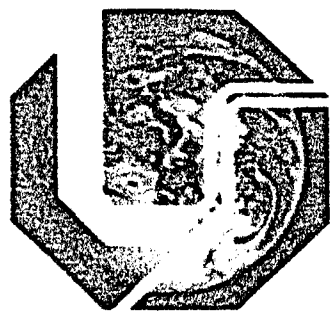


59  
G429.2  
TES/MEM



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**ESTUDOS SOBRE A INTERCALAÇÃO DOS  
CORANTES AMARANTO E ERITROSINA EM DNA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**AUTOR: ELAINE FREITAS GIACOMELLI**

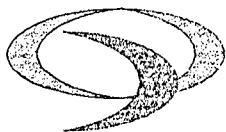
**ORIENTADORA: Profa. Dra. SANDRA TEREZINHA DE FARIAS  
FURTADO**

**Uberlândia 2003**

**SISBI/UFU**



1000211455



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Programa de Pós Graduação em Química- MESTRADO  
Instituto de Química  
Uberlândia/MG - Fone: (34) 3239-4385  
e-mail: [cpqquimica@ufu.br](mailto:cpqquimica@ufu.br)

ALUNA: ELAINE FREITAS GIACOMELLI

NÚMERO DE MATRÍCULA: 5991401- 4

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA INORGÂNICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

***“ESTUDOS SOBRE A INTERCALAÇÃO DOS CORANTES  
AMARANTO E ERITROSINA EM DNA: UV/VIS,  
ELETROFORESE E FLUORESCÊNCIA DO TÉRBIO (III).”***

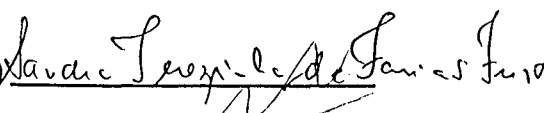
ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Terezinha de Farias Furtado

A Dissertação foi APROVADA em reunião pública, realizada no Anfiteatro do Bloco E do Campus Santa Mônica, em 11 de julho de 2003, às 12:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra T. de Farias Furtado

(IQ/UFU) 

Prof. Dr. Luiz Alfredo Pavanin

(IQ/UFU) 

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lídia Andeu Guillo

(UFG) 

Uberlândia, 11 de julho de 2003.

# ÍNDICE GERAL

ASSUNTO	página
Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iii
<b>I Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 DNA	2
1.2 Alterações na estrutura do DNA	10
1.3 Corantes	14
<b>II Parte Experimental</b>	<b>20</b>
II.1 Material	21
II.2 Aparelhagem	21
II.3 Procedimento	21
II.3.1 Purificação da água	21
II.3.2 Preparação de soluções dos corantes amarantho e eritrosina	22
II.3.3 Preparação da solução de DNA	22
II.3.4 Construção das curvas padrões para os corantes amarantho ,eritrosina e para o DNA	22
II.3.5 Soluções para estudos na região visível/ultravioleta do sistema DNA x Corante	23
II.3.6 Complexação com térbio(III)	23
II.3.7 Integridade do DNA	23
II.3.8 Solução de DNA para estudos de fluorescência	24
II.3.9 Solução contendo o íon térbio(III)	24
II.3.10 Solução do corante amarantho para estudos de fluorescência	24
II.3.11 Complexação com o íon térbio(III)	24
II.3.12 Preparação das amostras de DNA tratado com o corante e do padrão de DNA para estudos eletroforéticos	24
II.3.13 Soluções tampão	25
<b>III Resultados e Discussão</b>	<b>26</b>
III.1 Curvas de Calibração	27
III.2 Estudos na Região Ultravioleta/visível	31

III.3 Estudos de Fluorescência das soluções com íon $Tb^{3+}$	42
III.4 Estudos sobre a Integridade do DNA por Eletroforese	46
IV Conclusão	48
V Trabalhos Futuros	50
VI Apêndice	52
VI.1 UV/Vis	53
VI.2 Fluorescência	56
VI.3 Eletroforese	58
VII Bibliografia	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número de FIGURAS	TÍTULO	PÁGINA
Figura 1	Ribose, Desoxirribose e Nucleosídeo	2
Figura 2	As bases purinas: adenina, guanina	3
Figura 3	As bases pirimidínicas: timina, uracila e citosina	3
Figura 4	Modelo diagramático da dupla hélice do DNA (forma B)	4
Figura 5	Ligação 3'-5'-fosfodiéster	5
Figura 6	Os pares de bases adenina-timina, guanina-citosina, com as ligações de hidrogênio	6
Figura 7a	Representação esquemática da diferença de estrutura entre as formas A e B do DNA	7
Figura 7b	Formas A, B e Z do DNA	8
Figura 8	Fórmula estrutural da daunomicina	12
Figura 9	Fórmula estrutural do corante amarantho	13
Figura 10	Fórmula estrutural da eritrosina	13
Figura 11	Curva de calibração do corante eritrosina	27
Figura 12	Curva de calibração do corante amarantho	28
Figura 13	Curva de calibração do DNA	29
Figura 14	Espectro UV/Vis da solução aquosa do corante amarantho	31
Figura 15	Espectro UV/Vis da solução aquosa do DNA	32
Figura 16	Espectro UV/Vis da solução aquosa da mistura DNA – corante amarantho	33

<b>Figura 17</b>	<b>Espectro UV/Vis da solução aquosa do corante eritrosina</b>	<b>34</b>
<b>Figura 18</b>	<b>Espectro UV/Vis da solução aquosa da mistura DNA – corante eritrosina</b>	<b>35</b>
<b>Figura 19</b>	<b>Estrutura espacial de menor das moléculas dos corantes amaranto e eritrosina</b>	<b>41</b>
<b>Figura 20</b>	<b>Fluorescência do Têrbio: DNA / têrbio(III); têrbio(III); DNA / corante amaranto / têrbio(III)</b>	<b>42</b>
<b>Figura 21</b>	<b>Fluorescência do Têrbio: DNA / têrbio(III); corante amaranto / têrbio(III)</b>	<b>42</b>
<b>Figura 22</b>	<b>Eletroforese</b>	<b>46</b>

## ÍNDICE DE TABELA

TABELA	TÍTULO	PÁGINA
1	Leituras dos comprimentos de onda e absorbências do DNA, dos corantes Eritrosina e Amarantho, e das respectivas misturas	36

## AGRADECIMENTOS

*À Deus, por esse imenso universo de luz e sabedoria.*

*À todos que auxiliaram, com amor e simplicidade a  
realização deste trabalho.*



## RESUMO

Este trabalho tem por base a investigação sobre o processo de intercalação dos corantes amarantho e eritrosina, com o DNA.

Nós apresentamos nossos resultados da investigação da formação de compostos de intercalação entre DNA de timo de bezerro e estes corantes, usados normalmente como corantes alimentícios no Brasil. A formação destes compostos foram acompanhadas por UV/Vis, eletroforese em gel agarose e fluorescência de térbio(III) como sonda química para DNA.

Comparando-se com o DNA puro, as amostras na presença dos corantes apresentam um aumento na absorção. Simultaneamente, as absorções dos corantes diminuem. Estes resultados sugerem que os corantes são incorporados ao nucleotídeo do DNA.

É mostrado um espectro de fluorescência e os resultados sugerem os sítios ocupados pelo amarantho são os mesmos que aqueles ocupados pelo térbio(III). Uma vez que a fluorescência da sonda térbio é principalmente devido a ligação guanina, nós podemos concluir que o amarantho intercala com o DNA ocupando principalmente o sítio da guanina.

A eletroforese atestou a integridade após a sua interação com amarantho e eritrosina.

## ABSTRACT

This work has for base the research about the intercalation process of the dyes amaranth and erythrosine with DNA.

We present our results of an investigation of intercalation compound formation between calf thymus DNA and these colorants, frequently used food colorants in Brazil. Compounds formation were accompanied by UV/Vis, electrophoreses in agarose gel and terbium(III) fluorescence as chemical probe for DNA.

Compared to pure DNA, samples in the presence of the colorant show a increase in absorbance. Simultaneously, colorants absorbance's decreased. These results suggest that colorants are incorporated into the DNA nucleotide.

A fluorescence spectrum is showed and the results suggest the sites occupied by amaranth are the same as those occupied by terbium(III). Since the terbium probe fluorescence is primarily due to the guanine bounding, we can conclude that amaranth intercalate in DNA mainly occupying the guanine site.

Eletrophoreses attested DNA integrity after its interaction with amaranth and erythrosine.

# INTRODUÇÃO

## I - INTRODUÇÃO

### I.1- DNA

Descobertos nos fins do século XIX, os ácidos nucleicos são polinucleotídeos de ocorrência biológica em que resíduos de nucleotídeos estão ligados em uma sequência específica por ligações fosfodiésteres.. Embora estejam entre as maiores moléculas dos seres vivos e controlem os processos vitais básicos em todos os organismos, são compostos somente por alguns tipos de moléculas menores, os nucleotídeos que são as unidades constituintes dos ácidos nucleicos.

Designados de acordo com as moléculas de açúcar que contém, ribose e desoxirribose (fig.1) os dois tipos fundamentais de ácidos nucleicos , o ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxirribonucleico (DNA) dão por hidrólise , além do açúcar , dois outros tipos de moléculas , ácido fosfórico e uma base nitrogenada que pode ser purínica (fig.2) ou pirimidínica (fig.3). A molécula sem o grupo fosfato é chamada de nucleosídeo (fig. 1).

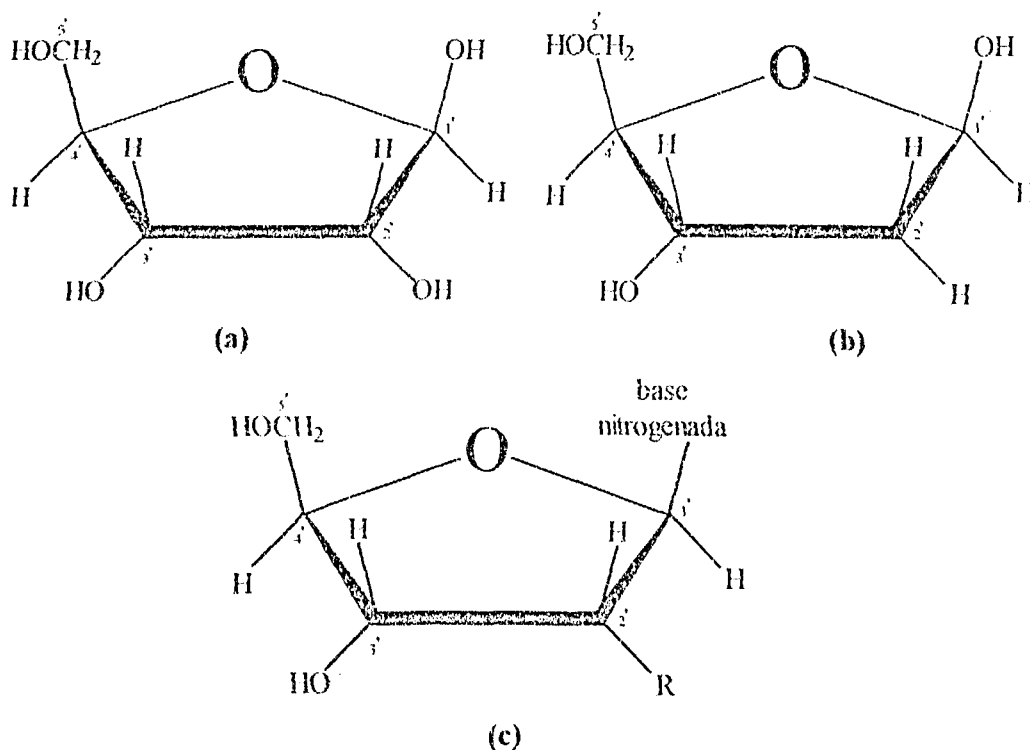


Figura 1 – (a) Ribose; (b) Desoxirribose; (c) Nucleosídeo (R = H, OH)

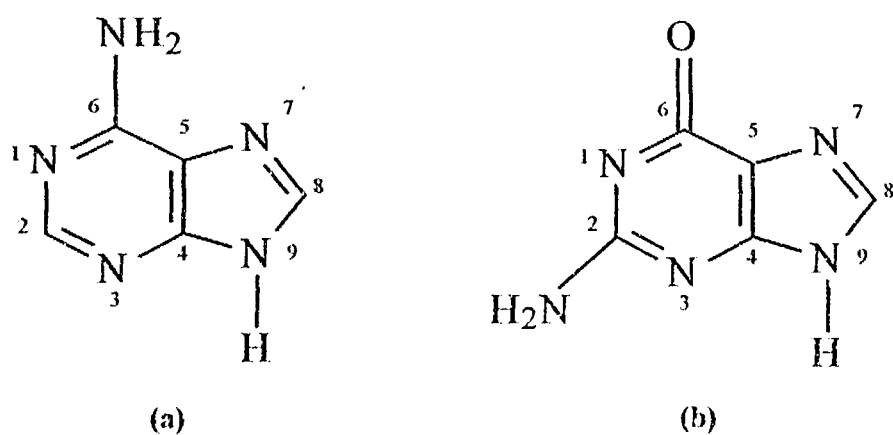
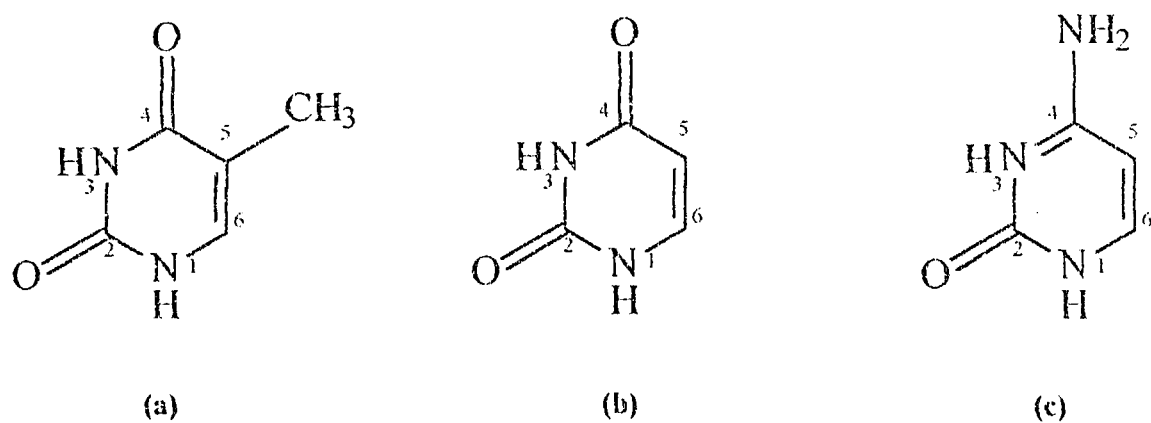


Figura 2 – As bases purinas: a- adenina, b- guanina.

Figura 3 – As bases pirimidínicas: a- timina, b- uracila, c- citosina <sup>(1)</sup>.

Maurice H. F. Wilkins e seus colaboradores, na Inglaterra, baseados em dados obtidos por difração de raios-X descobriram que as bases nitrogenadas se encontram empilhadas umas sobre as outras. Em 1953, Watson e Francis H. C. Crick<sup>(2)</sup>, dois bioquímicos ingleses levando em consideração todos os dados até então existentes, propuseram um modelo para a molécula de DNA, concluindo que a mesma é formada por duas fitas, filamentos ou cadeias de nucleotídeos, enrolados uns ao redor do outro, na forma de uma dupla hélice (fig 4). Cada filamento da sua estrutura é formado por uma cadeia de nucleotídeos ligados entre si. A pentose liga-se à base nitrogenada mediante uma ligação N- $\beta$ -glicosídica entre o átomo de carbono 1' da pentose e o átomo de nitrogênio 9 das bases púricas, ou átomo de nitrogênio 1 das bases pirimidínicas. Estas ligações glicosídicas possuem a distância de 10,85 Å entre si. O grupo de fosfato dos nucleotídeos está unido ao átomo de carbono 5' da pentose através de uma ligação diéster (fig. 5)<sup>(4)</sup>.

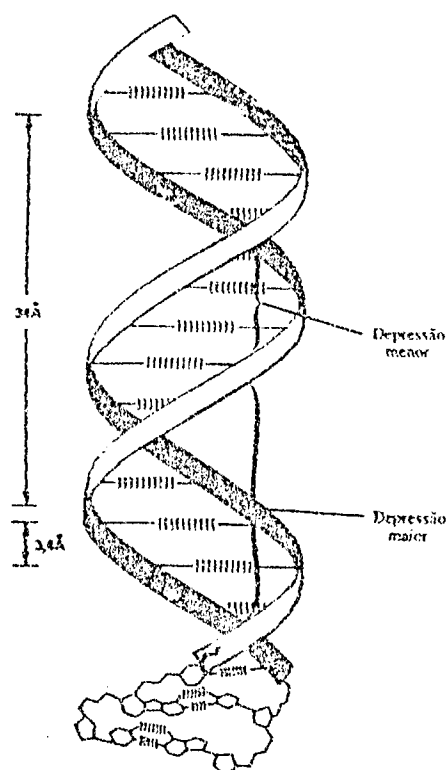


Figura 4: Modelo diagramático da dupla hélice do DNA (forma B). [De A. Kornberg, *DNA Replication*, p. 11, Freeman, San Francisco, 1980.]<sup>(3)</sup>.

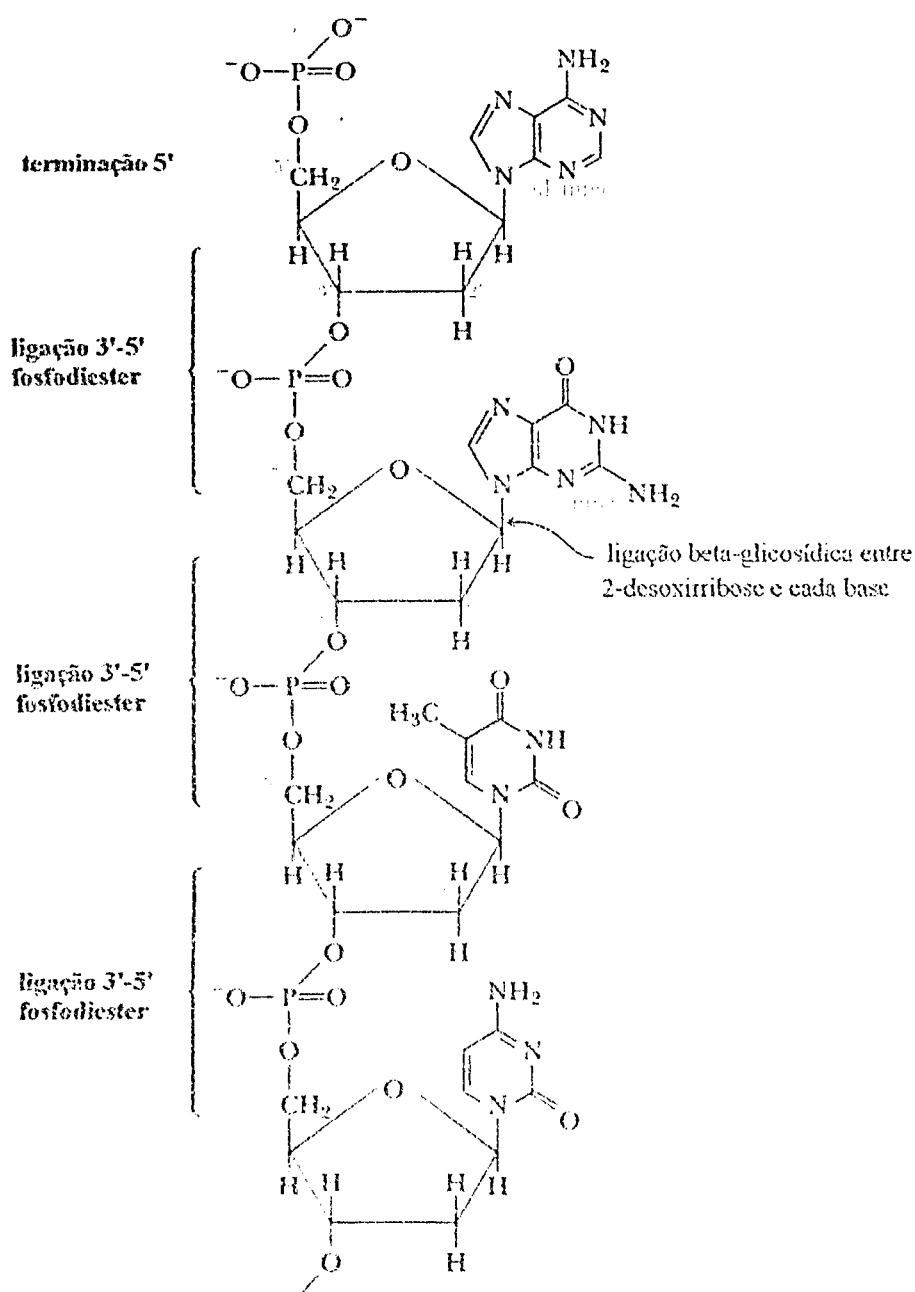


Figura 5: Ligação 3'-5'-fosfodiéster [Campbell, M.K; "Biochemistry", 2a. edição, Saunders College Publishing, 1995]<sup>(4)</sup>.

A união entre as duas cadeias ocorre devido a interação entre o grupo amino de uma base em um dos filamentos e o grupo ceto de outra base no outro filamento (fig. 6).

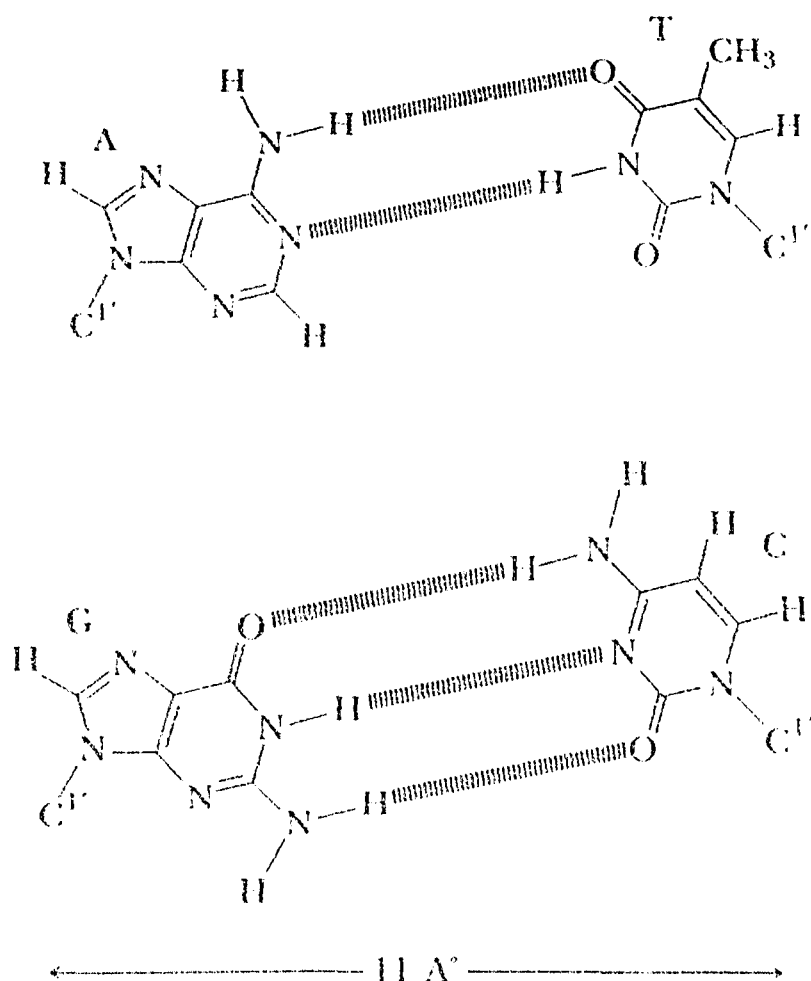


Figura 6: Os pares de bases adenina timina (A-T) e guanina – citosina (G-C) com suas ligações de hidrogênio <sup>(4)</sup>.



As duas fitas são complementares, uma das bases do par sendo púrica a outra será pirimidínica para que a ligação ocorra.

Cada volta da hélice possui um comprimento de 34 Å com diâmetro de 20 Å e 10 pares de bases (fig. 4 e 7a,b). A distância entre os pares de bases adjacentes é de 3,4 Å ; estes valores encontrados são em solução e *in vivo* na forma B do DNA, com 92% de grau de hidratação . Variações no grau de hidratação pode levar a conversão para as formas A e Z. A forma A apresenta grau de hidratação equivalente a 75%; nesta forma os pares de bases não são perpendiculares ao eixo da hélice, mas inclinados de 20°, o passo ficando reduzido para 28 Å com 11 pares por volta. A forma C possui um passo de 33 Å e 9 pares de bases por volta (fig. 7a,b).

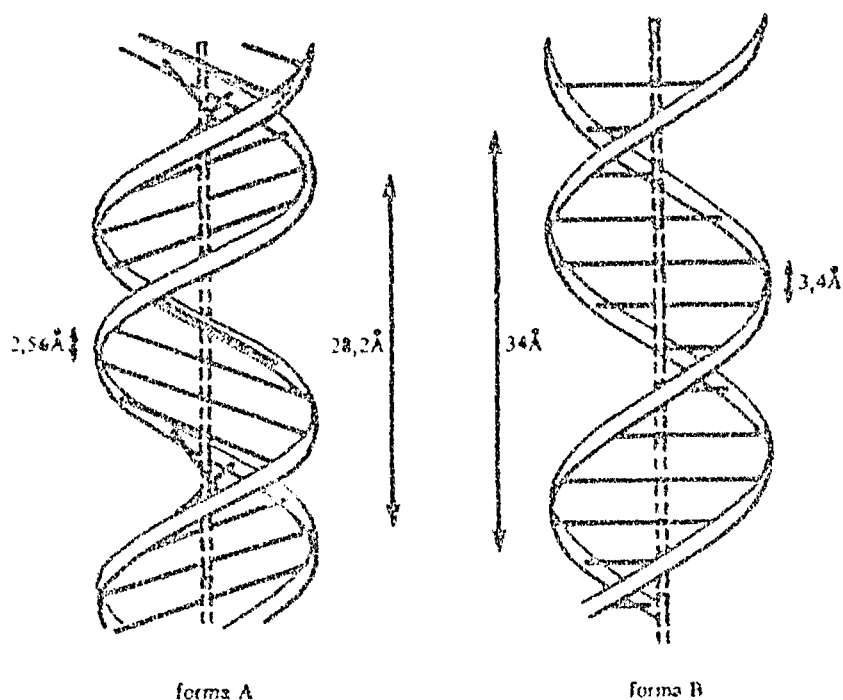


Figura 7a: Representação esquemática da diferença de estrutura entre as formas A e B do DNA. As duas fitas representam as cadeias de fosfato – açúcar, enquanto as barras horizontais indicam a ligação entre os pares de bases. A linha vertical é o eixo da fibra<sup>(2)</sup>.

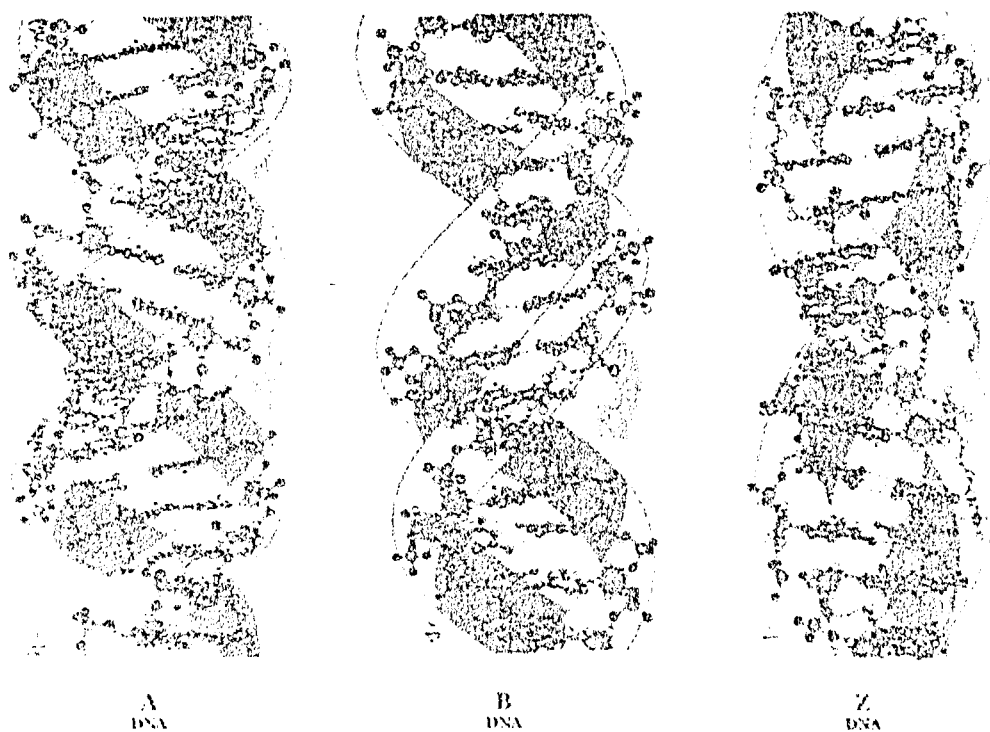


Figura 7b: Formas A, B e Z do DNA<sup>(2)</sup>.

O DNA pode se apresentar nas formas A, B, C, Z existindo ainda a forma D. O grau de hidratação favorece uma ou outra conformação. O solvente (água), é responsável pela estabilização das estruturas secundária e terciária, pois sustenta os ácidos nucleicos e diminui a repulsão entre os grupos fosfatos. As interações hidrofóbicas vão influenciar na ordenação das bases nitrogenadas; a polaridade do meio influencia a estrutura secundária do DNA<sup>(5)</sup>, o empilhamento das bases e estabilização da dupla hélice<sup>(6)</sup>.

As transições entre as conformações B e A e entre C e A, favorecidas em sistema contendo solventes orgânicos, foram monitorados mediante dicroísmo circular<sup>(7)</sup>. Outros estudos envolvendo dicroísmo circular e difração de Raio-X confirmam a ação do solvente na conformação do DNA, indicando que em solução aquosa este não se encontra na forma B com exatamente 10 pares de bases por passo, mas em uma conformação que apresenta o ângulo menor entre os pares de bases sucessivas. A blindagem de grupos expostos ao solvente leva à formação de dobras semelhantes aos polímeros cujas cadeias estão distribuídas aleatoriamente<sup>(8)</sup>.

## 1.2- ALTERAÇÕES NA ESTRUTURA DO DNA

Substâncias que podem interagir, através da intercalação com o DNA, são, em geral, agentes citotóxicos e mutagênicos potentes como cloroquina, clorpromazina, brometo de etídeo, iodeto de propídeo, antibióticos, corantes, etc.

Segundo Pritchard, Blake e Peacocke<sup>(9)</sup>, a intercalação envolve a sobreposição dos anéis aromáticos do intercalador e das bases adjacentes na mesma cadeia, causando profundas alterações conformacionais. A intercalação destas substâncias com o DNA pode ser acompanhada por métodos espectroscópicos; estes fornecem informações sobre a intensidade e posições das bandas de absorção e de emissão em virtude do sistema cromóforo do agente intercalante. As propriedades espectrais dessas substâncias são alteradas quando elas interagem com o DNA. A macromolécula de DNA apresenta forte absorção no ultravioleta com máximo em torno de 260 nm. Isto permite o acompanhamento da ação de substâncias sobre o DNA através de alterações sofridas tanto na intensidade como no comprimento de onda de absorção. Uma alteração no DNA nativo é acompanhado por aumento na absorbância devido à diminuição nas interações de hidrogênio, o que coloca as bases nitrogenadas mais expostas à luz<sup>(10)</sup>. Sobell<sup>(11)</sup> mostra como essa intercalação pode ocorrer, seu estudo explica o efeito de colisões de moléculas de solvente com o polímero de DNA. Na maioria das colisões ocorre transferência de energia que pode provocar alterações em sua estrutura e conseqüentemente possibilitar a intercalação de substâncias na cadeia do DNA.

Quando a colisão ocorre ao longo do eixo produz um movimento harmônico que poderá se propagar ao longo da cadeia. Movimentos harmônicos de grande amplitude podem alterar o número de pares de bases nitrogenadas por volta (aumentar) e sua inclinação em relação ao eixo (desenovelamento do DNA).

Uma amplitude vibracional crítica pode levar os resíduos de açúcar alternados a uma mudança de seu empacotamento alterando sua conformação devido ao aumento da energia tensional nas cadeias açúcar - fosfato. Nesta nova conformação observa-se o desempilhamento parcial de alguns pares de bases pareados,

possibilitando a ação de várias substâncias que podem reagir, via intercalação, com o DNA. Essas substâncias são formadas por anéis aromáticos, planares, que podem se inserir na cavidade hidrofóbica da cadeia helicoidal.

Estudos hidrodinâmicos e de difração de raio X utilizando derivados de acridina<sup>(8)</sup> fornecem dados que comprovam o aumento no comprimento do DNA, distorção da cadeia açúcar - fosfato e deformação da estrutura regular helicoidal à medida que os derivados da acridina se inserem entre os pares de bases. O complexo formado apresenta um difratograma que indica um aumento de separação entre os pares de bases de DNA devido à intercalação da acridina.

Informações sobre a conformação geral das biomacromoléculas e o modo de interação de novas substâncias com o DNA tem sido amplamente estudada pela cristalografia de raios-X, espectroscopia de RMN e outros métodos físicos. Entretanto, o uso destas técnicas é limitado, uma vez que tais métodos usualmente não podem fornecer informações sobre uma região pequena do biopolímero, propriedades estruturais que são diferentes do restante da macromolécula<sup>(13)</sup>. Entre as técnicas disponíveis para análise das mudanças conformacionais locais estão as que utilizam propriedades químicas<sup>(14,15)</sup>.

O uso de sondas com habilidade para reagir com uma pequena, mas alterada parte do biopolímero, pode fornecer informações fundamentais. Um grande número de sondas tem sido usado para pesquisar os ácidos nucleicos, estas diferem quanto à reatividade para os vários grupos destas macromoléculas<sup>(16,17)</sup>.

Evidências experimentais sugerem que o térbio pode ser usado como uma sonda química para verificar a estrutura secundária do ácido nucleico<sup>(18,19)</sup>. Este lantanídeo trivalente exibe um baixo nível de fluorescência intrínseca em solução aquosa<sup>(20,21)</sup>, esta é grandemente aumentada na quelatação com ligantes orgânicos, tais como anéis aromáticos dos ácidos nucleicos, com os quais forma um complexo de transferência de energia.

Quando o íon térbio(III) atua na dupla hélice do DNA ele interage com a ligação 3',5'-fosfodiéster (fig.5), e mostra um aumento na intensidade de fluorescência<sup>(22)</sup>. A sonda térbio fluoresce primariamente com resíduos de guanina e,

portanto é capaz de detectar perturbação ocorrida nas regiões do DNA que contém particularmente par guanina-citosina<sup>(20,23)</sup>.

Devido a estas características, o aumento da fluorescência do térbio(III) tem sido usado para estudos de regiões específicas do DNA e possíveis mudanças na estrutura biomolecular resultantes de sua interação com drogas antitumor *cis*-diclorodiaminaplatina(II)<sup>(24)</sup> e adriamicina<sup>(25)</sup>.

Modificações *in vitro* nos resíduos de guanina do DNA, provocadas por reagentes carcinogênicos como N-acetoxy-2-acetilaminofluor, resultaram em uma marcante interferência na habilidade da guanina para aumentar a fluorescência do Tb(III)<sup>(26)</sup>.

Flores e Haarer<sup>(27)</sup> estudaram a ação das substâncias daunomicina (fig. 3) na supressão da síntese do DNA e RNA com inibição da multiplicação celular. Amplamente utilizada como agente quimioterápico no tratamento de alguns tipos de leucemia, seus anéis aromáticos encaixam-se entre dois pares de bases no DNA, distorcendo sua estrutura, desenrolando-o e dobrando a distância entre os pares de base. Quando usada em conjunto com daunoxamina o anel "D" da daunomicina projeta-se sobre o sulco maior do DNA e o anel A, juntamente com a daunoxamina ocupam o sulco menor. A estabilização deste complexo ocorre via pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxila e carbonila de C<sub>6</sub>.

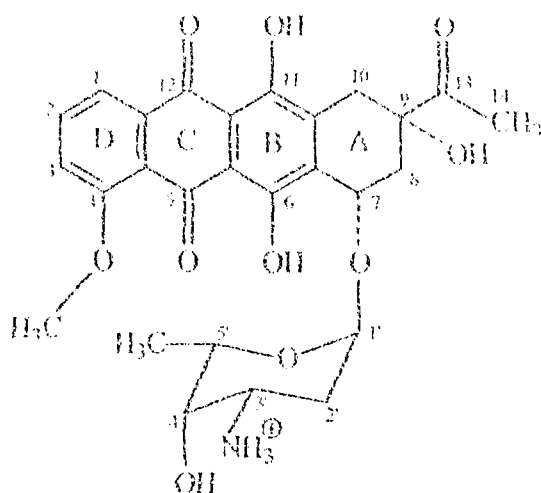


Figura 3: Fórmula estrutural da daunomicina.

Esse complexo inibe a multiplicação celular suprimindo a síntese de DNA e RNA.

Frizard e Suillerot <sup>(28)</sup> pesquisaram a ligação de daunomicina com o núcleo celular e com o DNA purificado, enquanto estudos de difração de raio X, fornecem estudos sobre a ligação específica da daunomicina no complexo daunomicina oligonucleotídeo.

Kersten <sup>(29)</sup> estudou a inibição do crescimento celular de *Bacillus subtilis* e de *Escherichia coli* pela daunomicina e outras substâncias. Para a daunomicina a inibição ocorre quando a dosagem da droga é de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para o *Bacillus subtilis* e  $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para a *Escherichia coli*.

### 1.3- CORANTES

Os corantes são aditivos usados para dar cor ou realçar o pigmento. Segundo a FAO (Organização de Alimentação e Agricultura da ONU), aditivo alimentar é qualquer “substância não nutritiva adicionada intencionalmente ao alimento, geralmente em quantidades pequenas, para melhorar sua aparência, sabor, textura e propriedades de armazenamento”. A importância da indústria de corantes decorre da necessidade de manutenção da cor natural do alimento como um fator fundamental para o marketing do produto. O armazenamento dos alimentos, após a colheita e, principalmente no seu processamento, quando expostos a altas temperaturas, ou em presença de outros componentes e aditivos podem levar a alterações de sua cor natural, em consequência, o uso de corantes tem sido crescente na indústria de alimentos. “São muitos os que consideram desnecessário o emprego dessa classe de aditivos em alimentos. O comitê misto da FAO/OMS de peritos em aditivos alimentares, em sua reunião de 1956, conveio que existem casos nos quais o uso de corantes alimentares é justificado e que o melhor modo de regular o seu uso é o estabelecimento de uma lista de corantes autorizados, que tenham sido ensaiados adequadamente em animais”<sup>(30)</sup>.

A legislação alemã em 1952 agrupou os corantes em 3 classes:

- 1 – classe dos corantes inofensivos;
- 2 – corantes que até melhor juízo poderiam ser usados, mas que, antes de sua admissão como inofensivos, ainda dependeriam de algumas experiências,
- 3 – classe dos corantes naturais.

Em 1956 a OMS estabeleceu uma lista incluindo 50 corantes naturais e 114 sintéticos, permitidos em 43 países.

Nos Estados Unidos a primeira legislação específica para o “Food an Drug Act of 1906” emmerou sete corantes que poderiam ser usados em alimentos; no decorrer do tempo, novos corantes foram adicionados a esta lista..



O “Food Drug and Comestic Act of 1938”, substituiu o “Act of 1906”, sendo criadas três categorias de corantes FD&C colors, D&C colors e Ext D&C.

Sob o novo ato, os nomes foram suprimidos, sendo usados prefixos e números. Por exemplo, amaranço – passou a ser FD&C Red nº 2.

1. FD&C corantes: são corantes que podem ser legalmente usados em alimentos, drogas e cosméticos.
2. D&C corantes: corantes que podem ser legalmente usados em drogas e cosméticos.
3. Ext. D&C corantes: podem ser legalmente usados somente em drogas de aplicação externa e cosméticos.

Os corantes também podem ser identificados por meio de números de cinco algarismos. Por exemplo, Amarelo Crepúsculo é o 15.985 segundo o “Colour Index”. O “Colour Index” é resultado do trabalho empreendido pela “Society of Dyers and Colourists” e foi feito graças a expansão da indústria britânica de fabricação de tintas durante a guerra de 1914 a 1918. Essa grande expansão gerou a necessidade de um levantamento de dados atualizados das tintas comerciais disponíveis. A publicação do “Colour Index” foi feita em 1924, e seu suplemento, em 1928.

Com a colaboração da “American Association of textil Chemists and Coloures”, dos EUA, foi publicado o “Colour Index” de 1945. A Segunda edição de 1956 foi dedicada à memória de Perkin, como fundador da indústria de corantes derivados da hulha. O “Colour Index”, 2ª edição de 1956, se compõe de quatro volumes, cujo conteúdo está dividido em 3 partes:

Parte I: Tintas e pigmentos classificados de acordo com seu uso (volumes I e II);

Parte II: Tintas e pigmentos classificados de acordo com sua constituição química; Index dos compostos intermediários (Volumell) e

Parte III: Abreviações usadas no Colour Index. Esclarecimentos para as abreviações usadas pelos fabricantes de tintas e pigmentos, referências literárias etc. (volume IV).

Considera-se corante natural o pigmento ou corante inócuo extraído de substância vegetal ou animal. Os principais utilizados em alimentação são: 1- Açafrão ou curcumina; 2- Antocianinas; 3- Carmim (coca em pó) e ácido cormínico (solução); 4- Carvão; 5- Clorofila cúprica, sal de sódio de clorofila cúprica, sal de potássio de clorofila cúprica; 6- Hemoglobina; 7- Páprica; 8- Extrato de urucum, bixina, norbixina; 9- Urzela; 10- Vermelho de beterraba.

A síntese de anilina por Perkin em 1856 deu margem à fabricação de inúmeros corantes sintéticos<sup>(31)</sup>. “A capacidade dos produtos de síntese de comunicar uma intensidade de cor suficiente às preparações, às quais os incorporamos, é de tal forma mais importante do que a maioria dos compostos orgânicos naturais, que ocasionou a rejeição dos corantes naturais há muitos anos.”

Os principais são:

- ✓ Corantes vermelhos: Escarlete GN, Bordeaux S, eritrosina;
- ✓ Corante alaranjado: amarelo crepúsculo;
- ✓ Corantes amarelos: amarelo ácido ou amarelo sólido, tartrazina e
- ✓ Corantes azuis: Indigotina, azul de Indantreno.

As informações disponíveis a respeito das propriedades biológicas de corantes e flavorizantes (aditivos alimentares) são freqüentemente sumárias e incompletas, embora atualmente, decisões sobre se um composto pode ou não ser usado com segurança, sejam feitas baseadas nestas informações. A comprovação de que muitas substâncias usadas como corantes e flavorizantes em alimentos são potencialmente mutagênicas, tem estimulado o aumento no interesse em estudos do ponto de vista toxicológico destas substâncias<sup>(32)</sup>.

Alguns aditivos alimentares têm sido proibidos devido a sua toxicidade. Por exemplo, o composto 2-(2-Furilo)-3-(5-nitro-2-firilo)acrilamida (AF-2) foi usado no Japão como conservante alimentar até 1965, data em que foi banido devido a sua carcinogenicidade em animais experimentais<sup>(33)</sup>. Outra substância, o corante *p*-dimetilaminoazobenzene (amarelo manteiga), um azo composto, foi proibido para

uso em alimentos nos Estados Unidos e Europa, também devido a sua carcinogenicidade em várias espécies animais<sup>(34)</sup>.

No caso de medicamentos, os corantes são utilizados para melhorar a sua aparência e proporcionar uma identidade única para o produto. Existem mais de 190 corantes aprovados pelo FDA para uso em preparações farmacêuticas<sup>(35)</sup>. A maioria das formulações para dosagens líquidas contém de um a três corantes<sup>(36)</sup>.

A exposição a corantes em medicamentos tem sido associada com reações de hipersensibilidade em pacientes sensíveis, incluindo anafilaxia, bronquiconstrição, angioedema, urticária, dores abdominais, vômitos e dermatite de contato. Embora sem confirmação em experimentos clínicos controlados, também tem sido sugerido uma ligação entre corantes, hiperatividade e comportamento agressivo em crianças<sup>(37)</sup>.

Apesar dos estudos epidemiológicos dos aditivos alimentares serem importantes na avaliação dos riscos toxicológicos em seres humanos, eles são dificultados porque a exposição não pode ser precisamente avaliada. Assim, a avaliação de riscos depende muito dos estudos de toxicidade laboratorial. O caminho normal para avaliar a genotoxicidade clínica é através de uma bateria de testes *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vivo* refletem a absorção, distribuição, excreção e metabolismo do composto<sup>(38)</sup>.

De acordo com dados compilados pelo Ministro da Saúde do Japão, alguns aditivos alimentares usados neste país são positivos no mínimo em um estudo de genotoxicidade *in vitro*, e muitos não foram testados *in vivo*, apesar da importância dos dados relativos a toxicidade obtidos *in vivo*<sup>(39)</sup>.

Estudos realizados usando testes cometas ("comet assay") para detecção de danos em DNA de órgãos de ratos tratados com corantes azo, xanteno, trifenilmetano e outros, mostrou que o corante Amarantho, causa danos no DNA da glândula estomacal, numa dosagem de 1000 mg.kg<sup>-1</sup>, 3 horas após a administração. Após 24 h de administração, Amarantho e outros corantes estudados, apresentaram danos no DNA do órgão gastrointestinal. A eritrosina, um corante xanteno, causou danos no DNA da glândula estomacal, cólon e bexiga urinária, após 3 h de administração, em

uma dosagem de  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$  ou maior<sup>(32)</sup>. Experimentos com ratos machos para observar os efeitos da Eritrosina na incidência de espermatozóides com cabeças irregulares, contagem e mobilidade de esperma indicaram que em doses de  $68 \text{ mg.kg}^{-1}$ , reduziu 50,8% da contagem padrão de esperma e a mobilidade foi reduzida em 57%. Numa dose de  $680 \text{ mg.kg}^{-1}$  de Eritrosina, observou-se um aumento de 157,1%, em relação ao controle, na incidência de espermatozóides com cabeças anormais<sup>(32)</sup>.

Neste trabalho, serão objetos de estudo os corantes amaranço (fig. 9) e eritrosina (fig.10) e as possíveis mudanças na estrutura do DNA resultantes da interação dessas substâncias em sua cadeia polinucleotídica.

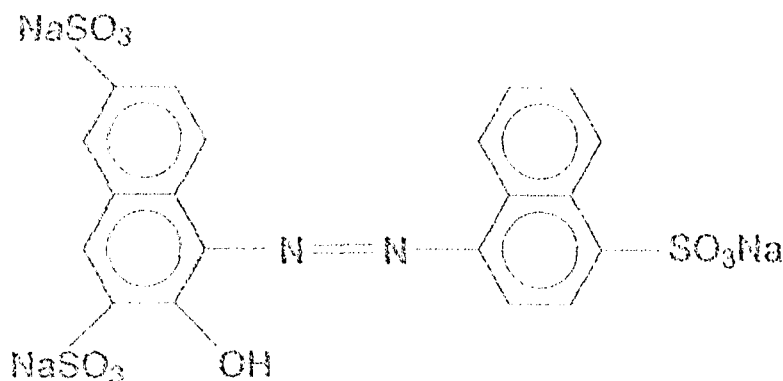


Figura 9: Fórmula estrutural do corante amaranço

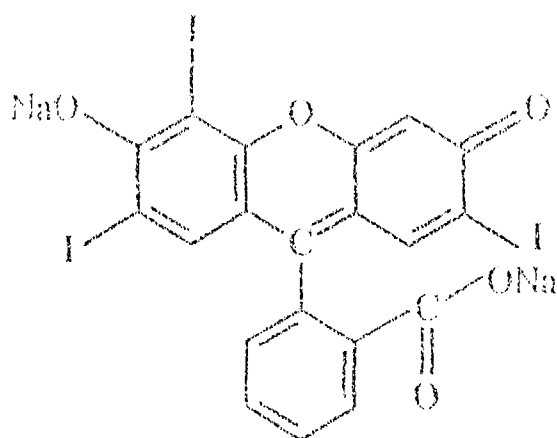


Figura 10: Fórmula estrutural da eritrosina

O acompanhamento da ação dessas substâncias sobre o DNA foi feito através do estudo das alterações sofridas na intensidade e posição das bandas de absorção e de emissão do DNA. O ion térbio(III) foi utilizado como sonda nos estudos de fluorescência, devido à sua capacidade de fluorescer primariamente com resíduos de guanina e, portanto, ser capaz de detectar perturbação ocorrida nas regiões do DNA que contém particularmente par guanina-citosina.

Conforme o tipo de interação que ocorre entre o corante e o DNA, o complexo formado poderá inibir a multiplicação celular suprimindo a síntese de DNA e RNA associado.

# PARTE EXPERIMENTAL

## II - PARTE EXPERIMENTAL

### II.1- Material

- Papel de diálise (Sigma Chemical);
- DNA do timo do bezerro (Sigma Chemical);
- Amaranho (Sigma Chemical);
- Eritrosina (Sigma Chemical);
- Cloreto de Têrbio(III) (Sigma Chemical).

### II.2- Aparelhagem

Os espectros da região ultravioleta e visível foram obtidos num espectrofotômetro UV-Visível -- Genesys 5 - Spectronic , utilizando celas de 1 cm de caminho ótico .

As massas dos corantes e do DNA foram pesadas numa microbalança Sartorius M2P.

A intensidade de fluorescência foi medida no espectrofluorímetro Hitachi F-4500.

A água destilada foi deionizada em deionizador Milli - Q Plus-Millipore

Todo o material foi autoclavado usando uma autoclave vertical da Phoenix modelo AV-30.

A eletroforese foi realizada num aparelho Biorad (Pharmacia).

### II.3- Procedimento

#### II.3.1- Purificação da água

Todas as soluções foram preparadas utilizando água deionizada. A água e todo material utilizado foi esterilizado na autoclave, segundo o procedimento comum de esterilização.

### II.3.2- Preparação de soluções dos corantes Amaranto e Eritrosina

Os corantes foram pesados na micro balança e a massa foi quantitativamente transferida para um balão volumétrico de 10,00 mL e completado o volume com água. As concentrações finais dos corantes foram  $0,72 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  para o corante amaranto e  $2,12 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  para o corante eritrosina.

### II.3.3- Preparação da solução de DNA

Preparou-se 25,00 mL de uma solução estoque de DNA  $24,00 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ , em tampão Tris-HCl, e desta solução foram retiradas alíquotas para estudos na região ultravioleta.

### II.3.4- Construção das curvas padrões para os corantes Amaranto, Eritrosina e para o DNA.

Para cada uma das substâncias foram preparadas soluções aquosas, de concentrações variadas e feitas as leituras de absorbância para construção das curvas padrões. As soluções dos corantes em concentrações da ordem de  $10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$  não resultaram em absorbâncias detectáveis pelo aparelho. Portanto, as concentrações finais do corante Eritrosina trabalhadas foram:  $1,2 \times 10^{-5}$ ;  $1,9 \times 10^{-5}$ ;  $2,5 \times 10^{-5}$ ;  $3,1 \times 10^{-5}$ ;  $3,5 \times 10^{-5}$ ;  $4,4 \times 10^{-5}$ ;  $4,8 \times 10^{-5}$ ;  $5,6 \times 10^{-5}$ ;  $6,0 \times 10^{-5}$ ;  $6,9 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . As concentrações finais do corante amaranto foram:  $0,1 \times 10^{-5}$ ;  $2,0 \times 10^{-5}$ ;  $3,0 \times 10^{-5}$ ;  $4,1 \times 10^{-5}$ ;  $5,1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . As concentrações finais do DNA foram:  $4,13 \times 10^{-5}$ ;  $5,22 \times 10^{-5}$ ;  $7,19 \times 10^{-5}$ ;  $11,75 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ .



### II.3.5- Soluções para estudos na região visível/ultravioleta do sistema DNA x Corante.

Foram preparados conjuntos de soluções transferindo-se volumes de 0,50 mL da solução estoque de DNA para um frasco ependorf de 3,00 mL. A cada um dos ependorf foi acrescentada uma alíquota de 1,50 mL de cada um dos corantes, a fim de obter as concentrações apropriadas iguais a  $1,59 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  para o corante eritrosina,  $0,54 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  para o corante amaranho e  $6,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para o DNA. A seguir foram feitas as leituras de absorbância.

### II.3.6- Complexação com $\text{Tb}^{3+}$ .

O cloreto de térbio ( $\text{TbCl}_3$ )  $10,00 \mu\text{mol.L}^{-1}$  foi complexado com DNA do fimo de bezerro  $11,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , em tampão Tris-HCl. Esta solução foi transferida para sacos de diálise e dialisada por 24 horas em câmara fria, a  $4^\circ\text{C}$ . Após 24 horas, esperou-se 30 minutos para obtenção do equilíbrio em temperatura ambiente, antes de se fazer as medidas de fluorescência.

### II.3.7- Integridade do DNA.

A integridade do DNA foi estimada em um gel de agarose 0,8% em tampão TAE (*tris*-hidroxiaminoacetato), segundo o procedimento de Sambrook et. al.<sup>(49)</sup>. O brometo de etídio foi utilizado para a visualização do DNA sob luz ultravioleta. Uma solução de brometo de etídio ( $10,00 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) foi preparada e mantida em frasco escuro a  $4^\circ\text{C}$ . Uma alíquota de 5,00  $\mu\text{L}$  dessa solução foi adicionada a 100,00 mL de gel não solidificado. As amostras de DNA foram preparadas, aplicadas e submetidas a uma voltagem de 3-5  $\text{V/cm}^2$  na cuba contendo o tampão.

**II.3.8- Solução de DNA para estudos de fluorescência**

Prepararam-se 25,00 mL de uma solução estoque de DNA  $18,30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , em tampão tris-HCl, e desta solução foram retiradas alíquotas para estudos de fluorescência.

**II.3.9- Solução contendo ion terbio(III)**

Preparou-se 10,00 mL de uma solução estoque de cloreto de terbio(III)  $50,00 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

**II.3.10- Solução do corante amaranto para estudo de fluorescência**

Preparou-se 10,00 mL de uma solução  $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  do corante amaranto.

**II.3.11- Complexação com terbio(III)**

Preparou-se conjuntos de soluções transferindo-se volumes de 3,00 mL da solução estoque de DNA para estudos de fluorescência para sacos de diálise. Ao primeiro foi acrescentado 1,00 mL de solução estoque de ion terbio e 1,00 mL de água. Ao segundo foi adicionado 1,00 mL de solução de ion terbio e 1,00 mL de solução de corante amaranto preparada para estudos de fluorescência. Uma terceira solução foi preparada a partir de 1,00 mL de solução de ion terbio e 4,00 mL de água.

**II.3.12- Preparação das amostras de DNA tratado com corante e do padrão de DNA para estudos eletroforéticos**

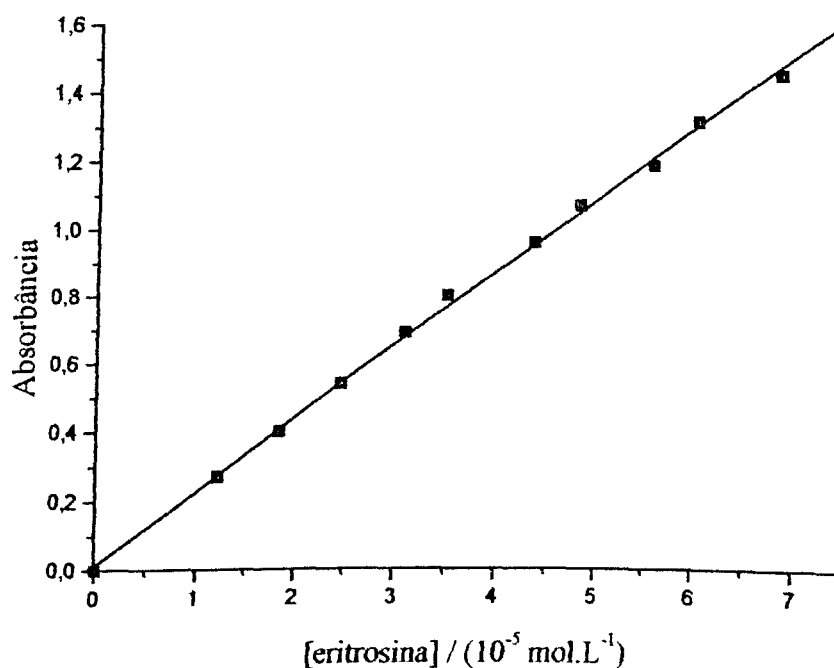
As amostras foram preparadas em tubos de microcentrifuga antes de serem aplicadas no gel. Foi adicionado 2,00  $\mu\text{L}$  de solução de DNA  $6,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com

# RESULTADOS E DISCUSSÃO

### III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

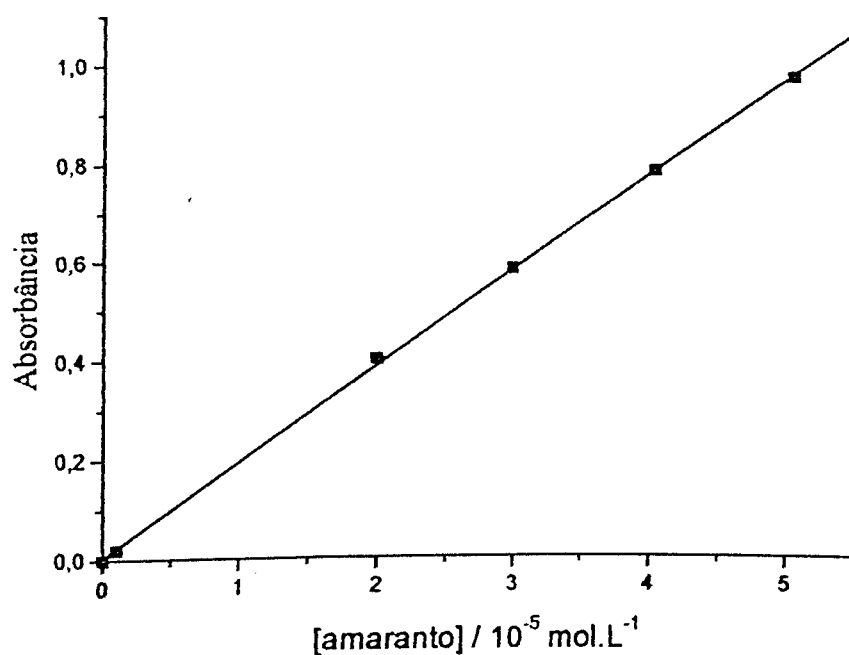
#### III.1-Curvas de Calibração

Na Figura 11, observa-se a curva de calibração do corante eritrosina, em solução aquosa. Esta curva apresenta um coeficiente de correlação de 0,99924 e o coeficiente de extinção molar obtido é de  $21465 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ .



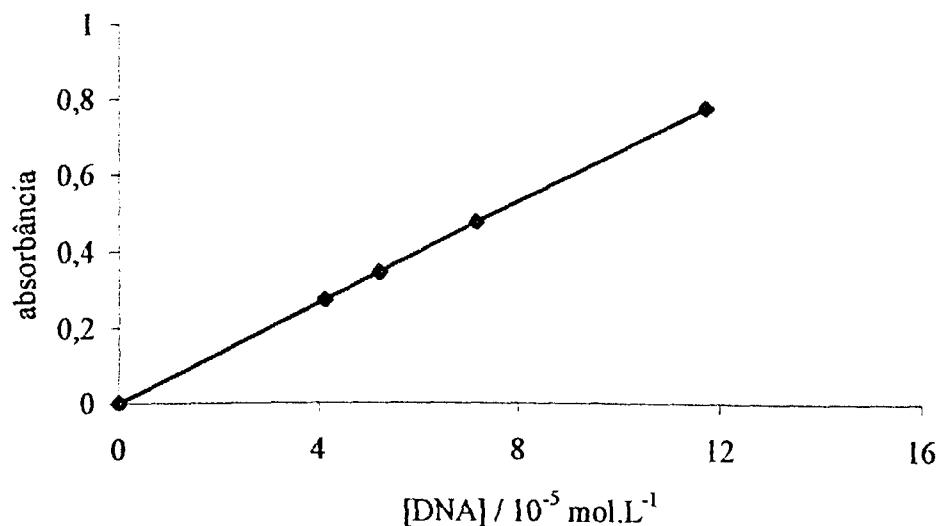
**Figura 11:** Curva de calibração do corante eritrosina ( $\lambda = 526 \text{ nm}$ ), em solução aquosa, nas concentrações:  $1,20 \times 10^{-5}$ ;  $1,90 \times 10^{-5}$ ;  $2,50 \times 10^{-5}$ ;  $3,10 \times 10^{-5}$ ;  $3,50 \times 10^{-5}$ ;  $4,40 \times 10^{-5}$ ;  $4,80 \times 10^{-5}$ ;  $5,60 \times 10^{-5}$ ;  $6,00 \times 10^{-5}$ ;  $6,90 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Na Figura 12, encontra-se a curva de calibração do corante amarantho, em solução aquosa. Esta curva apresenta um coeficiente de correlação de 0,99986 e o coeficiente de extinção molar obtido é de  $19151 \text{ mol}^{-1} \text{ Lcm}^{-1}$ .



**Figura 12:** Curva de calibração do corante amarantho ( $\lambda = 522 \text{ nm}$ ), em solução aquosa, nas concentrações:  $0,10 \times 10^{-5}$ ;  $2,00 \times 10^{-5}$ ;  $3,00 \times 10^{-5}$ ;  $4,10 \times 10^{-5}$ ;  $5,10 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ .

Na Figura 13, encontra-se a curva de calibração do DNA, em solução aquosa. Esta curva apresenta um coeficiente de correlação de 1,00000 e o coeficiente de extinção molar obtido é de  $6610 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{Lcm}^{-1}$ . O valor encontrado na literatura para o  $\epsilon$  é de  $6600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{Lcm}^{-1}$  (10, 41).



**Figura 13:** Curva de calibração do DNA ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ), em solução aquosa, nas concentrações:  $4,13 \times 10^{-5}$ ;  $5,22 \times 10^{-5}$ ;  $7,19 \times 10^{-5}$ ;  $11,75 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ .

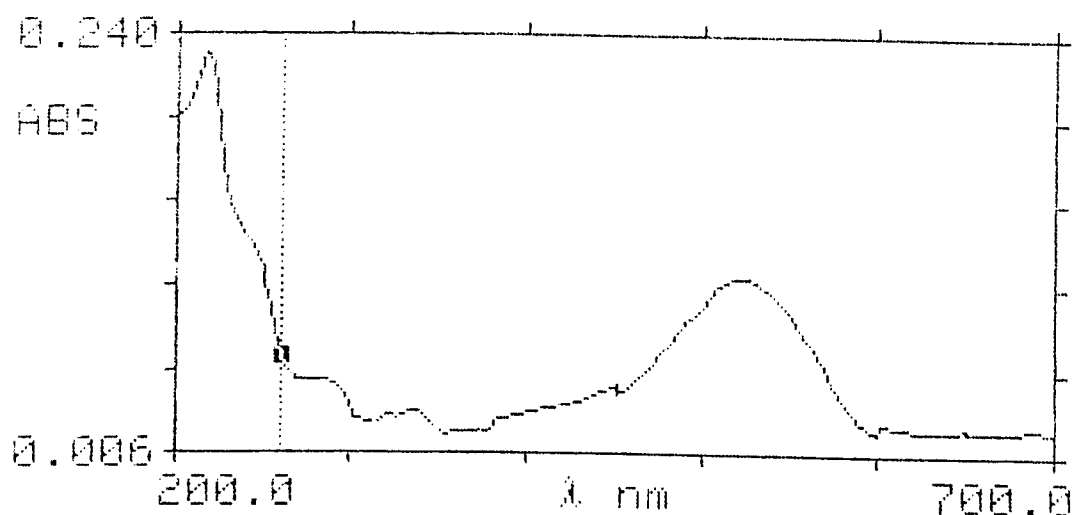
No nosso trabalho estudamos a intercalação dos corantes amaranth e eritrosina com o DNA observando as absorvâncias na região ultravioleta/visível e complexação com o íon térbio(III).

O estudo sobre o coeficiente de extinção molar  $\epsilon$  do DNA foi necessário para verificar se o valor de  $\epsilon$ , para as soluções de DNA, estava de acordo com a literatura<sup>(10,41)</sup>.

O DNA de timo de bezerro utilizado nos experimentos apresentou uma relação  $A_{260} / A_{280}$  (0,388 / 0,220) (Figura 13) igual a 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 DNA<sup>(48)</sup>. A absorvância em 260 nm refere-se ao DNA no seu comprimento de onda característico e a absorvância em 280 nm refere-se a presença de proteínas presentes no DNA.

## III.2- Estudos na região Ultra Violeta / Visível

Na figura 14 é mostrado o espectro de absorção na região UV/Vis do corante Amaranto, em solução aquosa e em concentração  $0,54 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ . O corante exibe máximo de absorção em 520 nm.



**Figura 14: Espectro UV/Vis da solução aquosa do corante amaranto com concentração  $0,54 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ .**



Na figura 15 é mostrado o espectro de absorção na região UV/Vis do DNA extraído do timo do bezerro, em solução aquosa e na concentração  $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Observa-se o máximo de absorção em 260 nm.

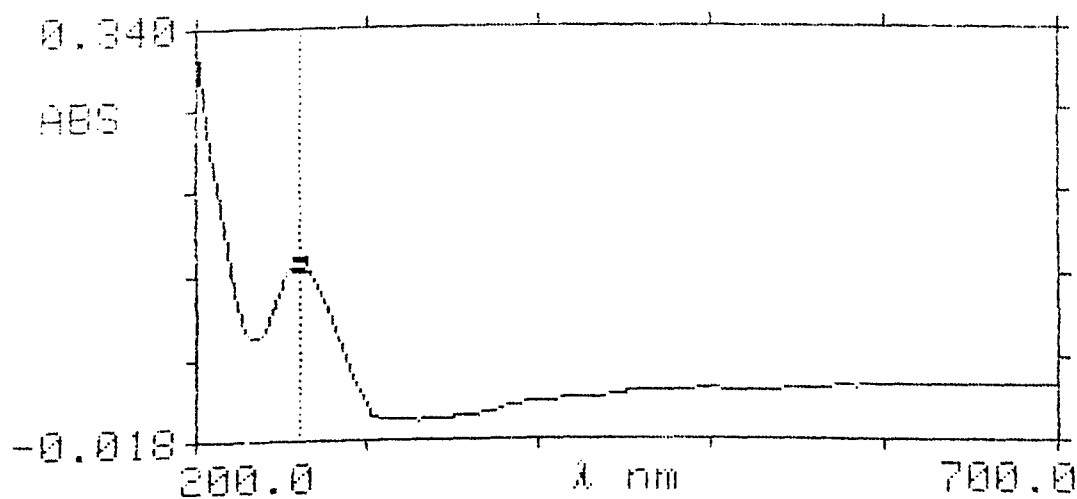
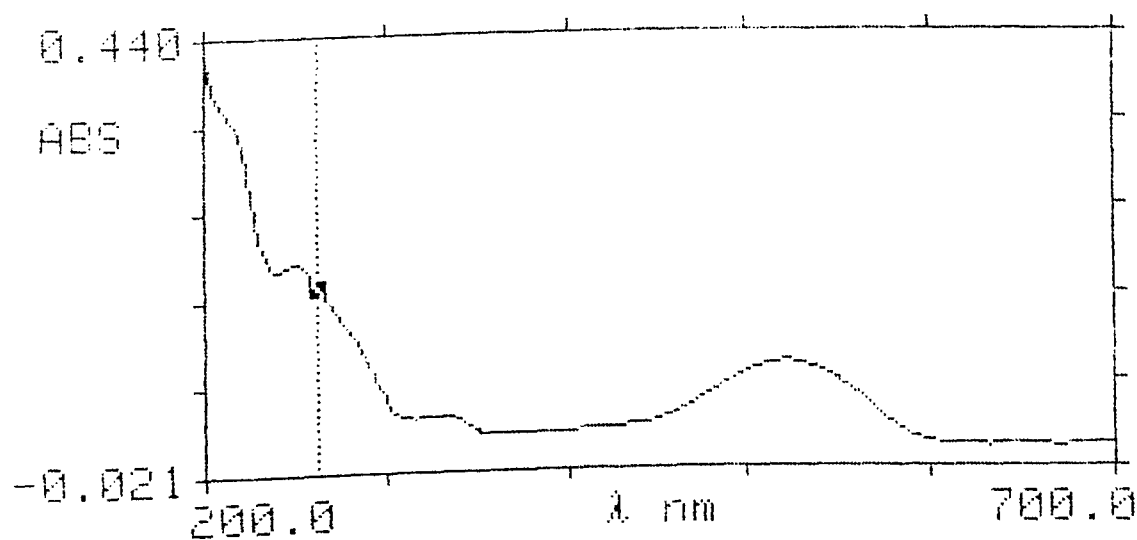


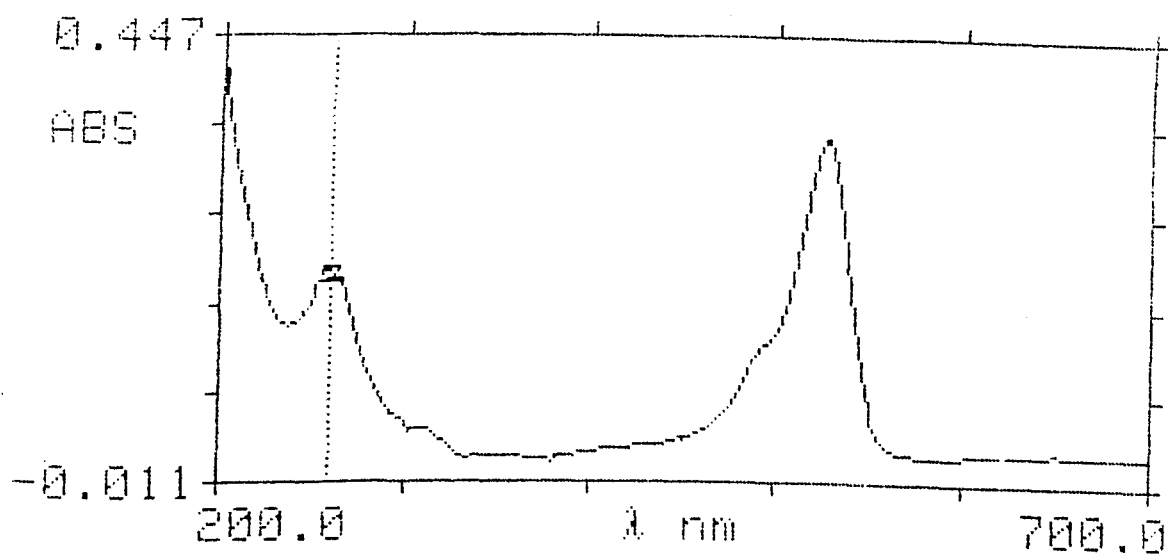
Figura 15: Espectro UV/Vis da solução aquosa do DNA com concentração  $6,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

A figura 16 mostra o espectro de absorção na região UV/Vis do corante amaranço, em solução aquosa e em concentração  $1,59 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ , com adição de DNA  $6,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .



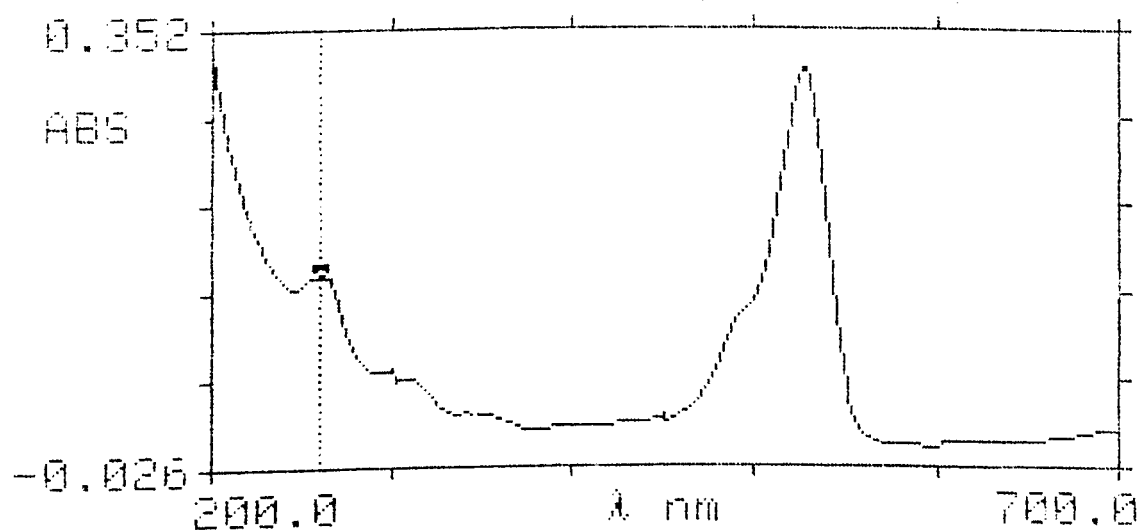
**Figura 16:** Espectro UV/Vis da solução aquosa da mistura do DNA na concentração  $6,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com o corante amaranço na concentração  $0,54 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ .

A figura 17 mostra o espectro de absorção na região UV do corante eritrosina em solução aquosa e em concentração  $1,59 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ .



**Figura 17: Espectro UV/Vis da solução aquosa do corante eritrosina com concentração  $1,59 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ .**

A figura 18 mostra o espectro de absorção na região UV do corante eritrosina, em solução aquosa e em concentração  $1,59 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  com adição de DNA  $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .



**Figura 18:** Espectro UV/Vis da solução aquosa da mistura do DNA na concentração  $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$  com o corante eritrosina na concentração  $1,59 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ .

**Tabela 1 – Leituras dos comprimentos de onda e absorbâncias do DNA, dos corantes Eritrosina e Amaranto, e das respectivas misturas.**

Figuras	Soluções aquosas	Concentrações	$\lambda_{\text{max}}$ / (nm)	Absorbância
15	DNA	$6 \mu\text{g.L}^{-1}$	260	0,134
17	Eritrosina	$1,59 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	526	0,342
14	Amaranto	$0,54 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	522	0,103
18	DNA + Eritrosina	As mesmas	260	0,144
			526	0,319
16	DNA + Amaranto	As mesmas	250	0,203
			260	0,174
			522	0,089

Comparando-se as figuras de 14 a 18 e dados na Tabela 1, observam-se variações na intensidade de absorção evidenciando algum tipo de interação do corante com o DNA, como intercalação entre os pares de bases adjacentes o que acarretaria variações na estrutura do DNA como alongamento da dupla hélice, distorção da cadeia açúcar-fosfato e conseqüente deformação da estrutura regular helicoidal ou interação com os grupos fosfato na superfície externa do DNA<sup>(41)</sup>. O aumento da absorção no DNA nativo foi acompanhado pelo aumento na absorbância do DNA, uma vez que a diminuição nas interações de hidrogênio têm como conseqüência, o aumento à exposição das bases nitrogenadas à luz<sup>(11)</sup>.

As variações nas intensidades de absorção foram registradas como um deslocamento hipocrômico dos corantes eritrosina e amaranço e deslocamento hipercrômico do DNA, alterações que também foram acompanhadas por deslocamento no comprimento de onda ( $\lambda$ ) de absorção máximo do DNA, no caso do corante amaranço.

No estudo das figuras 14, 15 e 16 observa-se a ação do corante amaranço sobre o DNA. Na Figura 16 pode-se constatar que o máximo de absorção do DNA foi deslocado de 260 nm para 250 nm. O seu deslocamento hipercrômico foi acompanhado no  $\lambda$  260 nm. A figura 15 apresenta o valor de absorção em 260 nm igual a 0,134 enquanto na figura 16 pode-se observar um aumento de 29,8% na absorção do DNA com o corante (absorção de 0,174). O deslocamento hipocrômico do corante pode ser acompanhado observando-se as figuras 14 e 16 no  $\lambda$  522 nm. A figura 14 apresenta o valor de absorção do amaranço 0,103 enquanto na figura 15 constata-se uma queda de 13,6%, com valor na absorção de 0,089.

Os deslocamentos observados para o DNA e corante evidenciam a interação do corante entre os pares de base, o que pode ser comprovado pela diminuição na concentração das moléculas livres do corante, ou seja, que foram intercaladas (13,6%). O aumento da absorção do DNA em 260 nm não pode ser atribuído unicamente às mudanças estruturais sofridas em função do corante; é preciso considerar também a ação da DNase que, atuando sobre o DNA provoca aumento de absorção, embora todos os cuidados tenham sido tomados para evitar a presença da DNase; o material utilizado foi autoclavado e as amostras preparadas exatamente no momento de sua utilização.

No estudo das figuras 15, 17 e 18 observa-se a ação do corante eritrosina sobre o DNA. Observando-se as Figuras 15 e 18 verifica-se o deslocamento hipercrômico do DNA no  $\lambda$  260nm. A absorção do DNA passou de 0,134 para 0,144, um aumento de 6,67%. O

deslocamento hipocrômico do corante eritrosina pode ser acompanhado pelas figuras 17 e 18; a absorção da eritrosina na Figura 18, apresenta uma absorção de 0,342 em 526nm enquanto na figura 17 a absorção encontrada é de 0,319.

O deslocamento hipocrômico da eritrosina revela uma queda de aproximadamente 6,72% na concentração de moléculas livres do corante, ou seja, 6,72% de moléculas do corante foram intercaladas. A intercalação da eritrosina é muito menor quando comparada à encontrada para o corante amaranto (13,6%). Este fato evidencia que a interação do corante amaranto com o DNA é mais efetiva que a do corante eritrosina. Essa diferença pode estar relacionada à estrutura do complexo de intercalação<sup>(42)</sup>.

Para elucidar essa questão é necessário um estudo sobre a estrutura do complexo de intercalação. Estudos envolvendo difração de Raios-X seriam indicados para explicações mais detalhadas quanto a forma como o corante interage com o DNA<sup>(43)</sup>.

Existem diversas possibilidades de interação que dependem essencialmente da estrutura e geometria do agente intercalante. Patel estudou a interação da daunomicina<sup>(44)</sup> com o DNA e a explicação mais plausível para as modificações observadas foi a interação entre os grupos fenólicos, via ligações de hidrogênio, com os grupos fosfatos ou com as bases nitrogenadas de ambas as fitas. Estes estudos envolveram variações na intensidade de fluorescência à medida que ocorria a intercalação em sítios com diferentes combinações de bases purinas e pirimidinas. A seletividade da daunomicina por pares de bases citosina-guanina pode ser explicada pela interação dos grupos -OH fenólicos através de ligações de hidrogênio intermoleculares com os elétrons  $\pi$  das bases C-G ou com o átomo de nitrogênio 2 (N2) ou oxigênio 6 (O6) de guanina e oxigênio 2 (O2) de citosina<sup>(44)</sup>.

Sobell<sup>(41)</sup>, em estudos envolvendo a proflavina intercalada em guanosina, comprovou, via difração de Raios-X, que a proflavina intercala com o eixo molecular maior paralelo ao par de bases pareado, formando ligações de hidrogênio entre seu grupo amino e os átomos de oxigênio dos grupos fosfatos.

Outras formas diferentes de interação com o DNA podem ser encontrados em estudos envolvendo quinacrina e mostarda de acridina<sup>(45)</sup>.

Portanto, para elucidar a questão sobre o tipo de interação corante-DNA são necessários estudos envolvendo variações da força iônica do meio em função da absorção,

RMN para acompanhar o deslocamento protônico e difração de Raios-X para o estudo da estrutura do complexo formado.

Os resultados obtidos na região ultravioleta / visível permitem que se calcule a concentração de íons fosfatos ( $P_{DNA}$ ) presentes no DNA, utilizando o  $\epsilon$  no valor de  $6600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$  em  $\lambda_{260}$ , o número de sítios ( $S_{DNA}$ ), o número de pares de bases por molécula do intercalador R e a concentração de corantes intercalados. Estes cálculos são mostrados a seguir.

A partir da equação de Lambert-Beer:

$$A = \epsilon bc$$

onde A é a absorvância do DNA, sendo igual a 0,134 para  $6 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,

$\epsilon$  é a absorvidade molar do DNA, sendo igual a  $6600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ ,

b é o caminho óptico, sendo igual a 1 cm.

c corresponde à concentração do íon fosfato

Portanto, a concentração inicial de fosfato no DNA é:

$$[P_{DNA}]_{\text{inicial}} = 2,03 \times 10^{-5}$$

$[S_{DNA}] = [P_{DNA}] / 2 = 1,02 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (a cada dois grupos fosfatos corresponde um sítio de intercalação)

**Para o corante amaranto:**

$$\begin{aligned} [S_{DNA}]_{\text{livre}} &= [P_{DNA}] / 2 - [\text{amaranto}]_{\text{intercalada}} \\ &= 1,02 \times 10^{-5} - 0,07 \times 10^{-5} = 0,95 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [P_{DNA}]_{\text{livre}} &= [P_{DNA}]_{\text{inicial}} - [\text{amaranto}]_{\text{intercalada}} \\ &= 2,03 \times 10^{-5} - 0,07 \times 10^{-5} = 1,96 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} R &= [S_{DNA}] / [\text{amaranto}]_{\text{intercalada}} \\ &= 1,02 \times 10^{-5} / 0,07 \times 10^{-5} = 14,67, \text{ ou seja, em torno de 14 pares de bases por molécula de amaranto intercalada} \end{aligned}$$



Para o corante eritrosina:

$$\begin{aligned} [S_{\text{DNA}}]_{\text{livre}} &= [P_{\text{DNA}}] / 2 - [\text{eritrosina}]_{\text{intercalada}} \\ &= 1,02 \times 10^{-5} - 0,11 \times 10^{-5} = 0,91 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} [P_{\text{DNA}}]_{\text{livre}} &= [P_{\text{DNA}}]_{\text{inicial}} - [\text{eritrosina}]_{\text{intercalada}} \\ &= 2,03 \times 10^{-5} - 0,11 \times 10^{-5} = 1,92 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} R &= [S_{\text{DNA}}] / [\text{eritrosina}]_{\text{intercalada}} \\ &= 1,02 \times 10^{-5} / 0,11 \times 10^{-5} = 9,27, \text{ ou seja, em torno de 9 pares de bases por} \\ &\text{molécula de eritrosina intercalada} \end{aligned}$$

Observa-se que o número de pares de bases por molécula do intercalador R para o amaranto é aproximadamente 63% maior que para a eritrosina.

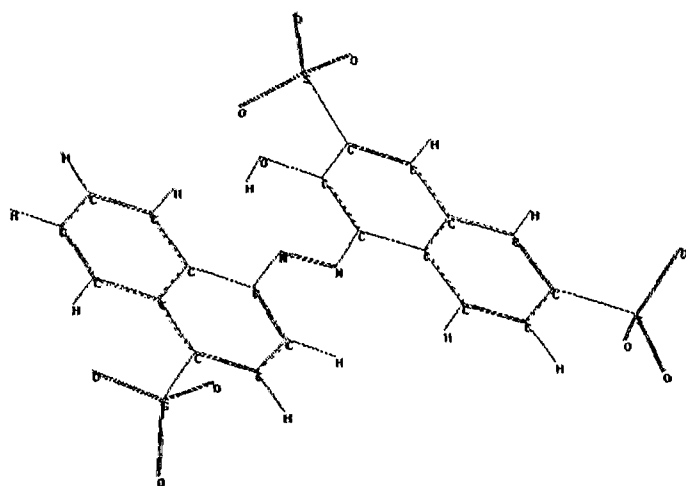
O número de moléculas de eritrosina intercalada é 49,41% menor que o número de moléculas de amaranto que sofreram intercalação.

O modo como a molécula vai interagir com o DNA depende muito das suas próprias características; as alterações provocadas na conformação da cadeia lateral do DNA são induzidas por interações eletrostáticas e interação de Van Der Waals entre o agente intercalante e o DNA. Até mesmo as diferenças quanto à planaridade da molécula podem afetar o tipo de interação <sup>(43)</sup>.

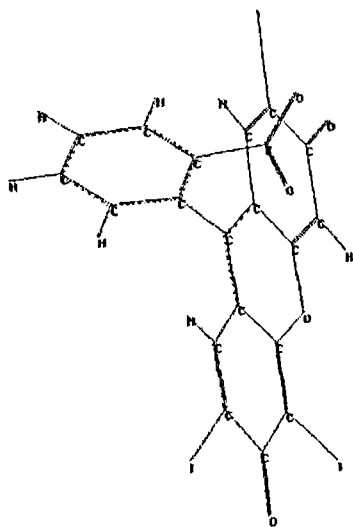
Considerando-se as estruturas de menor energia das moléculas dos corantes (Figura 19 a e b) observa-se que o amaranto é mais planar que a eritrosina. Provavelmente, a presença dos três grupos sulfônicos no amaranto dificultam a sua entrada na cavidade hidrofóbica do DNA. Considerando-se este raciocínio, a parte do amaranto que deve interagir deve ser a que possui apenas um grupo sulfônico. Observando-se a projeção espacial da molécula fica claro a proximidade deste grupamento sulfônico com o grupo hidroxila fenólico, o qual poderá formar ligação de hidrogênio, estabilizando o complexo DNA/corante.

A molécula de eritrosina não exibe total planaridade e deve interagir de forma diferente do corante amaranto. A intercalação poderá ocorrer de forma que uma porção da molécula do corante fique paralela ao plano definido pelas bases pareadas enquanto sua outra porção interage na superfície externa do DNA. A estabilização do complexo se dará

por forças eletrostáticas, interação de Van Der Walls ou formação de ligação de hidrogênio envolvendo o grupo carbonila, ou um átomo de iodo, com uma molécula de água e a base nitrogenada. O tipo de ligação de hidrogênio que irá ocorrer vai depender das bases entre as quais a intercalação ocorre<sup>(51)</sup>.



a

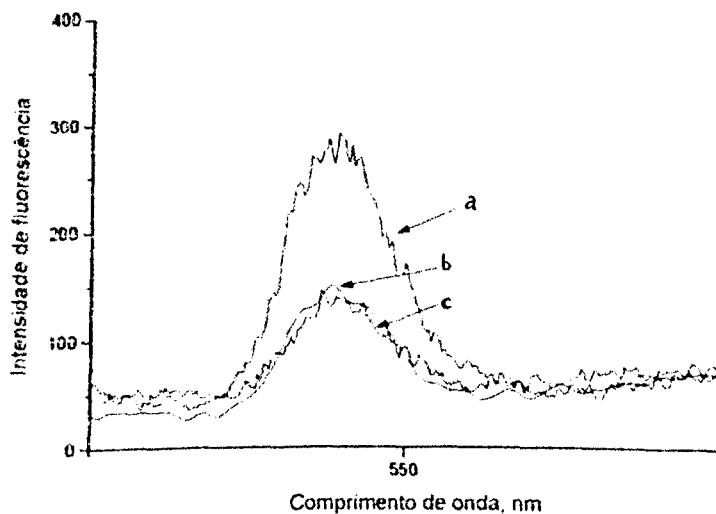


b

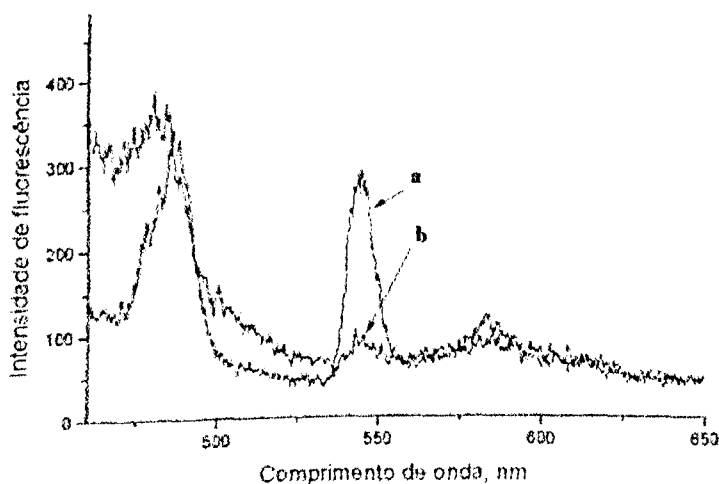
Figura 19: Estrutura espacial de menor energia das moléculas dos corantes amarantho (a) e eritrosina (b)<sup>(52)</sup>

### III.3- Estudos de Fluorescência das soluções com íon térbio(III)

A Figura 20 mostra o espectro de fluorescência do DNA / térbio(III); DNA / corante amaranto / térbio(III) e térbio(III). A Figura 21 apresenta o espectro de fluorescência do DNA / térbio(III) e corante amaranto / térbio(III).



**Figura 20: Fluorescência do Térbio: (a) DNA / térbio(III); (b) térbio(III); (c) DNA / corante amaranto / térbio(III).**



**Figura 21: Fluorescência do térbio: (a) DNA / térbio(III); (b) corante amaranto / térbio(III).**

Os espectros de fluorescência das soluções de térbio puro, térbio com corante e térbio com DNA e corante, com comprimento de onda de excitação em 220 nm, revelaram picos característicos de fluorescência em 550 nm. O comprimento de onda de absorção em 220 nm e comprimento de onda de emissão em 550 nm, para o íon térbio(III), foram otimizados, para maximizar a transferência de energia e minimizar o espalhamento de luz de fundo.

Pela análise da figura 20, observa-se a baixa fluorescência do íon térbio(III) em solução aquosa e o aumento de sua fluorescência quando em solução contendo DNA, o que já foi amplamente confirmado<sup>(20, 22)</sup>.

Este aumento pode ser explicado pela interação do íon térbio(III) com ácido nucleico que atua como aceptor de energia a qual é doada mais eficientemente por pares de bases C-G<sup>(22, 29)</sup>.

O íon térbio(III) liga-se ao ácido nucleico através da carga negativa do oxigênio do ânion fosfato, como sugerido pela maioria das pesquisas<sup>(17, 46)</sup>. Em estudos com oligômeros oligo(dG)<sub>4</sub><sup>(22)</sup>, verificou-se a relevância da proximidade do térbio(III) à base guanina; os resultados encontrados foram relacionados ao comprimento favorável à formação do sítio de ligação que justapõe o íon térbio(III) com a base guanina. Os outros oligômeros oligo(dG)<sub>6</sub>, oligo(dG)<sub>8</sub>, oligo(dG)<sub>2</sub>, poli(dG), d-GMP, não possuem comprimento favorável, não permitindo a formação de um sítio de ligação análogo.

Uma perda de 70% na habilidade do DNA para aumentar a fluorescência do íon térbio(III) foi encontrada após reação do DNA com a substância N-acetoxi-2-acetilaminofluór<sup>(24)</sup>, o que comprova a capacidade desta substância em ocupar o lugar que o íon térbio(III) ocuparia no DNA.

Pelo estudo da Figura 20, observa-se que não houve aumento na fluorescência do íon térbio(III), quando em solução de DNA contendo corante amaranth. Isto comprova a interação do corante com o DNA. A Figura 21 mostra que o corante não modifica a fluorescência do íon térbio(III). A interferência do corante na capacidade da guanosina em aumentar a fluorescência do íon térbio(III), ocorre devido a não acessibilidade do íon térbio(III) ao oxigênio do ânion fosfato da guanosina. A intercalação do corante entre os pares de base do DNA explica amplamente o efeito observado na figura 20.

A interação de várias substâncias com o DNA, via intercalação, está bastante comprovada através do acompanhamento de alterações sofridas nos comprimentos de onda e posições das bandas de absorção e de emissão do DNA. Experimentos envolvendo difração de raio x e dicroísmo circular também tem sido usados para o acompanhamento da interação de substâncias no DNA. Estudos envolvendo derivados de acridina<sup>(12)</sup>, apresentam um difratograma que indica que o complexo formado aumenta o comprimento do DNA com distorção da sua estrutura regular helicoidal. Esta distorção ocorre à medida que a substância intercalante se aloja entre os pares de base do DNA. Este fenômeno é precedido por um processo rápido de difusão do corante e interação com os grupos fosfatos, onde pode haver a formação de complexos oligoméricos.

Mudanças na conformação de polinucleotídeos sintéticos envolvendo as formas B e Z, não apresentaram mudanças na fluorescência do íon térbio(III). Conseqüentemente, a conversão da guanosina no DNA da geometria anti para a geometria syn, durante a transição B para Z, não é uma mudança suficiente para permitir uma diferenciação no aumento da fluorescência do íon térbio(III)<sup>(47)</sup>.

A presença do corante amaranto inviabiliza a interação térbio/DNA, onde o corante passa a ocupar os sítios de ligação do íon térbio(III), e não se observa nenhum aumento na fluorescência do íon térbio(III), quando em solução de DNA tratado com o corante amaranto. Isto indica que o corante amaranto está interagindo com os pares de bases CG, sítio comum para o íon térbio(III).

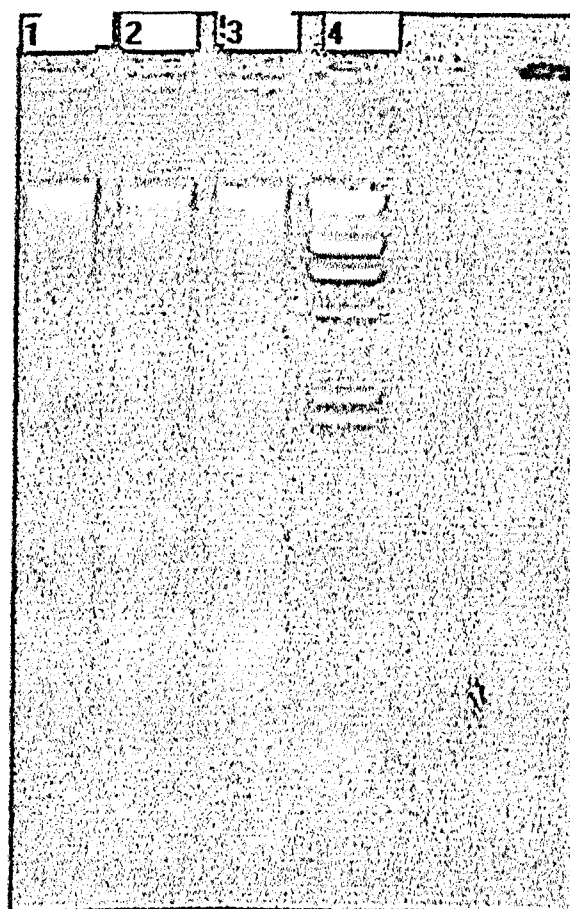
A proflavina e a quinacrina têm sua fluorescência suprimida por regiões ricas em CG atribuída a um complexo de transferência de cargas em que o corante atua como receptor e a guanina como doador de elétrons<sup>(41)</sup>.

É provável que esteja sendo formado um complexo de transferência de cargas onde o amaranto esteja atuando como um receptor e a guanina como um doador de elétrons. A interrupção na deslocalização dos elétrons  $\pi$  em cromóforos conjugados causada por uma interação com outra molécula, pode trazer o  $\lambda_{\max}$  para comprimentos de onda menores<sup>(49)</sup>. O complexo de transferência de carga formado entre o corante amaranto e o DNA deve estar interrompendo a deslocalização dos elétrons  $\pi$  dos pares de base CG do DNA, justificando o deslocamento do  $\lambda_{\max}$  de 260 nm para 250 nm, quando se mistura este corante com o DNA, somando-se a própria absorção do corante livre, o qual apresenta uma pequena

absorção neste comprimento de onda. O mesmo tipo de interação não ocorre com o corante eritrosina, uma vez que o  $\lambda_{\text{max}}$  de 260 nm não sofre variação. Isto indica que a intercalação da eritrosina ocorre por uma interação diferente da observada para o corante amaranto.

### III.4- Estudos sobre a Integridade do DNA por eletroforese

A Figura 22 mostra a integridade do DNA com e sem os corantes eritrosina e amaranço.



**Figura 22: Eletroforese mostrando a integridade do DNA : 1- DNA-Eritrosina, 2- DNA-Amaranto; 3- controle; 4-  $\lambda$  HindIII (marcador de peso molecular).**

A análise do DNA em gel de agarose 0,8% nos revelou que as amostras de DNA estão íntegras, apropriados para o uso em experimentos espectrofotométricos. A interação do corante com o DNA não provocou alterações em sua integridade, pois a eletroforese das amostras do DNA contendo corante também revelaram uma única banda próxima ao ponto de aplicação ( DNA íntegro ).

Considerando-se o aumento de absorbância do DNA e a queda de absorbância dos corantes causados pela interação do corante com o DNA, a presença de uma única banda indica que a interação do corante não provoca quebras no DNA.



# CONCLUSÃO

#### IV- CONCLUSÃO

Este trabalho permitiu concluir que é possível utilizar as técnicas UV/Vis, fluorescência e eletroforese para investigar modificações estruturais sofridas pelo DNA em solução contendo corantes alimentícios.

As mudanças ocorridas nos espectros de absorção das soluções contendo DNA e os corantes indicam algum tipo de interação entre eles. A interação de moléculas aromáticas com o DNA é um processo termodinâmico que pode envolver dois mecanismos, intercalação no DNA ou interação em sua superfície externa.

Na verdade, a estrutura em dupla hélice do DNA possibilita, em virtude de interações hidrofóbicas, a estabilização do complexo formado. Os complexos amaranto/DNA e eritrosina/DNA podem estar sendo estabilizados por interações eletrostáticas ou ter a sua estabilidade reforçada por ligações de hidrogênio.

A formação de complexos DNA/corante não comprometeu a integridade do DNA; os resultados obtidos através da técnica eletroforese mostraram que o DNA não apresentou quebras em sua estrutura após o tratamento com o corante, amaranto ou eritrosina.

Para os estudos de fluorescência utilizando o cátion térbio(III) como sonda, as alterações espectrais podem ser interpretadas como modificações nos sítios CG, onde o térbio interage, por moléculas dos corantes.

A interação de substâncias na cadeia polinucleotídica causa um desenrolamento na dupla fita do DNA, o que pode levar a um pareamento inadequado das bases, gerando mutações. Além disso, se o complexo formado for estabilizado por forças muito efetivas, isso dificultaria a separação das fitas no momento da transcrição do DNA ou do RNA associado prejudicando, ou mesmo impedindo, a síntese de proteínas.

Estes fatos justificam a necessidade de estudos envolvendo todos os corantes utilizados pela indústria alimentícia brasileira.

# TRABALHOS FUTUROS

## V- TRABALHOS FUTUROS

Para elucidar a estrutura formada na interação corantes eritrosina e amaranth com DNA e esclarecer a formação ou não formação de dímeros, assim como a estequiometria corante / DNA, sugerimos a continuação deste trabalho utilizando as seguintes técnicas:

- 1- estudo sobre a estrutura do complexo de intercalação. Estudos envolvendo difração de Raios-X seriam indicados para explicações mais detalhadas quanto a forma como o corante interage com o DNA.
- 2- Variações da força iônica para verificar a possível formação de dímeros de corante na superfície externa do DNA e a característica eletrostática da interação.
- 3- Estudos sobre a estabilidade do DNA / corante sob a ação de outros compostos intercalantes.
- 4- Estudos da ação dos corantes em células normais para observar a migração dos corantes para o interior das células.

# APÊNDICE

## VI- APÊNDICE

### VI.1 - UV / Visível

Todos os compostos são capazes de absorver radiação eletromagnética, porque todos contêm elétrons de valência que podem ser excitados para níveis de energia maiores<sup>(49)</sup>.

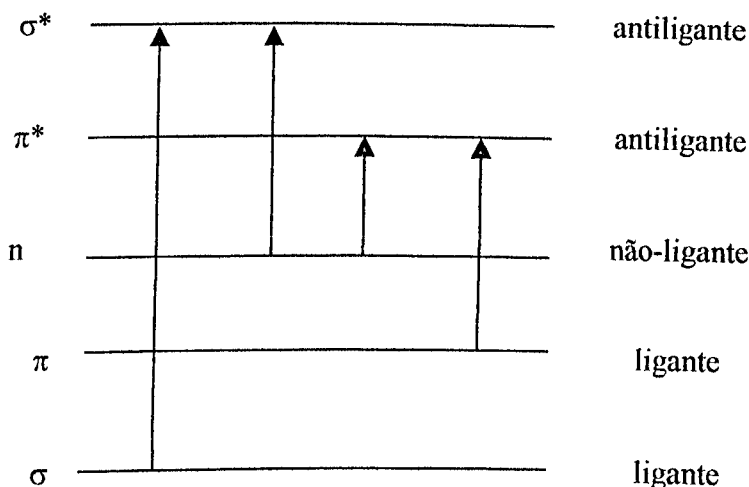
A absorção de energia provoca a promoção de elétrons do estado de energia normal a um estado de maior energia, com um tempo de vida curto; os elétrons retornam ao estado excitado de energia menor, e a energia absorvida é devolvida em forma de luz<sup>(53)</sup>.

A absorção de radiação no UV / Visível é restrita à um número limitado de grupos funcionais (cromóforos) que contêm elétrons de valência com energias de excitação relativamente baixas<sup>(49)</sup>.

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 linhas, gerando uma banda larga<sup>(49)</sup>.

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 deslocalizados sobre os átomos, como oxigênio, halogênio, enxofre e nitrogênio. Os elétrons não ligantes são designados pelo símbolo  $n$ <sup>(49)</sup>.

Na figura 11 são mostradas as energias dos vários tipos de Orbitais Moleculares (OM), onde as transições responsáveis pelas absorções, podem ocorrer<sup>(49)</sup>.



**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  $\sigma$  é excitado para o orbital molecular  $\sigma^*$ .

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

A absorvidade ( $\epsilon$ ) deste tipo de absorção normalmente fica entre 100 e 3000  $\text{L.cm}^{-1}.\text{mol}^{-1}$ .

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  $\pi$  para estados excitados  $\pi^*$ , caindo na faixa de 200 a 700nm. Ambas as transições necessitam de um grupo funcional insaturado para formar os orbitais  $\pi$ .

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

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  $\lambda$  menores. Este efeito recebe o nome de deslocamento hipsocrômico ou deslocamento azul.

Podem ocorrer deslocamentos para  $\lambda$  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  $n^{(49)}$ .

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 batocrômico<sup>(49)</sup>.

Este efeito é pequeno ( $\leq 5\text{nm}$ ) 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 solvente<sup>(49)</sup>.

Por outro lado a deslocalização dos elétrons  $\pi$ , em cromóforos conjugados, abaixa o nível de energia dos orbitais  $\pi^*$  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 menores<sup>(49)</sup>.

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 fotoquímicas<sup>(53)</sup>.

A lei de Bouguer - 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)<sup>(54)</sup>.

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



onde:

$$A_D = \log \left[ \frac{I_0}{I} \right]_D \text{ é a absorbância,}$$

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

$\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar.

$v$  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  $\text{mol. dm}^{-3}$  e  $d$  é o comprimento do caminho da amostra em  $\text{cm}$  <sup>(54)</sup>.

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

## VI.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<sup>(50)</sup>.

O processo de fluorescência é caracterizado por dois espectros. 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 fluorescente<sup>(50)</sup>.

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<sup>(50)</sup>:

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

Por conseguinte, a correspondente fração absorvida é<sup>(50)</sup>:

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

Mediante a redistribuição da equação anterior, acha-se a quantidade de energia radiante absorvida<sup>(50)</sup>:

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

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,

$$F = \phi P_0 (1 - e^{-\epsilon bc})^{(50)}.$$

No caso de soluções muito diluídas quando apenas uma pequena fração da energia radiante é absorvida (isto é, o termo  $\epsilon bc$  não maior que 0.05), a equação anterior pode ser simplificada para<sup>(50)</sup>:

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

em que K é uma constante instrumental; a fluorescência é emitida em todas as direções observadas apenas através de uma abertura limitada<sup>(50)</sup>.

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 ultravioleta<sup>(50)</sup>.

### VI.3- Eletroforese

Uma das técnicas mais utilizadas em biologia molecular, a eletroforese<sup>(40)</sup>, usa a combinação de propriedades carga / massa para separar diferentes substâncias.

A carga na molécula a ser separada permite que ela se mova, através do gel, em direção ao eletrodo de carga elétrica oposta. Ácidos nucléicos e oligonucleotídeos (fragmentos) são negativamente carregados em pH neutro, devido a presença dos grupos fosfatos. Quando estas moléculas carregadas negativamente são colocadas em um campo elétrico, entre dois eletrodos, elas migram totalmente em direção ao eletrodo positivo. Em ambos, ácidos nucléicos e oligonucleotídeos, cada resíduo de nucleotídeo contribui com uma carga negativa do fosfato para a carga total do fragmento, mas a massa do ácido nucléico ou oligonucleotídeo, aumenta correspondentemente. Conseqüentemente, a razão carga / massa, permanece aproximadamente igual, apesar do tamanho da molécula em questão. Como resultado, a separação ocorre simplesmente com base no tamanho. A separação é feita com o gel na posição vertical; o eletrodo negativo está no topo do gel, e o eletrodo positivo está no fundo. Existe um compartimento para todas as amostras e a corrente elétrica é aplicada até que a separação se complete com o menor oligonucleotídeo próximo ao fundo do gel.

O método mais comumente usado para detectar os produtos separados é baseado no rotulamento radioativo da amostra, usualmente com isótopo do fósforo de número de massa 32. Quando o oligonucleotídeo rotulado for separado, o gel é colocado em contato com um pedaço de filme de raio - X. Os oligonucleotídeos, contendo o isótopo radioativo, expõe a porção do filme com o qual eles estão em contato.

Quando o filme é desenvolvido as posições das substâncias rotuladas apresentam-se como bandas pretas. Esta técnica é chamada de auto radiografia.

Outra forma de detecção dos produtos separados é a adição do intercalante de base brometo de etídeo, o qual é fluorescente na região ultravioleta. Ele pode ser adicionado ao gel de agarose no momento de sua preparação. Ao término da corrida eletroforética, o

suporte contendo o gel com brometo de etídeo e as amostras são levadas ao trans iluminador de luz ultravioleta, registrando a ação. O gel de agarose é documentado utilizando o sistema de fotografia instantânea ou sistema automatizado de captura de imagem.

Quando o DNA genômico está íntegro observa-se uma única banda próxima ao ponto de aplicação; quando ele não está íntegro observa-se um arraste.

# BIBLIOGRAFIA

## IV- Bibliografia

- 1- P., Atkins and L. Jones, "Chemistry (Molecules, Matter and Change)", 426-429, 1997.
- 2- J. D. Watson e F. H. C. Crick, "Molecular Structure of Nucleic Acids", Nature, 171, 737, 1953..
- 3- E. L., Smith, "Bioquímica: aspectos gerais", Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 120-142, 1985.
- 4- M. K. Campbell, "Biochemistry", 2º edição, S. C. Publishing, USA, 1995.
- 5- S. Hanlon, S. Brudno, T. T. Wu e B. Wolf, "Structural Transitions of Deoxyribonucleic Acid in Aqueous Electrolyte Solutions. I. Reference Spectra of Conformational Limits", Biochemistry, 14, 1648, 1975.
- 6- D. Perahia, M. S. Jhon e B. Pullman, "Theoretical Study of the Hydration of B-DNA", Biochim. Biophys. Acta, 474, 349, 1977.
- 7- V. I. Ivanov, "Different Conformations of Double Stranded Nucleic Acid in Solution as Revealed by Circular Dichroism", Biopolymers, 12, 89, 1973.
- 8- S. Bram, "The Secondary Structure of DNA in solution and in Nucleohistone", J. Mol. Biol., 58, 277, 1971.
- 9- Pritchard, A. Blake e A. R. Peacocke, "Modified Intercalation Model for the Interaction of Aminoacridines and DNA", Nature, 212, 1360, 1966.
- 10- R. A., Baricatti, "Estudos sobre a estabilidade e estrutura do DNA através da fotofísica de corantes intercalados", Tese de Doutorado, Unicamp, 1998.
- 11- H. M. Sobell, "Structural and dynamic aspects of drug intercalation into DNA and RNA", and "Nucleic acid geometry and dynamics", Ed. R. H. Sarma, Pergamon Press, New York, pags. 289-323, 1980.
- 12- L. S. Lerman, "Structural considerations in the interaction of DNA and acridines", J. Mol. Biol. 3,18, 1961.
- 13- B. Zdenka e B. Brabec, "Reinterpretation of fluorescence of terbium ion-DNA complexes", Biophysical Chemistry, 33,55-61, 1989.

- 14- T. Kohwi- Shigematsu, R. Gelinas and H. Weintraub, "Human fetal to adult Hemoglobin switching-changes in chromatin structure of the Beta Globin Gene Locus", *P. Natl. Acad. Sci-Biol.*,80(24):7551-7555, 1983.
- 15- H. Johnston and A. Rich,"Chemical Probes of DNA conformation-Detection of Z-DNA at nucleotide resolution ",*Cell* 42(3):713-724, 1985.
- 16- D. P. Ringer, S. Burchett and D. E. Kizer,"Use of terbium-3 fluorescence enhancement to selective monitor DNA and RNA guanine residues and their alteration by chemical modification ", *Biochemistry-US* 17(22):4818-4825, 1978.
- 17- C. D. Barry, A. C. T. North, J. A. Glasel, R. J. P. Williams, and A. V. Xavier,"Quantitative determination of mononucleotide conformations in solution using lanthanide ion shift and broadening NMR probes", *Nature* 232(5308):236, 1971.
- 18- O. L. Horer, C. N. Zaharia and A. Marcu,"Terbium fluorescence in aqueous-solutions os nucleic-acids",*Rev. Roum Biochim* 14(3):175-179, 1977.
- 19- M. Al-Hakeem and S. S. Sommer, "Terbium identifies double-stranded-RNA on gels by quenching the fluorecence of intercalated ethidium bromide", *Anal. Biochem.* 163(2):433-439, 1987.
- 20- M. D. Topal, J. R. Fresco, "Polinucleotides fluorecence of terbium ion-nucleic acid complexes-A sensitive specific probe for unpaired residues in nucleic-acids", *Biochemistry-US* 19(24):5531-5537, 1980.
- 21- W. Y. Li et al., "Determination of DNA using sodium 9,10-antraquinone-2-sulfonate as an in situ photochemical fluorecence probe", *Anal. Chim. Acta*340((1-3):291-296, 1997.
- 22- Klakamp. L. Scott and H. D. William, "Lanthanide Ion Luminescence as a Probe of DNA Structure. 1. Guanine-Containing Oligomers and Nucleotides", *Journal of Inorganic Biochemistry* 46:175-192, 1992.
- 23- D. P. Ringer, B. A. Howell, and D. E. Kizer, "Use of terbium fluorescence enhancement as a new probe for assessing the single strand content of DNA", *Anal. Biochem.* 103(2):337-342, 1987.

- 24- M. Arquila, L. M. Thompson, and H. Simpkins, "Effect of Platinum anti-tumor agents on DNA and RNA investigated by terbium fluorescence", *Cancer Res* 43(3):1211-1216, 1983.
- 25- H. Simpkins, L. F. Pearlman, and L. M. Thompson, "Effects of Adriamycin on super coiled DNA and Calf Thymus nucleosomes studied with fluorescent-probes", *Cancer Res* 44(2):613-618, 1984.
- 26- O. Vrana, V. Brabec and V. Kleinwachter, "Polarographic studies on the conformation of some Platinum complexes-relations to antitumor-activity Anti-cancer", *Drug Des* 1 (2) : 95-109, 1986.
- 27- G. Floser e D. Haarer, "The photochemical properties of daunomycin solution and intercalated into DNA studied by photochemical hole burning". *Chem. Phys. Lett.*,144,288, 1988.
- 28- F. Frezard e A. Garnier-Suillerot, "Comparison of the binding of anthracycline derivatives to purified DNA and to nucleic", *Biochem. Biophys. Acta*,1036,121, 1990.
- 29- W. Kersten et. al., "Physicochemical properties of complexes between deoxyribonucleic acid and antibiotics with affect ribonucleic acid synthesis(actinomycin, daunomycin, cinerubin, nogalamycin, chromomycin, mithramycin,and olivomycin)", *Biochemistry*, 5, 237, 1966.
- 30- A. N. Júlio, "Aditivos de Alimentos – Teoria e prática", Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa , 1997.
- 31- S. S. Geni, C. Denise, M. L. Maria, C. C. Flávio, N. N. Afonso, M. A. Samira, "Corantes na Indústria de Alimentos", *Revista Nacional da Carne*, Junho de 1993.
- 32- A. H. Abdel Aziz, Samia A. Shouman, and S. F. Saad, "A Study on Reproductive toxicity of Erythrosine in Male Mice", *Pharmacological Research*, 35 (5), 1997
- 33- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide (AF-2), in: (IARC) Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Some food Additives, feed



- additives and Naturally Occurring substances, Vol. 31, World Health Organization, p. 47, 1983.
- 34- International Agency for research on Cancer (IARC), p-Dimethylaminoazobenzene, in: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals of Humans: Some Aromatic Azo Compounds, Vol.8, World Health Organization, 125-139, 1975.
- 35- Golightly L. k., Smolinske S. S., Bennett M. L. et . al., "Adverse effects associated with inactive ingredients in drug products", *Pharmaceutical excipients*, (3):128-65, 1988.
- 36- A. Kumar, R. M. Weatherly, D. C. sweeteners, "Sweeteners, flavorings, and dyes in antibiotic preparation s", *Pediatrics* 87:352-60, 1991.
- 37- Committee on Drugs, American Academy of Pediatrics, "Inactive ingredients in pharmaceutical products", *Pediatrics* 76: 635-43, 1985.
- 38- M. Hayashi, M. Matsui, K. Ishii, M. Kawasaki, "Genotoxicity evaluation datasheet of food additives by the MHW", *Environ. Mutagen. Res.* 22 (2000) 27-44 (1980-1998).
- 39- S. F. Yu, K. Satomi, K. Asako, O. Miyuki, K. Kazumi, I. Kayoko, T. Kazuyuki, T. Shuji, "The Comet Assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives", *Mutation Research* 519 : 103-119, 2002.
- 40- J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, "T. molecular cloning. A laboratory manual", 2a. edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989.
- 41- R. A. Baricatti , "Estudos espectroscópicos sobre as substâncias Alaranjado de Acridina e Daunomicina intercaladas em ácido desoxirribonucleico", Tese de Mestrado, Unicamp, 1993.
- 42- R. A. Barbosa, "Intercalação dos corantes alimentícios Vermelho-40 e Tartrazina em ácido desoxirribonucleico", Dissertação de Mestrado, Uberlândia, 2001.
- 43- J. Mazershi and K. Muchewicz, "The intercalation of imidazoacridinones into DNA induces conformational changes in their side chain", *Acta Biochimica Polonica*, 47, 1, 2000.

- 44- D. Patel, "NMR studies of structure and dynamics of synthetic DNA and RNA duplexes and their antibiotic intercalation complexes in solution", em "Nucleic acid geometry and dynamics", editor R; H. Sarma, Pergamon Press, New York (1980), p.185-231.
- 45- A. Andreoni et al, "Structural studies in biological molecules via laser-induced fluorescence: acridine-DNA complexes", em "Chemical and biochemical applications of lasers", ed. C. B. Moore, Academic Press, New York (1979), vol. IV, p.1-30.
- 46- C. F. Geraldles and R. J. P. Williams, "NMR-study of the conformation of a dinucleotide in solution using the lanthanide probe method", EUR J. Biochem. 97 (1) : 93-101 (1979).
- 47- R. P. David, E. L. Janet, and K. E. Donald, "The Influence of DNA Sequence on Terbium (III) Fluorescence Enhancement by DNA", J. Inorg. Biochemistry 24, 137-145 (1985).
- 48- J. Marmur, "A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms", J. Mol. Biol., 3, 208 (1961).
- 49- D. A. Skoog; D. M. West, "Principles of Instrumental Analysis", Hol, Rinehart and Winston, Inc. USA (1971).
- 50- O. A. Ohlweiler, "Química Analítica Quantitativa", Livros Técnicos e Científicos, Rio de Janeiro, 1974.
- 51- W. Saenger, "Principles of nucleic acid structure", Springer – Verlag, Heidelberg, 1984.
- 52- Colaboração de Jackson Antônio Lamounier Camargos Resende; estudos utilizando o Programa Hyperchem 5.11 – Hyperchem Computacional Chemistry; Hypercube, Inc., 1996;
- 53- J. R., Dyer, "Aplicações da Espectroscopia de Absorção aos Compostos Orgânicos", Ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1-10, 1969.
- 54- H. H., Perkampus, "UV-Vis Spectroscopy and Its Applications", Springer Laboratory, Berlin, 1-4, 1992.