

Universidade Federal de Uberlândia

**Centro de Ciências Exatas
Instituto de Química**

MON
54
B238
TCS/MCM

**" Intercalação dos corantes alimentícios Vermelho-40 e
Tartrazina em Ácido Desoxirribonucleico "**

SISBI/UFU



1000205253

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rachel Alessandra Barbosa

Orientadora: Sandra Terezinha de Farias Furtado

Uberlândia

Minas Gerais - Brasil

2002



Programa de Pós Graduação em Química- MESTRADO
Instituto de Química – UFU
Uberlândia/MG - Fone: (34) 3235-4385
e-mail: cpqquimica@ufu.br
www.cpqquimica.iqfu.ufu.br

ALUNA: RACHEL ALESSANDRA BARBOSA

NÚMERO DE MATRÍCULA: 5982420-1

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA INORGÂNICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“ESTUDO SOBRE A INTERCALAÇÃO DOS CORANTES ALIMENTÍCIOS VERMELHO-40 E TARTRAZINA EM ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEÍCO”.

ORIENTADORA: Profa. Dra. SANDRA TEREZINHA DE FARIAS FURTADO

A Dissertação foi **APROVADA** em reunião pública, realizada no Anfiteatro do Bloco X do Campus Santa Mônica, em 30 de abril de 2002, às 09:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA

Profa Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado

(IQ/UFU)

Sandra Terezinha de Farias Furtado

Prof. Dr. Foued S. Espíndola

(Gen.Bioquímica/UFU)

Foued S. Espíndola

Prof. Dr. Francisco B. Teixeira Pessine

(IQ/UNICAMP)

Francisco B. Teixeira Pessine

Uberlândia, 30 de abril de 2002.

Agradecimentos:

a Deus e àqueles que fazem algo ao próximo sem esperar alguma coisa em seu benefício próprio, a não ser a satisfação da ajuda.

Resumo

Estudos utilizando a técnica de absorção no ultravioleta / visível forneceram resultados que indicam que os corantes alimentícios Vermelho - 40 e Tartrazina podem formar compostos de intercalação com o DNA. A absorbância da solução do DNA é aumentada à medida que as absorbâncias das soluções dos corantes diminuem. O corante Vermelho - 40 parece ser mais efetivo que o corante Tartrazina, quanto ao número de moléculas intercaladas e quanto ao alongamento do DNA. Embora haja uma menor planaridade da molécula de Vermelho - 40 em relação à molécula de Tartrazina, aquela pode estar atuando através de dois mecanismos de ação: intercalação e interação na superfície externa do DNA. A molécula de Tartrazina tem uma maior planaridade e isto facilita a sua entrada entre os enovelamentos do DNA, ocupando um maior número de bases por molécula; os cálculos dos valores de R indicam estes resultados. A separação por cromatografia de coluna confirmou a intercalação de ambos os corantes no DNA, e sugere-se a formação de dois compostos de intercalação diferentes com o corante Vermelho-40. Estes resultados indicam que os corantes usados nos alimentos podem agir como agentes mutagênicos.

Abstract

Studies by ultraviolet / visible show that Red-40 and Tartrazine food dyes can form intercalation compounds with DNA. The absorbance of DNA solution increases as the absorbance of the dye solutions decreases. Compared to Tartrazine, the number of intercalated molecules is higher in the case of Red-40. Also, DNA stretching is more intense with the later dye. Although the Red-40 molecule is less flat than the Tartrazine molecule, the former can act by two mechanisms: intercalation and interaction with extern DNA surface. The higher flactness of the Tartrazine molecule makes its entrance among the ballads of DNA molecule more easy. As a result, a greater number of bases per molecule are occupied. This conclusion is supported by the calculated R-values. Column chromatography shows both dyes to present DNA intercalation. Chromatographic results also support the formation of two Red-40 intercalates. The results can explain the mutation produced in the DNA structure due to the use of this dyes in food.

I - Objetivos

O presente estudo tem como objetivo verificar a intercalação de moléculas dos corantes alimentícios Vermelho-40 e Tartrazina no ácido desoxirribonucléico (DNA), inferir sobre se mudanças estruturais do DNA estariam ligadas a intercalação.

INTRODUÇÃO

II- Introdução

II.1- DNA

As pessoas têm usado materiais para repassar informações desde que elas fizeram as primeiras pinturas em cavernas. O homem evoluiu a ponto tal que, hoje, podemos especular sobre a possibilidade de se obter informações nas moléculas simples. O estudo de tais moléculas pode servir como um instrumento fornecedor de dados de enorme importância. A natureza, entretanto, tem usado esta técnica por milhões de anos. Ela usa a molécula chamada ácido desoxirribonucleico (DNA) para guardar a informação genética que possibilita as formas de reprodução da vida¹.

Toda célula viva contém no mínimo uma molécula de DNA para controlar a produção de proteínas e carregar a informação genética de uma geração de células para a próxima geração. As moléculas de DNA humano são imensas. Se uma delas pudesse ser extraída do núcleo celular sem ser danificada e diretamente arrastada para fora, poderíamos ver que é altamente enovelada no espaço e que pode ter cerca de 2m de comprimento. A molécula de ácido ribonucleico (RNA) está intimamente relacionada ao DNA. Uma das suas funções é carregar a informação guardada pelo DNA para a região da célula onde aquela informação pode ser usada na síntese de proteína¹.

A melhor maneira para se entender a estrutura do DNA é ver como ela recebeu seu nome. Ela é um polímero construído de unidades repetidas, derivadas do açúcar ribose (figura 1-a). Para o DNA, a molécula ribose tem sido modificada pela remoção do átomo de oxigênio, no átomo de carbono 2, que é o segundo átomo de carbono a partir do átomo de oxigênio do éter, no anel de cinco

membros. Esta unidade se repete e o monômero é chamado desoxirribose (figura 1-b)¹.

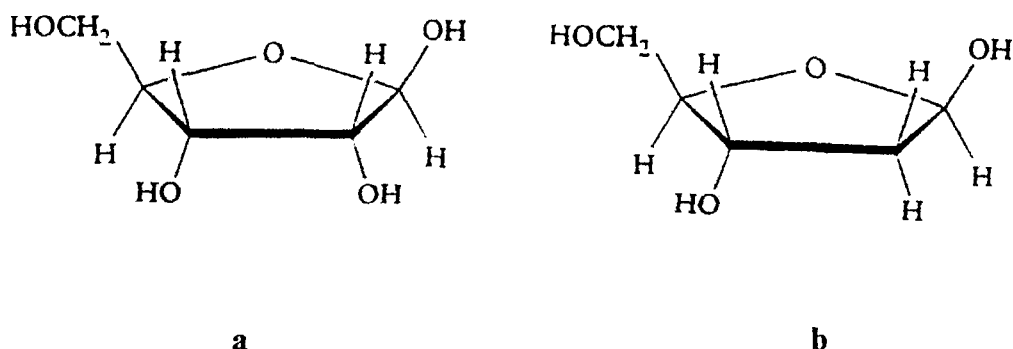


Figura 1 : a- Ribose; b- Desoxirribose¹

Ligado por uma ligação covalente ao átomo de carbono 1 do anel desoxirribose está uma amina (e por isso uma base), formando as purinas, que são (a) adenina, A, (b) guanina, G e as pirimidinas: (c) citosina, C, ou (d) timina, T (figura 2). As purinas possuem um átomo de hidrogênio na posição 9 e as pirimidinas na posição 1. No RNA, a uracila, U (figura 2-e), ocorre no lugar de timina. As bases são ligadas ao átomo de carbono 1 da desoxirribose através do nitrogênio do grupo NH ; o composto assim formado é chamado um nucleosídeo. Todos os nucleosídeos tem uma estrutura similar, que podemos resumir como mostrado na figura 2-f¹.

Neste estágio, os monômeros de DNA são cada qual completados por um grupo fosfato, $-\text{O}(\text{PO}_3)^{3-}$, ligado covalentemente ao átomo de carbono 5 do nucleosídeo para formar um nucleotídeo (figura 3). Como são

quatro monômeros nucleotídeos possíveis (um de cada base), eles são quatro nucleotídeos monômeros possíveis em cada tipo de ácido nucléico¹.

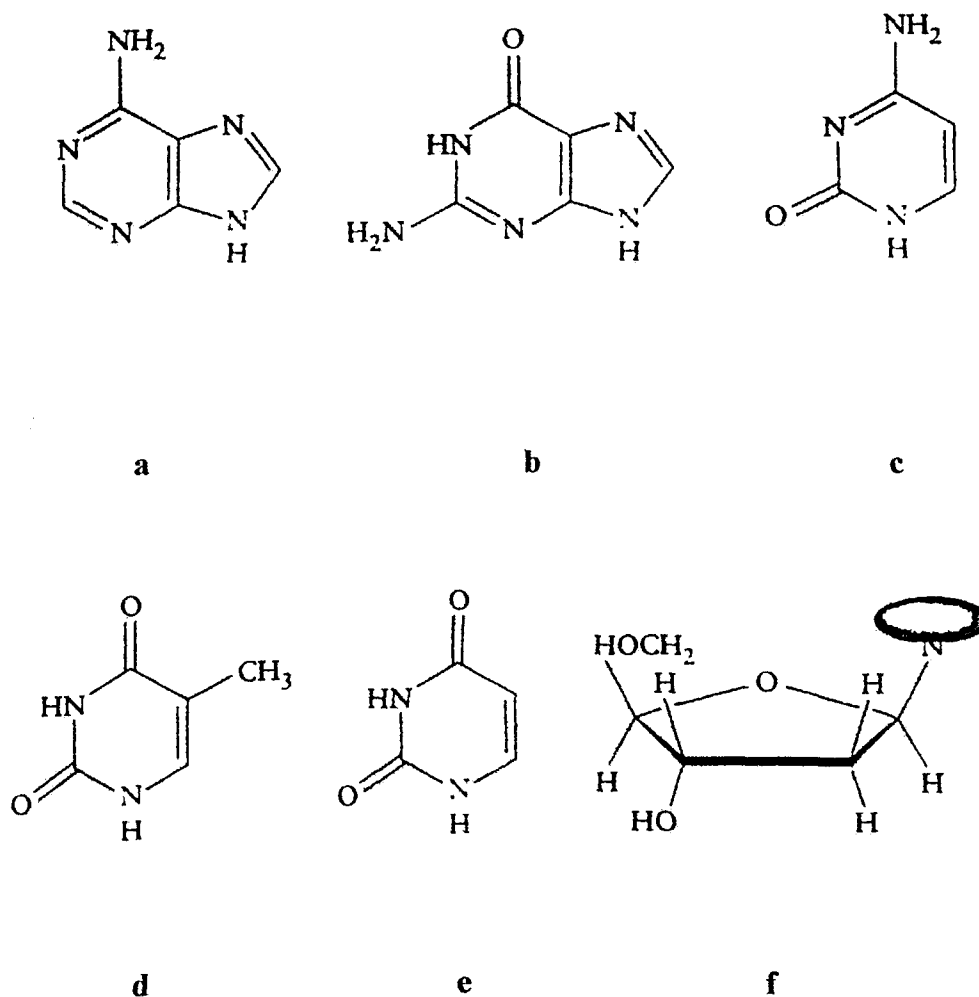


Figura 2: As bases purinas: a- adenina, b- guanina, c- citosina; as bases pirimidinas: d- timina, e- uracila, f- um nucleosídeo¹.

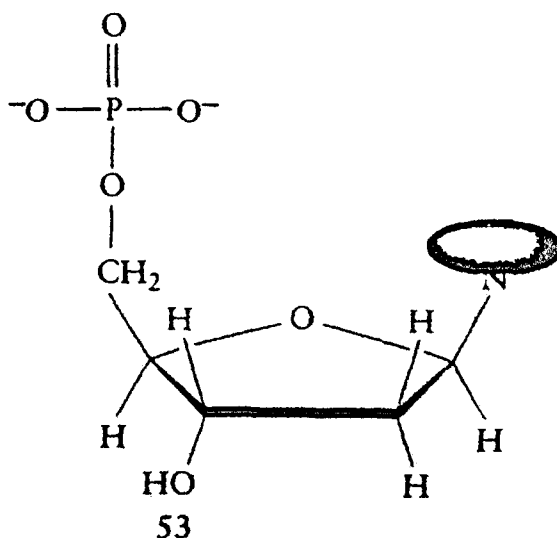


Figura 3: Um nucleotídeo¹

As moléculas de DNA e RNA são, portanto, polinucleotídeos, espécies poliméricas construídas de unidades nucleotídeo. A polimerização ocorre quando o grupo fosfato de um nucleotídeo condensa-se com o grupo - OH no átomo de carbono 3 de outro nucleotídeo, liberando, deste modo, uma molécula de água. Como esta condensação continua, resulta na estrutura mostrada na figura 4, um composto conhecido como um ácido nucléico. A molécula de DNA em si é uma dupla hélice em que duas longas fitas (polinucleotídeos) de ácido nucléico estão enroladas uma em torno da outra, formando a dupla hélice do DNA¹.

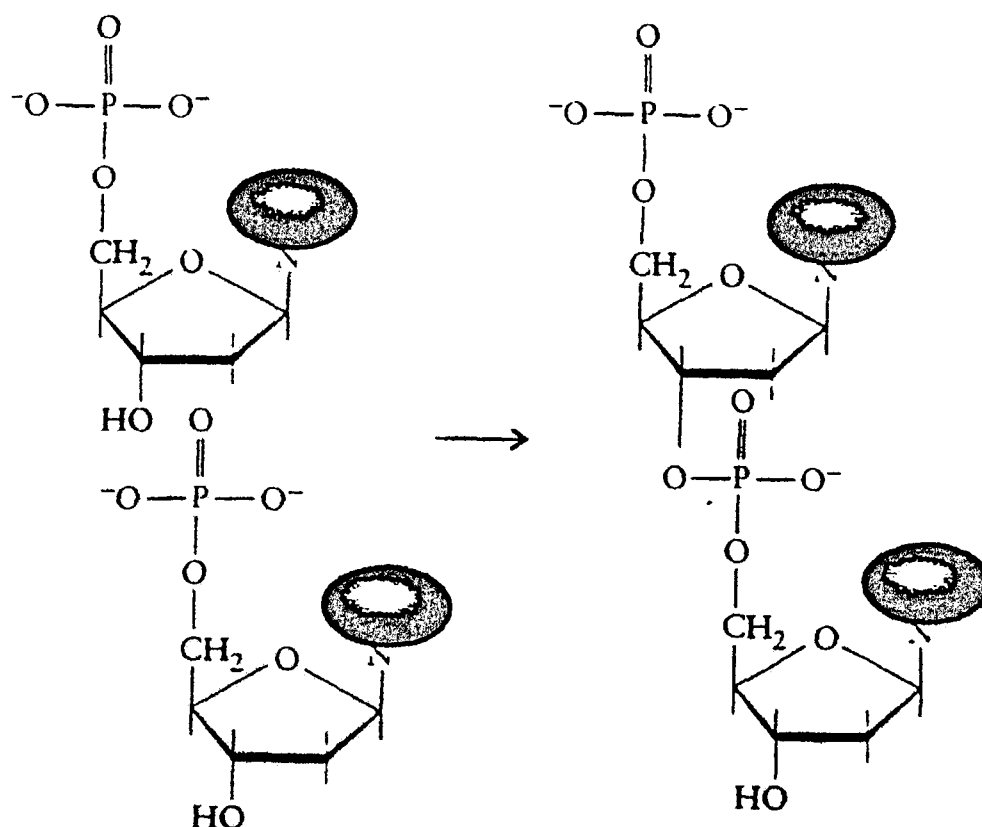


Figura 4: A condensação de nucleotídeos que leva à formação de ácidos nucléicos – um polinucleotídeo¹

Esta é voltada para a direita de modo que as duas fitas enroladas uma em torno da outra apresentam 10 pares de bases a cada passo. A dupla hélice tem diâmetro de 20 Å , mostrando sulcos maiores e menores que se caracterizam por possuir larguras e profundidades diferentes (figura 5)². Existem várias conformações do DNA, três das quais são semelhantes entre si (A, B, C). A forma B (figuras 5 e 8) é encontrada normalmente em solução e *in vivo* , que se converte em A (figura 8) quando o grau de hidratação é reduzido para menos de 75%.

A habilidade do DNA replicar-se consiste na sua estrutura de dupla hélice.

Há uma correspondência precisa entre as bases nas duas fitas¹.

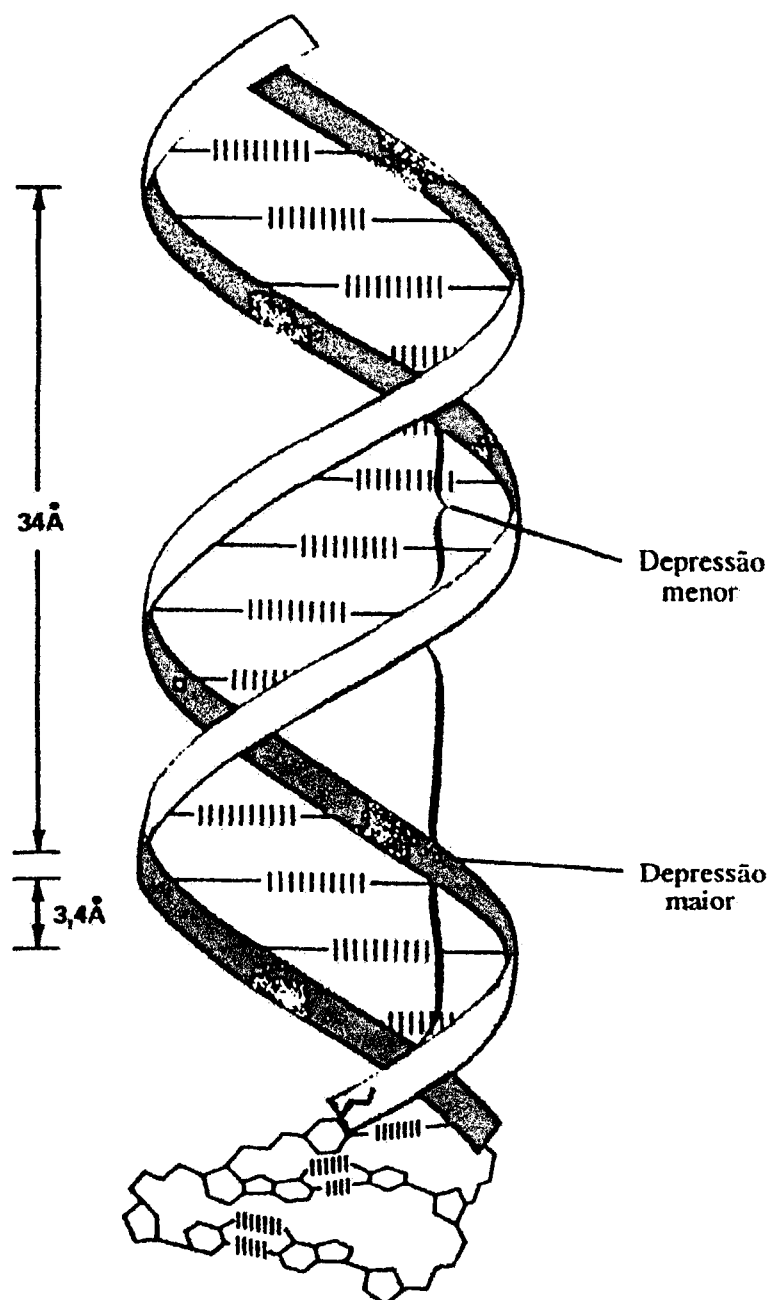


Figura 5 : Modelo diagramático da dupla hélice do DNA (forma B). [De A.

Kornberg, *DNA Replication*, p. 11, Freeman, San Francisco, 1980.]²

A adenina em um fita sempre forma ligações de hidrogênio com a timina na outra fita, e a guanina sempre forma ligações de hidrogênio com a citosina; assim os pares de bases são sempre AT e GC (figura 6), estando cada grupo amino de uma base em umas das fitas ligado a um grupo ceto de outra base na outra fita. As ligações glicosídicas, que unem cada par de bases à cadeia de açúcar – fosfato, possuem a mesma distância entre si (10,85 Å) e são simétricas em relação a um eixo binário localizado no plano do par de bases (figura 7)^{1,2}.

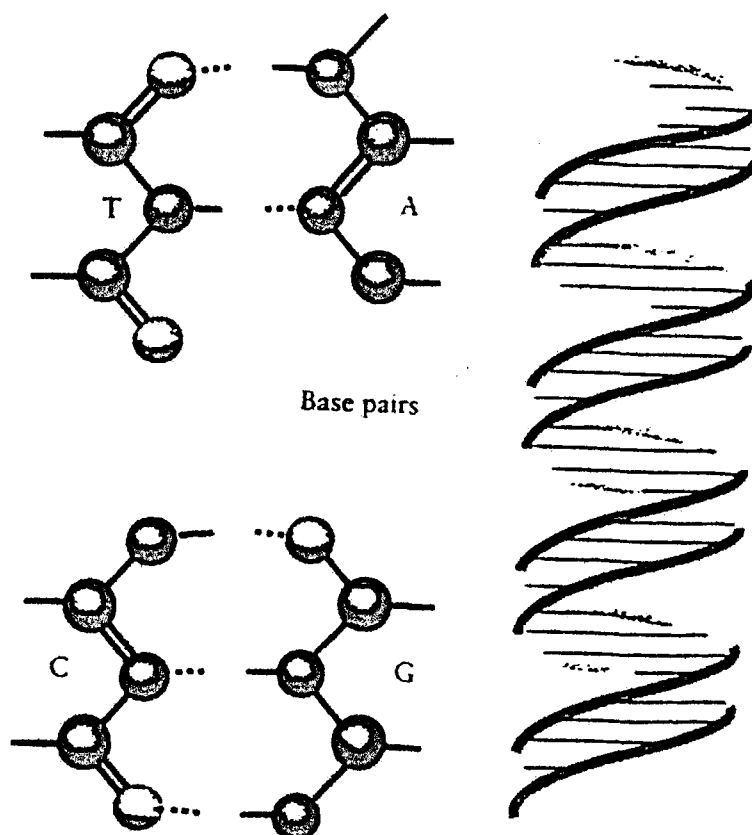


Figura 6: As bases na dupla hélice do DNA encontram – se ligadas através das ligações de hidrogênio que elas formam como mostrado à esquerda. Uma vez formados, os pares AT e GC são quase idênticos em tamanho e forma. Como resultado, os enovelamentos da hélice mostrado à direita são regulares e consistentes¹.

As duas fitas do DNA não são idênticas, mas complementares em termos de pareamento apropriado de bases. Assim, uma fita com ligação 5'-3' e a sequência A,G,G,T,T,C, etc., possui uma outra complementar que apresenta ligação 3'-5' e sequência T,C,C,A,A,G, etc.².

Os planos dos pares de bases adjacentes estão afastados de 3,4 Å; cada par de bases faz um ângulo de 36° em relação a seus vizinhos e cada passo da dupla hélice tem um comprimento de 34 Å (figura 8). Esses valores são para a estrutura "B" do sal sódico de DNA encontrado em fibras com 92% de umidade. Em condições fisiológicas, o número de pares de bases por passo aumenta de 10,0 para 10,4^{2,3}.

Tão bem como a replicação - a produção de cópias de si mesmo para a reprodução e divisão celular - o DNA governa a produção de proteínas por regeneração das moléculas de RNA. Essas moléculas, com U no lugar da T carregam informações sobre segmentos da mensagem genética para fora do núcleo das células animal ou vegetal, para a local onde a síntese de proteína é necessária¹.

A respeito dos espectros eletrônicos, todos os ácidos nucléicos apresentam forte absorção no ultravioleta, com máximo em aproximadamente 260nm. Quando o DNA nativo é alterado, um aumento acentuado da absorbância reflete uma diminuição nas interações por ligações de hidrogênio do DNA, colocando as bases mais expostas à luz que será absorvida³.

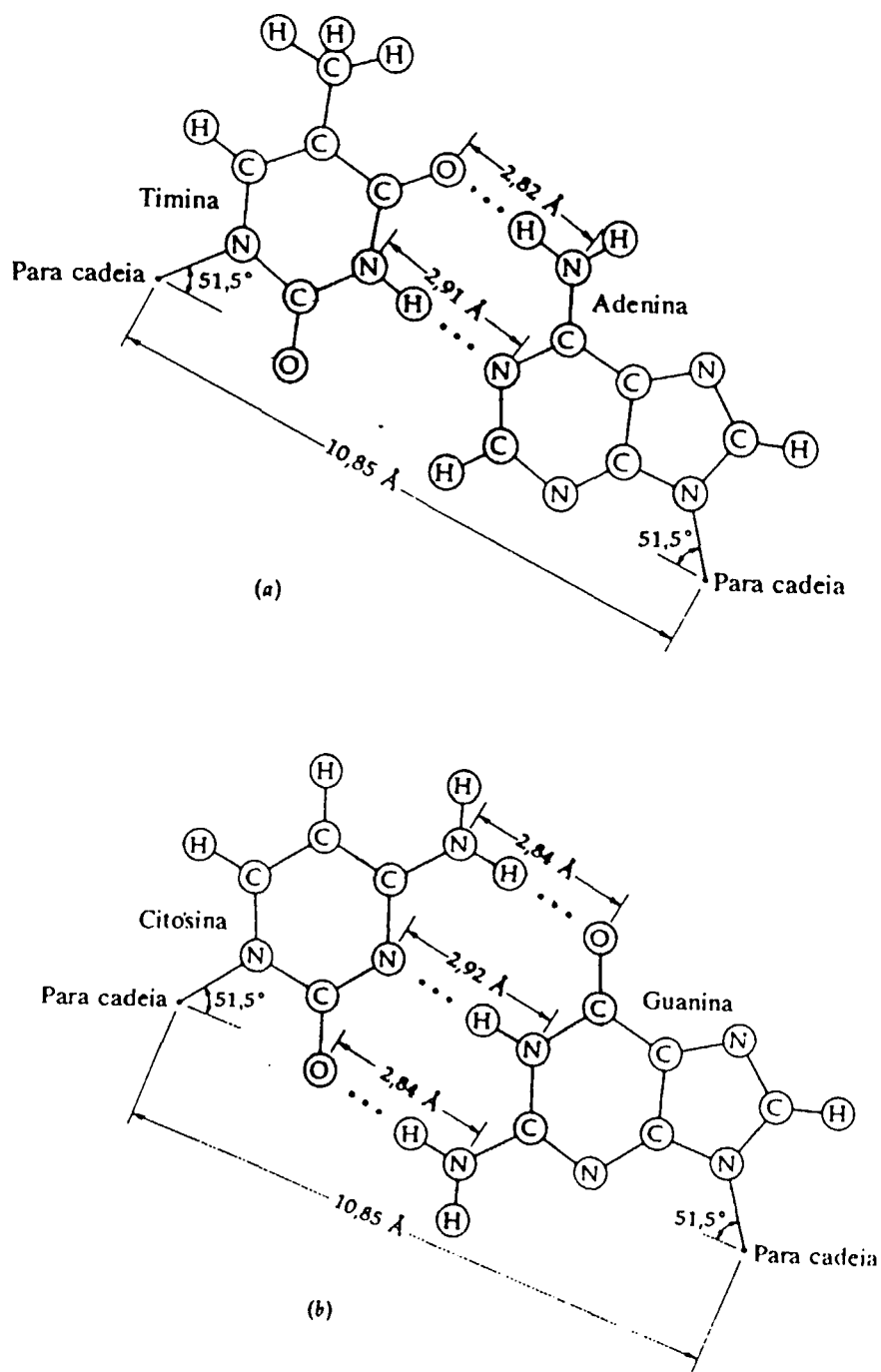


Figura 7 : Dimensões da ligação de hidrogênio da (a) timina com adenina e (b) da citosina com guanina na dupla hélice do DNA . [De M.H.F.Wilkins e S.Arnett, *J.Mol.Biol.*, 11:291 (1965)]².

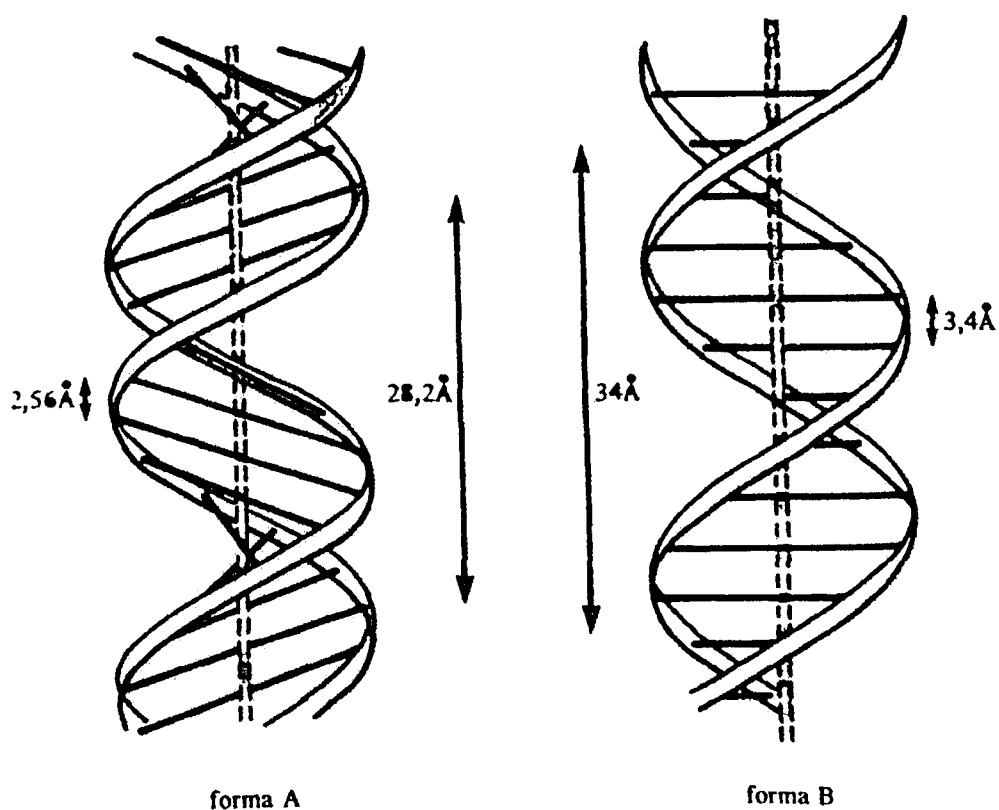


Figura 8 : Representação esquemática da diferença de estrutura entre as formas A e B do DNA. As duas fitas representam as cadeias de fosfato – açúcar, enquanto as barras horizontais indicam a ligação entre os pares de bases. A linha vertical é o eixo da dupla hélice².

II.2. Corantes

As indústrias se desdobram em criatividade e investimentos para lançarem no mercado produtos cada vez mais atrativos, resistentes, saborosos. No caso das indústrias alimentícias, como muitas outras, o visual é muito importante e muitas vezes caracteriza o sabor; daí o papel relevante dos corantes no preparo de doces, balas, chicletes, gelatinas, e outros mais, sendo assim, chamados de aditivos sensoriais, responsáveis por ativar o sentido da visão associado ao paladar.

II.2.1- Vermelho - 40

O corante Vermelho - 40 é composto principalmente pelo sal de sódio do ácido 6-hidroxi-5-[(2- metoxi-5-metil-4-sufofefenil)azo]-2-naftalenosulfônico, da classe monoazo (figura 9). O corante é um pó vermelho que dissolve em água para dar uma solução vermelha em meio ácido e neutro, e uma vermelha escura em meio básico e é levemente solúvel em etanol 95% . Apresenta traços de arsênio, chumbo e mercúrio. É usado em gelatinas, pudins, cremes, bebidas alcóolica e não alcóolicas, molhos, balas, congelados, frutas, sucos, pães, condimentos, carnes e aves^{5,6}.

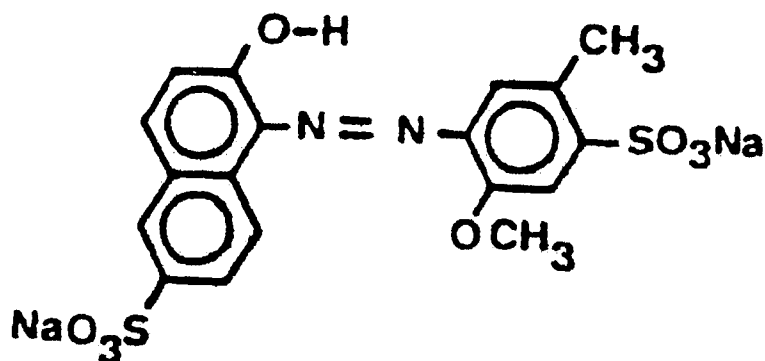


Figura 9 : Representação da molécula do corante Vermelho - 40

Uma solução contendo 16,4mg exibe em p H=7 uma absorbância (A) de 0,87 em λ_{500} e λ_{410} (ombro); em p H=1, A = 0,83 em λ_{490} e λ_{410} (ombro); em p H=13, A = 0,37 em λ_{500} e A = 0,41 em λ_{450} ^{5,6}.

II.2. Tartrazina

O corante Tartrazina ou amarelo n° 5 é o sal trisódico do ácido 5-oxo-1-(p-sulfofenil)-4-[(p-sulfofenil)azo]-2-pirazolina-3-carboxílico, da classe das pirazonas (figura 10). O corante é um pó amarelo - alaranjado que dissolve em água para dar uma solução amarelo dourado em meio neutro e ácido. Quando dissolvido em ácido sulfúrico concentrado ele apresenta uma solução laranja - amarelada que se torna amarela quando diluída em água. Também apresenta traços de arsênio, chumbo e mercúrio^{5,6}.

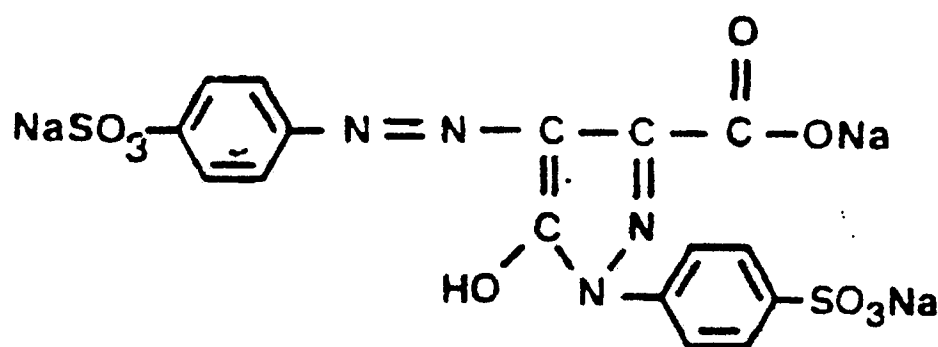


Figura 10 : Representação da molécula do corante Tartrazina

É regularmente usado em sobremesas (sobremesas em pó como pudins, cremes, gelatina, sorvete), balas, conservas, bebidas, carnes preparadas, e vegetais cozidos e enlatados^{5,6}.

Uma solução contendo 19,9mg exibe em pH = 7 uma absorbância de 1,4 em λ_{425} ; em pH = 1, A = 1,1 em λ_{426} ; em pH = 13 absorbância máxima abaixo de λ_{400} ^{5,6}.

II.3- Intercalação

Os ácidos nucléicos interagem com uma variedade de compostos incluindo íons metálicos simples, complexos metálicos, antibióticos, carcinogênicos, etc. Em geral seus modos de interação podem ser de três tipos: intercalação, ligação de "encaixe" e ligação covalente, e estas são frequentemente reforçadas por ligações de hidrogênio e/ou interação coulombica^{17,35}.

Ligações de encaixe, de moléculas pequenas em DNA, envolvem interações diretas da molécula com as bordas dos pares de bases nos sulcos das fitas de DNA. A intercalação envolve a inserção de um sistema de anéis aromáticos, planares ou aproximadamente planares, entre os pares de bases adjacentes. A ligação nos sulcos causa uma ligeira mudança na estrutura do DNA, e a intercalação leva a um alongamento, enrijecimento e desenrolamento do DNA³⁵.

O tratamento do complexo $[Pd(bpy)(en)]^{2-}$ (etilenobipiridínopaladato II) com DNA de "calf thymus" levou a mudanças espectrais caracterizadas por deslocamentos batocrômico e hipocrômico das bandas de absorção dos complexos. As bandas $\pi - \pi^*$ do anel bpy em 307,5 e 319,6 nm são deslocadas respectivamente para 312,7 e 323,7 nm, e suas intensidades reduzidas em cerca de 40% sob excesso de DNA³⁶.

Substâncias que intercalam entre pares de bases do DNA são, geralmente, agentes citotóxicos e mutagênicos potentes, apresentando um grupo cromóforo formado por anéis aromáticos, planares, que podem se inserir na cavidade hidrofóbica dessa macromolécula causando-lhe profundas alterações conformacionais. Em estudos de compostos de intercalação com DNA, encontrou-se que a força dirigente do processo de intercalação envolve uma variedade de interações hidrofóbicas e hidrofílicas com as nucleobases e os grupos fosfato.^{31,36}

Algumas destas substâncias apresentam ação farmacológica importante sendo utilizadas, sozinhas ou combinadas, em quimioterapia de algumas neoplasias. Deste modo, torna-se extremamente importante o estudo das interações entre DNA e essas substâncias buscando-se o entendimento dos equilíbrios envolvidos no processo de intercalação, da estrutura dos complexos formados, das alterações estruturais no DNA provocadas pela acomodação de moléculas entre os pares de

bases, do mecanismo de intercalação, etc. Portanto pode se afirmar que a investigação desses complexos formados é de interesse em química, bioquímica, biofísica, farmacologia e medicina³.

O modo de interação pode ser estudado por uma variedade de técnicas físico-químicas. Embora a cristalografia de raio-x forneça a mais definitiva e precisa informação estrutural, sua aplicação é limitada pelas dificuldades no crescimento de simples cristais de grandes moléculas, tais como as de complexos drogas-ácido nucléico. Recentemente, a espectroscopia vibracional tem se tornado uma ferramenta poderosa na elucidação dos modos de interação em solução, bem como no estado sólido³.

As primeiras evidências sobre a intercalação de compostos aromáticos em DNA vieram de estudos de hidrodinâmica e de difração de raio-x empregando derivados de acridina. O complexo formado entre a substância aromática e o DNA apresenta um difratograma que indica um aumento da separação entre os pares de bases do DNA³.

A intercalação ocorre entre os pares de bases adjacentes e são observadas as seguintes variações na estrutura do DNA: aumento do comprimento da dupla hélice, distorção da cadeia açúcar - fosfato e deformação da estrutura regular helicoidal, nas proximidades dos sítios de intercalação, a qual deforma os sítios vizinhos, tornando-os impróprios para a intercalação³.

Hoje, são conhecidas várias substâncias que podem interagir, via intercalação com o DNA: psoralenos, cloroquina, cloropromazina, brometo de etídeo, iodeto de propídeo, antibióticos, corantes, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, etc. Devido ao sistema cromóforo do intercalante, sua interação com o DNA pode ser seguida por métodos espectroscópicos, os quais fornecem informações espectrais e cinéticas, sobre o processo de intercalação. Estudos cinéticos mostram que este fenômeno, que ocorre na escala temporal de milisegundos, é precedido por um processo rápido de difusão e interação do intercalante com grupos fosfato, podendo haver a formação de complexos oligoméricos³.

De modo geral, as modificações espectrais podem ocorrer nas intensidades, posições e larguras das bandas de absorção, no tempo de vida e polarização espectral da fluorescência³.

II.4. Métodos de Análise

II.4.1 - UV / Visível

Todos os compostos são capazes de absorver radiação eletromagnética, porque todos contém elétrons de valência que podem ser excitados para níveis de energia maiores¹⁶.

A absorção de energia provoca a promoção de elétrons do estado de energia normal a um estado de maior energia, com um tempo de vida curto; os elétrons retornam ao estado excitado de menor energia, e a energia absorvida é devolvida em forma de luz⁷.

A absorção de radiação no UV / Visível é restrita à um número limitado de grupos funcionais (cromóforos) que contém elétrons de valência com energias de excitação relativamente baixas¹⁶.

O espectro eletrônico de moléculas orgânicas poliatômicas, contendo cromóforos, normalmente são complexos, porque a somatória das transições vibracionais nas transições eletrônicas leva a um espectro que é construído por um recobrimento de uma série de bandas estreitas, gerando uma banda larga¹⁶.

Os elétrons que contribuem para as absorções características de uma molécula orgânica são os que participam diretamente na formação da ligação entre os átomos (são absorções associadas a mais que um átomo) ou são elétrons desemparelhados (ou não ligantes) e que estão bastante localizados sobre os átomos, como oxigênio, halogênio, enxofre e nitrogênio. Os elétrons não ligantes são designados pelo símbolo n ¹⁶.

Na figura 11 são mostradas as energias dos vários tipos de Orbitais Moleculares (OM), onde as transições responsáveis pelas absorções podem ocorrer¹⁶.

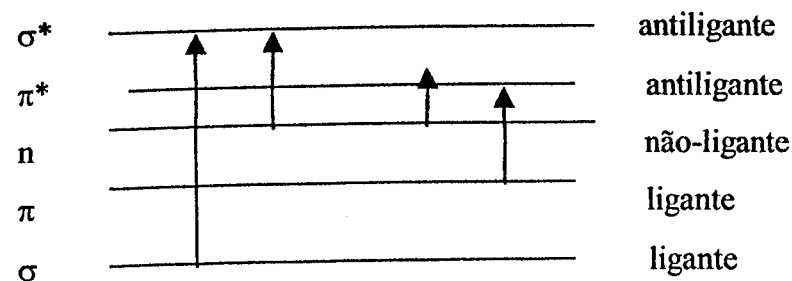


Figura 11: Energia dos vários tipos de orbitais.

As transições são, portanto, de quatro tipos: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$.

As transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ necessitam de energias altas, na região ultravioleta no vácuo (abaixo de 180nm). Um elétron do orbital molecular σ é excitado para o orbital molecular σ^* .

As transições $n \rightarrow \sigma^*$ são geradas por elétrons não ligantes. Necessitam de menor energia que do tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ e ficam entre 150 e 250nm.

A absorvidade (ϵ) deste tipo de absorção normalmente fica entre 100 e 3000 L.cm⁻¹.mol⁻¹.

Quanto às transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, muitas aplicações da espectroscopia de absorção em compostos orgânicos são baseadas nas transições de elétrons n ou π para estados excitados π^* , caindo na faixa de 200 a 700nm. Ambas as transições necessitam de uma ligação insaturada para formar os orbitais π .

As transições $n \rightarrow \pi^*$ apresentam absorvidades molares muito pequenas, estando no intervalo de 10 a 100 L.cm⁻¹.mol⁻¹.

As transições $\pi \rightarrow \pi^*$ têm absorvidades molares de 100 a 1000 vezes maiores.

Os picos das transições $\pi \rightarrow \pi^*$, quando se aumenta a polaridade do solvente geralmente são deslocados para λ menores. Este efeito recebe o nome de deslocamento hipsocrômico ou deslocamento para azul.

Podem ocorrer deslocamentos para λ maiores (mas não sempre), quando se aumenta a polaridade do solvente, nas transições $\pi \rightarrow \pi^*$.

Provavelmente, o efeito hipsocrômico vem devido à um aumento da solvatação do par de elétrons não ligado, abaixando a energia do orbital n ¹⁶.

Um segundo efeito do aumento da polaridade do solvente e que influencia as transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ é o deslocamento para comprimentos de ondas maiores, o efeito batocrômico¹⁶.

Este efeito é pequeno (≤ 5 nm) e pode ser sobreposto, nas transições $n \rightarrow \pi^*$, pelo efeito hipsocrômico. As forças atrativas de polarização entre o solvente e a molécula absorvente tendem a abaixar os níveis de energia dos

estados não-excitados e excitados. O efeito sobre o estado excitado é maior e as diferenças de energia tornam-se menores com o aumento da polaridade do solvente¹⁶.

Por outro lado a deslocalização dos elétrons π , em cromóforos conjugados, abaixa o nível de energia dos orbitais π^* dando-lhes um caráter menos anti-ligante. Como consequência o máximo de absorção é deslocado para comprimentos de onda maiores. Uma interrupção nesta deslocalização de elétrons, causada talvez por uma interação com uma outra molécula, pode trazer o $\lambda_{\text{máx}}$ para comprimentos de onda menores¹⁶.

A principal característica da energia absorvida na região do ultravioleta é a emissão de luz, enquanto que na região do infravermelho é o calor. Assim, a temperatura das substâncias (ou solução) aumenta durante a determinação do espectro de infravermelho. Em ambos, o resultado é a análise da energia transmitida em relação a energia incidente para uma dada frequência. Ocasionalmente, a energia absorvida pode induzir reações fotoquímicas⁷.

A lei de Bouquer - Lambert - Beer forma a base matemática - física das medidas de absorção de luz nos gases e soluções, nas regiões do UV/ Visível e Infravermelho (IV)⁸.

$$\log \left[\frac{I_0}{I} \right]_{\nu} = \log \left[\frac{100}{T(\%)} \right]_{\nu} \equiv A_{\nu} = \epsilon_{\nu} \cdot c \cdot d,$$

onde:

$$A_{\nu} = \log \left[\frac{I_0}{I} \right]_{\nu} \text{ é a absorbância,}$$

$$T_{\nu} = \left[\frac{I}{I_0} \right] \cdot 100 \text{ em \% é a transmitância,}$$

ϵ é o coeficiente de extinção molar.

ν é o comprimento de onda da medida.

I_0 é a intensidade da luz monocromática inserida na amostra e I é a intensidade da emergida a partir da amostra; C é a concentração da substância absorvente da luz em mol. dm^{-3} e d é o comprimento do caminho da amostra em cm ⁸.

A absorção no ultravioleta e no visível é causada especialmente por excitação eletrônica e o espectro fornece informações limitadas com relação à estrutura da molécula.

II.4.2- Fluorescência

Certas espécies químicas são capazes de absorver radiações em um curto comprimento de onda, e , depois, emitir radiação de comprimento de onda maior. A emissão que segue, relacionada com a queda da energia da molécula do mais baixo nível vibracional do estado eletrônico excitado, para um dos estados vibracionais excitados do nível eletrônico fundamental, constitui o espectro de fluorescência, quando a modificação de spin de ambos os elétrons for 1^o.

Uma espécie fluorescente emite seu espectro de fluorescência após absorver radiação em alguma parte dentro do seu espectro de excitação. O espectro de fluorescência aparece no lado do comprimento de onda maior, da banda de absorção de maior comprimento de onda, na forma de uma série de bandas de emissão. A relação qualitativa se faz com a distribuição espectral da radiação de fluorescência da substância fluorescente⁹.

A magnitude da fluorescência total depende da concentração da espécie fluorescente na solução. De acordo com a lei de Beer, a absorbância é diretamente proporcional à concentração. A fração da energia radiante transmitida é:⁹

$$\frac{P}{P_0} = e^{-\epsilon bc}$$

Por conseguinte, a correspondente fração absorvida é:

$$1 - \frac{P}{P_0} (1 - e^{-\epsilon bc})$$

Mediante a redistribuição da equação anterior, acha-se a quantidade de energia radiante absorvida⁹:

$$P_0 - P = P_0 (1 - e^{-\epsilon bc})$$

A intensidade da fluorescência total é igual à razão da absorção da energia radiante (fótons por unidade de tempo) multiplicada pela eficiência quântica da fluorescência,:

$$F = (P_0 - P)\phi$$

de onde,

$$F = \phi P_0 (1 - e^{-\epsilon bc})^9.$$

No caso de soluções muito diluídas quando apenas uma pequena fração da energia radiante é absorvida (isto é, o termo ϵbc não maior que 0,05), a equação anterior pode ser simplificada para⁹:

$$F = K \phi P_0 \epsilon b c,$$

em que K é uma constante instrumental; a fluorescência é emitida em todas as direções observadas apenas através de uma abertura limitada.⁹

Na análise fluorimétrica, é preciso ter em conta a eventual interferência de substâncias estranhas, que podem:

- a) absorver radiação excitadora
- b) absorver radiação emitida e
- c) emitir fluorescência própria,
- d) ou ainda, a substância fluorescente pode sofrer decomposição pela ação da radiação ultravioleta⁹.

II.4.3- Fotoquímica

Alguns dos processos fotoquímicos mais complexos ocorrem na natureza. Os processos naturais de fotossíntese, visão, pigmentação da pele, aceleração do crescimento pela luz são intrincados de reações fotoquímicas, etapas de transferências de energia, interconversões químicas, etc.⁴.

Uma reação fotoquímica ocorre quando uma molécula é elevada a partir do seu estado eletrônico fundamental para um estado superior de energia. Neste estado superior, a molécula pode seguir uma variedade de caminhos de reação. Dessa forma, a fotoquímica é relacionada com moléculas eletronicamente excitadas e as mudanças que elas sofrem. Cada espécie excitada pode ser produzida em uma variedade de formas, mas o método mais comumente usado para sua geração é através da absorção de um fóton de luz ultravioleta ou luz visível por uma molécula. Como consequência, os fotoquímicos tem um interesse em espectroscopia molecular, e o espectro de absorção ultravioleta / visível de compostos prevê informações essenciais sobre os comprimentos de onda que são absorvidos por uma dada molécula. A absorção é um pré - requisito para qualquer processo fotoquímico, desde que somente a luz que é absorvida possa conduzir até uma mudança fotoquímica. O espectro de absorção também dá uma indicação dos comprimentos de onda requeridos para obter diferentes estados eletronicamente excitados, desde que cada comprimento de onda de absorção maior, corresponda a uma transição para um estado diferente. Entretanto, nem todas as transições resultam em uma banda de absorção distinta e observável¹⁰.

O processo pelo qual os estados excitados são formados, suas propriedades físicas e os passos para o decaimento físico são todos de interesse considerável¹⁰.

P A R T E

E X P E R I M E N T A L

III. Parte Experimental

III.1- Reagentes

- DNA ("calf timus") – Sigma Chemical
- Vermelho-40 – doação da fábrica de balas "Princezinha"-Uberlândia; PM. = 496,54g.mol⁻¹
- Tartrazina (90 %) – Vetec; PM. = 534,37g.mol⁻¹
- KH₂PO₄ – Ecibra – 99%
- K₂HPO₄ – Art Lab – 99%
- Resina Sefacril-400 (S-400) - Pharmacia

Todas as soluções foram feitas utilizando-se água deionizada.

III.2. Equipamentos

- Espectrofotômetro UV - Visível – Genesys 5 - Espectronic
- Micro balança – Sartorius M2P
- Balança Analítica – Ohaus
- pHmetro – EPL 358
- Deionizador – Milli - Q Plus – Millipore
- Fluorímetro – Espectrofluorímetro Hitachi F-4500
- Câmara fotoquímica
- Coluna de separação
- Bomba peristáltica – Pharmacia LKB-Pump P-1

III.3- Preparo das Soluções

III.3.1- Solução estoque de DNA

Pesou - se na micro balança 0,090mg de DNA, colocou-se num balão de 5,0mL e adicionou água deionizada resfriada até completar o volume do balão ($18\mu\text{g.mL}^{-1}$). O balão foi movimentado manual e lentamente até não mais observar-se resíduos de DNA, foi envolvido em papel alumínio e mantido na geladeira durante a análise. Durante a homogeneização a solução foi monitorada, fazendo-se leituras de absorção, na região ultravioleta, de amostras coletadas na superfície e no fundo do balão, até que os resultados se tornassem reprodutíveis. Esta solução foi preparada a cada novo conjunto de medidas. A concentração de fosfato presente no DNA foi determinada espectroscopicamente, utilizando-se o coeficiente de extinção, $\epsilon = 6600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L cm}^{-1} (260\text{nm})^3$, fazendo-se a diluição para $9,0\mu\text{g.mL}^{-1}$, em tampão fosfato pH=7,0; a concentração de sítios de intercalação (S DNA) por PDNA / 2, foi determinada

III.3.2 Solução estoque de Vermelho - 40

Pesou-se na balança analítica 99,31mg do corante; a massa foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 1000mL e o volume completado com água deionizada ($2,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$). Em seguida foram registrados espectros de absorção da região do UV / Visível usando-se, cubetas de 1mL com caminho ótico de 1cm e uma solução diluída a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato pH7,0.

III.3.3- Solução Estoque de Tartrazina

Pesou-se na balança analítica 106,87mg do corante; a massa foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 1000mL e o volume completado com água deionizada ($2,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$). Em seguida foram registrados espectros de absorção da região do UV / Visível usando-se cubetas de 1mL com caminho ótico de 1cm e uma solução diluída a $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato pH=7,0.

III.3.4- Solução tampão fosfato pH= 7,0

Pesou-se na balança analítica 14,30g de KH_2PO_4 , 68,80g de K_2HPO_4 e transferiu - se quantitativamente ambas as massas para um balão volumétrico de 1000mL; completou-se o volume com água deionizada. Em seguida homogeneizou-se a solução e fez-se as medidas de pH para controle.

III.3.5- Solução para análise na região UV / Visível

Foram retiradas alíquotas de 2,5mL da solução estoque de DNA, 1,25mL da solução tampão fosfato e 1,25mL da solução estoque do corante, transferida para um balão de 5mL, misturadas manual e lentamente. Em seguida, registraram-se os espectros de absorção, em cubetas de 1mL, com caminho ótico de 1cm.

III.3.6- Solução para análise de fluorescência

Foram retiradas alíquotas de 2mL das soluções aquosas estoque dos corantes, transferidas para a cubeta do aparelho e registrados os espectros de fluorescência. Foram feitas diluições dessas soluções estoque, até diluição infinita, em água e em dioxano, e novamente registrados os espectros de fluorescência .

III.3.7- Soluções para análise sob incidência de luz

III.3.7.1- Vermelho-40

Alíquotas de soluções de DNA ($9,0\mu\text{g. mL}^{-1}$) , Vermelho-40 ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) e DNA/Vermelho-40 (tamponada) foram colocadas respectivamente em um reator, a 10 cm da fonte de radiação UV/ Visível (lâmpada de mercúrio de média pressão, de 400W), e iluminadas durante 2 minutos, com resfriamento feito com fluxo contínuo de água. A radiação foi selecionada utilizando-se um filtro amarelo que permitia a radiação acima de 490nm (visível).

III.3.7.2- Tartrazina

Aliquotas de soluções de DNA ($9,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$), Tartrazina ($5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$) e DNA/ Tartrazina (tamponada) foram colocadas respectivamente em um reator, a 10 cm da fonte de radiação Visível (lâmpada incandescente, de filamento de tungstênio, azul), e fotolisadas durante 2 minutos, com resfriamento feito com fluxo contínuo de água.

III.3.8- Cromatografia de coluna

Amostras de $150 \mu\text{L}$ da mistura DNA/Vermelho-40 e DNA/Tartrazina, $18 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, respectivamente, foram injetadas em uma coluna de 10 cm de comprimento, com 0,5 cm de diâmetro, preenchida com 1,5 mL de resina S-400 e eluídas com solução tampão-fosfato ($\text{pH}=7$), por cinco vezes o volume da coluna. Para facilitar o fluxo usou-se uma bomba peristáltica, numa velocidade de fluxo de aproximadamente $600 \mu\text{L/min}$. As aliquotas coletadas corresponderam à frações de $600 \mu\text{L}$. Em seguida, registraram-se leituras de absorção, em cubetas de $600 \mu\text{L}$, com caminho ótico de 1cm.

III.4 Curvas de Calibração

III.4.1- Curvas de Calibração do DNA

Preparou-se soluções aquosas de concentração: 5,0: 10,0: 20,0: 40,0 e $60,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em seguida foram registradas as leituras de absorção em 260nm e traçada a curva de calibração.

III.4.2- Curva de Calibração do Vermelho - 40

Preparou-se, por diluição da solução estoque, soluções aquosas do corante de concentração: $5,0 \times 10^{-5}$; $2,5 \times 10^{-5}$, $1,25 \times 10^{-5}$ e $0,625 \times 10^{-5} \text{ mol. L}^{-1}$. Em seguida foram registradas as leituras de absorção em 502nm e traçada a curva de calibração.

III.4.3- Curva de Calibração da Tartrazina

Preparou-se, por diluição da solução estoque, soluções de concentração: $5,0 \times 10^{-5}$; $2,5 \times 10^{-5}$ e $1,25 \times 10^{-5}$ e $0,625 \times 10^{-5}$ mol. L⁻¹. Em seguida foram registradas as leituras de absorção em 427nm e traçada a curva de calibração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV - Resultados e Discussão

IV.1- Espectros de UV/Visível das soluções

As figuras IV.1, IV.2 e IV.3 mostram os espectros de absorção na região do UV/ Visível, das soluções de DNA, Vermelho - 40 e Tartrazina, respectivamente.

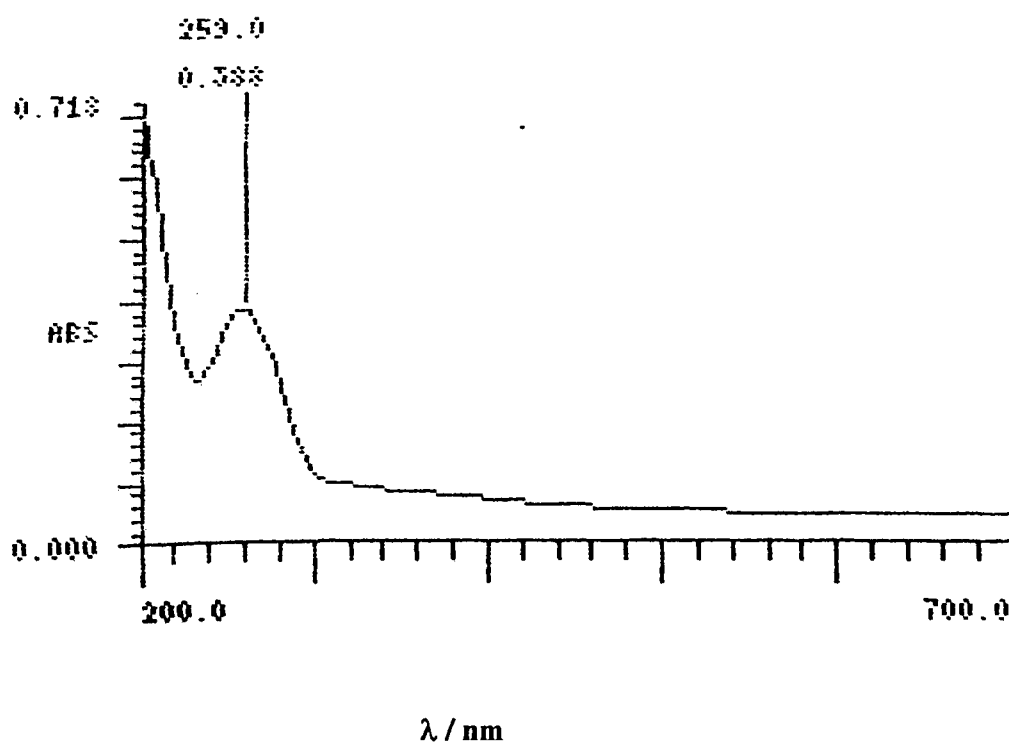


Figura IV.1- Espectro de absorção de DNA $9,0 \mu\text{g. mL}^{-1}$, em tampão fosfato, pH= 7,0.

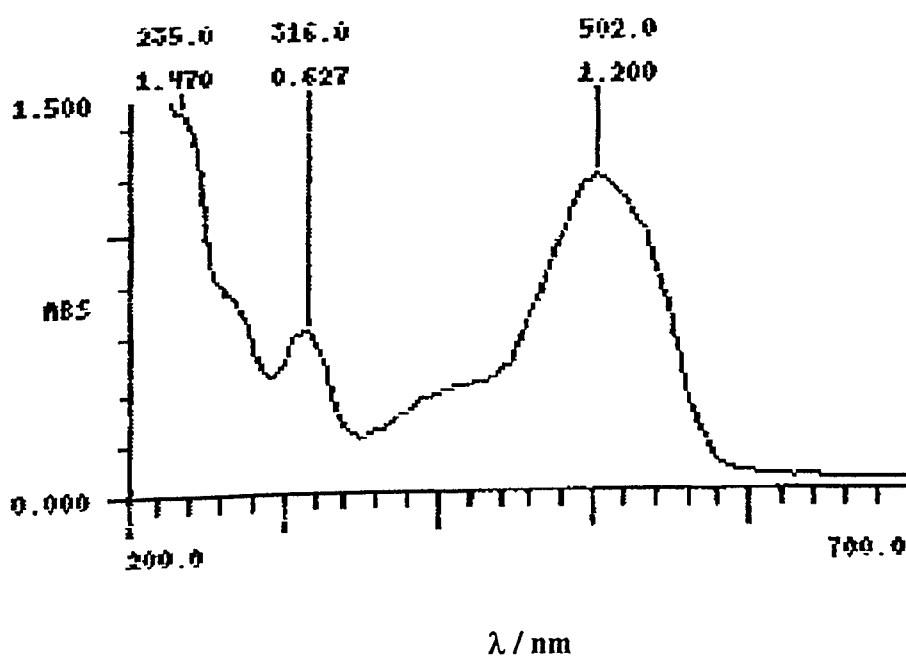


Figura IV.2- Espectro de absorção do Vermelho - 40, $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, em tampão fosfato, pH= 7,0.

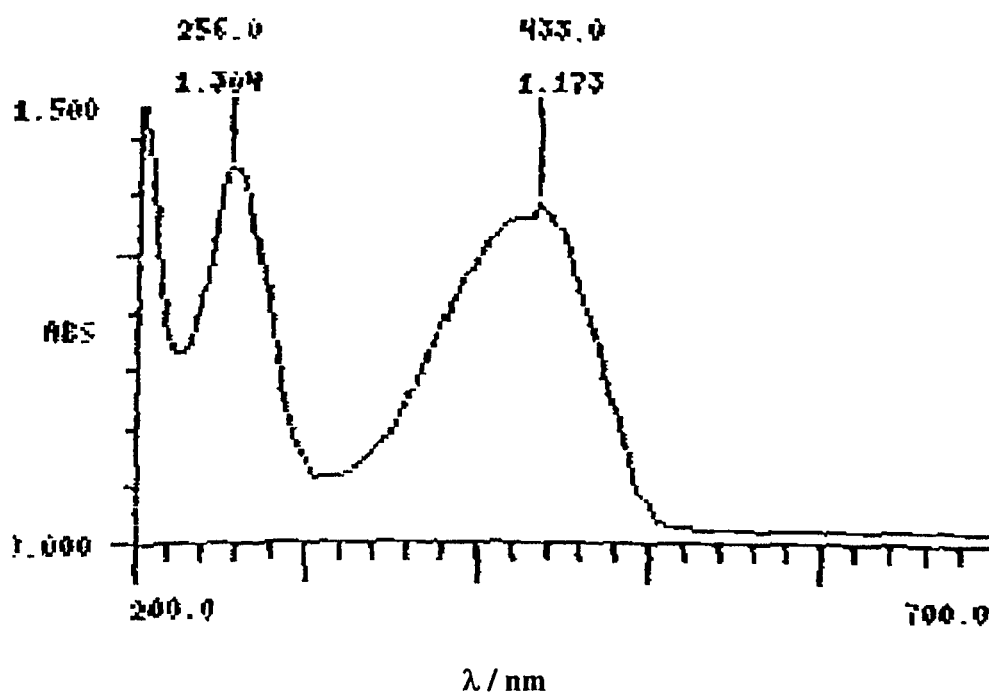


Figura IV.3- Espectro de absorção da Tartrazina, $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, em tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$.

IV.2- Curvas de Calibração

As figuras IV.4 , IV.5 e IV.6 mostram as curvas de calibração do DNA, Vermelho - 40 e Tartrazina, respectivamente.

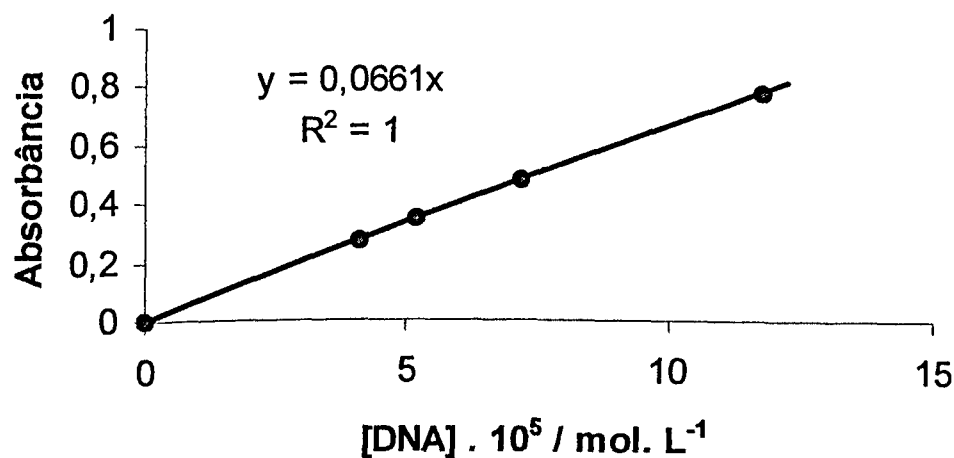


Figura IV.4 -Curva de calibração do DNA ($\lambda = 259$), em solução aquosa, nas concentrações: $4,13 \times 10^{-5}$; $5,22 \times 10^{-5}$; $7,19 \times 10^{-5}$ e $11,8 \times 10^{-5}$ mol.L⁻¹.

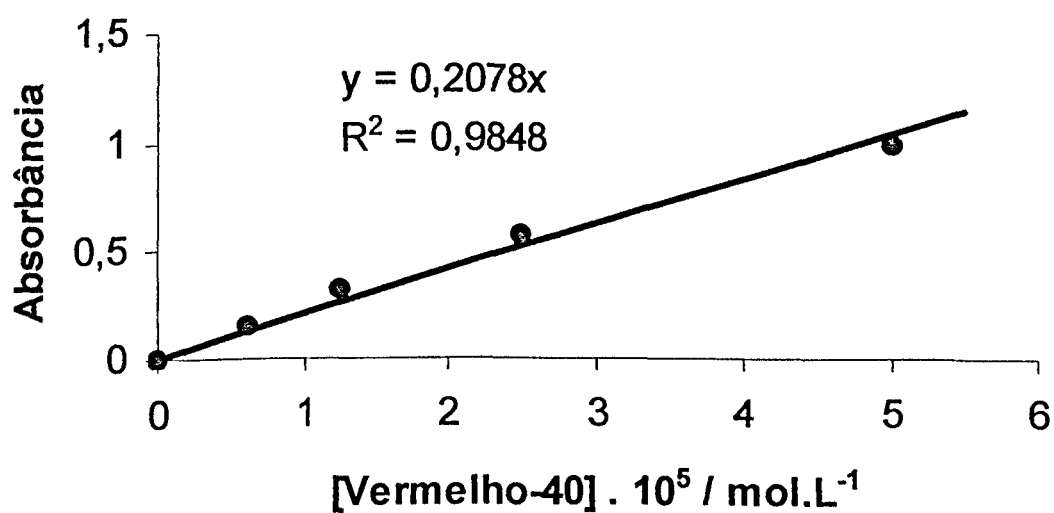


Figura IV.5- Curva de calibração do Vermelho-40, em solução aquosa, nas concentrações: $6,25 \times 10^{-6}$; $1,25 \times 10^{-5}$; $2,5 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-5} mol.L^{-1}$.

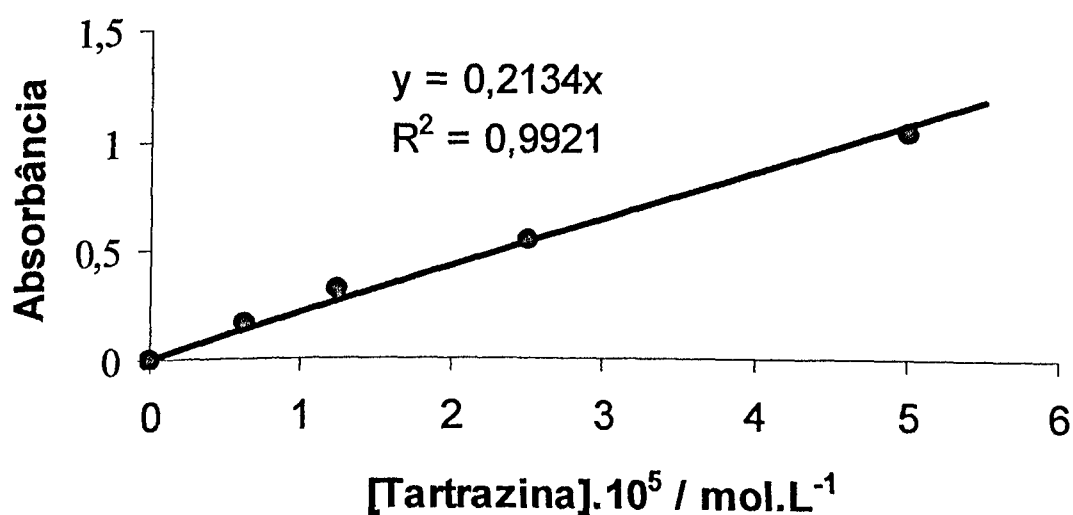


Figura IV.6- Curva de calibração da Tartrazina em solução aquosa, nas nas concentrações : $6,25 \times 10^{-6}$; $1,25 \times 10^{-5}$; $2,5 \times 10^{-5}$; $5,0 \times 10^{-5}$ mol.L^{-1} .

A fluorescência do Vermelho – 40 e Tartrazina em água não pôde ser detectada; usou – se então o solvente dioxano como uma alternativa de suprimir a polaridade do meio. Novamente, nenhuma fluorescência pôde ser detectada em ambos os corantes. Em função desta propriedade, as discussões foram realizadas utilizando – se a técnica UV / Visível.

O coeficiente de extinção molar (ϵ), para o Vermelho-40, segundo a curva de calibração obtida na Figura IV-5, é de $20780 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$; para a Tartrazina, segundo a curva de calibração obtida na Figura IV-6, é de $21340 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$. Para o DNA, o coeficiente de extinção molar encontrado é de $6610 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, valor este calculado através da inclinação da curva de calibração (Figura IV-4), expressa em valores de concentração molar dos grupos fosfatos, conforme literatura^{3,21}. O valor de ϵ , em água, aceito na literatura é de $6.600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.²²

O estudo sobre o coeficiente de extinção molar do DNA foi necessário para verificar se o valor de ϵ para as soluções de DNA, estavam de acordo com a literatura²².

Para se verificar a pureza e integridade do DNA, usou – se a relação A_{260} / A_{280} ($0,388 / 0,220$) (Figura IV-4) ; razão entre a absorbância do DNA no seu comprimento de onda característico, 260nm, e o valor do comprimento de onda 280nm, característico da presença de proteínas. O valor obtido foi de 1,8, estando dentro dos valores considerados na literatura (1,8 – 2,0) e sendo aceito em estudos sobre interações entre substâncias químicas e o DNA²³.

IV.3- Espectros de UV/Visível das Misturas

Os espectros a seguir mostram as análises de UV - Visível das misturas da solução de DNA com os corantes Vermelho - 40 (figura IV.7) e Tartrazina (figura IV.8), em meio tamponado, com uma solução de DNA.

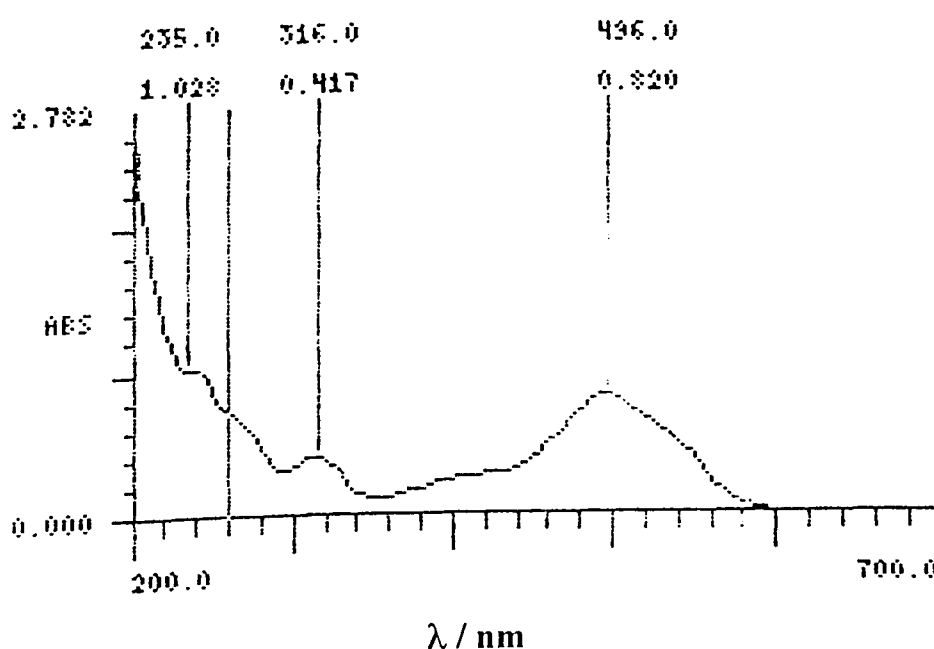


Figura IV.7- Espectro de absorção da mistura de DNA $9,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e Vermelho - 40 $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato pH 7,0.

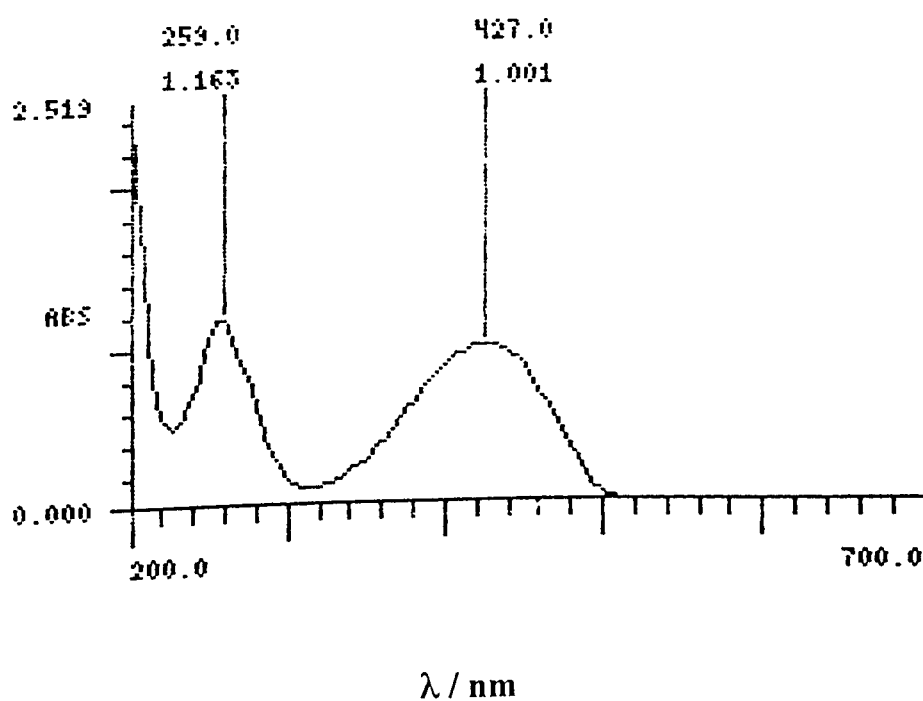


Figura IV.8- Espectro da mistura DNA $9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e Tartrazina $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato pH 7,0.

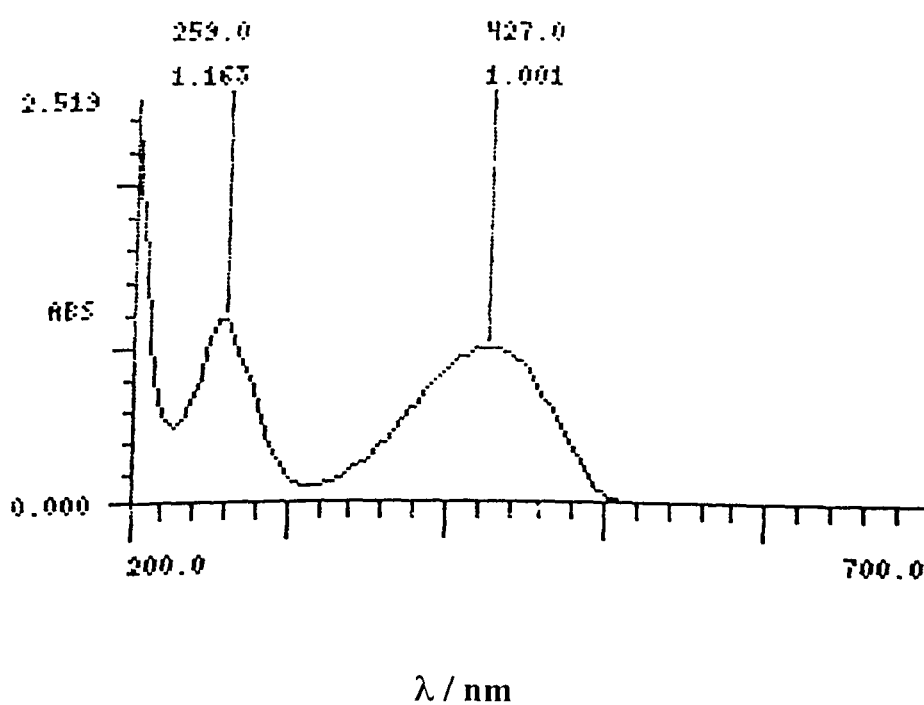


Figura IV.8- Espectro da mistura DNA $9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e Tartrazina $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato pH 7,0.

O fenômeno da intercalação foi acompanhado pela diminuição da absorção de ambos os corantes, além do aumento na absorção do DNA. Isto se deu porque um aumento da absorbância em 259nm, pode ser atribuído à própria absorção do corante Tartrazina, que apresenta um pico de absorção em 259 nm. Este fato impede, portanto, neste caso, de se atribuir o aumento da absorção em 259nm, unicamente às mudanças estruturais sofridas no DNA pela intercalação.

Os dados obtidos nas figuras IV.1 a IV.8, estão incluídos na Tabela 1. Observa-se nesta Tabela uma diminuição na absorção no λ_{496} do Vermelho-40, de 1,200 para 0,820, o que corresponde a uma diminuição da concentração livre deste corante de cerca de $1,58 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$; esta diminuição da concentração pode estar relacionada à intercalação das moléculas corante entre os pares de bases adjacentes do DNA.

Observa-se na Tabela 1, que a absorbância do DNA (sabe-se da literatura, que a absorbância do DNA em 259nm é, principalmente devido à guanosina^{19, 21}), tem um aumento na absorção de 0,388 para 0,722 (86,0%), quando na presença do Vermelho-40. Uma vez que não se pode descartar a ação da DNase, embora se tenha tomado todos os cuidados quanto à esterilização, este aumento na absorção do DNA, pode estar representando dois efeitos que se somam: a quebra do DNA pela DNase e a intercalação do corante Vermelho-40 no DNA. Ambos os fatores, expõem a guanosina do DNA aos efeitos de absorção no ultravioleta, aumentando a concentração da espécie absorvente.

Tabela 1- Leituras dos comprimentos de onda e absorbância do DNA, Vermelho-40 e Tartrazina, isolados e nas respectivas misturas, *in vitro*.

	Concentração	$\lambda_{\text{máx.}}$	Absorbância
DNA	9,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	259nm	0,388
V-40	5,0 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	502nm	1,200
TARTRAZINA	5,0 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	259nm	1,304
		427nm	1,173
DNA + V-40	9,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	259nm	0,722
	5,0 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	496nm	0,820
DNA + TARTRAZINA	9,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	259nm	1,163
	5,0 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	427nm	1,001

O efeito da intercalação é corroborado pelo aumento na absorção de 31,7% da absorbância, no λ característico do Vermelho-40 (de 1,200 para 0,820), quando este é adicionado à solução de DNA, indicando que há menos espécie absorvente livre do corante.

Observa-se também que houve um pequeno efeito hipsocrômico de 502 para 496nm no Vermelho-40, quando na mistura com DNA. A espectroscopia de absorção revela que a adição de soluções flavopiridol a DNA leva a um deslocamento do comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx.}}$)³⁰.

Isto pode indicar um aumento da polaridade do meio e que provavelmente, as transições observadas no Vermelho-40 são do tipo $n \rightarrow \pi^*$. Pode ser também, que os pares de elétrons não ligados dos grupos funcionais hidroxila, sulfônico e metoxi da molécula Vermelho-40 devem estar ligados às bases do DNA, abaixando a energia do orbital n . Os elétrons não-ligantes (n) do corante Vermelho-40 podem estar interagindo com os elétrons π das bases do DNA, particularmente a guanosina, dando um efeito de estabilização do estado π^* do corante, abaixando sua energia. Uma outra possibilidade é, que na interação DNA/Vermelho-40, a deslocalização dos elétrons na molécula do corante esteja

sendo interrompida pela ligação com as bases do DNA abaixando o $\lambda_{\text{máx}}$ para um comprimento de onda menor.

Para a solução de DNA com Tartrazina o aumento na absorbância, em 259nm, foi de 0,388 (DNA) para 1,163 (DNA mais corante), bem mais de 100%. Porém, em 259nm, a Tartrazina, assim como DNA, também apresenta absorbância, o que impede uma comparação neste λ .

Observa-se, pela figura IV.7, que no comprimento de onda da Tartrazina, 427nm, a absorbância da solução vai de 1,173 para 1,001, uma diminuição de 14,7%, não havendo neste caso efeito de deslocamento de banda, o que leva a inferir que, com a Tartrazina não deve ocorrer mudança na polaridade do meio. A queda de 14,7% na concentração do corante Tartrazina e a não modificação no $\lambda_{\text{máx}}$ indica que, provavelmente, houve uma ligação DNA/corante, sem modificações detectáveis, na energia dos orbitais n e π^* da Tartrazina.

Este decréscimo na absorbância no $\lambda_{\text{máx}}$ da Tartrazina, de 1,173 para 1,001, corresponde a uma diminuição da concentração livre deste corante de cerca de $7,33 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$; assim como para o Vermelho-40, esta diminuição da concentração de Tartrazina pode estar relacionada à intercalação do corante entre os pares de bases adjacentes do DNA.

Quando se compara as soluções de DNA com Tartrazina e DNA com Vermelho-40, na mesma concentração de corante, observa-se uma queda de 18,1% na absorbância da solução DNA/Vermelho-40 ($\lambda_{496} = 0,820$) em relação à solução DNA/Tartrazina ($\lambda_{427} = 1,001$).

Isto leva a supor que, se ocorre a formação de um composto de intercalação DNA/corante, esta diferença na porcentagem de intercalação entre os dois corantes, pode indicar uma maior planaridade da molécula Tartrazina que na de Vermelho-40, facilitando a sua entrada entre os “enovelamentos” do DNA.

Como a molécula de Vermelho-40 não é totalmente planar (Figura IV-9)²⁰, pode-se inferir que a sua entrada provoca uma maior expansão do DNA, aumentando sua absorbância. Estudos usando modelagem molecular seriam indicados para elucidar estas interações DNA/Vermelho-40³⁴, visto que não existem dados experimentais acerca da estrutura de complexos de intercalação formados pela maioria das substâncias. Sabe-se que podem ocorrer

diferenças significantes na conformação da cadeia lateral do DNA, e que as mesmas são induzidas por interações eletrostáticas, bem como, por interações de Van der Waals entre o intercalador e o DNA³².

Resultados relevantes, tais como o número de sítios (S_{DNA}), a concentração de DNA (expressa em grupos fosfato- $[P_{DNA}]$), o número de pares de bases por molécula do intercalador (R) e a concentração dos corantes intercaladores, já mencionados acima, podem ser obtidos através de cálculos simples, como seguem:

- $[P_{DNA}]_{inicial} = 5,88 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (obtida através da relação da Lei de Lambert-Beer, usando $\epsilon = 6600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)
- $[S_{DNA}] = [P_{DNA}] / 2 = 2,94 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (a cada dois grupos fosfatos corresponde um sítio de intercalação)

Para o corante Vermelho – 40:

- $[S_{DNA}]_{Livre} = [P_{DNA}] / 2 - [V-40]_{intercalado} = 1,36 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$
- $[P_{DNA}]_{Livre} = [P_{DNA}]_{inicial} - [V-40]_{intercalado} = 4,3 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$
- $R = [S_{DNA}] / [V-40]_{intercalado} = 1,86$, ou seja, aproximadamente, dois pares de bases do DNA por molécula do Vermelho – 40 intercalada

Para o corante Tartrazina:

- $[S_{DNA}]_{Livre} = [P_{DNA}] / 2 - [Tartrazina]_{intercalado} = 2,21 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$
- $[P_{DNA}]_{Livre} = [P_{DNA}]_{inicial} - [Tartrazina]_{intercalado} = 5,15 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$
- $R = [S_{DNA}] / [Tartrazina]_{intercalado} = 4,0$, ou seja, quatro pares de bases do DNA por molécula de Tartrazina intercalada.

Os valores de R (1,86 para o Vermelho-40 e 4,0 para a Tartrazina) reforçam o fato de que a molécula do corante Tartrazina, tendo maior planaridade do que a molécula do corante Vermelho-40 (Figura IV-9), inviabiliza uma maior quantidade bases para intercalar. A molécula dietídio (2,7-diamino-9-[2,7-diamino-10-N-fenantridio]10-N-fenatridio), por exemplo, dada a sua estrutura com dois planos perpendiculares, apresenta para cada um deles excelentes propriedades de intercalação³³. Cada molécula do Vermelho-40, em função da sua disposição espacial, pode estar interagindo com o DNA pelos dois mecanismos propostos na literatura^{24, 25}, ou seja, parte da molécula intercala e parte interage externamente na superfície do DNA, inviabilizando o sítio adjacente, não só diminuindo a distância entre as voltas do DNA, mas também bloqueando a sua entrada.

Para garantir a neutralidade elétrica entre os grupos fosfatos, encontram-se cátions como Na^+ e Mg^{2+} . Para que ocorra a intercalação, os corantes devem competir com esses, retirando-os, o que leva a pensar que estes corantes podem induzir a perda de íons metálicos, tão necessários à manutenção das necessidades biológicas.

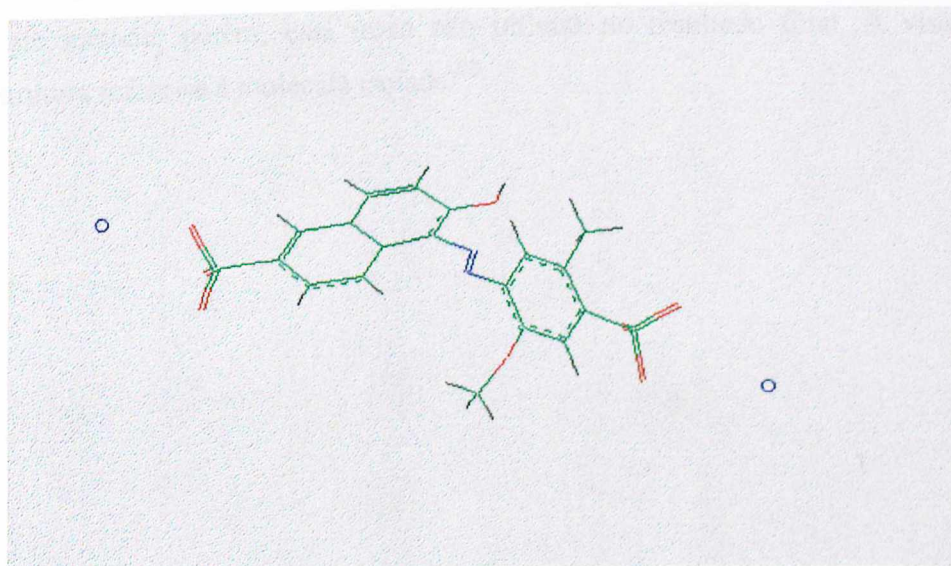
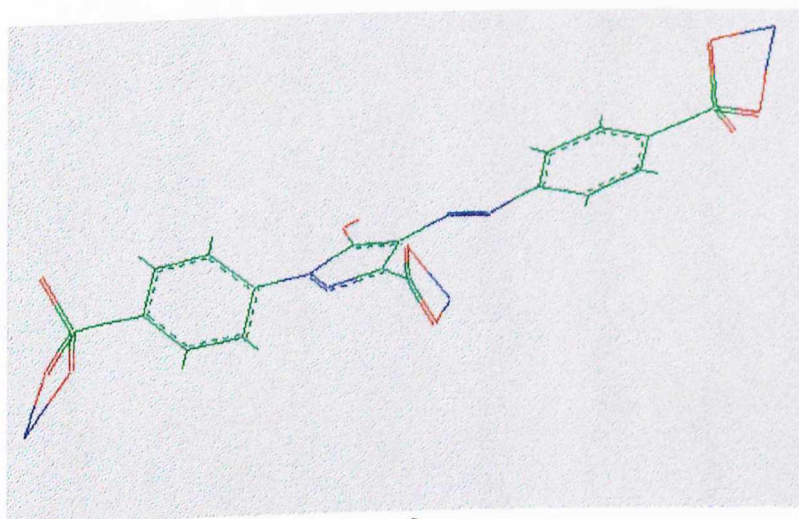
**a****b**

Figura IV.9 : Estrutura espacial das moléculas : a- Vermelho – 40; b- Tartrazina²⁰.

Estas estruturas apresentadas na figura IV.9 foram obtidas através da otimização, feita empregando o método semi-empírico MNDO. Durante a modelagem, os cátions presentes são íons lítio, pois o sódio não é parametrizado neste método, porém, essa troca não influirá no resultado final. A visão da estrutura refere-se à molécula isolada⁽²⁰⁾.

IV.4- Espectros de UV/Visível após a incidência de luz

As figuras IV.10, IV.11 e IV.12 mostram os espectros de absorção na região do UV Visível das soluções de DNA, Vermelho - 40 e Tartrazina, após a incidência de luz, respectivamente. Os corantes foram incididos por luz em seus comprimentos de onda característicos.

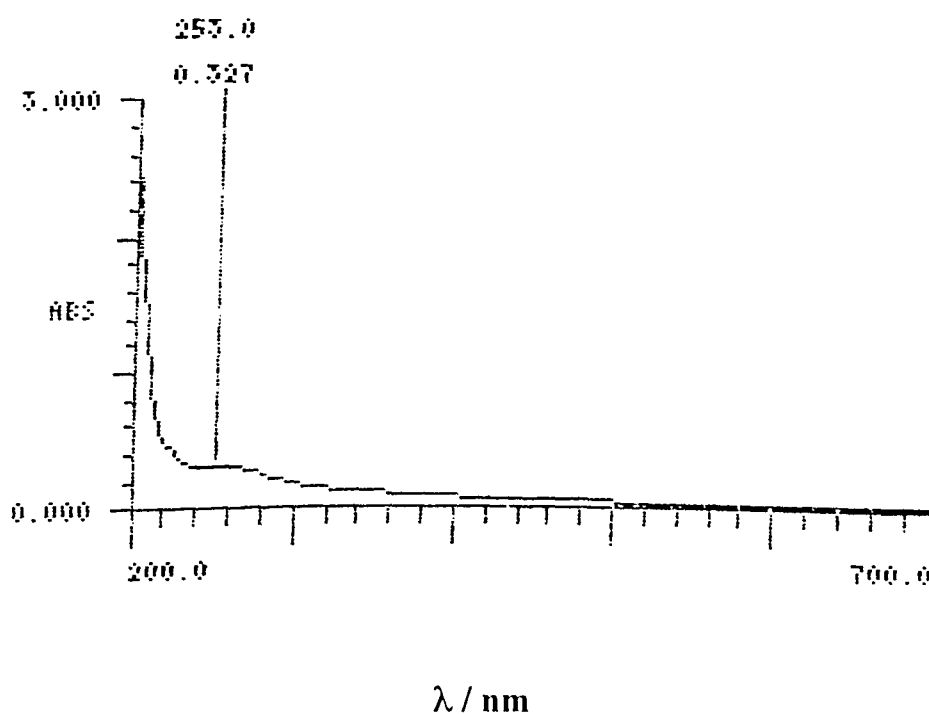


Figura IV.10- Espectro de absorção, após a incidência de luz , da solução de DNA 9,0 $\mu\text{g. mL}^{-1}$, em tampão fosfato, pH 7,0.

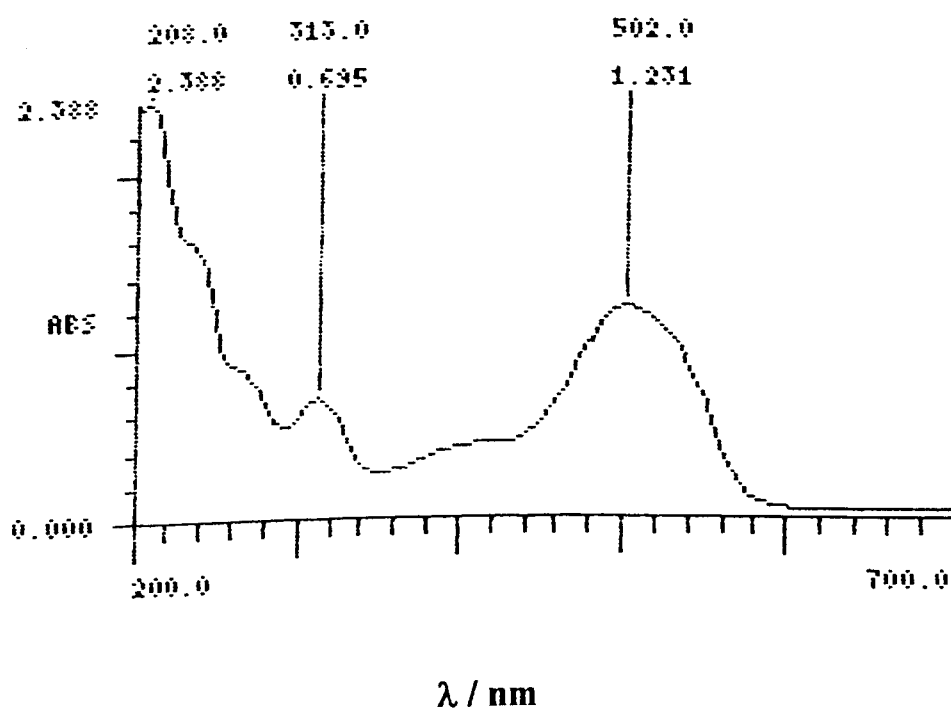


Figura IV.11- Espectro de absorção , após a incidência de luz, da solução do corante Vermelho – 40 $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, em tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$.

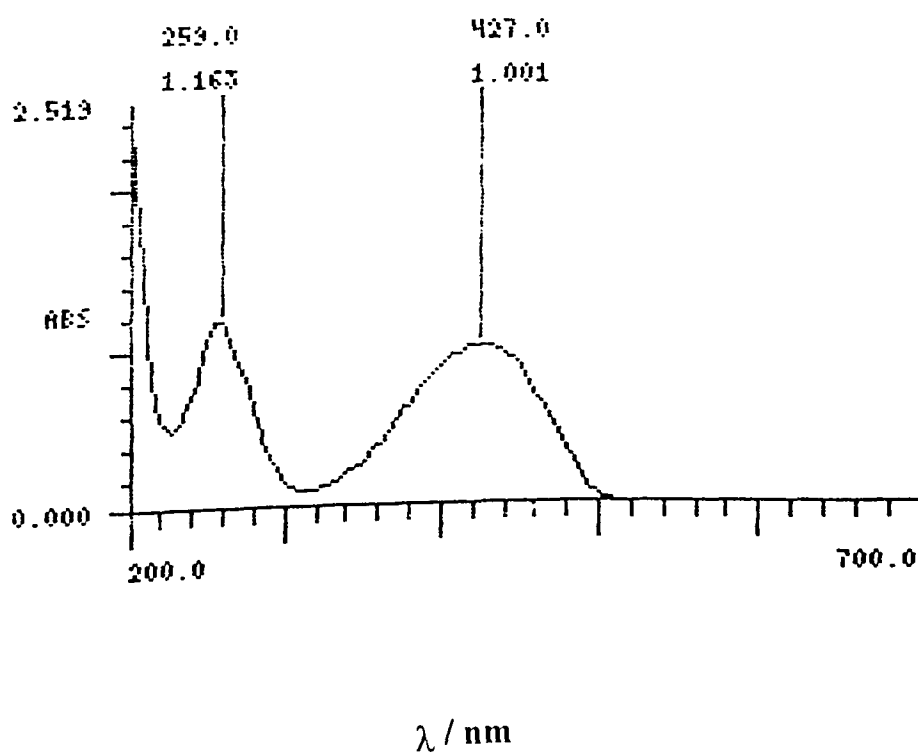


Figura IV.12- Espectro de absorção, após a incidência de luz, da solução do corante Tartrazina $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, em tampão fosfato, pH 7,0.

Os espectros a seguir mostram as análises de UV / Visível das misturas da solução de DNA com os corantes Vermelho-40 (figura IV.13) e Tartrazina (figura IV.14), em meio tamponado, após a incidência de luz.

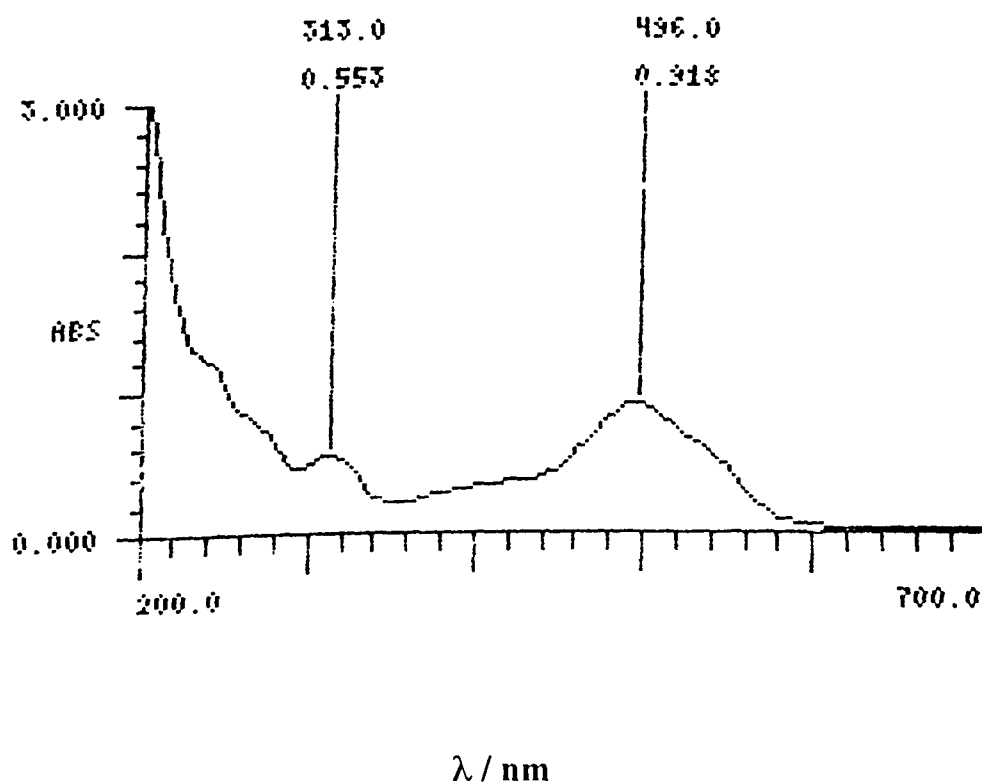


Figura IV.13- Espectro de absorção , após a incidência de luz, da mistura de DNA $9,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e Vermelho - 40 $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato pH 7,0.

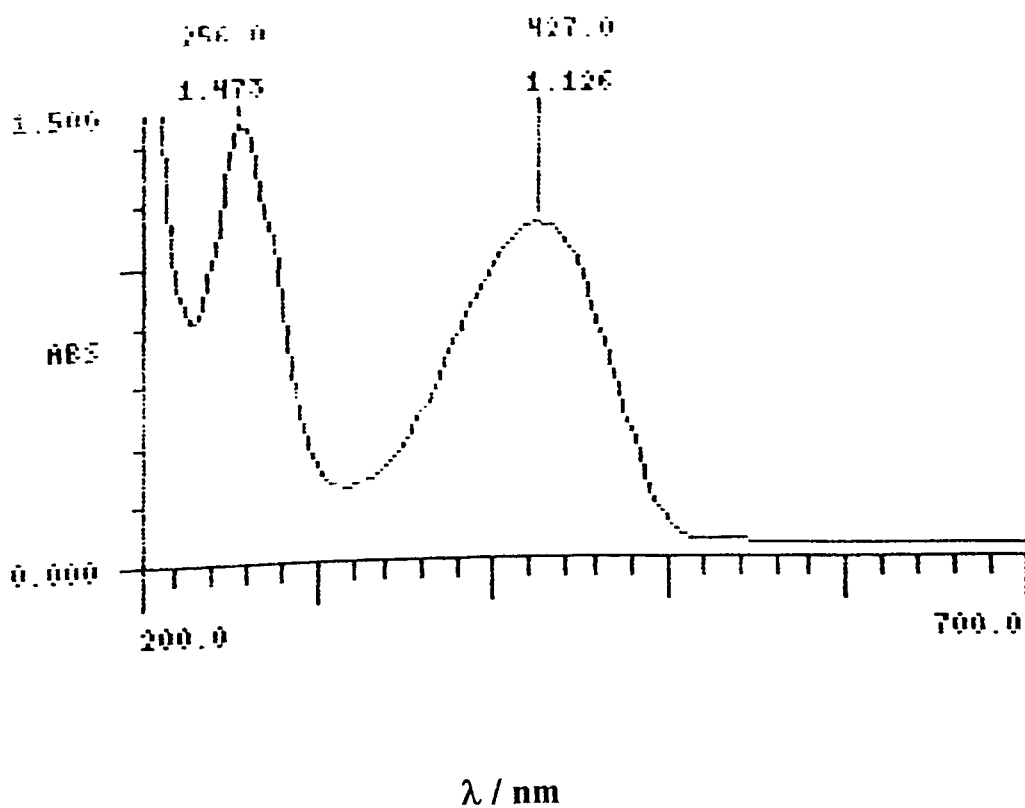


Figura IV.14- Espectro de absorção, após a incidência de luz, da mistura de DNA $9,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e Tartrazina $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$, em tampão fosfato, pH = 7,0.

Os pré – testes com medidas de absorbância destas misturas, sem incidência de luz, foram realizados de cinco em cinco minutos, até um total de trinta minutos, sendo que nos primeiros cinco minutos, foram lidas de um em um minuto. Constatou – se que as modificações nos espectros aconteciam no primeiro minuto e se mantinham. Em função disto, para os estudos sobre o efeito da incidência de luz, foi determinado um tempo de dois minutos de exposição à irradiação.

Estes resultados encontram – se na Tabela 2 (2 a e 2 b) e nas Figuras IV – 10 a IV – 14 .

Na Tabela 2-a, tem-se os resultados para o Vermelho –40. Observando – se esta tabela, verifica – se que a absorbância da mistura DNA / Vermelho – 40, aumenta de 0,820 para 0,918 (um aumento de 10,7 %). É provável que o corante Vermelho – 40 livre possa estar atuando como um sensibilizador, gerando espécies excitadas como, por exemplo, oxigênio singlete, que, por sua vez, pode estar interagindo com o DNA, seja por reação química, seja por emissão de luz, após decaimento para o estado fundamental; ocorre então neste caso, um aumento da espécie absorvente, que pode ser a guanosina do DNA²³, nas regiões que não estão intercaladas com o corante, uma vez que não houve variação no λ_{max} da mistura, sem incidência de luz e com incidência de luz. Isto também é reforçado pela pequena variação de 2,5 % na absorbância que ocorre no Vermelho – 40 livre, em 502 nm, após a incidência de luz.

O próprio corante sofre pouca influência da luz , sendo sua maior contribuição a absorção da luz irradiada. Há duas classes de reações possíveis para o sensibilizador triplete^{26, 27}. Estas reações são classificadas como Tipo I^{26, 28} e Tipo II²⁹. Caso o corante seja um sensibilizador que sofra reações do Tipo II, ele passa para um estado excitado de maior energia e ao decair, transfere esta energia para o meio reacional, gerando uma ou mais espécies excitadas, tais como 1O_2 , $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$, OH_2^{\cdot} .

A mesma discussão pode ser aplicada à mistura DNA / Tartrazina (Tabela 2 b), onde o aumento da absorbância (11,1%) foi semelhante ao aumento da mistura DNA / Vermelho – 40. Porém, tem uma contribuição maior na formação de espécies absorventes formadas à partir da Tartrazina livre (5,3 %).

Tabela 2- Leituras dos comprimentos de onda e absorbâncias do DNA, Vermelho-40 e Tartrazina, isolados e nas respectivas misturas, *in vitro*, em condições fotoquímicas: Tabela 2-a (Vermelho-40) e Tabela 2-b (Tartrazina)

Tabela 2-a

	Concentração	$\lambda_{\text{máx.}}$		Absorbância	
		Sem Luz	Com Luz	Sem Luz	Com Luz
DNA	9,0 g.mL ⁻¹	259	253	0,388	0,327
V-40	5,0 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	502	502	1,200	1,231
DNA + V-40	9,0 g.mL ⁻¹	259	259	0,722	0,800
	5,0 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	496	496	0,820	0,918

Tabela 2-b

	Concentração	$\lambda_{\text{máx.}}$		Absorbância	
		Sem Luz	Com Luz	Sem Luz	Com Luz
DNA	9,0 g.mL ⁻¹	259	253	0,388	0,327
TARTRAZINA	5,0 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	259	256	1,304	1,356
		427	427	1,173	1,239
DNA + TARTRAZINA	9,0 g.mL ⁻¹	259	259	1,163	1,473
	5,0 x 10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	424	427	1,001	1,126

Por outro lado, a luz ultravioleta causa uma grande variedade de danos ao DNA²⁴. Muitos estudos sobre os fotoprodutos de DNA com irradiação visível e UV – próximo tem sido feitos²⁴.

Os efeitos são, geralmente, bem mais fracos que os obtidos com $\lambda_{\text{irr}} < 300$ nm e os fotoprocessos e mecanismos podem ser mais complexos. A irradiação em 313 nm, usando acetona como sensibilizador, aumentou a formação de dímero – Py (dímeros de pirimidina), mas não foi possível detectar a formação de adutos pirimidina – (6 – 4) pirimidona^{25,26}.

Observando – se nas Tabelas 2, a absorbância do DNA sem incidência de luz ($\lambda = 259\text{nm}$, $A = 0,388$) tem uma queda de 15,7% ($\lambda = 253\text{nm}$, $A = 0,327$) após a incidência.

O mesmo não se observa quando os corantes estão intercalados no DNA, uma vez que o $\lambda_{\text{máx.}}$ não sofre variação, na intercalação de ambos os corantes no DNA. Isto pode refletir uma maior estabilidade do DNA intercalado, tornando a estrutura do DNA intercalado menos flexível.

IV.5- Cromatografia de coluna

O método de separação por cromatografia de coluna baseia-se no princípio de que a resina utilizada tenha alguma afinidade por uma das substâncias presentes na mistura; neste caso a resina utilizada não foi específica para separação de moléculas de DNA, uma vez que, tratando-se de uma resina separadora por tamanho, reterá em sua superfície as moléculas dos corantes, que são moléculas pequenas. O tamanho da coluna influencia na eficiência do processo, por isso optou-se por uma coluna pequena que não causaria a dispersão das amostras alterando sensivelmente a composição das alíquotas. Este teste foi definitivo na constatação do fenômeno da intercalação.

As curvas a seguir mostram o acompanhamento simultâneo das leituras de absorção do DNA e do corante, em cada amostra coletada.

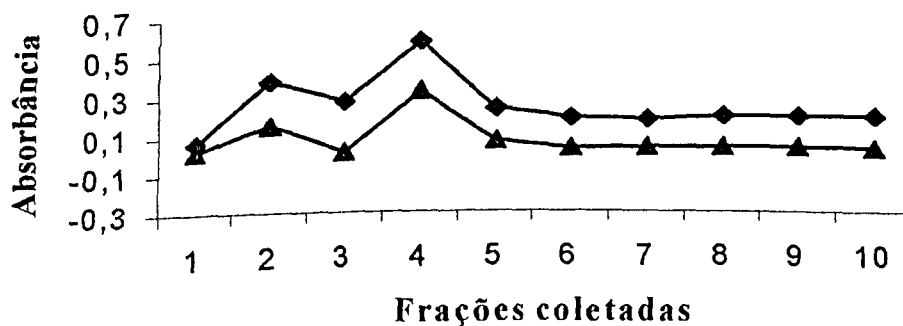


Figura IV.15:Variação da absorbância do composto DNA / Vermelho-40, nos comprimentos de onda 260 (quadrado) e 502 nm (triângulo)

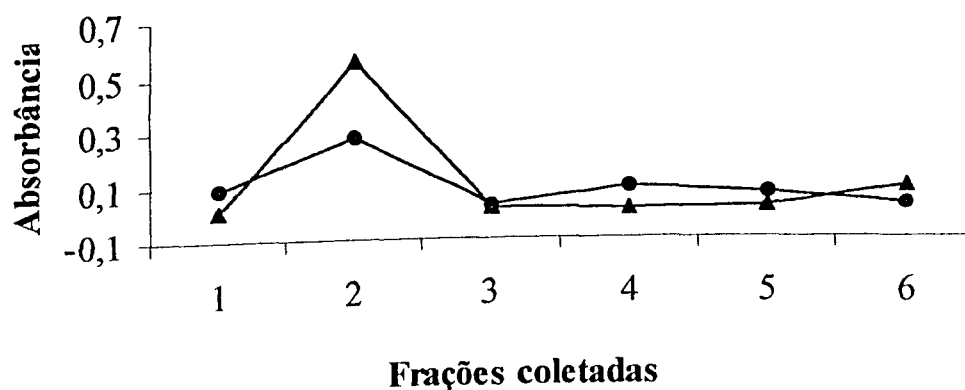


Figura IV.16:Variação da absorbância do composto DNA / Tartrazina, nos comprimentos de onda 260 (bolinha) e 427 nm (triângulo).

As amostras coletadas na coluna de separação registram que as frações contendo DNA constituem as primeiras alíquotas a serem coletadas. De fato, se a resina utilizada (S-400), permite o fracionamento da mistura por tamanho de molécula, sendo gradualmente seletiva por ordem decrescente de tamanho. A constatação seria de que as moléculas de DNA deveriam sair primeiramente, enquanto que as moléculas do corante deveriam ficar retidas por mais tempo. Isto foi acompanhado pelas leituras das absorbâncias das alíquotas nos comprimentos de onda do DNA e dos corantes.

Partindo-se dos princípios que, alíquotas com leituras de absorbância no comprimento de onda de 260nm contém frações de DNA e alíquotas com leituras de absorbância nos comprimentos de onda 502 e 427nm separadamente, contém frações dos corantes Vermelho-40 e Tartrazina, respectivamente, e que as moléculas de DNA saíam primeiro e as dos corantes posteriormente, seria uma resposta conclusiva para o fenômeno da intercalação, que as alíquotas contendo frações de DNA verificadas pelas leituras de absorção, indicassem também leituras de absorção nos comprimentos de onda característicos dos corantes, que só seriam eluídos mais adiante.

A figura IV.15, mostra as duas curvas de acompanhamento simultâneo das absorbâncias da mistura DNA/Vermelho-40 em cada tubo de alíquota coletada, nos seus respectivos comprimentos de onda característicos. Verifica-se que ocorreram duas alíquotas com picos de frações absorvendo em 260nm, a segunda e a quarta, sendo que as mesmas também traziam consigo absorbâncias referentes ao comprimento de onda característico do Vermelho-40. Isto indica que o Vermelho-40 está intercalado ao DNA. Os dois picos presentes levam a crer que o DNA, tratando-se de um polímero, estaria nesta mistura constituindo tamanhos diferentes de moléculas. Em ambas as alíquotas, o corante Vermelho-40 deve estar presente fazendo parte de dois tipos diferentes de compostos de intercalação, o que é reforçado pela sua estrutura espacial pouco planar que possibilita a intercalação por um lado ou outro da molécula, através dos anéis aromáticos.

Observando-se a figura IV.16, que retrata o mesmo fato para a mistura DNA/Tartrazina, verifica-se que o DNA saiu quase que completamente na segunda alíquota juntamente com o corante, diferentemente do que acontece em relação ao Vermelho-40, a Tartrazina com sua molécula bastante planar estaria intercalada de uma única maneira.

O excesso dos corantes, não intercalado no DNA ficou retido na resina, de tal maneira que, no caso do Vermelho-40 a extração teve que ser feita usando um outro solvente.

CONCLUSÃO

V- Conclusão

Estes estudos preliminares indicam que os corantes Vermelho-40 e Tartrazina podem intercalar no DNA. Este composto de intercalação é, aparentemente, estável, uma vez que, após formado, o $\lambda_{\text{máx}}$ tanto na região de absorção dos corantes quanto do DNA, não sofre variação após incidência de luz. O composto de intercalação DNA/corante causa uma expansão na dupla fita do DNA, o que pode causar um pareamento inadequado das bases, gerando mutações.

VI - Proposta de Trabalhos Futuros

1. Estudo cinético da formação das misturas DNA/Vermelho-40 e DNA/Tartrazina e da influência de cátions metálicos na formação do complexo DNA/corante.

A intercalação de moléculas aromáticas no DNA é um processo termodinâmico que pode envolver dois mecanismos: intercalando no DNA²⁴ ou interagindo externamente na superfície do DNA²⁵. É necessário fazer um estudo cinético para que fique mais claro a interação DNA/corante. Estudos usando modelagem molecular também devem ser feitos

Estudo calorimétrico, para a verificação de parâmetros termodinâmicos, tais como ΔG , ΔH , ΔS .

2. Estudo fotoquímico dos compostos DNA/Vermelho-40 e DNA/Tartrazina.

No presente estudo foi observado que, provavelmente, ocorre a formação de uma espécie excitada que pode estar interagindo com o DNA, nas regiões intercaladas pelos corantes. Para que seja identificada esta espécie excitada, são necessários estudos usando inibidores específicos para 1O_2 (metionina, triptofano, guanosina, histidina, etc.), OH^\bullet (DABCO, benzoato e bicarbonato), $O_2^{\bullet-}$ (SOD E SOD desnaturada)²¹.

3. Estudo sobre a integridade do DNA, após a intercalação.

Para se confirmar a integridade do DNA é necessário um estudo aplicando-se a técnica de eletroforese.

4. Estudos de Dicroísmo circular, para verificar possíveis alterações nas conformações do DNA.

5. Estudo usando sondas fluorescentes externas ao DNA, como por exemplo isotiocianato de fluoresceína, que após a intercalação podem dar informações sobre as mudanças ocorridas através do monitoramento da sonda.

VII- Referências Bibliografias

1. P. W., Atkins and L. Jones, "Chemistry (Molecules, Matter and Change)", 1997, 426-429.
2. E. L., Smith, "Bioquímica: aspectos gerais", Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1985, 120-142.
3. R. A., Baricatti, "Estudos sobre a estabilidade e estrutura do DNA através da fotofísica de corantes intercalados", Tese de Doutorado, Unicamp, 1998.
4. L. N., Allinger, "Química orgânica", Guanabara Dois, Rio de Janeiro, 1998.
5. G. A., Burdock, "Food and Color Additives", CRC Press, USA, 1996, 1078-1081.
6. Committee Food Chemicals Codex, "Food Chemical Codex, Second Supplement to the third edition", National Academic Press, Washington, D. C., 1986, 49-49.
7. J. R., Dyer, "Aplicações da Espectroscopia de Absorção aos Compostos Orgânicos", Ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1969, 1-10.
8. H. -H., Perkampus, "UV-Vis Spectroscopy and its Applications", Springer Laboratory, Berlin, 1992, 1-4.
9. O. A., Ohlweiler, "Química Analítica Quantitativa", Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 1974, 713-717.
10. W., Horspool, D., Arnesto, "Organic Photochemistry", Ellis Horwood and Prentice Hall, England, 1992, 1-3.
11. M., Lim; M., Lee; K. T., Yue; L. G., Marzilli, "Inorganic Chemistry", 1993, 32, 3217-3226.
12. N. E., Mukundan; G., Pethö; D. W., Dixon; M. S., Kim; L. G., Marzilli, "Inorganic Chemistry", 1994, 33, 4676-4687.
13. N. B., Colthup; L. H., Daly; S. E., Wiberley, "Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy", Academic Press, Califórnia, 1990, 1-73.
14. N., Baccan; J. C., Andrade; O. E. S., Godinho; J. S., Barone, "Química Analítica Quantitativa Elementar", Edgard Blücher, São Paulo, 1979.
15. A., Reiser, "Photoreactive Polymers: The Science and Technology of Resists", John Wiley and Sons, New York, 1989.

16. D. A., Skoog; D. M., West, "Principles of Instrumental Analysis", Holt, Rinehart and Winston, Inc., USA, 1971.
17. K., Nakamoto, "Infrared and Raman spectra of inorganic and coordination compounds", John Wiley, New York, 1997, 362.
18. R. M., Silverstein; G. C., Bassler and T. C., Morrill, "Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos", Tradução: Ricardo Bicca de Alencastro, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1994.
19. B., Gutter; W., T., Speck and H., S., Rosenkranz, "Biochim. Biophys. Acta", 475, 307, 1977.
20. Contribuição do Prof. Dr. Antônio Eduardo da Hora Machado, IQ-UFU, 2001.
21. S. T. Farias-Furtado, "Geração de Oxigênio Singlete na Degradação de Malonaldeído por peroxidase", Tese de Mestrado, UNICAMP, 1982.
22. R. A., Baricatti, "Estudos espectroscópicos sobre as substâncias Alaranjado de Acridina e Dautomicina intercalados em ácido desoribonucleico", Tese de Mestrado, Unicamp, 1993.
23. J. Marmur, "A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms", J. Mol. Biol., 3, 208, 1961.
24. N. Kure et al, "Kinetics of the interaction between DNA and acridine orange", Bull. Chem. Soc. Jpn., 61, 643, 1988.
25. M. Sakoda et al, "Kinetic studies on acridine orange-DNA interaction", J. Biochem., 71, 891, 1972.
26. G. O., Schenck and E. Kock, "Zwischenreaktionen Bei Photosensibilisierten prozessen in Losungen", Z. Elektrochem, 64, 1, 1960.
27. C. S., Foote, " Mechanisms of Photosensitized Oxidation – there are several different types of Photosensitized Oxidation which may be important in biological systems", Science, 162, 963, 1968.
28. K. Gollnick, "Type 2 photosensitized oxygenation reactions" Adv. in Chem. Series, 77, 78, 1968.
29. C. S., Foote, "Free Radical in Biology", (W. A. Pryor Ed.), 85, Academic Press, N. Y., 1976.

30. K. C., Bible; R. H., Bible; T.J., Svingen et al, "Flavopiridol binds to duplex DNA", *Cancer Research*, 60, 9, 2000.
31. X., Qu and J.B., Chaires, "Hydration changes for DNA intercalation", *J. of the Am. Soc.*, 123, 1, 2001.
32. J., Mazershi and K., Muchewicz, "The intercalation of imidazoacridinones into DNA induces conformational changes in their side chain", *Acta Bioch. Pol.*, 47, 1, 2000.
33. R. R., Monaco; W. Polkosnik and S., Dwarakanath, "Dynamics simulation of the interaction between the novel intercalator diethidium cation and b-form DNA", *J. of Biom. Struc. & Dynam.*, 15, 1, 1997.
34. R. W., Larsen; R., Jasuja; R. K., Hetzler; P.T., Muraoka; V. G., Andrada and D. M., Jameson, "Spectroscopic and molecular modelig studies of caffeine complexes with DNA intercalators", *Bioph. J.*, 70, 1, 1996.
35. C. M., Hellas Yau; H. L., Chan and M., Yang, "Determination of mode of interactions between novel drugs and calf thymus DNA by using quartz crystal resonator", *Sens. and Act.*, 81, 2002.
36. M., Cusumano and A .,Giannetto, "The Interaction of Mixed-Ligand Square-Planar complexes with Calf Thymus DNA", *J. of Inorg. Bioch.*, 1997.
37. M. K., Campbell, "Biochemistry", Second Edition, Saunders College Publishing, USA,1995.