHYSICS*, v. 25, n. 2, 1992.
- [88] FRITZSCHE, H.; TRIEBEL, H.; CHAIRES, J. B.; DATTAGUPTA, N.; CROTHERS, D. M. Studies on interaction of anthracycline antibiotics and deoxyribonucleic-acid-geometry of intercalation of Iremycin and Daunomyc. *Biochemistry*, v. 21, n. 17, 1982.
- [89] VARDEVANYAN, P. O.; ANTONYAN, A. P.; MANUKYAN, G. A.; KARAPETYAN, A. T. Study of ethidium bromide interaction peculiarities with DNA. *Exp. Mol. Med.*, v. 33, n. 4, 2001.
- [90] SISCHKA, A.; TOENSING, K.; ECKEL, R.; WILKING, S. D.; SEWALD, N.; RIOS, R.; ANSELMETTI, D. Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands. *Biophys. J.*, v. 88, n. 1, 2005.
- [91] Structure & function: proceedings of the Seventh Conversation in the Discipline Biomolecular Stereodynamics held at the State University of New York at Albany. D. Adenine Press, c1992.
- [92] CROTHERS, D. M. CALCULATION OF BINDING ISOTHERMS FOR HETEROGENEOUS POLYMERS. *BIOPOLYMERS*, v. 6, n. 4, 1968.
- [93] JAINA, S. C.; TSAIA, C.-C.; SOBELLA, H. M. Visualization of drug-nucleic acid interactions at atomic resolution : II. Structure of an ethidium/dinucleoside monophosphate crystalline complex, ethidium:5-iodocytidylyl (3-5) guanosine. *Journal of Molecular Biology*, v. 114, n. 3, 1977.
- [94] COURY, J. E.; MCFAIL-ISOM, L.; WILLIAMS, L. D.; BOTTOMLEY, L. A. A novel assay for drug-DNA binding mode, affinity, and exclusion number: scanning force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 93, n. 22, 1996.

- [95] ROCHA, M. S. Revisiting the neighbor exclusion model and its applications. *Biopolymers*, New York, v. 93, n. 1, 2010.