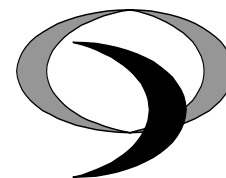




UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDOS SOBRE A INTERCALAÇÃO DOS CORANTES AZUL
BRILHANTE-FCF E AZUL DE COOMASSIE G-250 EM ÁCIDO
DESOXIRRIBONUCLEÍCO (DNA)**

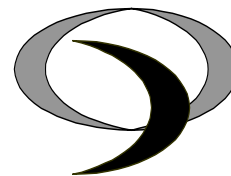
CARMEN FABÍOLA OTONI DE QUEIROZ

Uberlândia-MG

Julho/2007



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA



PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDOS SOBRE A INTERCALAÇÃO DOS CORANTES
AZUL BRILHANTE-FCF E AZUL DE COOMASSIE G-250 EM ÁCIDO
DESOXIRRIBONUCLEÍCO (DNA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química na Universidade Federal de Uberlândia-UFU para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração: Química Inorgânica.

CARMEN FABÍOLA OTONI DE QUEIROZ

Orientadora: Profa. Dra. SANDRA TEREZINHA DE FARIAS FURTADO

**Uberlândia-MG
Julho/2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Q3e Queiroz, Carmem Fabíola Otoni de, 1975-

Estudos sobre a intercalação dos corantes azul brilhante-FCF e azul de coomassie G-250 em ácido desoxirribonucleico (DNA) / Carmen Fabíola Otoni de Queiroz. - 2007.

102 f. : il.

Orientadora: Sandra Terezinha de Farias Furtado.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia,

Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Corantes - Teses. I. Furtado, Sandra Terezinha de Farias. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 54



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química- MESTRADO
E-mail: cpqquimica@ufu.br - Fone: 3239-4385

ALUNO(A): CARMEM FABIOLA OTONI DE QUEIROZ

NÚMERO DE MATRÍCULA: 5052410

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

"Estudos sobre a Intercalação dos Corantes Azul Brilhandt-FCF e Azul de Coomassie G-250 em Ácido Desoxirribonucléico (DNA)"

ORIENTADOR:

PROF^a DRA. SANDRA TEREZINHA DE FARIAS FURTADO

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada na Sala 1G 215 no Campus Santa Mônica, no dia 26 de julho de 2007, às 14h00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof^a Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Instituto de Química / UFU)

Prof^a Dra. Sandra Morelli
(Instituto de Genética e Bioquímica / UFU)

Prof^a Dra. Lídia Andreu Guillo
(Instituto de Ciências Biológicas / UFG)

[Handwritten signatures of Sandra Terezinha de Farias Furtado, Sandra Morelli, and Lídia Andreu Guillo]

Uberlândia, 26 de julho de 2007.

Aos meus pais; Valter e Amélia e aos
meus avós Alzira e Orcalino
(*in memoriam*) que estão sempre em
meus pensamentos.

Agradecimentos

Durante quase dois anos, muitas pessoas contribuíram para o desenvolvimento e concretização deste trabalho, a quem quero expressar o meu sincero agradecimento.

Especialmente à minha orientadora, Professora Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado, pela orientação, apoio, amizade e ensinamentos valiosos na elaboração deste trabalho e, sobretudo pela confiança em mim depositada.

Aos professores; Dr. Antônio Eduardo da Hora Machado, Dra. Rejane Maria Ghisolfi da Silva e Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado, que ministraram as disciplinas cursadas durante o curso.

Aos colegas do Laboratório de Biossegurança e Bioinorgânica do Instituto de Química-UFU; Juliana, Ana Maria e Batuira, pelo companheirismo e amizade, sem falar na imprescindível colaboração para a realização das análises.

Aos funcionários dos laboratórios de ensino, que prontamente sempre nos atenderam, colaborando com reagentes e equipamentos.

Aos professores; Dr. Sebastião Eiras e Dr. Ortellado pela contribuição no estudo da variação do pH dos corantes. Ao doutorando Edmar pela colaboração na plotagem dos dados na região do UV/Vis.

Ao colega, professor João Ribeiro Franco Neto pela cooperação e amizade nos momentos de intranquilidade.

A Dona Maria dos Anjos, minha eterna gratidão, que me hospedou em sua casa com todo carinho e dedicação, sempre com uma palavra amiga nas horas difíceis.

À Deus, por estar sempre ao meu lado e por ter permitido chegar até aqui.

ÍNDICE GERAL

ASSUNTO	Página
Índice de Tabelas	i
Índice de Figuras	ii
Índice de Quadros	iv
Abreviaturas	v
Resumo	vi
Abstract	vii
1 Introdução	2
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo Geral	3
1.1.2 Objetivos Específicos	3
1.2 (DNA) ácido desoxirribonucléico	4
1.3 Estrutura do DNA	5
1.4 Dupla Hélice do DNA	8
1.5 Estruturas dinâmicas do DNA	11
1.6 Fenômeno da Intercalação	13
1.7 Corantes Alimentícios	15
1.7.1 Corante Azul Brilhante - FCF	17
1.8 Corantes para ensaios bioquímicos	19
1.8.1 Corante Azul de Coomassie	19
2 Parte Experimental	22
2.1 Materiais	22
2.2 Equipamentos	22
2.3 Preparo das Soluções	22
2.3.1 Solução estoque de DNA	22
2.3.2 Solução estoque do Azul Brilhante e Azul de Coomassie	23
2.3.3 Solução estoque para curvas de calibração	23

2.3.3.1	Curva de Calibração do DNA.....	23
2.3.3.2	Curva de Calibração do Azul Brilhante.....	24
2.3.3.3	Curva de Calibração do Azul de Coomassie	24
2.3.4	Soluções para estudos sobre a variação do pH do meio do Azul Brilhante e Azul de Coomassie	24
2.3.5	Soluções para estudos sobre a intercalação	25
2.3.5.1	Soluções para estudos sobre a intercalação do Azul Brilhante em DNA	25
2.3.5.2	Soluções para estudos sobre a intercalação do Azul de Coomassie em DNA.....	27
2.3.6	Precipitação do DNA puro para estudos no Infravermelho.....	29
2.3.7	Precipitação do DNA com os corantes para estudos no Infravermelho.....	29
3	Resultados e Discussão.....	31
3.1	Espectros de UV/Visível das soluções	31
3.2	Curvas de Calibração	34
3.3	Estudos sobre variação de pH do meio dos corantes.....	38
3.3.1	Comportamento do Corante Azul Brilhante em meio ácido e básico ...	38
3.3.2	Comportamento do Corante Azul de Coomassie em meio ácido e básico	41
3.4	Estudos sobre Intercalação	43
3.4.1	Estudos sobre Intercalação do Corante Azul Brilhante em DNA	43
3.4.2	Estudos sobre Intercalação do Corante Azul de Coomassie em DNA.....	55
3.5	Alterações na estrutura do DNA por análise espectrofotométrica na região do Infra vermelho (IV)	67
4	Conclusão	75
5	Trabalhos Futuros	77
6	Apêndice.....	79
6.1	Apêndice – A	79
6.2	Apêndice – B	89
7	Referências Bibliográficas.....	96

Tabela – 1: Valores das concentrações de DNA e do Azul Brilhante (DNA variável e AZB fixo)	26
Tabela – 2: Valores das concentrações de DNA e do Azul Brilhante (DNA fixo e AZB variável)	27
Tabela – 3: Valores das concentrações de DNA e do Azul de Coomassie (DNA variável e AZC fixo)	28
Tabela – 4: Valores das concentrações de DNA e do Azul de Coomassie (DNA fixo e AZC variável)	28

Figura – 1.1: Bases purinas, bases pirimidinas e nucleotídeo	6
Figura – 1.2: Ligação fosfodiéster no esqueleto covalente do DNA.....	7
Figura – 1.3: Modelo diagramático da dupla hélice do DNA	10
Figura – 1.4: Pareamento das bases por ligações de hidrogênio.....	10
Figura – 1.5: Estruturas dinâmicas do DNA (A-DNA, B-DNA e Z-DNA).....	12
Figura – 1.6: Fórmula estrutural do Corante Azul Brilhante FCF.....	18
Figura – 1.7: Fórmula estrutural do Corante Azul de Coomassie G-250.....	20
Figura – 3.1: Espectro de absorção de DNA $3,42 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	31
Figura – 3.2: Espectro de absorção do corante Azul Brilhante-FCF $4 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$	32
Figuras– 3.3: Espectro de absorção do corante Azul de Coomassie G-250 $2,5 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ (A): λ_{max} 601 nm e (B): λ_{max} 260 nm	33
Figura – 3.4: Curva de calibração do DNA (λ_{max} 260 nm)	34
Figura – 3.5: Curva de calibração do Corante Azul Brilhante FCF (λ_{max} 630nm)	35
Figura – 3.6: Curva de calibração do Corante Azul de Coomassie (λ_{max} 602nm)	36
Figura – 3.7: Comportamento do corante Azul Brilhante-FCF $4 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em função do pH	39
Figura – 3.8: Comprimento de onda máximo corante Azul Brilhante-FCF (λ_{max} 630nm) $4 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ em função do pH.....	40
Figura – 3.9: Comportamento do corante Azul de Coomassie $4 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em função do pH	42
Figura – 3.10: Variação da concentração do DNA em função da concentração livre de corante Azul Brilhante, na mistura	46
Figura – 3.11: Espectros de absorção das soluções contendo DNA e corante Azul brilhante $[\text{AZB}] = 6,66 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[\text{P}_{\text{DNA}}]$ variáveis	47
Figura – 3.12: Variação da concentração adicionada do corante Azul Brilhante em função da concentração do DNA, na mistura	50
Figura – 3.13: Variação do efeito hipercrômico do corante Azul Brilhante em função da concentração do DNA, na mistura	51
Figura – 3.14: Duplo-recíproco da variação da concentração adicionada do corante Azul Brilhante em função da concentração efetiva do DNA.....	54

Figura – 3.15: Variação da concentração do DNA em função da concentração livre de corante Azul de Coomassie (602 nm) na mistura	58
Figura – 3.16: Espectros de absorção das soluções contendo DNA e corante Azul brilhante [AZC] = $6,66 \times 10^{-6}$ mol. L ⁻¹ e [P _{DNA}] variáveis	59
Figura – 3.17: Variação da concentração adicionada do corante Azul de Coomassie em função da concentração do DNA, na mistura.....	62
Figura – 3.18: Variação do efeito hipocrômico do corante Azul de Coomassie em função da concentração do DNA, na mistura	63
Figura – 3.19: Duplo-recíproco da variação da concentração adicionada do corante Azul de Coomassie em função da concentração efetiva do DNA.....	66
Figura – 3.20: Espectro de absorção do IR do DNA _p	70
Figura – 3.21: Espectro de absorção do IR do DNA _{prec} com álcool isopropanol	71
Figura – 3.22: Espectro de absorção do IR do DNA/Azul Brilhante	72
Figura – 3.23: Espectro de absorção do IR do DNA/Azul de Coomassie	73
Figura – 6.1: Diagrama esquemático do espectro eletromagnético.....	80
Figura – 6.2: Níveis de Energia eletrônica molecular.....	84
Figura – 6.3: Principais aplicações da espectrometria no infravermelho	86
Figura – 6.4: Vibrações de um grupo de átomos	87

Quadro – 1: Estudos sobre intercalação variando a concentração do DNA fixando a concentração do corante Azul Brilhante-FCF.....	44
Quadro – 2: Estudos sobre intercalação variando a concentração do corante Azul Brilhante FCF fixando a concentração do DNA.....	49
Quadro – 3: Duplo recíproco variação da concentração do Azul Brilhante fixando a concentração do DNA	53
Quadro – 4: Estudos sobre intercalação variando a concentração do DNA fixando a concentração do corante Azul de Coomassie	56
Quadro – 5: Estudos sobre intercalação variando a concentração do corante Azul de Coomassie fixando a concentração do DNA	61
Quadro – 6: Duplo recíproco variação da concentração do Azul de Coomassie fixando a concentração do DNA	65

Abreviaturas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AZB	Azul Brilhante
AZC	Azul de Coomassie
CI	Colour Index
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
DINAL	Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
DNA _p	DNA puro
DNA _{prec}	DNA precipitado
DNA _{AZB}	DNA precipitado com Azul Brilhante
DNA _{AZC}	DNA precipitado com Azul de Coomassie
FAO	Food and Agriculture Organization
IDA	Ingestão Diária Aceitável
INS	International Numbering System (Sistema Internacional de Numeração)
K _{int}	Constante de Intercalação
OMS	Organização Mundial da Saúde
P _[DNA]	Concentração de grupos fosfatos de DNA
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido ribonucleico)
S _[DNA]	Concentração de sítios de intercalação de DNA
UV/Vis	Ultra violeta / Visível

RESUMO

Este trabalho versa sobre o processo de intercalação de dois tipos de corantes em DNA, o Azul brilhante FCF, um corante alimentício e o Azul de Coomassie G-250, que é habitualmente usado em ensaios bioquímicos. Dados obtidos através de ensaios de espectrofotometria de absorção na região do UV/Vis e de infravermelho com relação ao complexo formado entre o DNA/Azul Brilhante mostram uma efetiva interação entre o Azul Brilhante FCF e o DNA, reforçando a possibilidade do corante estar intercalando entre as bases do DNA, ocupando principalmente o sítio da guanina. Não foram observadas alterações tão relevantes nas absorções com relação ao complexo formado entre o DNA/ Azul de Coomassie. Podemos concluir que o Azul de Coomassie pode estar se ligando através de interação eletrostática na superfície do DNA, ou seja, se ligando aos grupos fosfatos.

ABSTRACT

This work turns on the process of intercalation of two types of dyes in DNA, the Brilliant Blue FCF, an food dye and the Coomassie Blue G-250, that is habitually used in biochemists assays. Data gotten through assays of the spectroscopy of absorption in the region of the UV/Vis and of infrared with regard to the complex formed between DNA/ Brilliant Blue show an effective interaction between Brilliant Blue FCF and the DNA, strengthening the possibility of the dye to be intercalating enter the bases of the DNA, occupying mainly the site of guanine. So excellent alterations in the absorptions with regard to the formed complex had not been observed enter the DNA/Coomassie Blue. We can conclude that the Coomassie Blue G-250 can be binding through electrostatic interaction in the surface of the DNA, that is, binding to the phosphate groups.

INTRODUÇÃO

1- Introdução

Cada ser vivo que habita a Terra possui uma codificação diferente de instruções em seu DNA “*escritas*” na mesma linguagem. Estas diferenças geram as diferenças orgânicas entre os organismos vivos. A informação genética, armazenada nos cromossomos e transmitida às células filhas através da replicação do DNA, é expressa através da transcrição em RNAm (RNA mensageiro) e a tradução subsequente em cadeias polipeptídicas. Resumidamente, o código do DNA é transcrito para o RNA mensageiro, que, então, deixa o núcleo para ser traduzido em proteínas. Vários fatores afetam diretamente a expressão e/ou a estrutura do DNA, sendo que um dos agentes que podem interagir com o polímero é o corante.

Estudos sobre a intercalação de corantes em DNA foram realizados mostrando que essas substâncias intercalam entre seus pares de bases. Dados sobre a intercalação dos corantes Eritrosina, Tartrazina, Vermelho – 40 e Amaranto em DNA, já foram obtidos no laboratório Biossegurança e Bionorgânica da Profa. Sandra Terezinha de Farias Furtado, Instituto de Química/UFU. Estes resultados comprovaram a intercalação dos corantes citados e foram objetos de duas teses de mestrado (BARBOSA, 2002 e GIACOMELLI, 2003).

1.1 - Objetivos

1.1.1 - Objetivo Geral

Verificar os efeitos dos corantes: Azul Brilhante-FCF e Azul de Coomassie G-250 no DNA e as possíveis mudanças estruturais no polinucleotídeo, através de métodos espectroscópicos.

1.1.2 – Objetivos Específicos

Estudar os efeitos dos corantes Azul brilhante FCF e Azul de Coomassie G-250 no DNA. Estes estudos abrangem o coeficiente de extinção molar dos corantes e o coeficiente de extinção molar do DNA; o efeito da variação do pH do meio dos corantes; variação da concentração do DNA na intercalação com os corantes, testes realizados na região do UV/Visível e precipitação do DNA com isopropanol e a posterior análise espectrofotométrica na região do infravermelho.

1.2- (DNA) ácido desoxirribonucléico

Os nucleotídeos possuem uma variedade de papéis no metabolismo celular. Eles são a moeda energética nas transições metabólicas, os elos químicos essenciais na resposta das células aos hormônios e outros estímulos extra celulares, e os componentes estruturais de uma coleção de co-fatores enzimáticos intermediários metabólicos. Eles são os constituintes dos ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucléico – DNA e ácido ribonucléico – RNA. O DNA é a molécula repositória da informação genética e da estrutura de cada proteína. Cada biomolécula de componente celular é um produto da informação programada na seqüência nucleotídica dos ácidos nucleicos da célula. A seqüência de aminoácidos de cada proteína em uma célula e a seqüência de cada molécula de RNA é especificada pela seqüência do DNA da célula. Um segmento de DNA que contém informações necessárias para síntese de um produto biológico funcional, seja proteína ou RNA, é referido como um gene. A habilidade de armazenar e transmitir informação genética de uma geração para a próxima é uma condição fundamental para a vida (STRYER, 1996; LEHNINGER, 2002).

1.3 - Estrutura do DNA

O DNA é um polímero de unidades desoxirribonucleotídeas; um nucleotídeo consiste numa base nitrogenada ligada a uma ose e a um ou mais grupamentos fosfatos. A ose em um desoxirribonucleotídeo é a desoxirribose. O prefixo desoxi indica que nesta ose falta um átomo de oxigênio que está presente na ribose, o composto original. A base nitrogenada é um derivado de purina ou pirimidina. (STRYER, 1996).

A figura 1.1 ilustra as bases constituintes dos ácidos nucléicos; as bases encontradas no DNA são as purinas; (Adenina (a) e Guanina (b)) e as pirimidinas (Timina (c) e Citosina (d)); no RNA a base Timina do DNA é substituída pela Uracila (e). Em resumo para o DNA as bases são: adenina, guanina, citosina e timina e para o RNA as bases são: adenina, guanina, citosina e uracila. A unidade monomérica que representa o nucleotídeo (f) é formada pela pentose que se liga a uma das bases e, por último, ao grupo fosfato.

A base de um nucleotídeo une-se covalentemente pelo N-1 das pirimidinas e pelo N-9 das purinas por meio de uma ligação N- β -glicosídica, ao carbono-1' da pentose; o fosfato está esterificado ao carbono-5' (STRYER, 1996). Os nucleotídeos sucessivos do DNA são ligados covalentemente por meio de “pontes” de grupos fosfato, em que o grupo 5'-hidroxila de uma unidade nucleotídica une-se ao grupo 3'-hidroxila do nucleotídeo seguinte por uma ligação fosfodiéster (figura 1.2). Todas as ligações fosfodiéster possuem a mesma orientação ao longo da cadeia, conferindo a cada fita linear do ácido nucléico uma polaridade específica e distinta nas extremidades 5' e 3' (LEHNINGER et al., 2002).

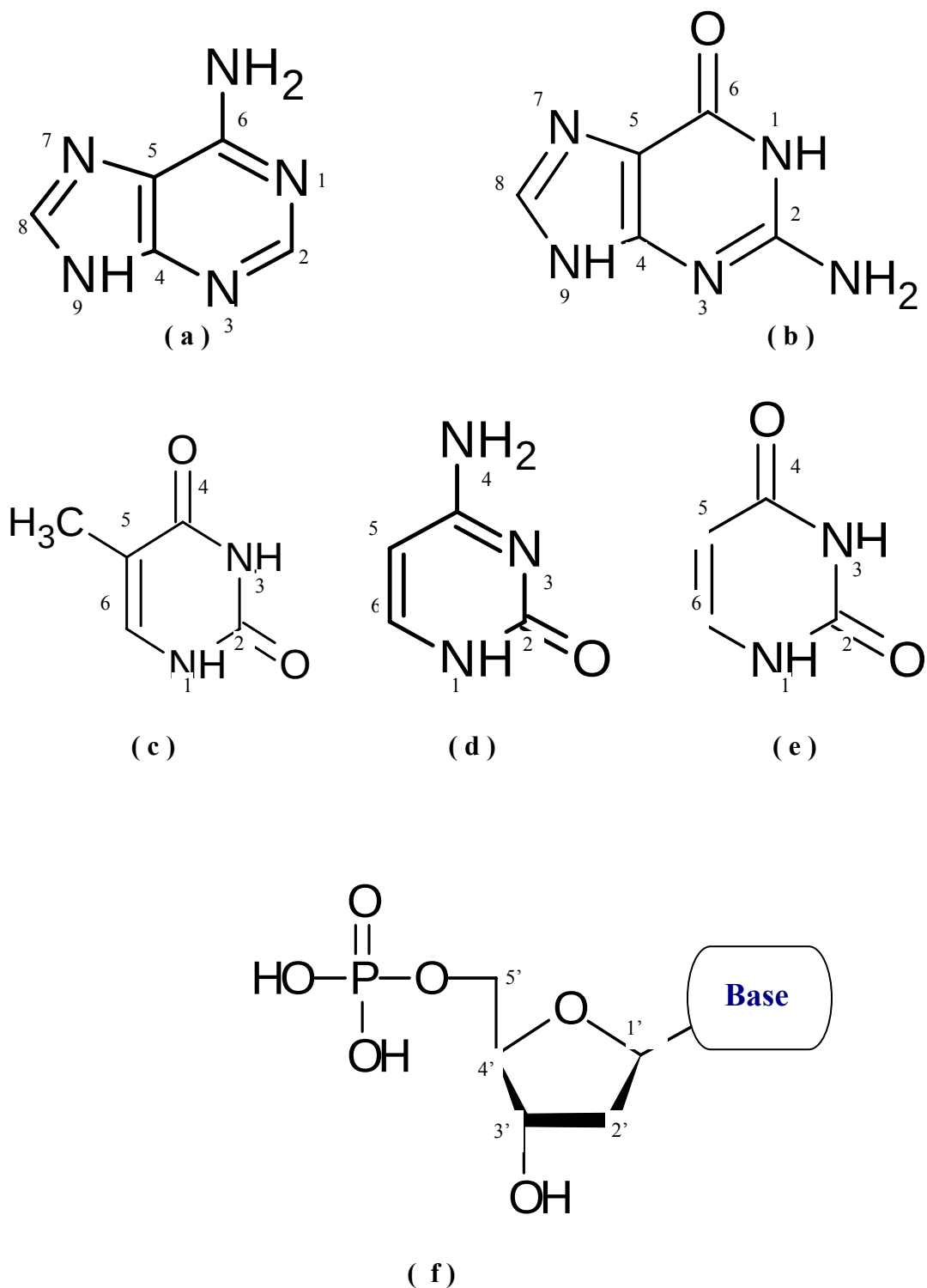


Figura: 1.1- As bases purinas; adenina(a), guanina(b), e as bases pirimidinas; timina (c), citosina(d), uracila(e), nucleotídeo(f) (ATKINS e LORETTA 1997).

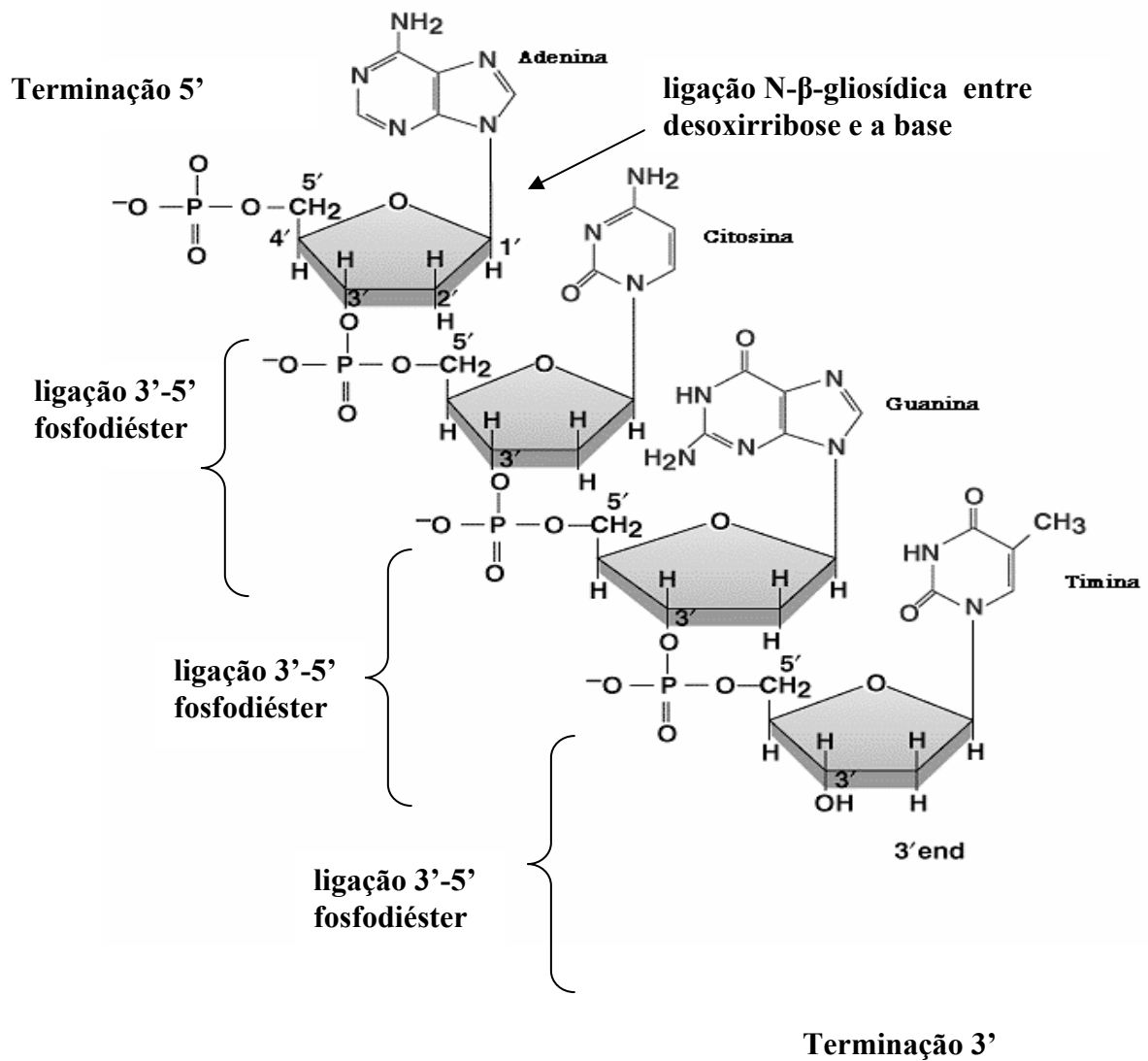


Figura: 1.2 - Ligação fosfodiéster no esqueleto covalente do DNA. A extremidade 5' da macromolécula não possui nucleotídeo na posição 5' e a extremidade 3' não possui nucleotídeo na posição 3'.
(DEVLIN, 1997)

1.4 - Dupla Hélice do DNA

A elucidação da dupla hélice do DNA estabelecida por Watson e Crick foi baseada em importantes informações obtidas por outros pesquisadores relatados a seguir. Nos últimos anos da década de 1940, Erwin Chargaff concluiu que as bases adenina e timina ($A = T$) e guanina e citosina ($G \equiv C$) estão presentes em quantidades equimolares e a partir dessas relações segue-se que a soma dos resíduos das purinas iguala-se à soma dos resíduos de pirimidina. A difração de raios-X em fibras de DNA foi método usado por Rosalind Franklin e Maurice Wilkins; eles descobriram um padrão de difração de raios-X característico. A partir desse padrão deduziram que os polímeros de DNA são helicoidais com duas periodicidades ao longo do seu eixo maior, uma de 3,4 Å e outra de 34 Å. O problema então era formular um modelo tridimensional da molécula do DNA que poderia considerar não apenas os dados da difração de raios X, mas também as equivalências de bases específicas (LEHNINGER, 2002). A estrutura do sal de ácido desoxirribonucléico, (figura 1.3) foi proposta por Watson e Crick é descrita em artigo na revista *Nature* em 1953.

“Fizemos as suposições químicas usuais, ou seja, que cada cadeia consiste de grupos fosfato diester que ligam resíduos de β -D-desoxirribofuranose com ligações 3', 5'. As duas cadeias (mas não suas bases) estão ligadas por um par (díade) perpendicular ao eixo da fibra. Ambas as cadeias seguem hélices que giram no sentido dextrógiro, mas, por causa do par, as seqüências dos átomos nas duas cadeias vão em direções opostas, isto é, as bases estão do lado de dentro da hélice e os fosfatos na parte externa. o açúcar sendo aproximadamente perpendicular à base ligada. Há um resíduo em cada cadeia a cada 3,4 Å na direção z. Fizemos a suposição de um ângulo de 36° entre resíduos adjacentes na mesma cadeia, de modo que a estrutura se repete depois de 10 resíduos em cada cadeia, isto é, após 34 Å. A distância de um átomo de fósforo do eixo do filamento é de 10 Å. Como os fosfatos estão na parte externa, cátions têm acesso fácil a eles. A estrutura é aberta, e seu teor de água é bastante alto.

A característica nova da estrutura é a maneira pela qual as duas cadeias são mantidas juntas pelas bases purina e pirimidina. Os planos das bases são perpendiculares ao eixo do filamento. Elas estão unidas aos pares, sendo que uma única base de uma cadeia está conectada, por ligação de hidrogênio, a uma única base da outra cadeia, de modo que as duas jazem lado a lado com coordenadas z idênticas. Um dos pares deve ser uma purina e o outro uma pirimidina para que a ligação possa ocorrer. As ligações de hidrogênio são feitas como se segue: purina posição 1 para pirimidina posição 1; purina posição 6 para pirimidina posição 6. Foi observado experimentalmente (Chargaff, Wyatt, 1952) que a razão entre as quantidades de adenina e timina, e a razão entre guanina e citosina são sempre muito próximas da unidade para o ácido desoxirribonucléico. É provavelmente impossível construir essa estrutura com um açúcar ribose no lugar da desoxirribose, porque o átomo extra de oxigênio levaria a um contato de Van der Waals muito próximo. Os dados de raios-X sobre o ácido desoxirribonucléico previamente publicado (Atsbury, 1947; Wilkins e Randall, 1953) são insuficientes para um teste rigoroso de nossa estrutura. Até onde podemos afirmar, ela é aproximadamente compatível com os dados experimentais, mas isso deve ser considerado como não comprovado até que tenha sido verificado com dados mais precisos. Não escapou à nossa observação que o pareamento específico que postulamos sugere imediatamente um possível mecanismo de cópia para o material genético” (WATSON e CRICK, 1953).

O DNA nativo consiste em duas cadeias antiparalelas num arranjo de duplas hélices enroladas no sentido da mão direita, representado na figura 1.4. O pareamento das bases complementares de cada fita se dá de maneira padronizada ($A=T$ e $G\equiv C$), sendo que adenina forma duas ligações de hidrogênio com a timina e a citosina forma três ligações com a guanina (VOET e VOET, 1990). A superfície do DNA é composta por duas regiões distintas que se diferenciam pela geometria, denominadas **sulco maior** e **sulco menor**, uma cavidade menor e a outra maior (SCHABERLE, 2002).

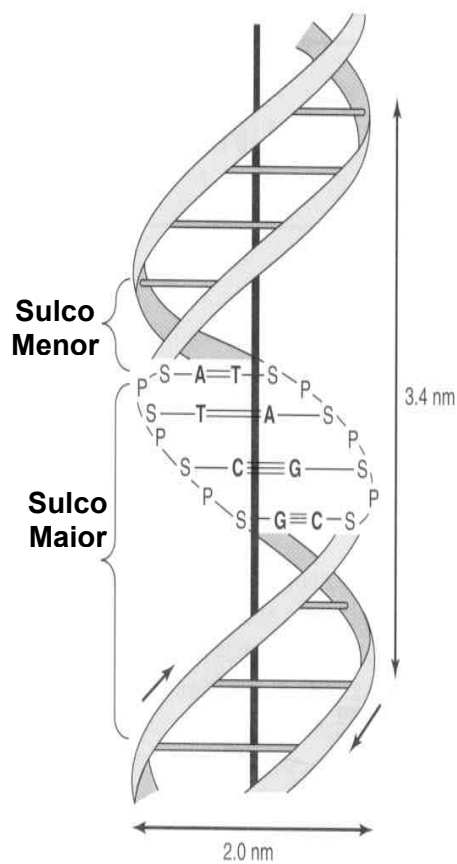


Figura: 1.3 - Modelo diagramático da dupla hélice do DNA forma B (VOET e VOET, 1990)

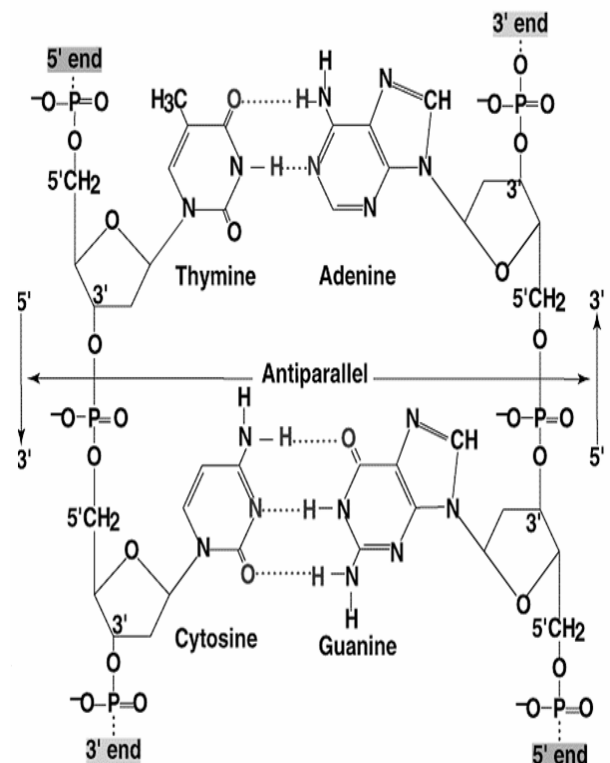


Figura: 1.4 - Pareamento das Bases por ligações de hidrogênio, fita dupla de DNA (CONN e STUMPF, 1980)

1.5 - Estruturas dinâmicas do DNA

O DNA é uma molécula estruturalmente dinâmica que pode existir em uma variedade de formas helicoidais: A-DNA, B-DNA e Z-DNA. A forma B-DNA é a fisiológica mais encontrada, onde as interações com as bases nitrogenadas promovem a formação da dupla hélice com rotação para a direita e das fendas menor e maior; seu comprimento é de 34 Å e o diâmetro de aproximadamente 20 Å, com espaçamento entre os pares de base de 3,4 Å, e 92% de grau de hidratação. A forma A-DNA é a isoforma do DNA que está presente em meio com baixa concentração de água, apresentando diâmetro de aproximadamente 26 Å e espaçamento entre os pares de base de 2,7 Å e apresenta um 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 Z-DNA possui a rotação da hélice para a esquerda, sendo bem diferente das outras duas isoformas (KRUGH, 1994; BARICATTI, 1995; STRYER, 1996).

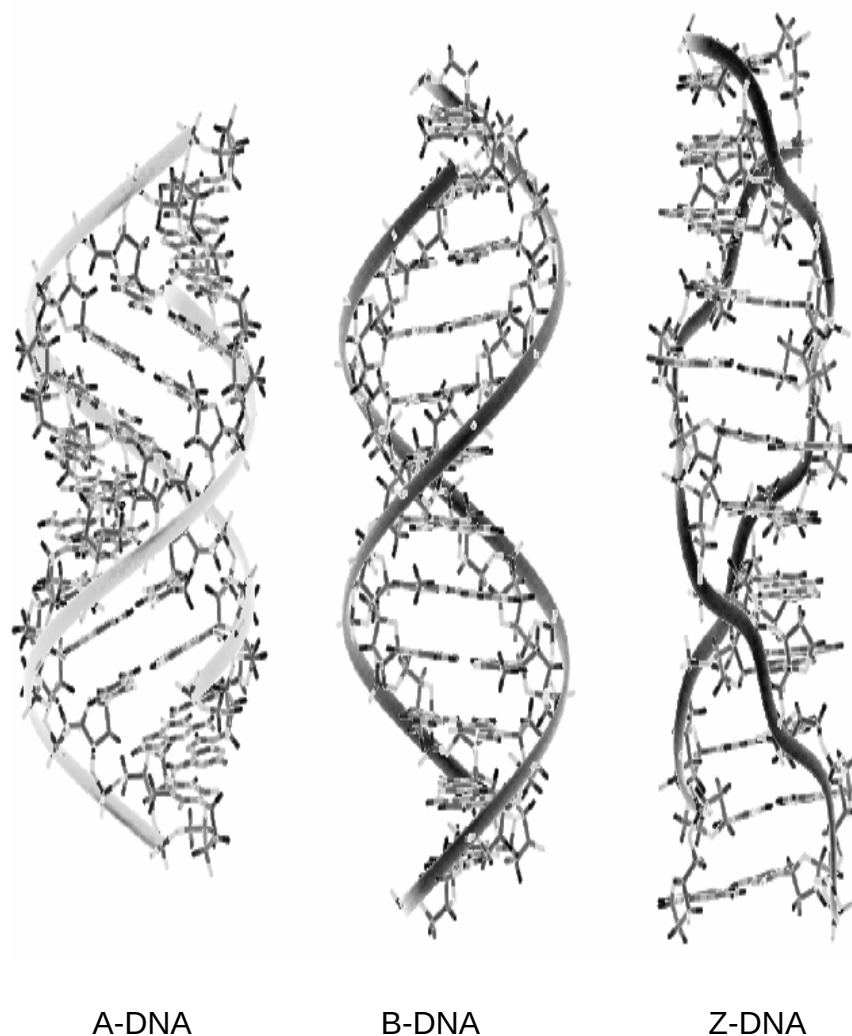


Figura: 1.5 - Estruturas dinâmicas do DNA: A-DNA parcialmente desidratado, hélice mais curta e larga; B-DNA sob condições fisiológicas e Z-DNA com polímeros ricos em G:C, com purinas e pirimidinas alternadas na mesma fita, hélice menos torcida com movimento em zig-zag do esqueleto ose-fosfato.
(http://en.wikipedia.org/wiki/Image:A-B-Z-DNA_Side_View.png)

1.6 - Fenômeno da intercalação do DNA com algumas substâncias

Dentre as diversas substâncias com propriedade intercalantes no DNA, ressaltam-se algumas, como: antibióticos, acridinas, cloroquina, brometo de etídeo, iodeto de propídeo, antibióticos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, corantes, entre outros (BARICATTI, 1995; ALMEIDA et al., 2005). A interação de alguns compostos com o DNA depende de características como hidrofobicidade, carga e a estrutura espacial (tamanho em particular). Os compostos hidrofóbicos ou anfífilos, de tamanho adequado, podem intercalar entre as bases nitrogenadas do DNA, ou, se possuem carga positiva, podem se ligar através da interação eletrostática na superfície do DNA, onde os grupos fosfatos têm carga negativa para esta região (KURODA e TANAKA, 1994).

Agentes intercalantes antineoplásicos têm como alvo principal a fenda menor do B-DNA, por um mecanismo de ação que se baseia na intercalação nos pares de base nitrogenada CG (citosina e guanina). A intercalação apresenta uma componente eletrostática relacionada à interação do tipo π , existente entre os intercalantes e as bases CG, além de complexos de transferência de elétrons. Devido a esta característica, os intercalantes são constituídos por anéis aromáticos fundidos, apresentando alta densidade eletrônica. Os antibióticos naturais tipos: antraciclina, como a doxorubicina e a daunorubicina, como citado, também costumam ser classificadas como agentes intercalantes. A presença de anéis aromáticos fundidos constituindo o arcabouço molecular também permite observar outra característica relacionada ao mecanismo de ação, que é o espaçamento das bases nitrogenadas do DNA. Os intercalantes interagem com as bases nitrogenadas CG provocando um espaçamento devido ao volume molecular, formando um ângulo de aproximadamente 90° em relação ao eixo do DNA

(ALMEIDA et al, 2005). A intercalação geralmente altera a estrutura do B-DNA, com o aumento no espaçamento dos pares de base CG de 3,4 Å para cerca de 7 Å. É descrito que o mecanismo de ação desta classe baseia-se na formação de um trímero constituído pelo intercalante, DNA e topoisomerase II. Este trímero seria estabilizado e interromperia a separação das bases nitrogenadas do DNA, necessária à transcrição (para os ligantes na fenda menor também seria observada esta característica). Algumas destas moléculas foram descritas como ativas, tendo como alvo biológico as topoisomerases I e II, entretanto a correlação entre a intercalação e a interação com a topoisomerase II ainda não foi definida, sendo objeto de diversos estudos recentes (POOT e KILLER, 1995).

De acordo com estudos hidrodinâmicos e de difração de raios-X, Lerman (1961) verificou as primeiras evidências sobre a intercalação em compostos derivados da acridina. O difratograma indicou um aumento na separação entre os pares de base do DNA. A intercalação ocorreu entre as bases adjacentes e foram observadas as seguintes variações na estrutura do DNA: aumento do comprimento da dupla hélice, distorção da cadeia açúcar – fosfato e deformação da estrutura helicoidal, nas proximidades dos sítios vizinhos de intercalação, tornando-os impróprios à intercalação.

Segundo Baricatti (1998) a intercalação destas substâncias com o DNA pode ser acompanhada por métodos espectroscópicos: que fornecem informações sobre a intensidade e a posição das bandas de absorção ou emissão. Em virtude do sistema cromóforo do agente intercalante, suas propriedades espectrais são alteradas quando interagem com o DNA. É evidenciado um aumento na absorção do DNA na região do ultravioleta, no pico máximo de 260nm, característico do polímero, fato que justifica-se pela diminuição ligações de hidrogênio, que coloca as bases mais expostas à luz.

1.6 - Corantes Alimentícios

Corantes são aditivos alimentares definidos como toda substância que confere, intensifica ou restaura a cor de um alimento. Conforme Resolução da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) nº 44/77 (Apêndice B), aditivo é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, sem o propósito de nutrir. A manutenção da cor natural do alimento constitui-se em um fator fundamental para o *marketing* do produto, (CONSTANT, STRINGHETA, SANDI, 2002).

Atualmente, tem-se manifestado uma consciência crescente em torno das características possivelmente tóxicas de muitos corantes. Essa tendência reflete em alguns países mediante o ajuste gradativo na sua utilização em produtos alimentares, cosméticos e medicinais. Segundo Schvartsman (1982) o uso do corante Amarantho foi proibido nos Estados Unidos e em outros países, devido a relatos de efeitos carcinogênicos em testes com animais.

Antes de serem liberados para consumo, os corantes passam por uma análise de risco por especialistas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização para a Alimentação e Agricultura (FAO), organismos da Organização das Nações Unidas (ONU) que definem se podem ser usados nos alimentos, em que produtos podem ser usados e suas quantidades. Também definem a chamada Ingestão Diária Aceitável (IDA), ou seja, quanto pode ser ingerido por dia, por uma pessoa em relação ao seu peso, sem que haja risco para a saúde. Apesar de terem a aprovação OMS/FAO, não significa que alguns deles não possam trazer riscos à saúde para determinadas pessoas que

apresentem alguma doença ou sensibilidade no organismo. Portanto, no caso dos aditivos, uma regra deve ser seguida: quanto menos, melhor.

No Brasil, em 28.01.87, a Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (DINAL/MS) pela Portaria Nº 17 (Apêndice B), proibiu a utilização dos corantes sintéticos: **Amarelo Ácido, Azul de Indatreno, Vermelho Sólido E, Escarlata GN e Laranja GCN**, fato que foi justificado pela ausência de informações toxicológicas seguras, o que representava risco potencial a saúde pública. No Brasil, a regulamentação do uso de aditivos para alimentos, inclusive corantes, é realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Pela legislação atual, através das resoluções nº 382 a 389/1999(Apêndice B) da ANVISA é permitido o uso de onze corantes artificiais, que são identificados por um Sistema Internacional de Numeração de Aditivos Alimentares, “*International Numbering System*”(INS) elaborado pelo Comitê do Codex; sendo eles: Tartrazina(INS-102), Amarelo Crepúsculo (INS-110), Amaranto (INS-123), Ponceau 4R (INS-124), Eritrosina (INS-127), Vermelho 40 (INS-129), Azul Patente V(INS-131), Indigotina (INS-132), Azul Brilhante (INS-133), Verde Rápido (INS-143) e Azorubina (INS-122).

O controle de qualidade e/ou toxicológico dos corantes, com relação a sua concentração nos alimentos é usualmente realizado por métodos cromatográficos ou espectrofotométricos. No caso dos métodos cromatográficos, características como alto custo e envolvimento de várias etapas de extração dificultam a obtenção de uma análise rápida. Já os métodos espectrofotométricos, embora mais acessíveis, apresentam limitada seletividade (KAPOR, et al., 2001). A literatura científica é farta em apontar cuidados com a ingestão dos sintéticos e revela reações adversas que podem causar a ingestão desses aditivos, como; alergias, disritmias cardíacas, problemas circulatórios,

gástricos e oftalmológicos, distúrbios da tireóide, câncer e mutações gênicas, (ANTUNES e ARAÚJO, 2000). Os corantes presentes nos alimentos podem ter efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos, isto é, podem induzir mutações no DNA e/ou podem favorecer o desenvolvimento de tumores. Acredita-se que cerca de (1/3) um terço de todos os cânceres humanos possam estar relacionados com o hábito alimentar (AMES, 1983; RENNER, 1990).

1.6.1 - Corante Azul Brilhante-FCF

O corante Azul Brilhante FCF é descrito como um sal dissódico com nomenclatura oficial: Sal dissódico de etil [4-[etil(m-sulfobenzil)amino]-2,5-ciclohexadieno-1-ilideno](m-sulfobenzil)Hidróxido de Amônio. O corante também é conhecido por, Erioglaucina, Blue Acid 9, Food Blue N° 1 (Japão). Tem a fórmula molecular $C_{37}H_{34}N_2O_9S_3Na_2$, peso molecular 792,84 g/mol e C.I. (Color Index) 42090; sua fórmula é representada na figura 1.6 (MAGA e TU, 1994). O azul brilhante FCF, é um corante sintético derivado da classe do trifenilmetano, tem a aparência de um pó avermelhado-azul; o λ máximo da luz absorvida para o azul brilhante FCF corresponde a 630nm, em solução aquosa; em pH ácidos ocorre uma variação irrelevante deslocando para 629nm e em pH básicos não ocorre uma variação no λ máximo. Em todos os pH apresenta um pico na região entre 400nm a 410nm (Committee Food Chemicals Codex, 1986).

O azul brilhante FCF é encontrado em bebidas, produtos de laticínio, doces em geral, produtos de higiene pessoal, farmacêuticos e cosméticos, combinado com eritrosina e/ou tartrazina. Tem a capacidade de induzir reações alérgicas, pode causar

hiperatividade em crianças, eczema e asma; recomenda-se a eliminação desse corante na dieta das crianças (CALIL e AGUIAR, 1999).

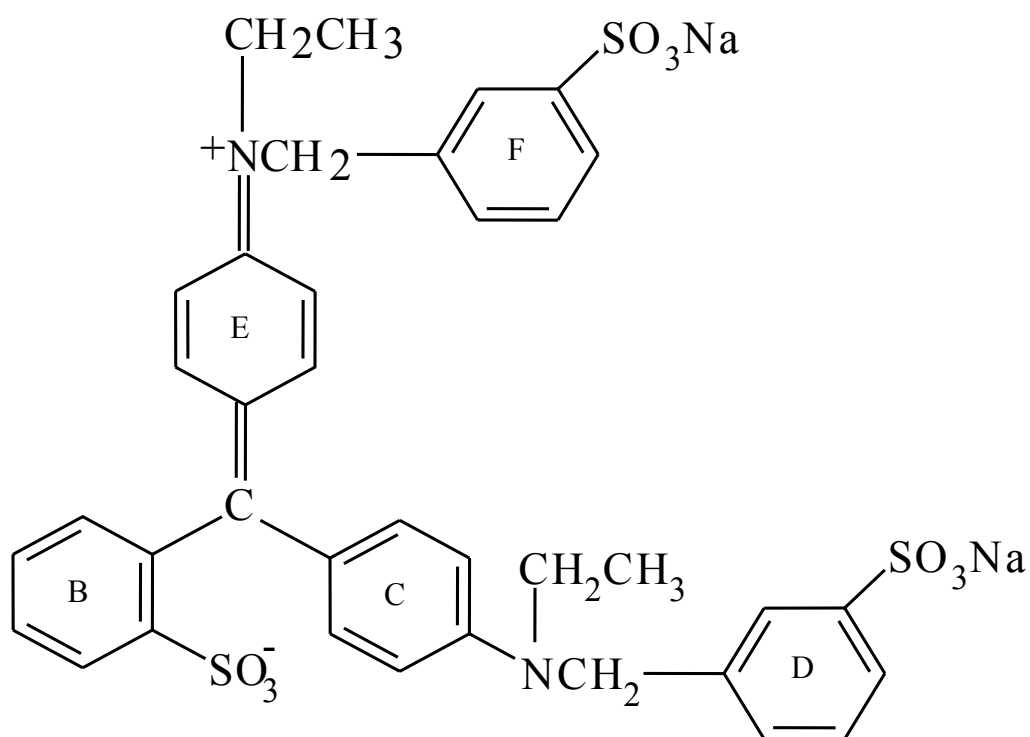


Figura: 1.6 - Fórmula estrutural do Corante Azul Brilhante FCF
(MAGA e TU, 1994)

1.7 Corantes para ensaios bioquímicos

Muitos métodos espectrofotométricos, ao longo dos anos, foram propostos para a determinação de proteínas totais, mas não existe uma metodologia considerada de uso universal para todos os meios. Os métodos geralmente mais utilizados são o do Biureto, de Lowry, do “Coomassie brilliant blue” G-250 ou reagente de Bradford. O método de Bradford é mais rápido e sensível que o de Lowry e é utilizado para a determinação de proteínas totais em diversos meios: plasma ou soro sanguíneo, saliva humana, produtos alimentícios, leite humano, tecidos de plantas, entre outros (ZAIA, ZAIA, LICHTIG, 1998).

1.7.1 - Corante Azul de Coomassie G-250

O corante Azul de Coomassie G-250, C.I: 42655 apresenta peso molecular igual a 854,04 g/mol e fórmula $C_{47}H_{48}N_3NaO_7S_2$. A figura 1.7 representa sua fórmula estrutural. É frequentemente utilizado em ensaios bioquímicos para identificar proteínas no processo de eletroforese; é um dos reagentes do método de **Bradford** (RAUF, ASHRAF, ALHADRAMI, 2005).

O método de Bradford é uma técnica baseada na interação entre o corante e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. A reação entre o corante/proteína provoca um deslocamento da solução ácida do Azul de Coomassie G-250, das formas protonadas com um pico máximo de 465nm, para 595nm quando o corante se liga à proteína (BRADFORD, 1976; ZAIA, ZAIA, LICHTIG, 1998). As interações hidrofóbicas e iônicas estabilizam a forma

iônica do corante, causando uma mudança visível da cor, ou seja, acentuando a tonalidade azul causando uma mudança visível da cor, ou seja, acentuando a tonalidade azul (CASSIANO, et al., 2002). Este corante também é usado em processos de degradação fotocatalítica na presença de H_2O_2 (RAUF, ASHRAF, ALHADRAMI, 2005).

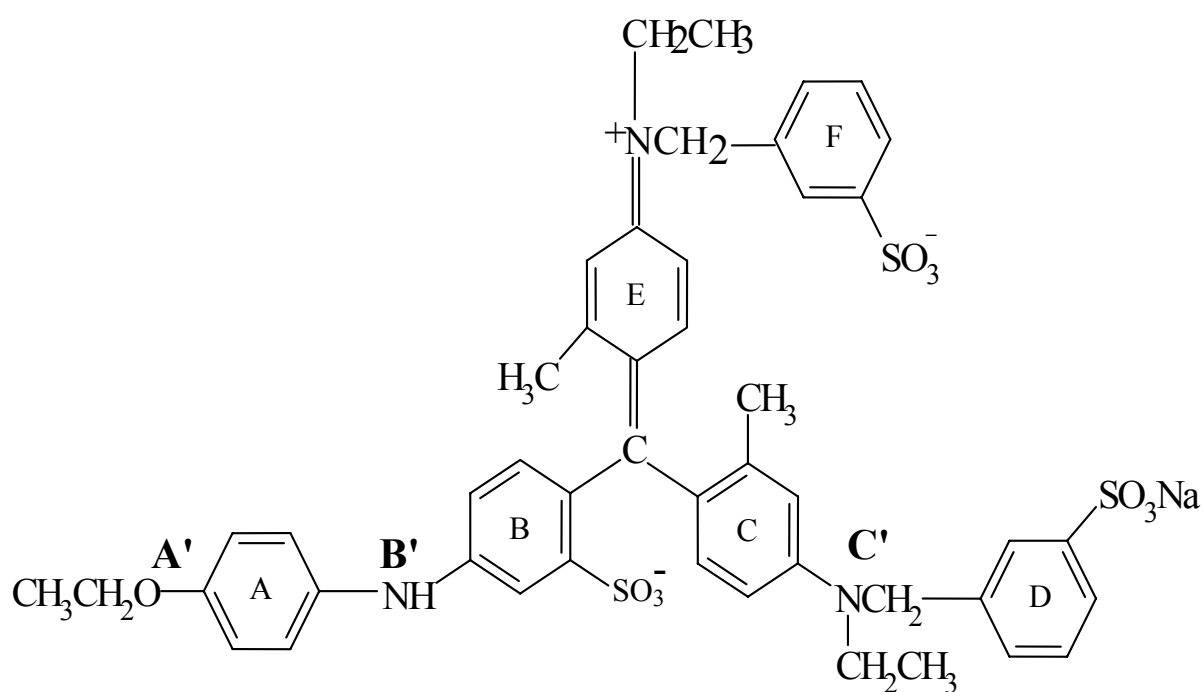


Figura: 1.7 - Fórmula estrutural do Corante Azul de Coomassie G-250 (RAUF, ASHRAF, ALHADRAMI, 2005)

PARTE

EXPERIMENTAL

2 - Parte Experimental

2.1 – Materiais

Os reagentes utilizados foram: DNA de timo de bezerro (*Calf Tymus*) – Sigma Chemical; corante Azul Brilhante/ FCF – Sigma Aldrich , PM: 792,8 g/mol; corante Azul de Coomassie G-250- Sigma Chemical,, PM: 854 g/mol; HCl-Vetec - 32%; NaOH – Vetec-PA; KBr–Vetec PA; álcool Isopropanol–Synth PA; NaCl – Vetec PA; peneiras Moleculares. Todas as soluções foram preparadas com água desionizada.

2.2 – Equipamentos

Os equipamentos utilizados foram: espectrofotômetro UV / VISÍVEL – Hach; Balança analítica - Ohaus; micro balança Sartorius M2P; pHmetro – EPL 358; desionizador – Milli – Q Plus – Milipore; Epectrômetro IV 1000 FT–IR Paragon 1000 da Perkin Elmer; micropipetas automáticas.

2.3 - Preparo das soluções

2. 3.1 - Solução estoque de DNA

Foi transferido 4,3 mg de DNA para um balão volumétrico de 25 mL e adicionou-se água desionizada e resfriada até completar o volume do balão, para obter uma solução $172 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O balão foi agitado lentamente até não mais observar-se resíduos do DNA e haver completa homogeneização. Para garantir a homogeneização

da solução, esta foi monitorada, fazendo leituras das absorções na região do ultravioleta (λ_{max} de 260 nm) de amostras coletadas na superfície e no fundo do balão, até que as absorções fossem as mesmas. A solução foi envolvida em papel alumínio e mantida na geladeira durante todos os procedimentos.

2.3.2 - Soluções estoque dos corantes Azul Brilhante-FCF e Azul Coomassie G-250

As soluções estoque de cada corante foram preparadas pesando 39,64 mg do corante Azul Brilhante e 42,70 mg do corante Azul de Coomassie. As massas foram quantitativamente transferidas para os balões volumétricos de 100 mL e o volume completado com água desionizada. A concentração final de ambos os corantes foi de $5 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$.

2.3.3- Soluções para curvas de calibração

2.3.3.1-Curva de Calibração do DNA

Para a construção da curva de calibração do DNA foram preparadas, por diluição da solução estoque, as soluções nas seguintes concentrações: 5 ; 10 ; 20 ; 40 e $60 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em seguida, as leituras de absorção em 260 nm (figura 3.1, pág. 31) foram registradas e traçada a curva de calibração com as concentrações: 2,27; 2,81; 4,66; 5,1 e $9,9 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ (figura 3.4, pág. 34).

2.3.3.2- Curva de Calibração do corante Azul Brilhante-FCF

As soluções diluídas para o corante azul brilhante-FCF foram preparadas da mesma forma que no item 2.3.3.1, nas seguintes concentrações: 4; 5; 6; 7; $8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. As leituras de absorção λ_{max} do corante (630 nm) (figura 3.2, pág. 32) foram registradas e traçada a curva de calibração (figura 3.5, pág. 35).

2.3.3.3 - Curva de Calibração do corante Azul de Coomassie

Soluções diluídas da solução estoque do corante azul de coomassie foram preparadas com água desionizada, nas seguintes concentrações: 1; 1,5; 2 ; 2,5; $3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Foram registradas as leituras de absorção no λ_{max} do corante (601 nm) e em (260 nm) outro pico característico do corante (figuras 3.3, pág. 33) e traçada a curva de calibração (figura 3.6, pág. 36).

2.3.4 - Soluções para estudos sobre variação de pH do meio dos corantes Azul Brilhante e Azul de Coomassie

Preparou-se inicialmente 25 mL de cinco soluções de cada corante, a partir da solução estoque, com concentração final de $4 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 1, 3 , 7 , 9 e 12. Foram preparadas sete soluções de cada corante com concentração final igual a $4 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ e pH de 0,72 a 13,33, as soluções mais concentradas tiveram a finalidade de se observar a variação dos picos característicos dos corantes. As soluções

ácidas de pH 0,72 a 3 foram preparadas completando-se o volume do balão volumétrico com HCl 1×10^{-1} , 1×10^{-2} e 1×10^{-3} mol.L⁻¹, respectivamente. As soluções básicas com pH 7,95 a 13,33 foram preparadas completando-se o balão com NaOH 1×10^{-6} , 1×10^{-5} e 1×10^{-2} mol.L⁻¹. As soluções de HCl e NaOH foram preparadas com água desionizada. A solução neutra de pH 7 foi obtida completando-se o volume do balão apenas com água desionizada, os valores de pH foram controlados com o pHmetro – EPL 358.

2.3.5- Soluções para estudos sobre a intercalação

2.3.5.1- Soluções para estudos sobre a intercalação do Azul Brilhante em DNA

A partir das soluções estoques de DNA e do corante foram preparadas várias soluções do sistema **DNA / Azul Brilhante** usando o seguinte procedimento:

a- Fixando a concentração de corante Azul Brilhante

Foram adicionados volumes constantes da solução estoque do corante, em frascos de ependorf de 1,5 mL. A cada um destes frascos adicionou-se concentrações variadas do DNA, completando-se o volume de 1,5 mL, com água desionizada, os dados sobre as concentrações obtidas encontram-se na Tabela 1.

b - Fixando a concentração de DNA

Foram adicionados volumes constantes da solução estoque do DNA em frascos ependorf de 1,5 mL. A cada um destes frascos adicionaram-se concentrações variadas do corante. O volume para 1,5 mL foi completado com água desionizada. Os dados sobre os volumes adicionados e concentrações respectivas, encontram-se na Tabela 2.

**Tabela-1 Valores das concentrações do Azul Brilhante e DNA
(DNA variável e AZB fixo)**

Solução estoque [DNA]= 24 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ $3,42.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	[DNA] na Mistura / mol.L^{-1}	Solução estoque [AZB] 1.10^{-4} mol.L^{-1}	[AZB] na Mistura / mol.L^{-1}
Volume (mL)		Volume (mL)	
0,0	0	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,1	$0,228 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,2	$0,456 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,3	$0,684 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,4	$0,912 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,5	$1,140 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,6	$1,368 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,7	$1,596 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,8	$1,824 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,9	$2,052 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$

**Tabela -2 Valores das concentrações de DNA e do Azul Brilhante
(DNA fixo e AZB variável)**

Solução estoque [DNA] = 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ 3,42.10 ⁻⁵ mol.L ⁻¹	[DNA] na Mistura / mol.L ⁻¹	Solução estoque [AZB] / 1.10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹	[AZB] na Mistura / mol.L ⁻¹
Volume (mL)		Volume (mL)	
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	0	0
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	0,04	2,66 x 10 ⁻⁶
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	0,06	4,00 x 10 ⁻⁶
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	0,08	5,33 x 10 ⁻⁶
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	0,10	6,66 x 10 ⁻⁶
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	0,12	8,00 x 10 ⁻⁶
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	0,14	9,33 x 10 ⁻⁶
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	0,16	10,60 x 10 ⁻⁶
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	0,18	12,00 x 10 ⁻⁶
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	0,20	13,33 x 10 ⁻⁶

2.3.5.2 - Soluções para estudos sobre a intercalação do Azul de Coomassie em DNA

Os procedimentos para os estudos sobre a intercalação do Azul de Coomassie e DNA foram realizados como no item 2.3.5.1 a e b, trocando-se o corante Azul Brilhante por Azul de Coomassie. Os dados obtidos com as concentrações fixas do corante Azul de Coomassie e os dados obtidos com as concentrações fixas do DNA encontram-se nas Tabelas 3 e 4 respectivamente.

**Tabela-3 Valores das concentrações do Azul de Coomassie e de DNA
(DNA variável e AZC fixo)**

Solução estoque [DNA]= 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ $3,42.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	[DNA] na Mistura / mol.L^{-1}	Solução estoque [AZB] 1.10^{-4} mol.L^{-1}	[AZB] na Mistura / mol.L^{-1}
Volume (mL)		Volume (mL)	
0,0	0	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,1	$0,228 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,2	$0,456 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,3	$0,684 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,4	$0,912 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,5	$1,140 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,6	$1,368 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,7	$1,596 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,8	$1,824 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$
0,9	$2,052 \times 10^{-5}$	0,1	$6,66 \times 10^{-6}$

**Tabela-4 Valores das concentrações de DNA e Azul de Coomassie
(DNA fixo e AZC variável)**

Solução estoque [DNA] = 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ $3,42.10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$	[DNA] na Mistura / mol.L^{-1}	Solução estoque [AZB] 1.10^{-4} mol.L^{-1}	[AZB] na Mistura / mol.L^{-1}
Volume (mL)		Volume (mL)	
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	0	0
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	0,04	$2,66 \times 10^{-6}$
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	0,06	$4,00 \times 10^{-6}$
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	0,08	$5,33 \times 10^{-6}$
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	0,10	$6,66 \times 10^{-6}$
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	0,12	$8,00 \times 10^{-6}$
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	0,14	$9,33 \times 10^{-6}$
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	0,16	$10,60 \times 10^{-6}$
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	0,18	$12,00 \times 10^{-6}$
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	0,20	$13,33 \times 10^{-6}$

2.3.6 - Precipitação do DNA puro para estudos no Infravermelho

Preparou-se 25 mL de uma solução aquosa de DNA de concentração $464 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$. Desta solução foram retiradas alíquotas de 5 mL e à elas adicionou-se 0,5 mL da solução $0,1\text{mol}.\text{L}^{-1}$ de cloreto de sódio (NaCl). A esta solução foi adicionado 5mL do álcool isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$) e homogeneizou-se até a formação do precipitado. Lavou-se o pelete do DNA com o referido álcool e o mesmo foi colocado em um vidro de relógio, coberto por papel alumínio, e posto na geladeira. Deixou-se secar lentamente por uma semana. Após o período de secagem registraram-se os espectros de absorção no infravermelho.

2.3.7 - Precipitação do DNA com os corantes para estudos no Infravermelho

Retirou-se 5 mL da solução de DNA preparada no item 2.3.6, adicionou-se 1 mL das soluções aquosas dos corantes Azul Brilhante e Azul de Coomassie, respectivamente, com concentração $5.10^{-4} \text{mol}.\text{L}^{-1}$. Em seguida adicionou-se 0,5 mL cloreto de sódio (NaCl) às soluções. Para a precipitação do DNA com os corantes, utilizou-se o procedimento para precipitar o DNA da solução sem os corantes. Os espectros de absorção no infravermelho foram registrados, após o período de secagem.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3 - Resultados e Discussão

3.1 - Espectros de UV/Visível das soluções

As figuras 3.1, 3.2 e 3.3 A e B mostram os espectros de absorção na região do UV/Visível, das soluções de DNA, Azul Brilhante-FCF e Azul de Coomassie, respectivamente.

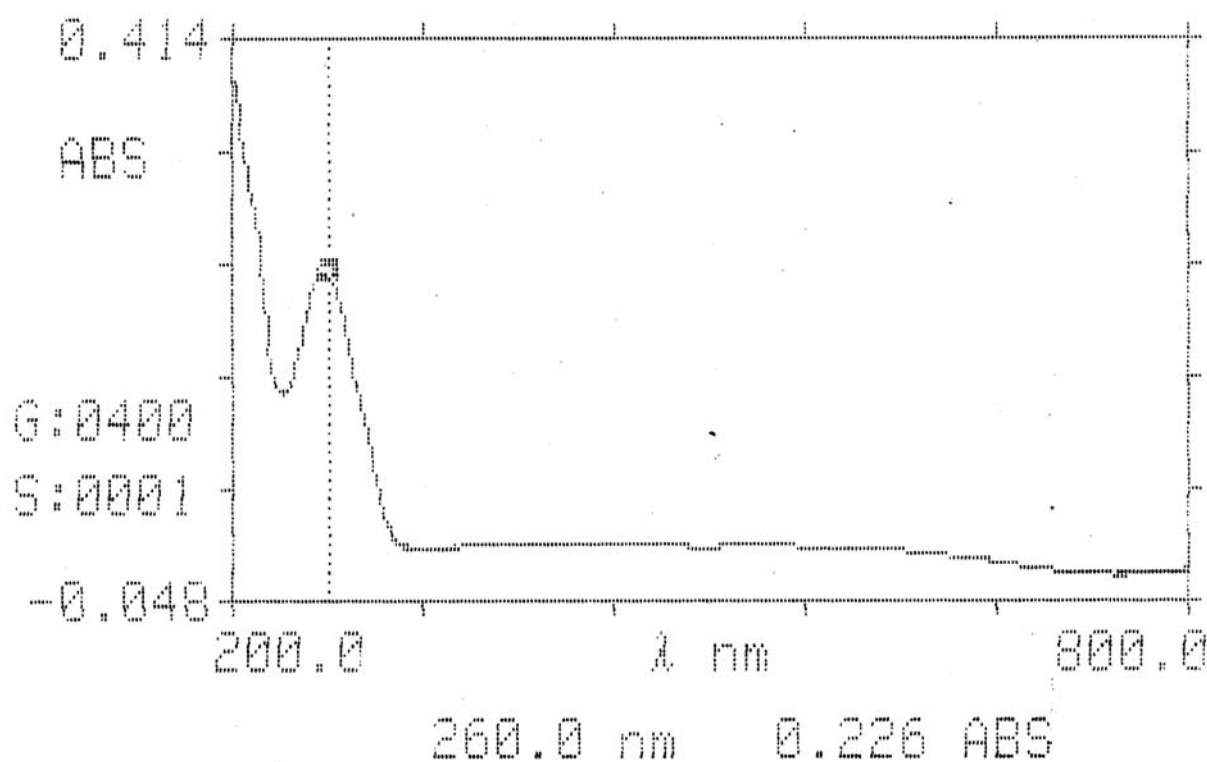


Figura: 3.1 - Espectro de absorção de DNA $3,42 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ / $24 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em solução aquosa pH = 7

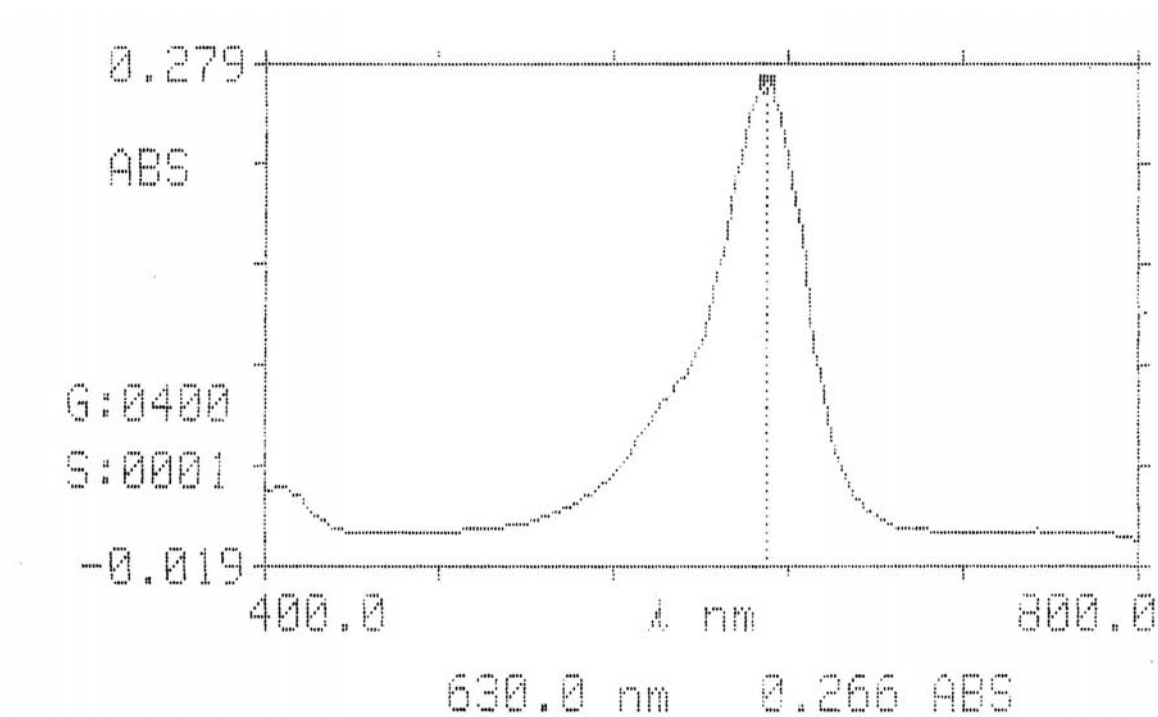
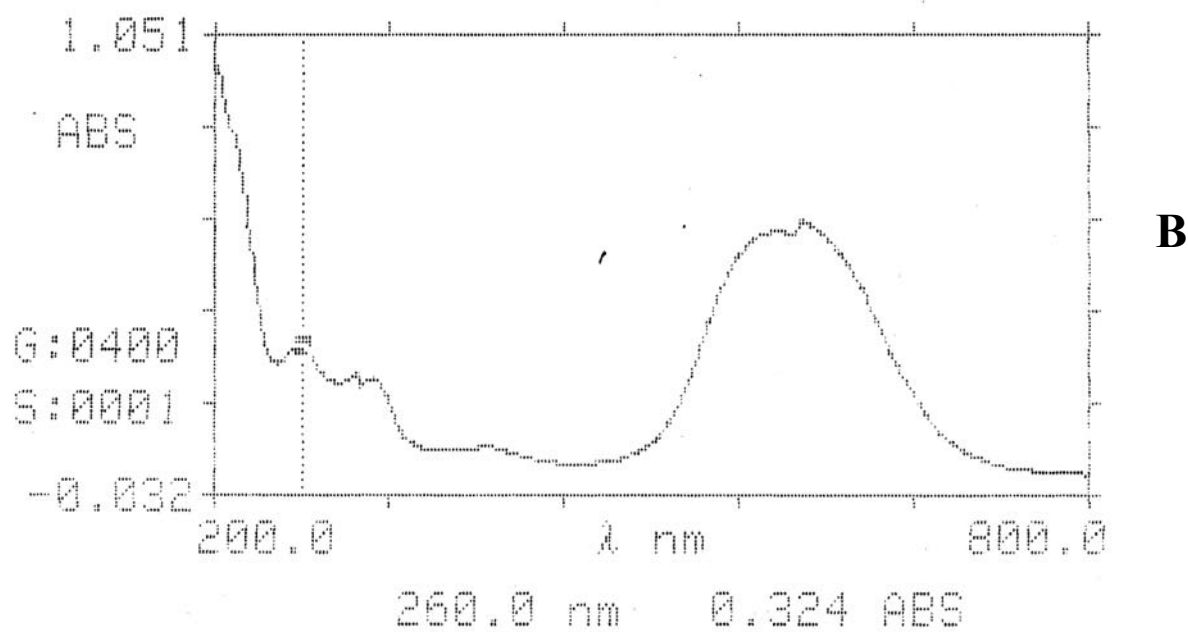
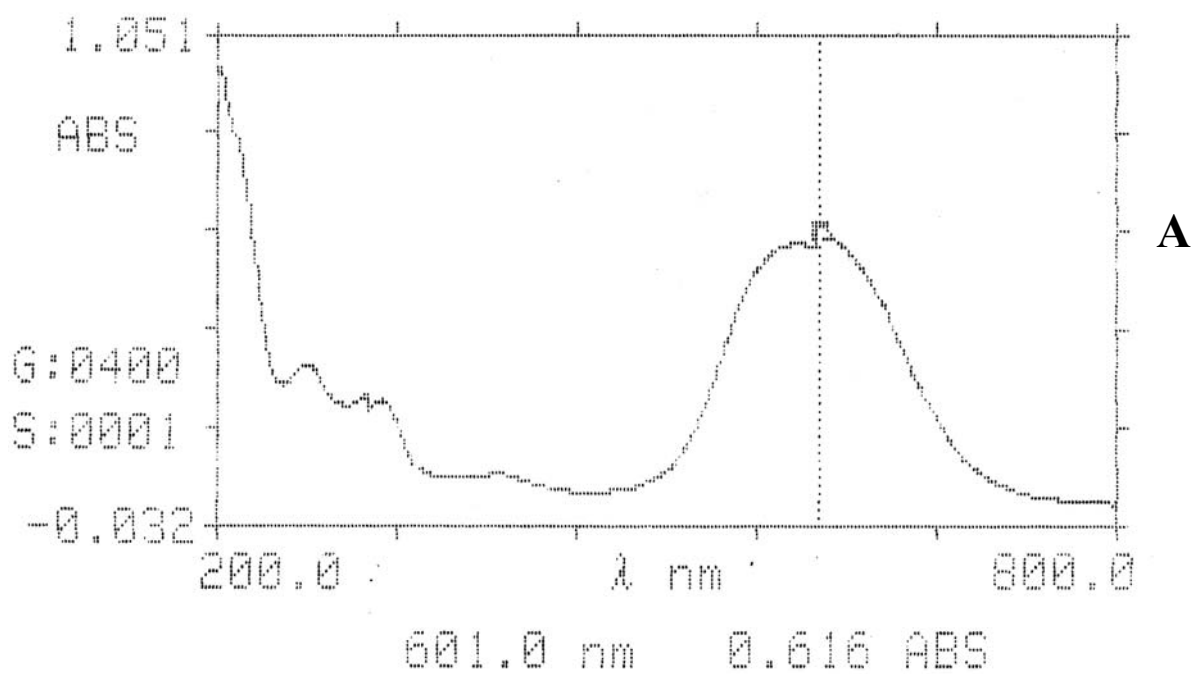


Figura: 3.2- Espectro de absorção do corante Azul Brilhante-FCF $4 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ em solução aquosa pH = 7



Figuras: 3.3 - Espectros de absorção do corante Azul de Coomassie G-250, $2,5 \times 10^{-6}$ mol.L⁻¹ em solução aquosa pH = 7; (A): λ_{max} 601 nm e (B): λ_{max} 260 nm

3.2 - Curvas de Calibração

Nas figuras 3.4, 3.5 e 3.6 encontram-se as curvas de calibração do DNA, Azul Brilhante-FCF e Azul de Coomassie G-250, respectivamente.

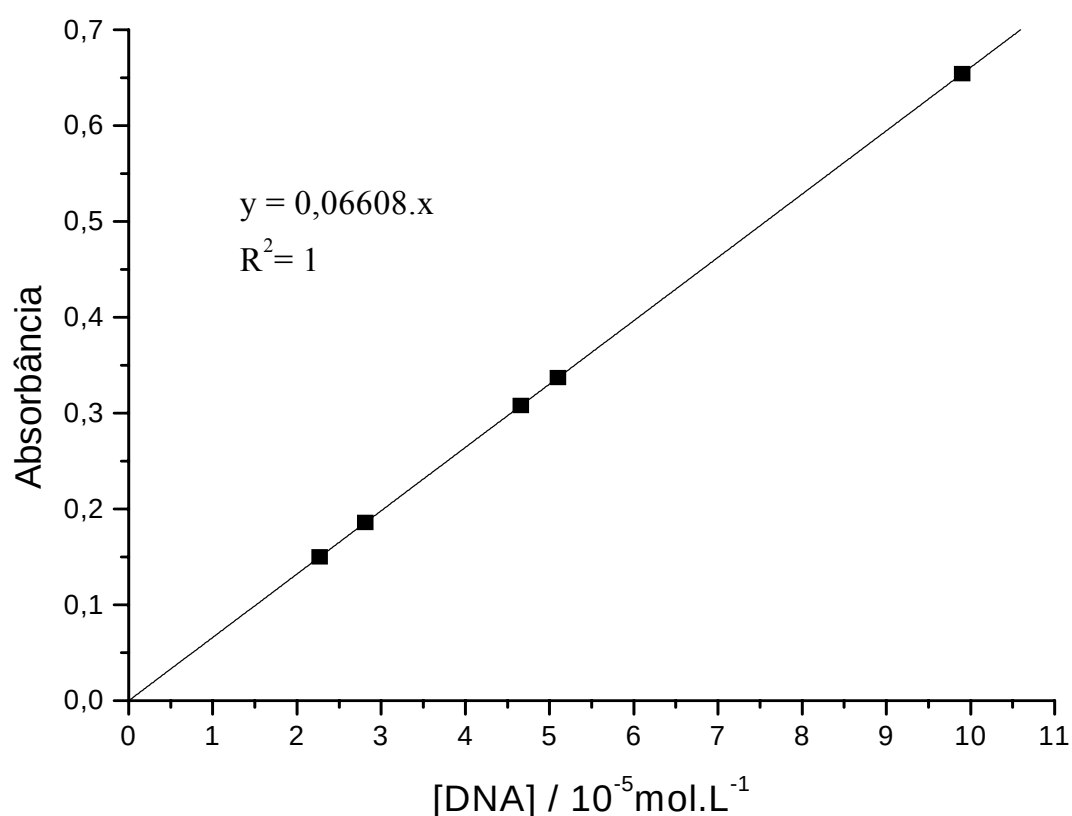


Figura: 3.4- Curva de calibração do DNA (λ_{max} 260 nm) em solução aquosa, nas concentrações: 2,27; 2,81; 4,66; 5,1 e $9,9 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

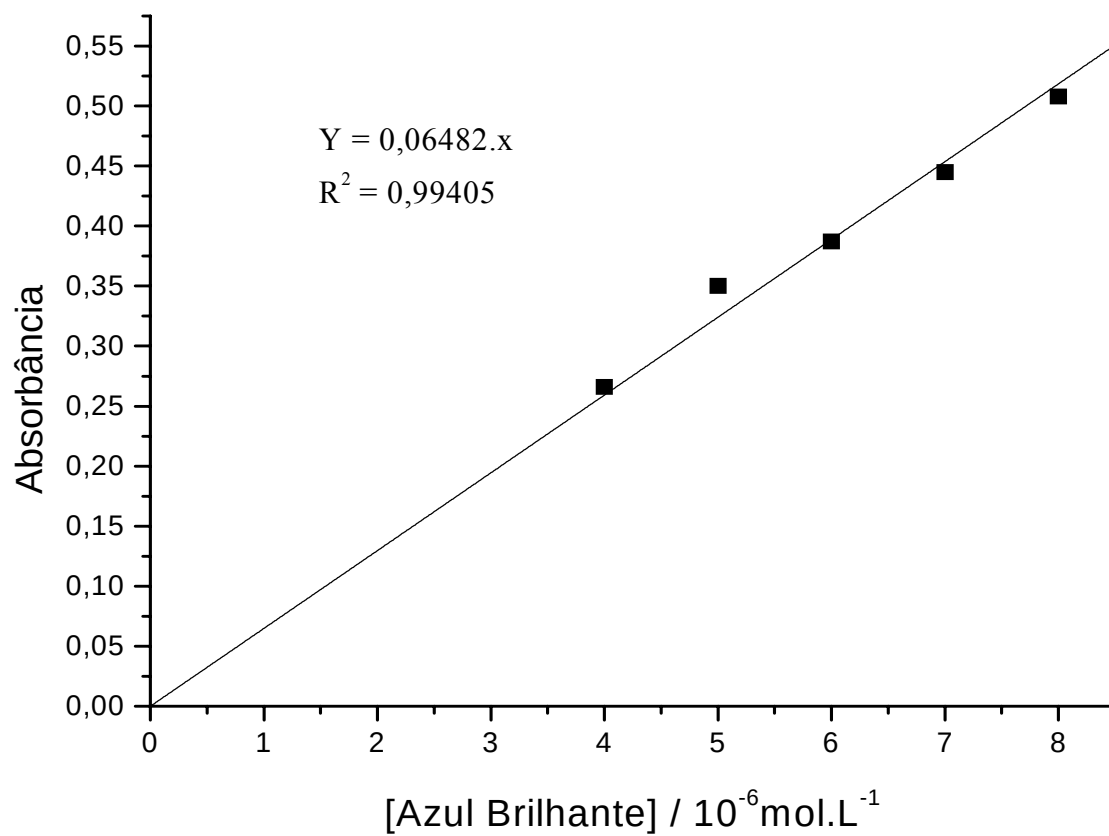


Figura: 3.5- Curva de calibração do corante Azul Brilhante
(λ_{max} 630nm) em solução aquosa nas concentrações: 4; 5; 6;
7; e $8 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$

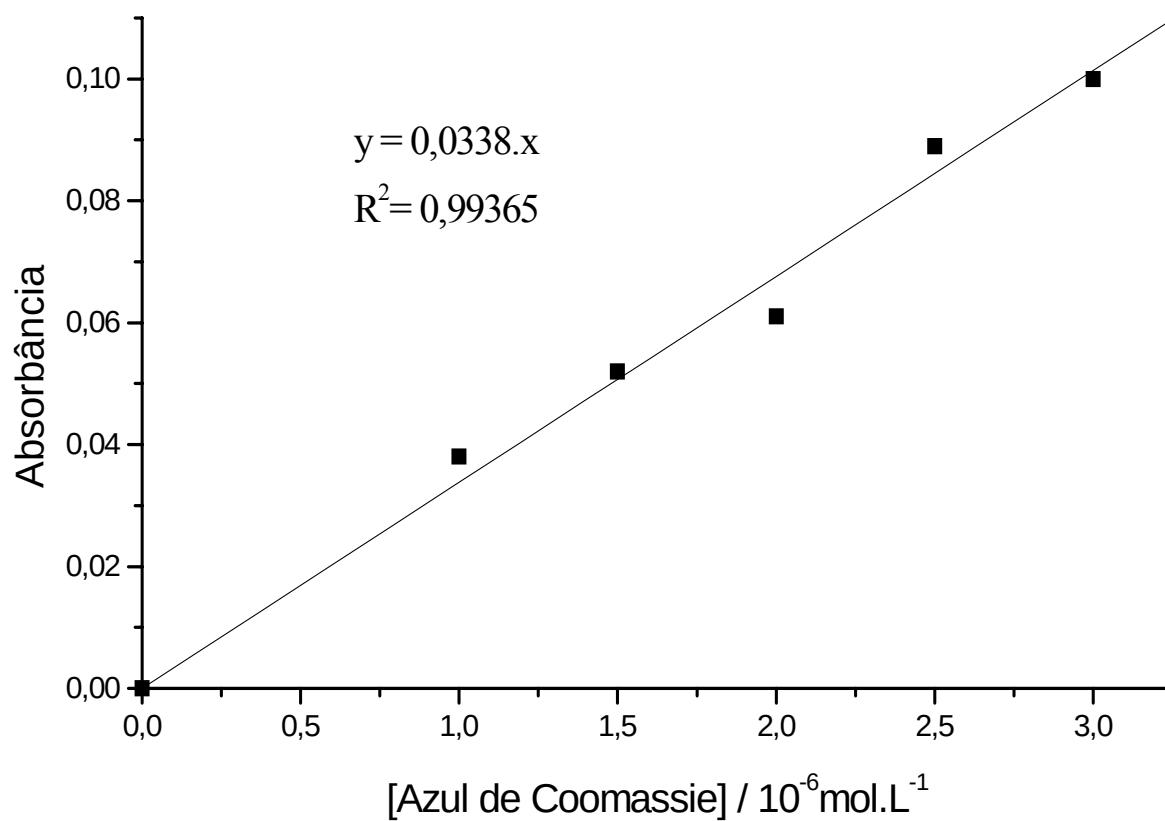


Figura: 3.6- Curva de calibração do corante Azul de Coomassie (λ_{max} 602 nm) em solução aquosa, nas concentrações: 1; 1,5; 2; 2,5 e $3 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$

As discussões a seguir referem-se à técnica espectroscópica de absorção no UV/Visível. O coeficiente de extinção molar (ϵ) encontrado para o DNA é $6.608 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, como mostra a figura 3.4, com coeficiente de regressão (R) de 1,0000. Este valor foi calculado pela inclinação da curva de calibração e expressa em termos de concentração molar, dos grupos fosfatos do ácido nucléico (BARICATTI, 1998). O valor experimental do coeficiente de extinção molar do DNA está muito próximo do valor de ϵ em soluções aquosas de DNA da literatura que é de $6.600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ (KUBISTA, AKERMAN, NORDÉN, 1987; KURE, SANO, HARADA, YASUNAGA, 1988). A figura 3.5 mostra a curva de calibração do corante Azul Brilhante e o coeficiente de extinção molar (ϵ) experimental é de $64.820 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, com coeficiente de regressão linear (R) de 0,99751. Segundo a curva de calibração ilustrada na figura 3.6, o coeficiente de extinção molar (ϵ) do corante Azul de Coomassie tem o valor de $33.800 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ e coeficiente de regressão linear (R) de 0,99365.

Para se verificar a pureza, quanto a proteínas, e a integridade do DNA estabeleceu-se uma relação entre A_{260}/A_{280} (0,226 / 0,121). Esta relação representa a razão entre a absorbância do DNA no seu comprimento de onda característico (260 nm) e o valor do comprimento de onda característico da presença de proteínas (280 nm). O valor obtido foi de 1,87, estando dentro dos valores considerados na literatura (1,8-2,0) e sendo aceito em estudos sobre intercalação entre compostos químicos e DNA (VORLÍČKOVÁ, KYPR, SKLENÁŘV, 2005).

3.3 - Estudos sobre variação de pH do meio dos corantes

3.3.1 - Comportamento do Corante Azul Brilhante em meio ácido e básico

No estudo feito sobre o comportamento do corante Azul Brilhante sob a influência da acidez do meio (figura 3.7), observou-se que os espectros de absorção (λ_{max} 630 nm) do corante azul brilhante FCF não sofreu nenhuma alteração em relação variação do pH (HEINS e FLURY, 2000). Traçou-se o gráfico do comprimento de onda máximo do corante (630 nm) em função do pH (figura 3.8) e verifica-se que o corante manteve-se na forma monoprotionada, independente do meio ser ácido, básico ou neutro. Portanto, os estudos com a intercalação do corante Azul Brilhante-FCF em DNA foram realizados em pH 7, ou seja pH fisiológico, considerando-se que o corante está na forma monoprotionada.

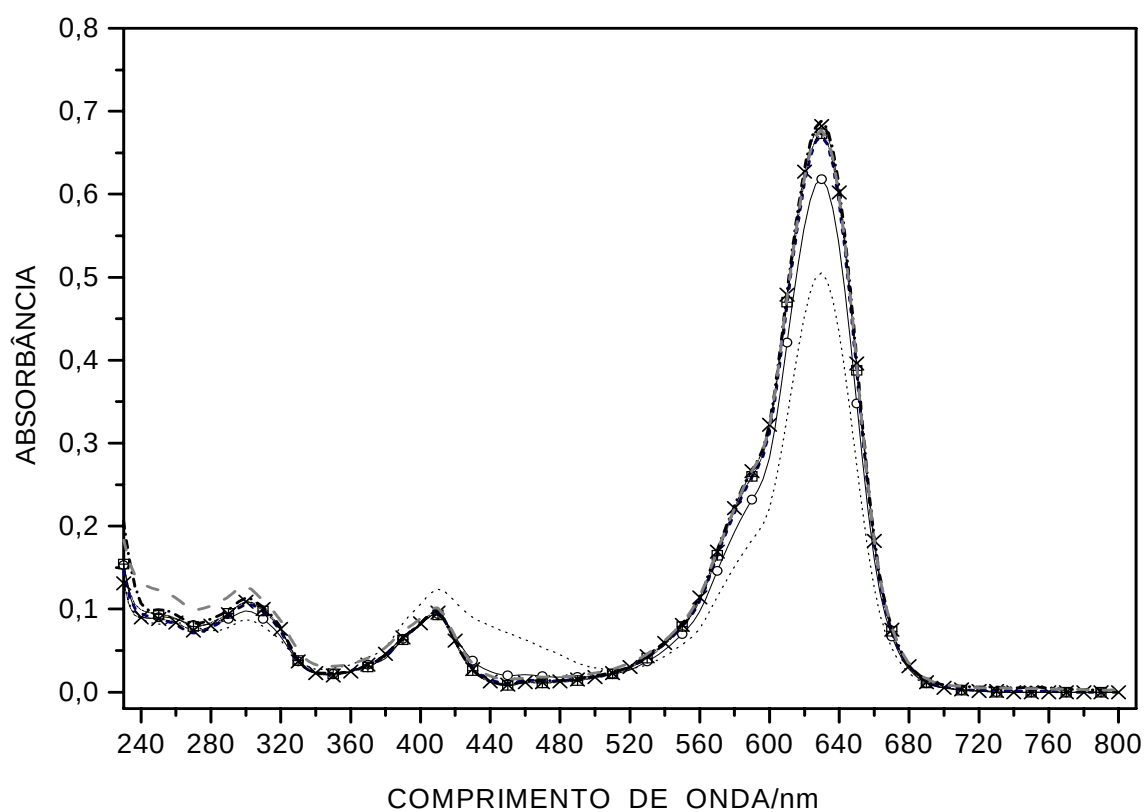


Figura: 3.7- Comportamento do corante Azul Brilhante-FCF
 $4 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em função do pH.

.....	pH 1,32;				
—○—	pH 2,41;	-----	pH 3,62;	---x---	pH 7,64 ;
-----	pH 7,95;	---□---	pH 8,79 ;	- - - -	pH 13,33

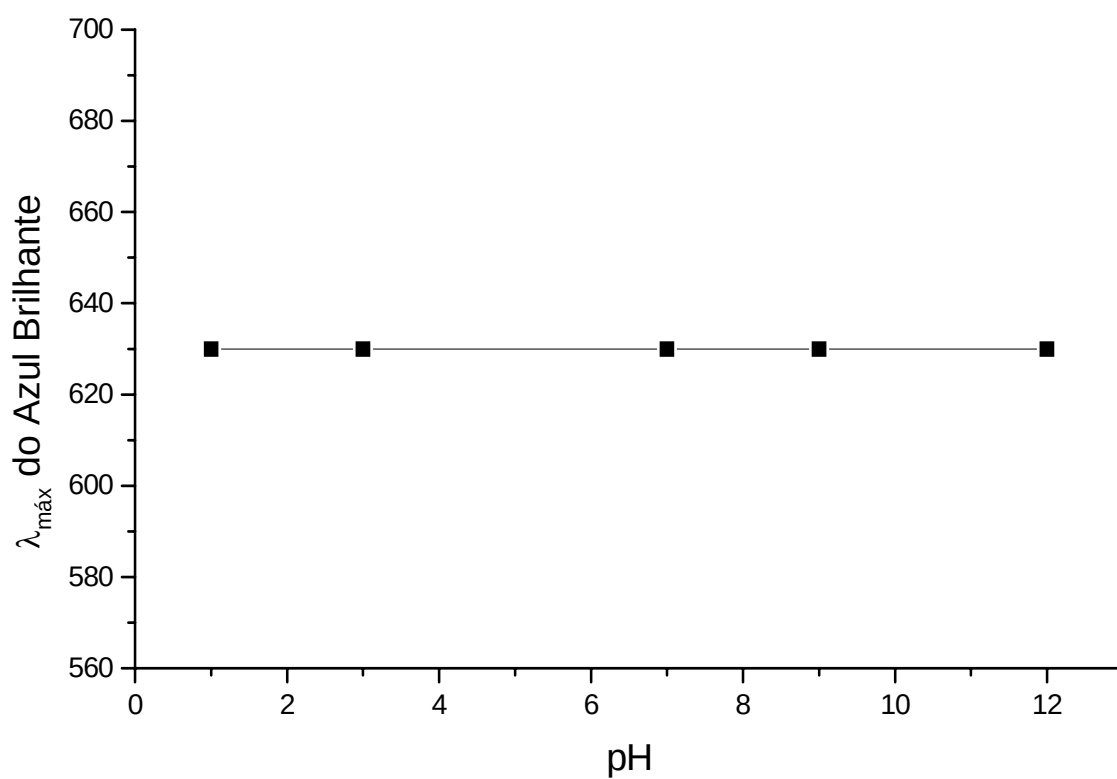


Figura: 3.8- Comprimento de onda máximo corante Azul Brilhante-FCF (λ_{max} 630nm), $4 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ em função do pH , : 1, 3, 7, 9, 12.

3.3.2 - Comportamento do Corante Azul de Coomassie em meio ácido e básico

No estudo feito sobre o comportamento do corante Azul de Coomassie sob a influência da acidez do meio, observou-se a presença de dois picos: em pH 0,72 ($\lambda_{\text{máx}}$ 460 nm e 651 nm) e pH 1,6 ($\lambda_{\text{máx}}$ 440 nm e $\lambda_{\text{máx}}$ 630 nm). Entre os pH 2,55 e 12,55, o corante apresentou um único $\lambda_{\text{máx}}$ com o valor entre 590nm a 610nm; estes dados estão registrados na figura 3.9. Observa-se, portanto, não apenas o deslocamento do pico na região de 600 nm, mas o desaparecimento do pico 460 nm presente em meio muito ácido. Este comportamento sugere a presença de espécie triprotonada em pH 0,72, espécie diprotonada na região do pH 1,60, espécie monoprotônica na região de pH 6,0 e neutra em pH 12,55. Segundo a molécula do corante Azul de Coomassie (figura 1.7) em meio muito ácido (pH 0,72) é possível que as regiões **A'**, **B'**, **C'** estejam protonadas; em pH 1,60 estão protonadas as regiões **A'** e **B'**; na região de pH 6,0 está protonada a região **A'** e em pH básico, não existe protonação. É provável que o corante, em meio básico, esteja deslocando o equilíbrio da água, captando hidroxila, uma vez que o pH da solução inicial em 13,80 foi deslocado para 12,55. Considerou-se que a espécie do corante trabalhada com o DNA, em pH neutro foi a monoprotônica.

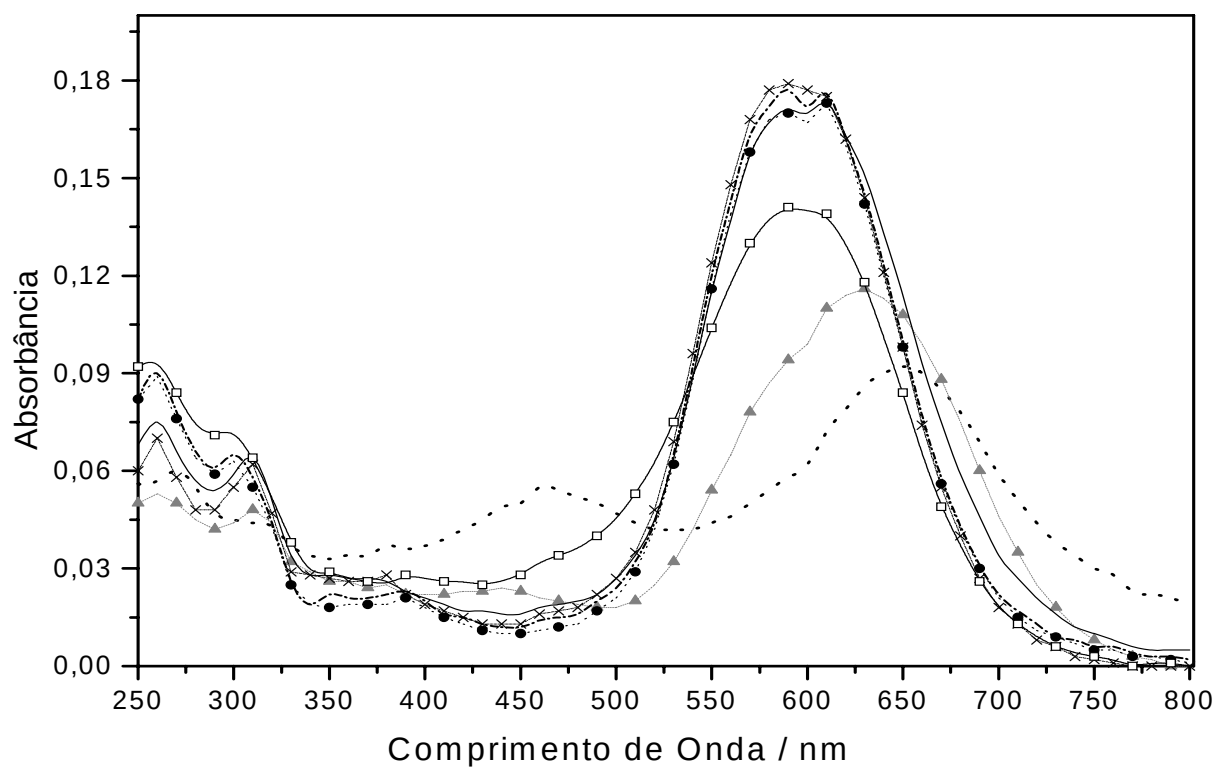


Figura: 3.9- Comportamento do corante Azul de Coomassie $4 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ em função do pH,

----- pH 0,72;
----- pH 1,6 ; ——— pH 2,55 ; ----- pH 5,80;
----- pH 6,10; ----- pH 6,55; —□— pH 12,55

3.4 - Estudos sobre Intercalação

3.4.1 - Estudos sobre a intercalação do Azul Brilhante em DNA

Para a discussão destes resultados, foi considerado como concentração adicionada, aquela obtida pelos cálculos estequiométricos, considerando-se o volume pipetado e adicionado no ependorf, de volume 1,5 mL. Foi considerado como concentração efetiva, a obtida pelos valores de absorbância registrados nos espectros UV/Visível.

Pelo Quadro 1 e figura 3.10 e figura 3.11, observa-se que à medida que aumenta a concentração de DNA na mistura, diminui a concentração de corante livre na solução, indicando que os sítios de intercalação aumentam com o aumento da concentração do DNA, ou seja, aumenta a possibilidade de intercalação do corante quando a concentração do DNA é aumentada (ANIKOVSKY, TATIKOLOV, KUZMIN, 1999). A figura 3.10, demonstra a relação inversamente proporcional entre o aumento da concentração de DNA, que está relacionada com o aumento dos sítios de intercalação, e a concentração livre de corante na mistura.

No Quadro 1, na coluna referente ao número de pares de bases intercaladas R , observa-se a relação entre os sítios de intercalação (S_{DNA}) e a concentração livre do corante Azul brilhante na mistura. O número de bases intercaladas aumenta com o aumento de sítios do DNA disponíveis para a intercalação, indicando que ainda há corante no meio reacional para ser intercalado (corante não esgotado).

QUADRO 1 : Estudos sobre intercalação variando a concentração do DNA fixando a concentração do corante Azul Brilhante-FCF

Variação da concentração do DNA em função da concentração do Corante Azul Brilhante-FCF na mistura VA (volume adicionado / mL) e [AZB] e $[P_{DNA}]$ / mol.L ⁻¹							
VA AZB/ mL	[AZB] adicionada na mistura	[AZB] livre na mistura	VA DNA / mL	$[P_{DNA}]$ teórica na mistura	$[P_{DNA}]$ efetiva na mistura	Sítios de Intercalação (S_{DNA})	R (Nº pares de bases intercaladas)
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$7,41 \times 10^{-6}$	0,0	0	0	0	0
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$6,93 \times 10^{-6}$	0,1	$0,228 \times 10^{-5}$	$1,29 \times 10^{-5}$	$0,64 \times 10^{-5}$	0,93
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$6,72 \times 10^{-6}$	0,2	$0,456 \times 10^{-5}$	$1,50 \times 10^{-5}$	$0,75 \times 10^{-5}$	1,11
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$6,66 \times 10^{-6}$	0,3	$0,684 \times 10^{-5}$	$1,81 \times 10^{-5}$	$0,90 \times 10^{-5}$	1,35
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$6,46 \times 10^{-6}$	0,4	$0,912 \times 10^{-5}$	$1,97 \times 10^{-5}$	$0,98 \times 10^{-5}$	1,52
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$6,26 \times 10^{-6}$	0,5	$1,140 \times 10^{-5}$	$2,12 \times 10^{-5}$	$1,06 \times 10^{-5}$	1,69
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$5,37 \times 10^{-6}$	0,6	$1,368 \times 10^{-5}$	$2,21 \times 10^{-5}$	$1,11 \times 10^{-5}$	2,07
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$4,44 \times 10^{-6}$	0,7	$1,596 \times 10^{-5}$	$2,64 \times 10^{-5}$	$1,32 \times 10^{-5}$	2,97
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$3,96 \times 10^{-6}$	0,8	$1,824 \times 10^{-5}$	$2,89 \times 10^{-5}$	$1,45 \times 10^{-5}$	3,65
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$3,39 \times 10^{-6}$	0,9	$2,052 \times 10^{-5}$	$3,12 \times 10^{-5}$	$1,56 \times 10^{-5}$	4,60

A concentração dos íons fosfatos $[P_{DNA}]$ foi obtido pelas absorbâncias na região do UV/Visível no lâmbda máximo característico (260nm) nas soluções aquosas de DNA, (BARICATTI, 1998) obedecendo a equação de Lambert-Beer, onde a concentração da espécie absorvente é proporcional à sua absorbância (A) segundo a relação: $A = \epsilon.b.c$

A é a absorbância do DNA com o valor igual a 0,226 para $[DNA]$ de $24 \mu\text{g.mL}^{-1}$

ϵ é a absorvidade molar do DNA, sendo igual a $6.600 \text{ mol}^{-1}\text{L.cm}^{-1}$

b é o caminho óptico com o valor de 1cm

c é a concentração da espécie em mol L^{-1}

Portanto a concentração da solução estoque do DNA usada para os cálculos de intercalação com o corante Azul Brilhante é:

$$[P_{DNA}] = 3,42 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$$

Cálculos para concentração dos Sítios de intercalação $[S_{DNA}]$

$$[S_{DNA}] = [P_{DNA}] / 2 \text{ (a cada dois grupos fosfatos corresponde um sítio de intercalação)}$$

Cálculos para o valor de R (número de pares de bases por molécula de intercalador)

$$R = [S_{DNA}] / [\text{Corante livre na mistura}]$$

Cálculos para o valor da $[\text{Corante AZB livre na mistura}]$

De acordo com a equação da Lambert-Beer: $A = \epsilon.b.c$

A é a absorbância do corante **AZB** com o valor igual a 0,480 (λ_{max} 630nm)

ϵ é a absortividade molar do corante , sendo igual a de $64.820 \text{ mol}^{-1}.\text{L}.\text{cm}^{-1}$

b é o caminho óptico com o valor de 1cm

c é a concentração da espécie em mol L^{-1}

O valor abaixo corresponde a primeira concentração do corante relacionada no Quadro 1. As demais concentrações do corante são calculadas da mesma forma.

$$[\text{Corante AZB livre na mistura}] = 7,41 \times 10^{-6} \times 10 \text{ mol.L}^{-1}$$

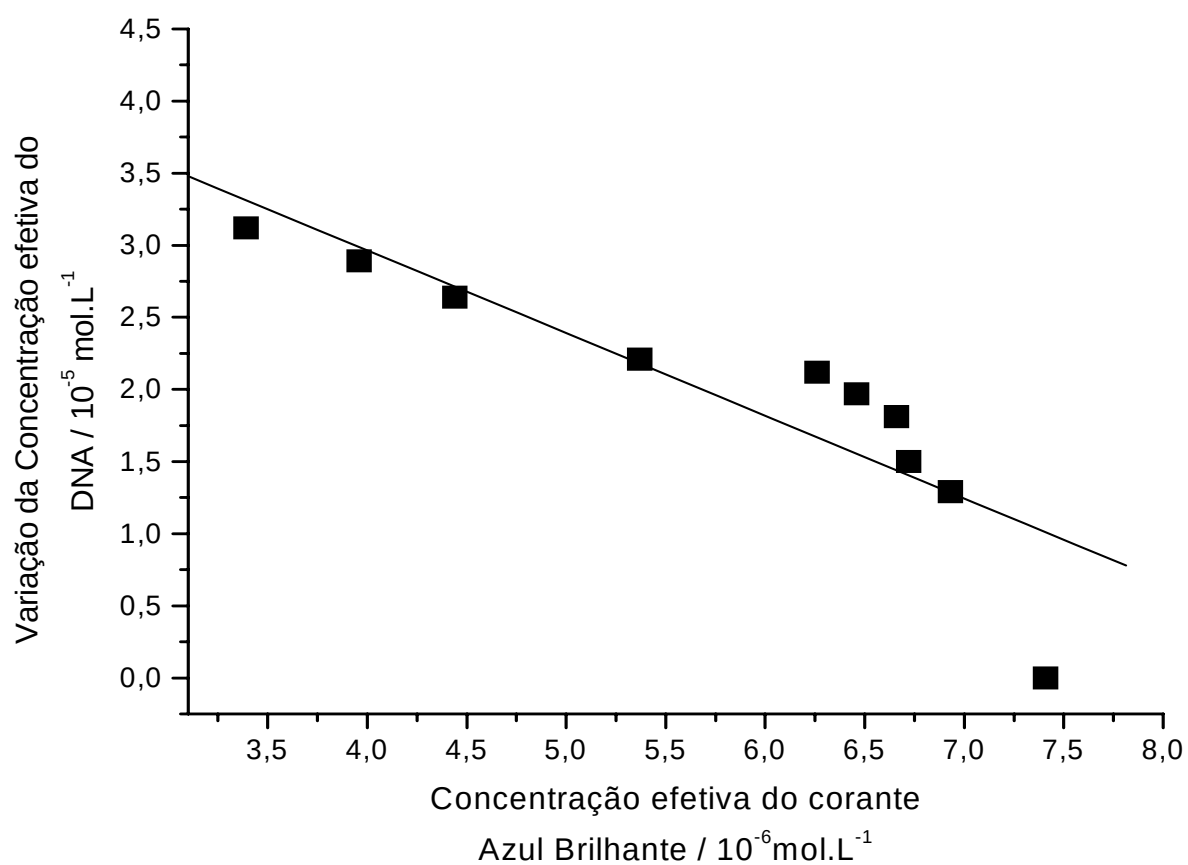


Figura: 3.10 - Variação da concentração do DNA em função da concentração livre de corante Azul Brilhante, na mistura

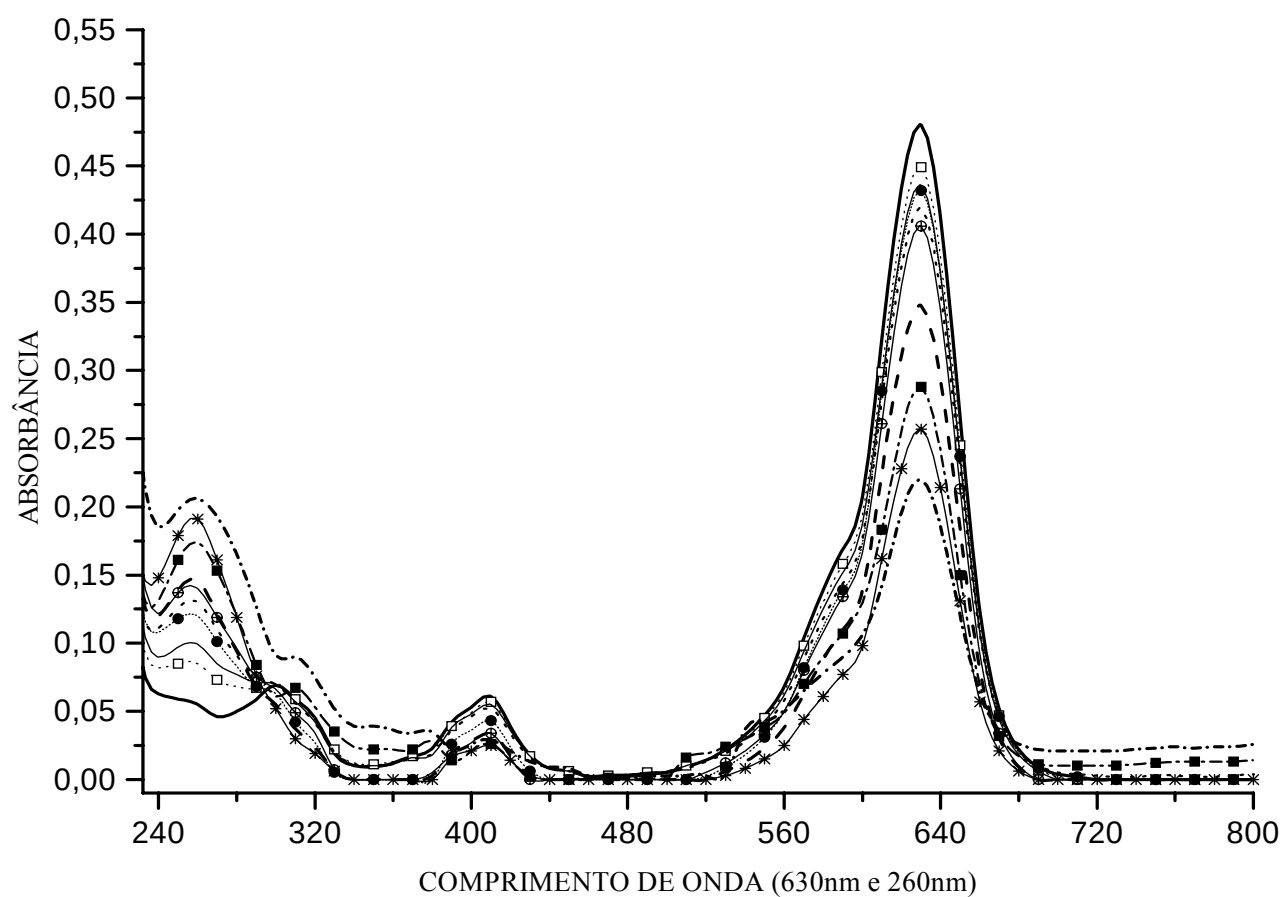


Figura: 3.11- Espectros de absorção das soluções contendo DNA e corante Azul brilhante $[AZB] = 6,66 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[P_{\text{DNA}}] =$
— 0,00; ...□... 1,29; — 1,50; ...●... 1,81;
... 1,97; —⊕— 2,12; - - - 2,21; - · - 2,64;
—*— 2,89; - - - - 3,12 $\times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$

Pelo Quadro 2 e gráficos 3.12 e 3.13, observa-se que à medida em que aumenta a concentração do corante Azul Brilhante, mantendo-se fixa a concentração adicionada de DNA, atinge-se a saturação dos sítios de intercalação do DNA, numa concentração do corante adicionado de $8,00 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. A concentração efetiva do corante neste ponto é $8,75 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, devido ao efeito hipercrômico do mesmo. Este efeito hipercrômico do corante indica a formação de um complexo de transferência de carga na intercalação corante/DNA (MONTANARI, MONTANARI, VELOSO, BEEZER, MITCHELL, 1998; ALMEIDA, LEITÃO, REINA, MONTANARI, DONNICI, LOPES, 2005). A relação $[P_{\text{DNA}}]/[\text{corante}]$ para atingir a saturação é 4,16, ou seja, a concentração do corante precisa ser 4,16 vezes maior que a concentração do DNA para saturar os seus sítios de intercalação.

QUADRO 2 : Estudos sobre intercalação variando a concentração do corante Azul Brilhante-FCF fixando a concentração do DNA

Variação da concentração do Corante Azul Brilhante-FCF em função da concentração do DNA na mistura VA (volume adicionado / mL) e [AZB] e [P_{DNA}] / mol.L⁻¹							
VA DNA/ mL	[P _{DNA}] adicionada na mistura	[P _{DNA}] efetiva na mistura	V.A. AZB/ mL	[AZB] teórica na mistura	Efeito hipercrômico do AZB na mistura	Sítios de Intercalação (S _{DNA})	R (nº pares de bases intercaladas)
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	2,32 x 10 ⁻⁵	0	0	0	0	0
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	2,42 x 10 ⁻⁵	0,04	2,66 x 10 ⁻⁶	3,32 x 10 ⁻⁶	1,21 x 10 ⁻⁵	4,54
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	2,80 x 10 ⁻⁵	0,06	4,00 x 10 ⁻⁶	4,97 x 10 ⁻⁶	1,40 x 10 ⁻⁵	3,50
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	2,86 x 10 ⁻⁵	0,08	5,33 x 10 ⁻⁶	6,29 x 10 ⁻⁶	1,43 x 10 ⁻⁵	2,68
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	2,97 x 10 ⁻⁵	0,10	6,66 x 10 ⁻⁶	7,43 x 10 ⁻⁶	1,48 x 10 ⁻⁵	2,22
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	3,33 x 10 ⁻⁵	0,12	8,00 x 10 ⁻⁶	8,75 x 10 ⁻⁶	1,66 x 10 ⁻⁵	2,07
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	3,33 x 10 ⁻⁵	0,14	9,33 x 10 ⁻⁶	9,27 x 10 ⁻⁶	1,66 x 10 ⁻⁵	1,78
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	3,30 x 10 ⁻⁵	0,16	10,60 x 10 ⁻⁶	9,67 x 10 ⁻⁶	1,65 x 10 ⁻⁵	1,56
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	3,33 x 10 ⁻⁵	0,18	12,00 x 10 ⁻⁶	10,35 x 10 ⁻⁶	1,66 x 10 ⁻⁵	1,38
1,0	2,28 x 10 ⁻⁵	3,23 x 10 ⁻⁵	0,20	13,33 x 10 ⁻⁶	10,44 x 10 ⁻⁶	1,61 x 10 ⁻⁵	1,21

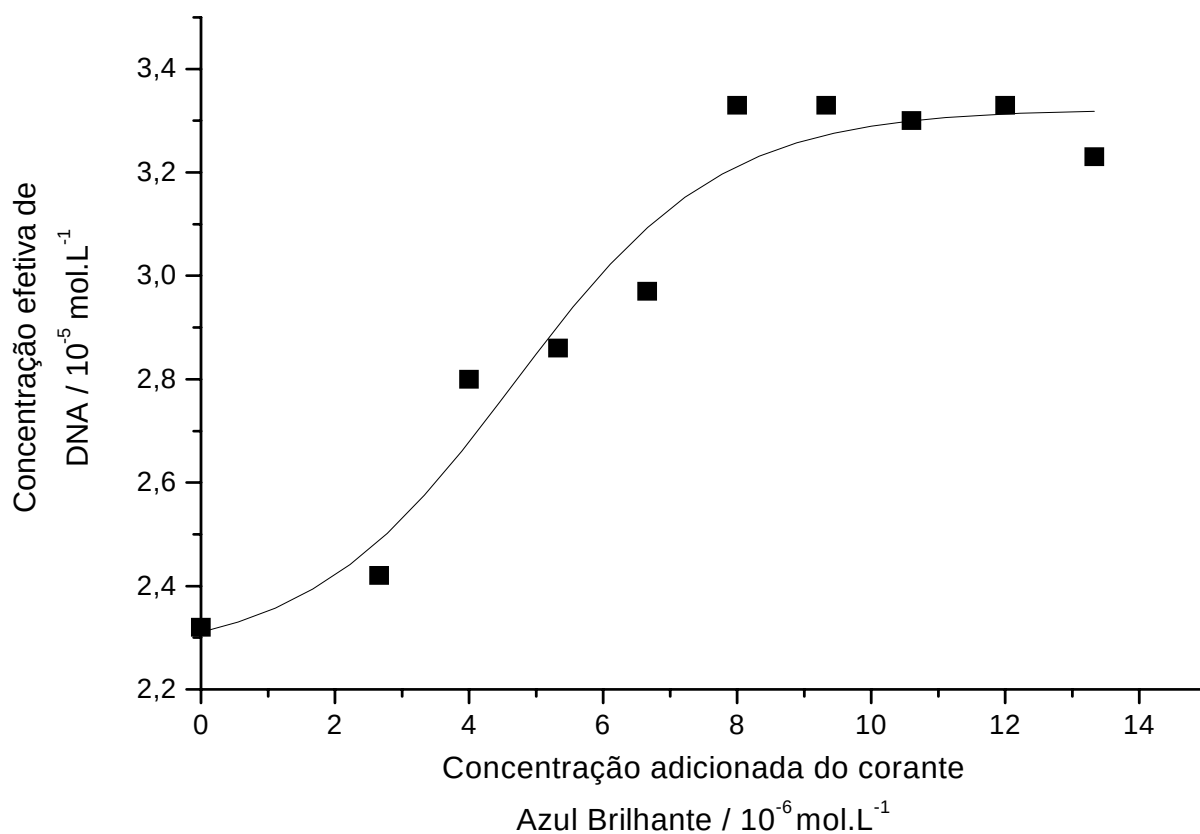


Figura: 3.12- Variação da concentração adicionada do corante Azul Brilhante em função da concentração do DNA, na mistura.

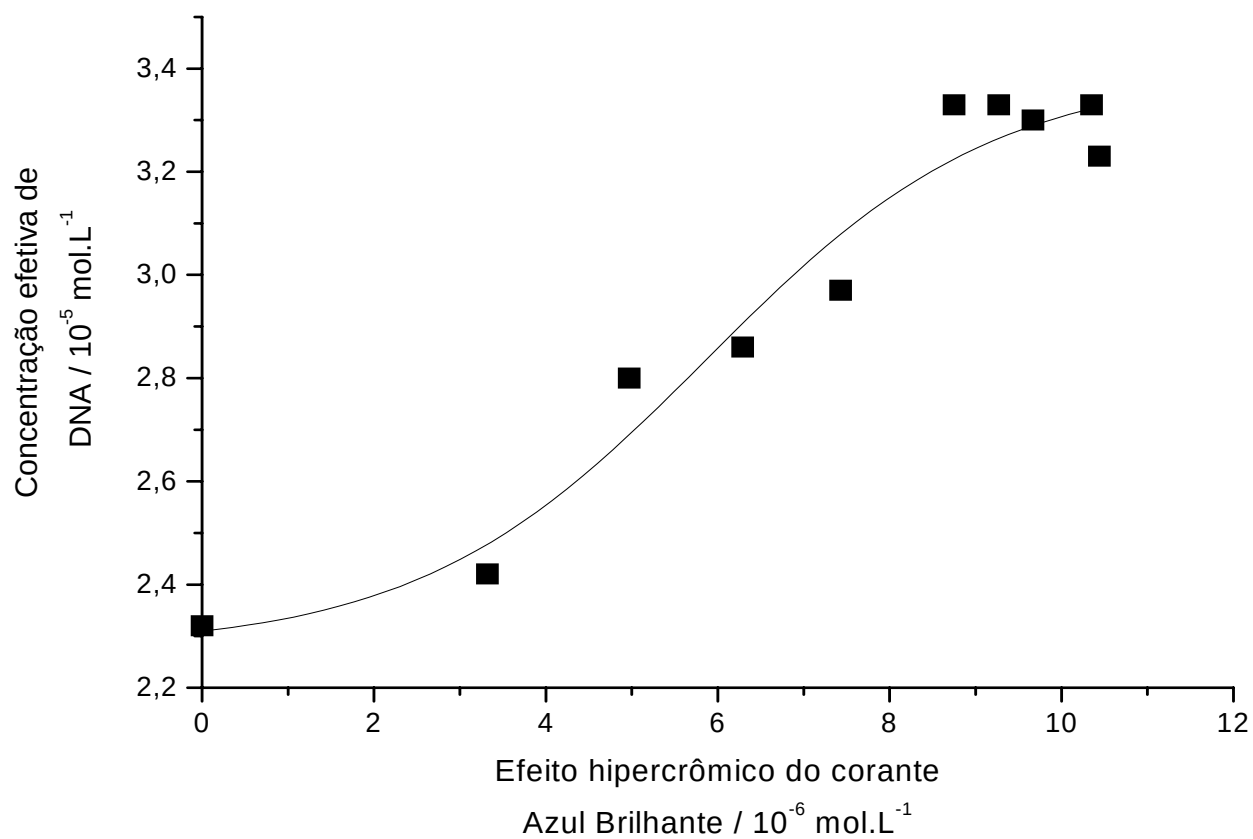


Figura: 3.13- Variação do efeito hipercrômico do corante Azul Brilhante em função da concentração do DNA, na mistura

Fazendo-se uma analogia com o gráfico obtido para a cinética enzimática de Michaelis-Menten, observa-se que as figuras 3.12 e 3.13 apresentam o mesmo aspecto, atingindo um nível de saturação. Baseado nesta analogia, fez-se o gráfico duplo recíproco para variação da concentração adicionada do corante Azul Brilhante em função da concentração efetiva do DNA (Quadro 3 e figura 3.14). Encontrou-se o valor de β (intersecção com o eixo y) de $2,68 \text{ mol.L}^{-1}$ e que pode corresponder à concentração do corante que reduz os sítios de DNA para metade de seu valor inicial. O valor $-0,21$ (intersecção com o eixo x) corresponde à negativa da constante de intercalação K_{int} do corante no DNA, ou seja, a K_{int} para o corante azul brilhante é $0,21$ (FURTADO, 1982).



QUADRO 3: Duplo recíproco variação da concentração do Azul Brilhante fixando a concentração do DNA

1 / [DNA] EFETIVA mol.L⁻¹ com o corante 1/ [Azul Brilhante] (adicionada) na mistura mol.L⁻¹	
[DNA] EFETIVA mol.L⁻¹ na mistura com Azul Brilhante	[Azul Brilhante] (adicionada) na mistura mol.L⁻¹
4,31 x 10 ⁴	∞
4,13 x 10 ⁴	3,76 x 10 ⁵
3,57 x 10 ⁴	2,50 x 10 ⁵
3,49 x 10 ⁴	1,88 x 10 ⁵
3,36 x 10 ⁴	1,50 x 10 ⁵
3,00 x 10 ⁴	1,25 x 10 ⁵
3,00 x 10 ⁴	1,07 x 10 ⁵
3,03 x 10 ⁴	0,94 x 10 ⁵
3,00 x 10 ⁴	0,83 x 10 ⁵
3,09 x 10 ⁴	0,75 x 10 ⁵

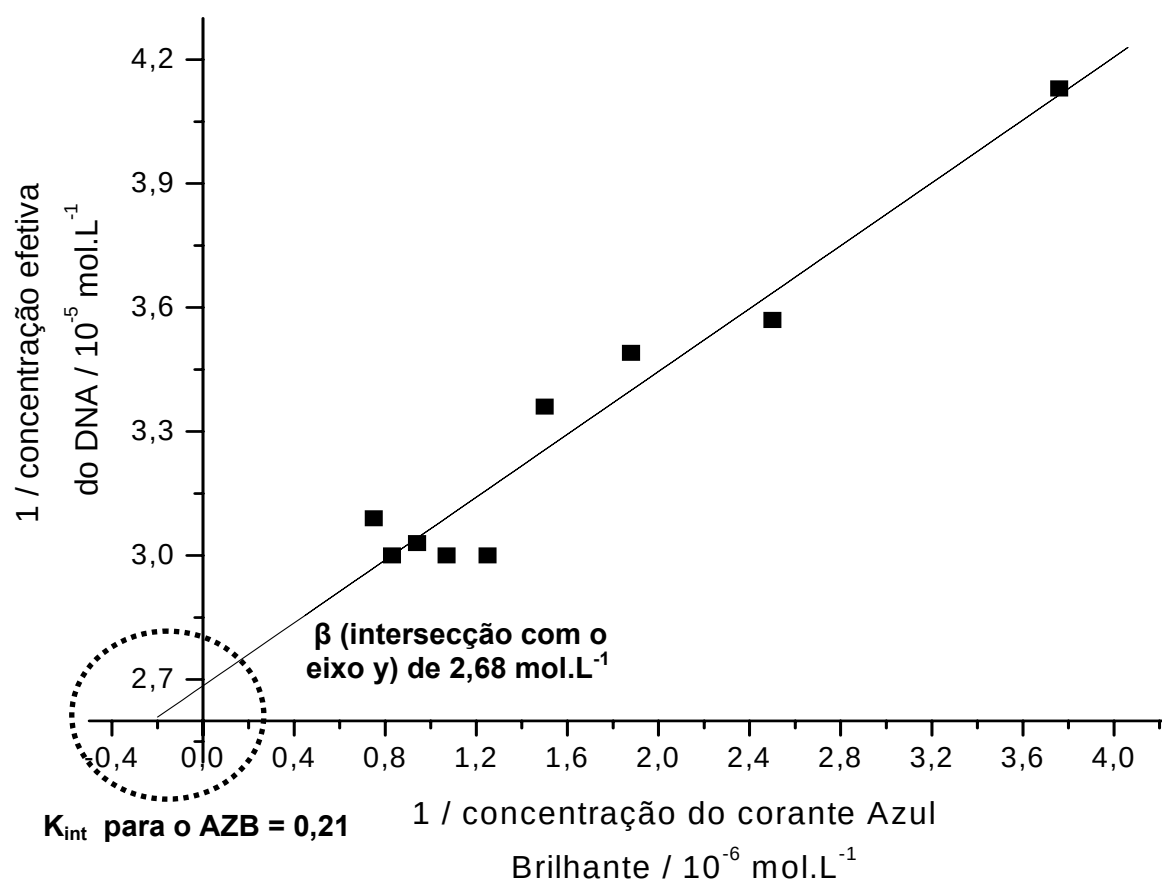


Figura: 3.14- Duplo-recíproco da variação da concentração adicionada do corante Azul Brilhante em função da concentração efetiva do DNA.

3.4.2 - Estudos sobre a intercalação do Azul de Coomassie em DNA

Para estas discussões foi considerado como concentração efetiva, a obtida pelos valores de absorbância registrados nos espectros UV/Visível e foi considerado como concentração adicionada, aquela obtida pelos cálculos estequiométricos, considerando-se o volume pipetado e adicionado no ependorf, de volume 1,5 mL.

Pelo quadro 4 e figuras 3.15 e 3.16 observa-se um comportamento semelhante ao corante Azul Brilhante, ou seja, à medida que a aumenta a concentração de DNA na mistura diminui a concentração de corante livre. Foi observado que a quantidade de grupos fosfatos no DNA que absorvem é menor na mistura do DNA com o corante Azul de Coomassie em relação a mistura do DNA com o corante Azul Brilhante. Conseqüentemente, o número de sítios de intercalação foi menor, assim como os valores de R . Este resultado pode indicar que o corante Azul de Coomassie não está intercalando, mas ligando-se na superfície externa do DNA. Na coluna referente ao número de pares de bases intercaladas R (Quadro 4), observou-se a relação entre os sítios de intercalação (S_{DNA}) e a concentração livre do corante Azul de Coomassie na mistura (BARICATTI, 1998). Os resultados indicam que o número de bases que poderiam ser intercaladas aumenta com o aumento de sítios do DNA disponíveis para a intercalação, indicando que ainda há corante livre no meio reacional (corante não esgotado). É provável que o corante Azul de Coomassie, ao se ligar na superfície externa do DNA, torna os sítios de intercalação indisponíveis, o que explica os valores encontrados de R .

Os espectros do corante Azul de Coomassie em solução aquosa registraram um pico em 260nm. Para os cálculos da concentração do P_{DNA} (grupos fosfatos) dados mostrados no Quadro 4, fez-se a subtração da absorbância registrada no pico em 260nm do corante em solução aquosa, cujo o valor registrado foi de 0,05, das absorbâncias referentes à mistura DNA/Corante.

QUADRO 4: Estudos sobre intercalação variando a concentração do DNA fixando a concentração do corante Azul de Coomassie

Variação da concentração do DNA em função da concentração do Corante Azul de Coomassie na mistura VA (volume adicionado / mL) e [AZC] e $[P_{DNA}] / \text{mol.L}^{-1}$							
VA AZC/ mL	[AZC] adicionada na mistura	[AZC] livre na mistura $\lambda_{\text{max}} 602\text{nm}$	VA DNA/ mL	$[P_{DNA}]$ teórica na mistura	$[P_{DNA}]$ efetiva na mistura	Sítios de Intercalação (S_{DNA})	R (Nº pares de bases intercaladas)
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$4,55 \times 10^{-6}$	0,0	0	0	0	0
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$4,46 \times 10^{-6}$	0,1	$0,228 \times 10^{-5}$	$0,33 \times 10^{-5}$	$0,16 \times 10^{-5}$	0,35
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$4,29 \times 10^{-6}$	0,2	$0,456 \times 10^{-5}$	$0,54 \times 10^{-5}$	$0,27 \times 10^{-5}$	0,63
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$4,11 \times 10^{-6}$	0,3	$0,684 \times 10^{-5}$	$0,68 \times 10^{-5}$	$0,34 \times 10^{-5}$	0,83
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$4,00 \times 10^{-6}$	0,4	$0,912 \times 10^{-5}$	$1,04 \times 10^{-5}$	$0,52 \times 10^{-5}$	1,30
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$3,90 \times 10^{-6}$	0,5	$1,140 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-5}$	$0,67 \times 10^{-5}$	1,72
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$3,87 \times 10^{-6}$	0,6	$1,368 \times 10^{-5}$	$1,65 \times 10^{-5}$	$0,82 \times 10^{-5}$	2,11
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$3,80 \times 10^{-6}$	0,7	$1,596 \times 10^{-5}$	$1,77 \times 10^{-5}$	$0,89 \times 10^{-5}$	2,34
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$3,70 \times 10^{-6}$	0,8	$1,824 \times 10^{-5}$	$1,93 \times 10^{-5}$	$0,96 \times 10^{-5}$	2,60
0,1	$6,66 \times 10^{-6}$	$3,55 \times 10^{-6}$	0,9	$2,052 \times 10^{-5}$	$2,12 \times 10^{-5}$	$1,06 \times 10^{-5}$	2,98

A concentração dos íons fosfatos $[P_{DNA}]$, os cálculos da concentração da solução estoque do DNA usada para a intercalação com o corante Azul de Coomassie, a concentração dos sítios de intercalação $[S_{DNA}]$ e o cálculo para o R (número de pares de bases por molécula de intercalador) são idênticos aos citados no item 3.4.1.

Cálculos para o valor da [Corante AZC livre na mistura]

De acordo com a equação da Lambert-Beer: **$A = \epsilon.b.c$**

A é a absorbância do corante **AZC** com o valor igual a 0,154 (λ_{max} 602nm) .

ϵ é a absortividade molar do corante , sendo igual a de 33.800 mol⁻¹L.cm⁻¹ .

b é o caminho óptico com o valor de 1cm

c é a concentração da espécie em mol L⁻¹

O valor abaixo corresponde a primeira concentração do corante relacionada no Quadro 4. As demais concentrações do corante são calculadas da mesma forma.

$$\text{[Corante AZC livre na mistura]} = 4,55 \times 10^{-6} \times 10 \text{ mol.L}^{-1}$$

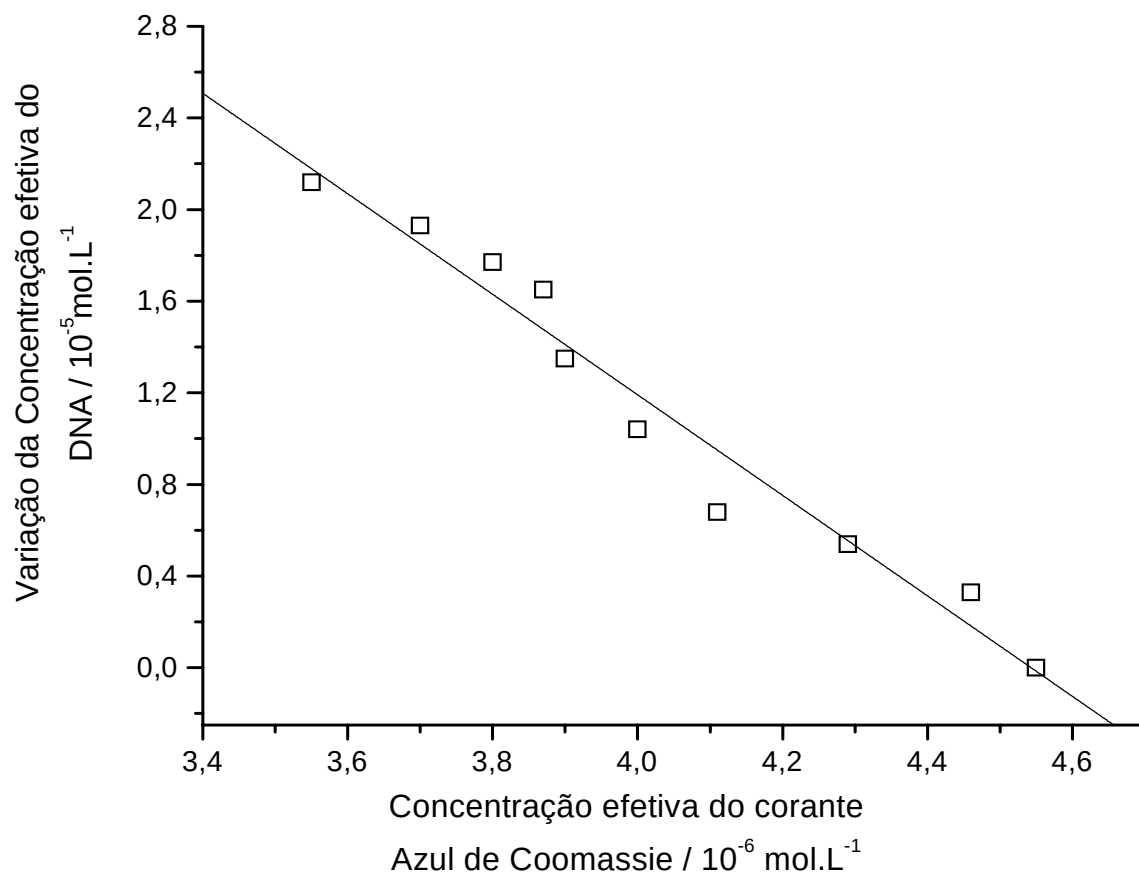


Figura: 3.15- Variação da concentração do DNA em função da concentração livre de corante Azul de Coomassie (602 nm) na mistura

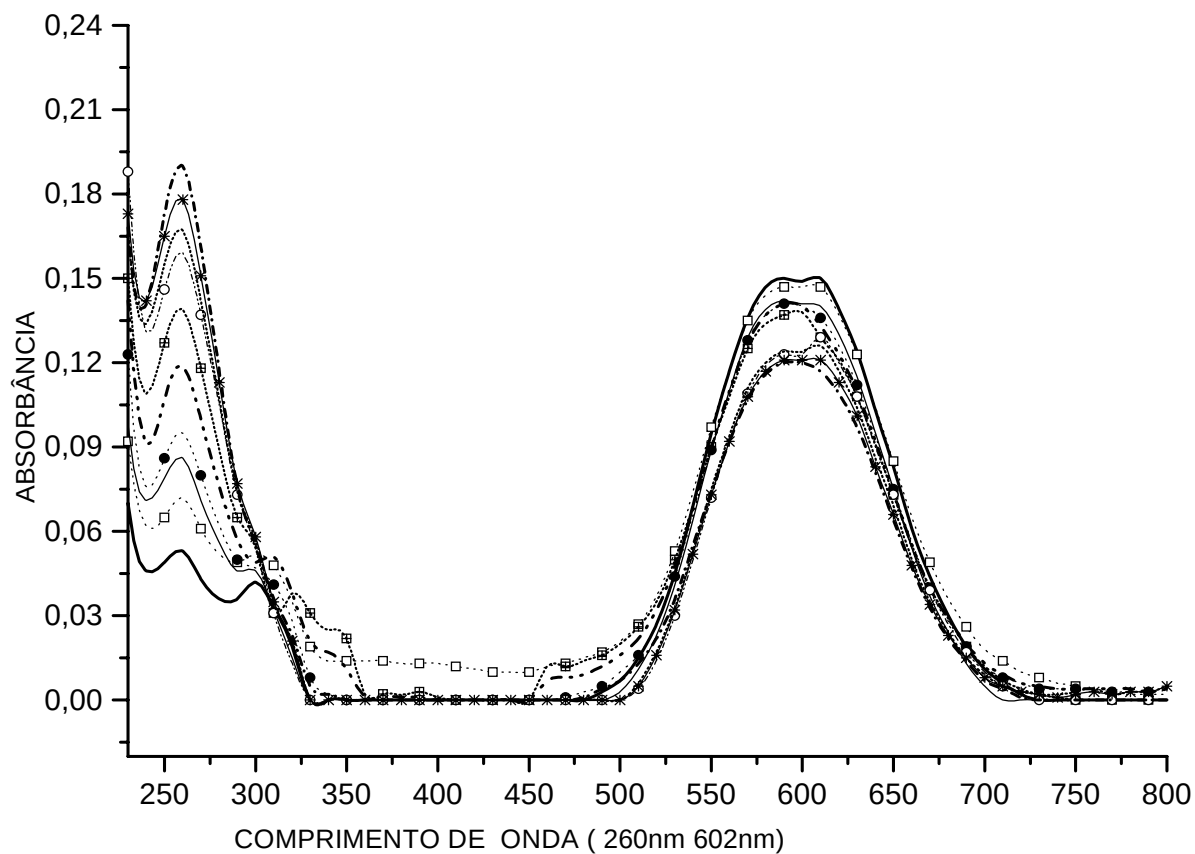


Figura: 3.16- Espectros de absorção das soluções contendo DNA e corante Azul de Coomassie $[AZC] = 6,66 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e $[P_{DNA}] =$ — 0,0; ... □ ... 0,33; — 0,54; ... ● ... 0,68; --- 1,04; ... □ ... 1,35; ... ○ ... 1,65; ... 1,77; —*— 1,93; --- 2,12x10⁻⁵ mol.L⁻¹

De acordo com o Quadro 5 e figura 3.17, constatou-se que a partir da sexta amostra da mistura DNA/Azul de Coomassie, obteve-se a saturação, ou seja, a capacidade de intercalação se esgotou, por mais que se adicione corante não há mais sítios disponíveis para intercalação, sendo atingido a saturação dos sítios de intercalação do DNA, numa concentração do corante adicionado de $8,00 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$ e de concentração do corante efetiva de $4,23 \times 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$, quando se considera o efeito hipocrômico do mesmo. A relação $[P_{\text{DNA}}]/[\text{corante}]$ para atingir a saturação é 3,25, ou seja, a concentração do corante precisa ser 3,25 vezes maior que a concentração do DNA para tornar os seus sítios de intercalação indisponíveis.

Observou-se também um efeito hipocrômico, figura 3.18, do corante livre na mistura, quando comparado com a concentração do corante adicionado. Este efeito reflete a diminuição da concentração do corante Azul de Coomassie livre para absorver e que deve estar ligada nos grupos fosfatos do DNA. Como visto na seção 3.4.1 o efeito do corante Azul Brilhante foi correspondente a formação de uma complexo de transferência de carga, enquanto que no coomassie este tipo de complexo não deve ser formado.

O DNA tem um efeito hiperocrômico com os dois corantes o Azul Brilhante e Azul de Coomassie, semelhante ao comportamento do DNA com o corante acridina. O corante acridina tem um efeito hipocrômico semelhante ao corante Azul de Coomassie que se refere a interação de empilhamento entre a acridina e as nucleobases; Adenina e Timina. O anel acridina numa simples fita pode estar empilhado em todas as nucleobases, numa conformação mais favorável porque a estrutura da simples fita é mais flexível (FUKUI K, 1996).

QUADRO 5: Estudos sobre intercalação variando a concentração do corante Azul de Coomassie fixando a concentração do DNA

Variação da concentração do Corante Azul de Coomassie em função da concentração do DNA, na mistura VA (volume adicionado / mL) e [Azul de Coomassie] e $[P_{DNA}] / \text{mol.L}^{-1}$							
VA DNA/ mL	$[P_{DNA}]$ adicionada na mistura	$[P_{DNA}]$ efetiva na mistura	VA AZC/ mL	[AZC] teórica na mistura	Efeito hipocrômico do AZC na mistura $\lambda_{\text{max}} 602\text{nm}$	Sítios de Intercalação (S_{DNA})	R (Nº pares de bases intercaladas)
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	$2,32 \times 10^{-5}$	0	0	0	0	0
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	$2,53 \times 10^{-5}$	0,04	$2,66 \times 10^{-6}$	$0,80 \times 10^{-6}$	$1,26 \times 10^{-5}$	4,73
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	$2,57 \times 10^{-5}$	0,06	$4,00 \times 10^{-6}$	$1,48 \times 10^{-6}$	$1,29 \times 10^{-5}$	3,22
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	$2,60 \times 10^{-5}$	0,08	$5,33 \times 10^{-6}$	$2,36 \times 10^{-6}$	$1,30 \times 10^{-5}$	2,43
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	$2,62 \times 10^{-5}$	0,10	$6,66 \times 10^{-6}$	$2,99 \times 10^{-6}$	$1,32 \times 10^{-5}$	1,98
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	$2,60 \times 10^{-5}$	0,12	$8,00 \times 10^{-6}$	$4,23 \times 10^{-6}$	$1,31 \times 10^{-5}$	1,63
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	$2,62 \times 10^{-5}$	0,14	$9,33 \times 10^{-6}$	$5,09 \times 10^{-6}$	$1,32 \times 10^{-5}$	1,41
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	$2,60 \times 10^{-5}$	0,16	$10,60 \times 10^{-6}$	$5,41 \times 10^{-6}$	$1,31 \times 10^{-5}$	1,23
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	$2,59 \times 10^{-5}$	0,18	$12,00 \times 10^{-6}$	$5,77 \times 10^{-6}$	$1,30 \times 10^{-5}$	1,08
1,0	$2,28 \times 10^{-5}$	$2,59 \times 10^{-5}$	0,20	$13,33 \times 10^{-6}$	$5,83 \times 10^{-6}$	$1,30 \times 10^{-5}$	0,97

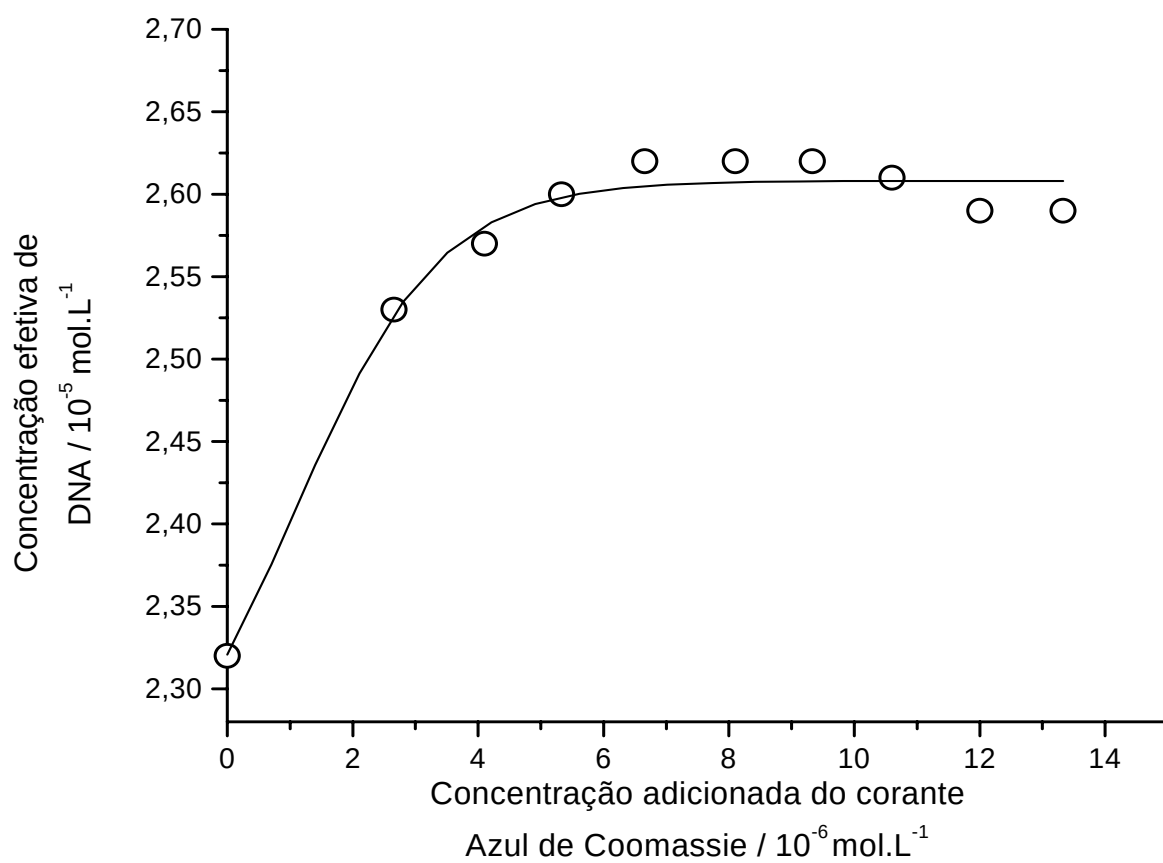


Figura: 3.17- Variação da concentração adicionada do corante Azul de Coomassie em função da concentração do DNA, na mistura.

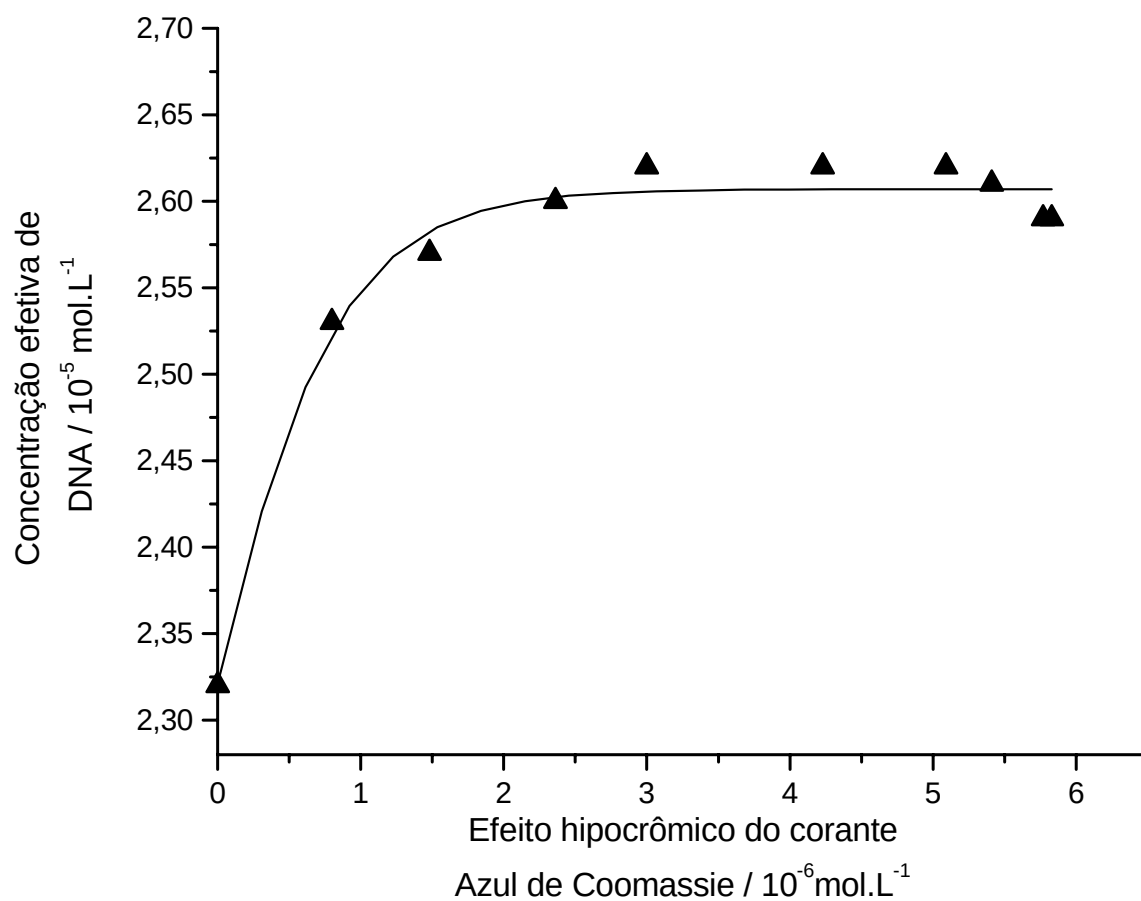


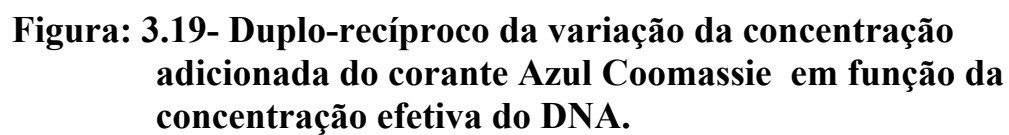
Figura: 3.18- Variação do efeito hipocrômico do corante Azul de Coomassie em função da concentração do DNA, na mistura.

Observando-se que as figuras 3.17 e 3.18 apresentaram o mesmo aspecto, atingindo um nível de saturação, da mesma forma como com o corante Azul Brilhante, fez-se uma analogia com o gráfico obtido para a cinética enzimática de Michaelis-Menten,. Baseado nesta analogia traçou-se o gráfico duplo recíproco para variação da concentração adicionada do corante Azul de Coomassie em função da concentração efetiva do DNA (Quadro 6 e figura 3.19). Encontrou-se o valor de β de $3,81 \text{ mol.L}^{-1}$ que pode corresponder à concentração do corante que reduz os sítios de DNA para metade de seu valor inicial. O valor -0,38 (interseção com o eixo x) corresponde à negativa da constante de intercalação K_{int} do corante no DNA, ou seja, a K_{int} para o corante Azul de Coomassie é 0,38 (FURTADO, 1982).



QUADRO 6: Duplo recíproco variação da concentração do Azul de Coomassie fixando a concentração do DNA

1 / [DNA] EFETIVA mol.L⁻¹ com o corante [Azul de Coomassie] (adicionada) na mistura mol.L⁻¹	
[DNA] EFETIVA mol.L⁻¹ na mistura com Azul de Coomassie	[Azul de Coomassie] (adicionada) na mistura mol.L⁻¹
4,31 x 10 ⁴	∞
3,95 x 10 ⁴	3,76 x 10 ⁵
3,89 x 10 ⁴	2,50 x 10 ⁵
3,85 x 10 ⁴	1,88 x 10 ⁵
3,83 x 10 ⁴	1,50 x 10 ⁵
3,85 x 10 ⁴	1,25 x 10 ⁵
3,83 x 10 ⁴	1,07 x 10 ⁵
3,85 x 10 ⁴	0,94 x 10 ⁵
3,86 x 10 ⁴	0,83 x 10 ⁵
3,86 x 10 ⁴	0,75 x 10 ⁵



3.5 - Alterações na estrutura do DNA análise espectrofotométrica na região do Infravermelho (IV)

As discussões a seguir referem-se a técnica espectroscópica de absorção na região infra-vermelha. Considerando que a metodologia para a precipitação do DNA utilizou álcool isopropílico, fez-se necessário comparar o espectro IV do DNA puro (não precipitado) com o DNA precipitado com álcool isopropílico.

A atribuição das bandas para o DNA foi realizada segundo Andrushchenko e Hackl (1997) e Dyer (1969). Os espectros do DNA, com corante e sem corante, foram obtidos após tratamento com álcool isopropílico, exceto o espectro do DNA_{puro} que foi obtido com o DNA sem qualquer tratamento. Considerando que a metodologia para a precipitação do DNA utilizou álcool isopropílico, fez-se necessário comparar o espectro IV(infravermelho) do DNA puro (não precipitado - DNA_{puro}) com o DNA precipitado com álcool isopropílico (DNA_{prec}). Os espectros na região infravermelho do DNA_{puro}, DNA_{prec}, DNA_{AZB} e DNA_{AZC} encontram-se nas figuras 3.20, 3.21, 3.22 e 3.23 respectivamente. Observou-se um alargamento na forma das bandas do DNA_{prec} na região de absorção do grupo OH, entre 3430 e 3450 cm⁻¹, em relação ao DNA_{puro}. Este alargamento foi atribuído à maior exposição dos grupos OH, em decorrência da mudança conformacional do DNA, causada pela presença do álcool isopropanol. As bandas de vibração assimétricas (1297,03 cm⁻¹) e simétricas (um ombro - 1095,70 cm⁻¹) atribuídas aos grupos PO²⁻ no DNA_{puro} foram deslocadas para 1238,19 e 1091,01 cm⁻¹ no DNA_{prec}, com considerável aumento na absorção, indicando maior exposição dos grupos fosfatos para absorção. Andrushchenko e Hackl (1997) atribuíram a banda da ribose em 1053 cm⁻¹; neste artigo, a banda da ribose no DNA_{puro} é atribuída em 1079,74

cm^{-1} . A banda atribuída ao P=O alifático da ribose, também sofre variações no seu formato. Esta banda da ribose, no DNA_{puro} , foi deslocada para 1051,79 (um ombro) no DNA_{prec} . Este fato reforça que o álcool isopropanol causa uma alteração na conformação do DNA, deixando os grupos fosfatos e ribose mais expostos para absorver. Atribui-se que o DNA_{puro} encontra-se na forma B e que o DNA_{prec} encontra-se na forma A, sendo esta mudança atribuída ao tratamento com o álcool isopropílico. Em função das modificações que o álcool isopropílico causa no DNA quando da sua precipitação com o mesmo, as comparações dos espectros IV do DNA com os corantes serão feitas, principalmente, em relação ao DNA_{prec} e DNA_{puro} .

Quando se compara o espectro do DNA_{puro} , DNA_{prec} e DNA com o corante Azul Brilhante (DNA_{AZB}), observa-se um alargamento da banda na região de 3.400 cm^{-1} para o DNA_{AZB} ($3.427,69 \text{ cm}^{-1}$ para DNA_{puro} , $3.433,80 \text{ cm}^{-1}$ para DNA_{prec} e $3.428,57 \text{ cm}^{-1}$ para DNA_{AZB}). Da mesma forma como discutido para DNA_{prec} , houve uma mudança na conformação do DNA; é provável que o DNA_{AZB} encontra-se na forma A, uma vez que apresenta um alargamento semelhante a banda do DNA_{prec} , característico da forma A. A região entre 890 cm^{-1} e 550 cm^{-1} do DNA_{AZB} apresenta modificações tanto com relação ao DNA_{puro} quanto em relação ao DNA_{prec} . As bandas em $836,72 \text{ cm}^{-1}$ DNA_{puro} e $832,75 \text{ cm}^{-1}$ DNA_{prec} , atribuídas a ligação NH (DYER, 1969) passam a ser um ombro em $829,9 \text{ cm}^{-1}$ no espectro IV do DNA_{AZB} , indicativo de que o corante ligou-se nas bases do DNA. A banda em $1089,10$ para DNA_{AZB} apresenta um alargamento e um ligeiramente deslocamento (comparada com a banda em $1091,01$ do DNA_{prec}) e a banda em $1233,57$ está deslocada e ligeiramente mais larga, em relação ao DNA_{puro} . Este alargamento da banda em $1233,57$ para DNA_{AZB} indica uma sobreposição das bandas dos grupos PO^{2-} e da banda da ribose, um ombro em $1062,79$ que atribuímos à banda da

ribose, deslocado em relação ao DNA_{prec}. Estes dados indicam maior exposição dos grupos PO²⁻ e ribose, em relação ao DNA_{prec} e maior interação do corante Azul Brilhante com o DNA. A banda em 832,75 cm⁻¹ DNA_{prec} atribuída NH das bases, é deslocada para 826,75 no DNA_{AZB}; atribuímos este deslocamento à intercalação do corante Azul brilhante nas bases do DNA.

Os espectros do DNA_{prec} e do DNA com o corante Azul de Coomassie (DNA_{AZC}) apresentam muitas semelhanças, principalmente na região entre 890 cm⁻¹ e 550 cm⁻¹, região de absorção das bases do DNA. As bandas atribuídas a ligação NH das bases apresentam o mesmo valor, 832,75; esta observação indica que este corante não intercala entre as bases do DNA. As bandas atribuídas aos grupos fosfatos no DNA_{prec} foram deslocadas para 1234,09 e 1089,47 no DNA_{AZC}, mas apresentam o mesmo valor que DNA_{AZB}. O ombro em 1060,94, atribuído à ribose no DNA_{AZC}, é um valor bem próximo do atribuído ao corante Azul Brilhante. Estes resultados indicam que, embora o corante Azul de Coomassie não intercale nas bases do DNA, ele interage nos grupos fosfatos e ribose; esta ligação pode ser a interação eletrostática na superfície do DNA, onde os grupos fosfatos têm carga negativa para esta região, citada por Kuroda e Tanaka, (1994). Estes resultados obtidos com os corantes Azul Brilhante e Azul de Coomassie são corroborados pelos estudos em nosso laboratório utilizando a técnica ultravioleta-visível (a ser publicado). O corante Azul de Coomassie não intercala nas bases do DNA, provavelmente, devido a dois fatores: a) aos grupos CH₃ ligados aos carbonos 1' dos anéis aromáticos aqui designados como **C** e **E** (figura 1.7); estes grupos devem estar causando um impedimento estérico; b) a presença do anel aromático assinalado como **A** no corante Azul de Coomassie e ausente no Azul Brilhante (figura 1.6).

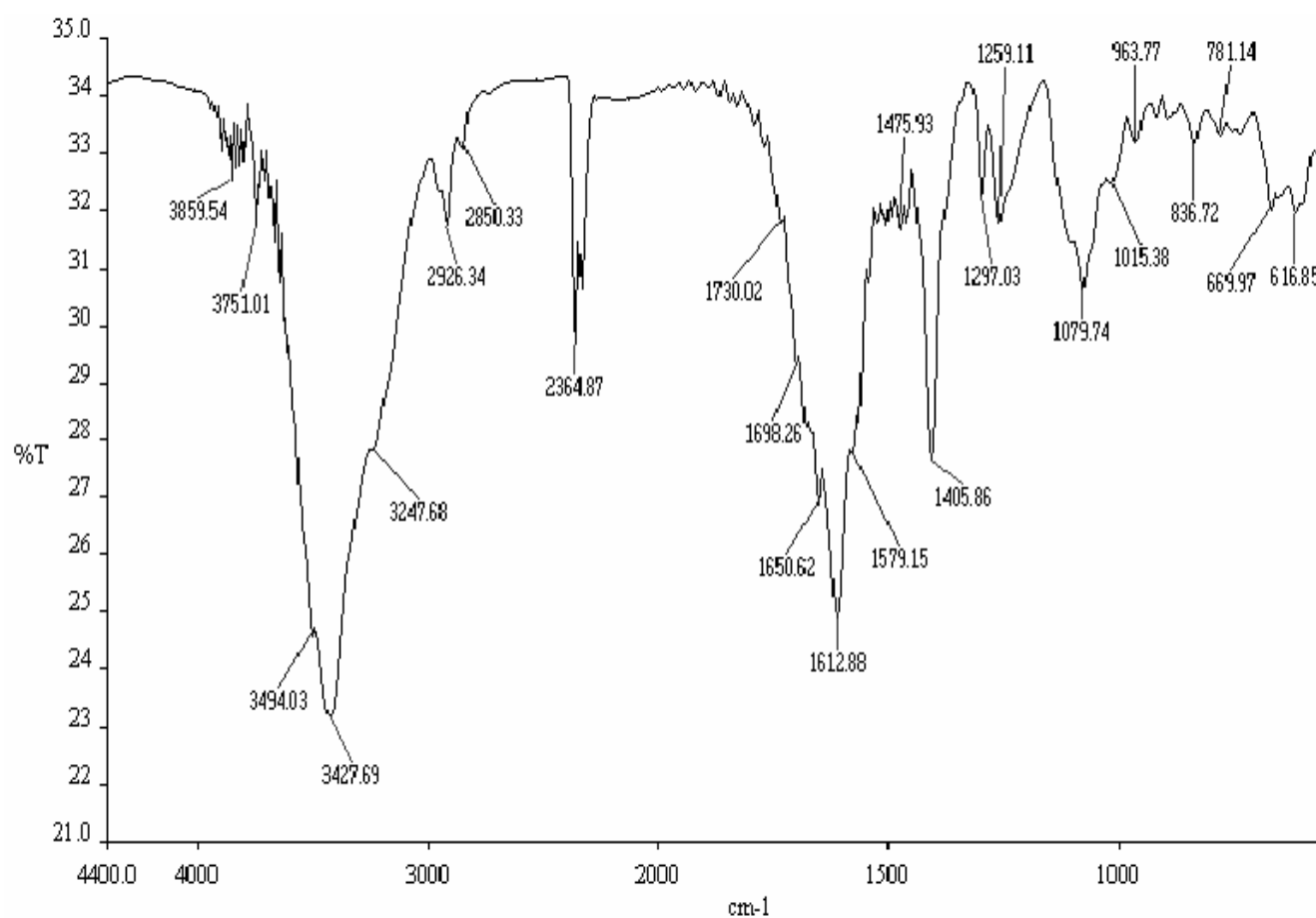


Figura: 3.20- Espectro de absorção do IR do DNA_{puro}

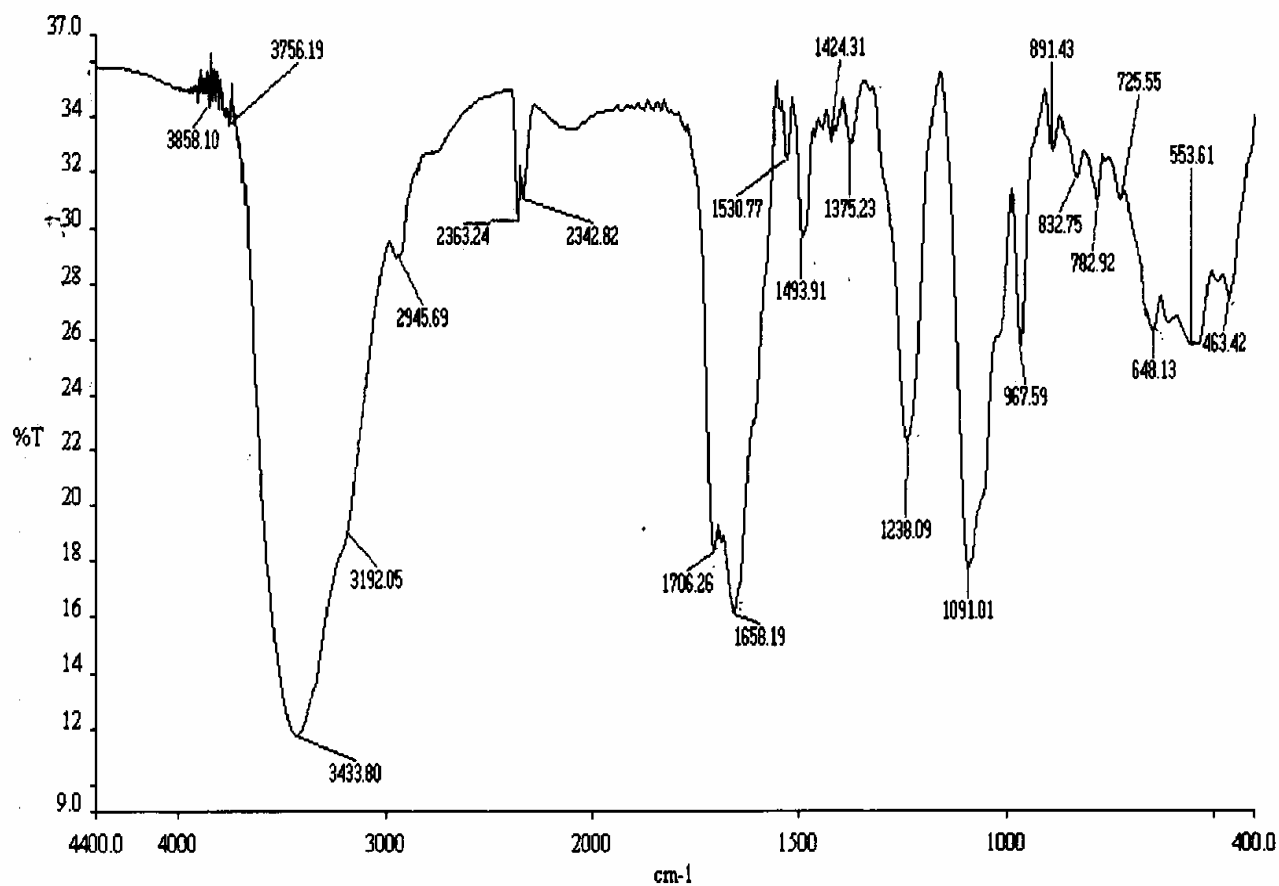


Figura: 3.21- Espectro de absorção do IR do DNA_{precipitado} com álcool isopropanol

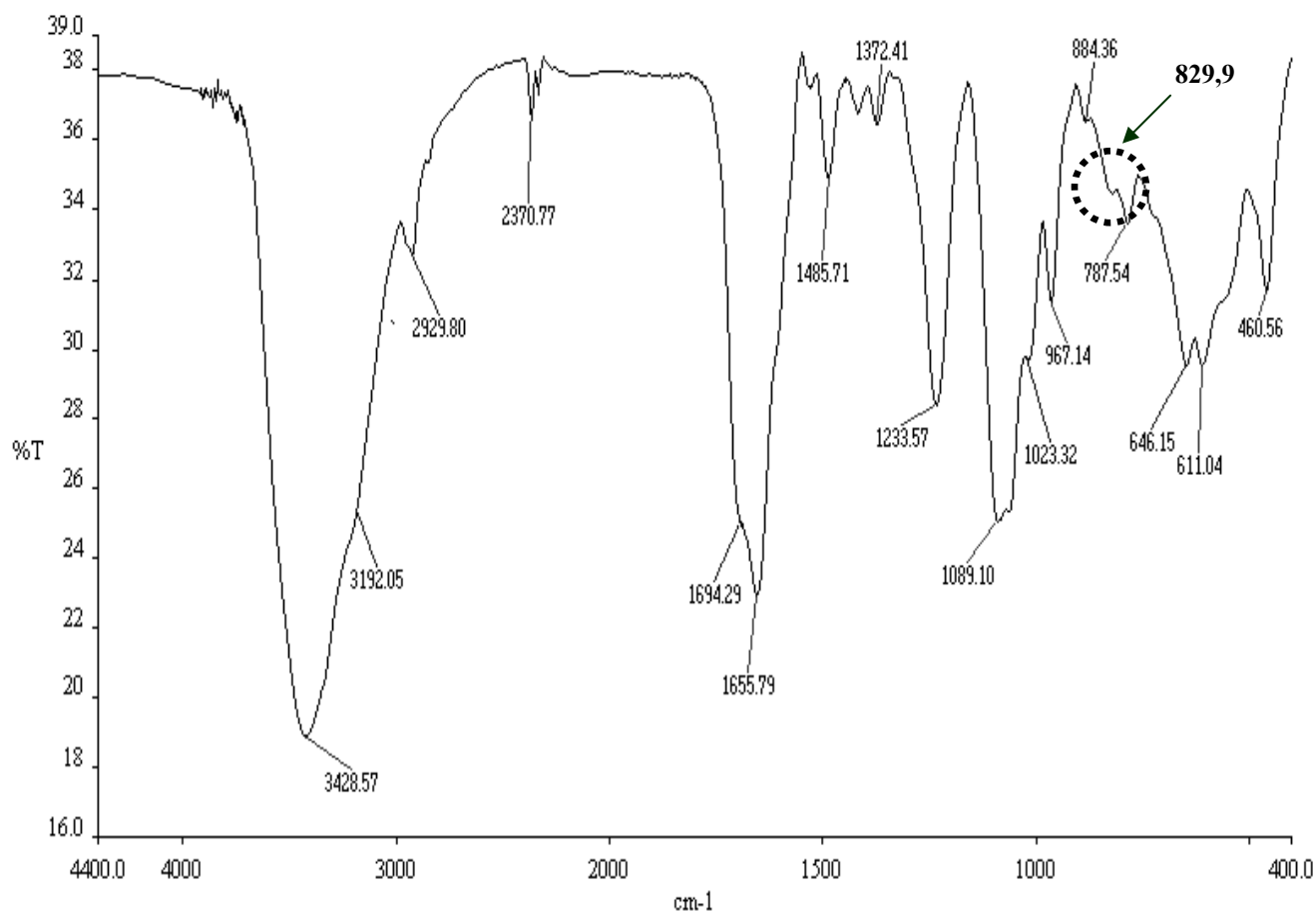


Figura: 3.22- Espectro de absorção do IR do DNA precipitado/AZB

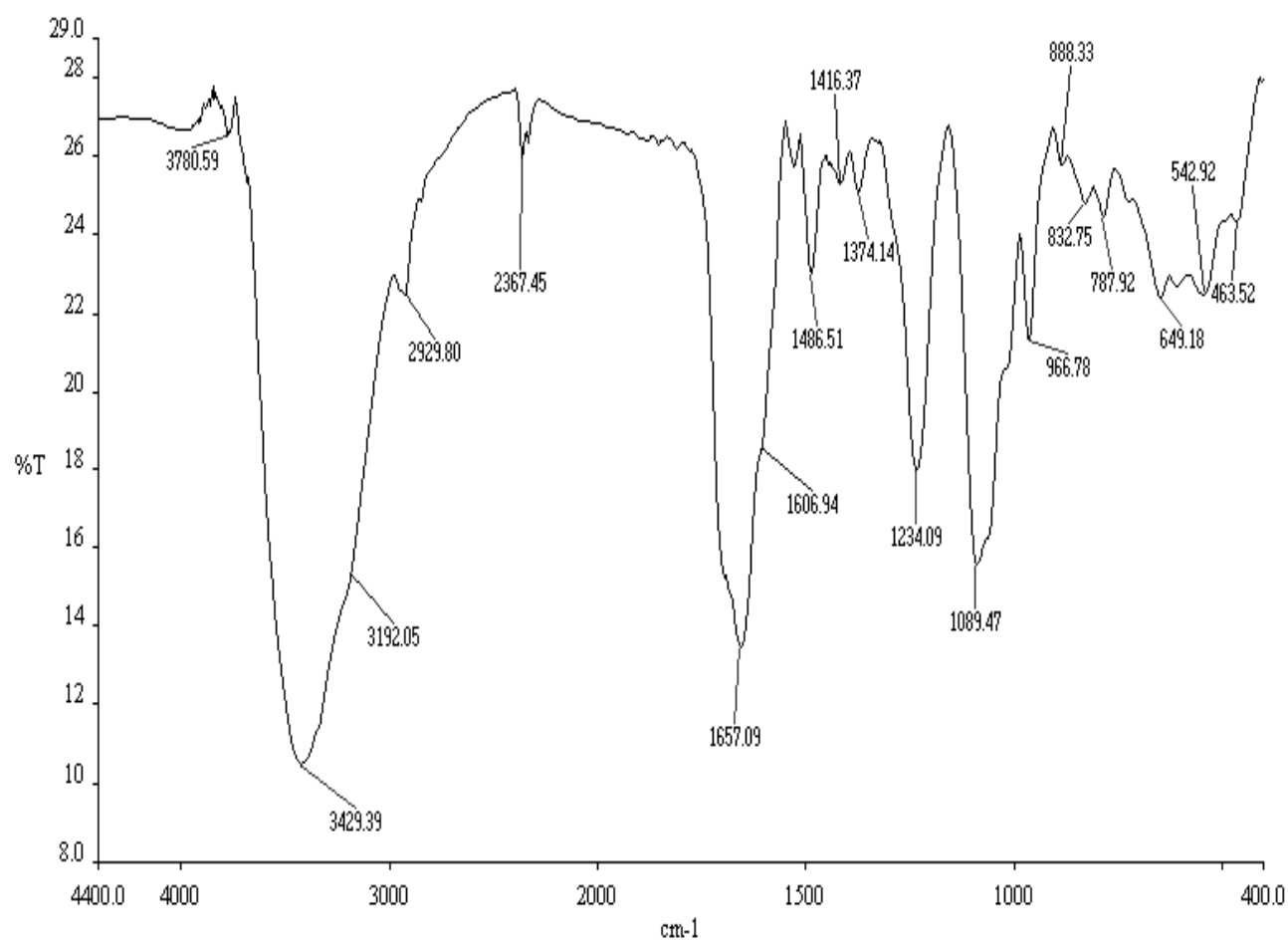


Figura: 3.23- Espectro de absorção do IR do DNA precipitado/AZC

CONCLUSÃO

4 – Conclusão

Estudos preliminares constataram o valor do coeficiente de extinção molar para o DNA, o qual foi coerente com a literatura. Encontrou-se também os coeficientes de extinção molar dos corantes para calcular a concentração dos corantes livres na mistura. Após a variação do pH do meio dos corantes, o estudo da intercalação foi feito em pH neutro (fisiológico) e os corantes se apresentaram na forma monoprotônica. A precipitação do DNA com álcool isopropanol induziu a mudança conformacional do DNA da forma B (DNA_{puro}) para a forma A (DNA_{prec.}).

Os resultados deste trabalho indicam que o corante alimentício Azul Brilhante FCF, pode intercalar entre as bases do DNA. Esta intercalação pode ser observada pelas mudanças nos espectros de absorção na região do UV-Vis, considerando o λ máximo do corante Azul Brilhante e do DNA. Os resultados observados nos espectros de absorção na região UV-Vis foram confirmados nos espectros do infravermelho do complexo DNA/Azul Brilhante, onde se constatou uma alteração nas bandas do espectro na região característica das ligações N-H das bases do DNA.

Com relação à interação do corante Azul de Coomassie G-250, verificou-se que este corante se ligou na superfície do polímero de DNA, mais propriamente nos grupos fosfatos, conforme dados obtidos na região UV-Vis e infravermelho. Os testes feitos na região do infravermelho do complexo DNA/Azul de Coomassie, não registraram alteração na região das bases do DNA, bandas características das ligações N-H.

Conclui-se, portanto, que o corante azul brilhante pode estar intercalando nas bases do DNA, enquanto que o Azul de Coomassie pode estar interagindo na superfície do DNA.

TRABALHOS

FUTUROS

5 - Trabalhos Futuros

Para elucidar a estrutura formada no complexo DNA-AZB / DNA-AZC e considerando as propostas dos membros da banca do exame de qualificação sugerimos para a continuidade deste trabalho os estudos a seguir:

1. Estudo sobre a estrutura do DNA envolvendo difração de Raios-X (**XANES e EXAFS**) sendo indicados para explicações mais detalhadas quanto a forma como os corantes interagem com o DNA.
2. Estudo da **força iônica** para verificar a possível formação de dímeros dos corantes na superfície externa do DNA e as características eletrostáticas da interação.
3. Estudos de Corantes de Antocianina na intercalação com DNA, verificar a estabilidade do DNA, comparar com os dados obtidos do corante Azul brilhante e propor a substituição do corante sintético pelas Antocianinas.
4. Estudos sobre a viabilidade da aplicação desses corantes na terapia fotodinâmica.
5. Verificar a intercalação dos corantes em DNA bacteriano e teste com a ação da DNase sobre DNA .
6. Verificar a ação dos corantes numa cultura celular para observar a modificação no empacotamento cromossômico.

APÊNDICE

6.1 - Apêndice (A)

6.1.1 - Métodos de análise

6.1.1.1 – Espectrometria

A espectrometria é o processo analítico-instrumental baseado nas propriedades de absorção, emissão e reflexão de energia eletromagnética em região específica do espectro (PAVIA, 1996; SILVERSTEIN, 1987). Uma das propriedades mais importantes da luz é a dualidade de sua natureza: a luz pode ser tratada como matéria e como onda. A emissão e absorção da energia radiante podem ser **quantizadas** (fóton), esta propriedade é importante para explicar como a radiação eletromagnética que interage com a matéria. A energia de cada fóton é proporcional à frequência da radiação e é dada pela seguinte relação:

$$E = h\nu \quad (1)$$

E = energia do fóton (unidade é ergs molécula⁻¹)

ν = frequência em ciclos por segundo (unidade é o Hz=1 c.p.s.)

h = constante de Planck (6,626 x 10⁻²⁷ erg's)

A luz também tem natureza ondulatória e possui certa frequência (**ν**) uma onda que também pode ser descrita por seu comprimento de onda λ , definido como a distância entre dois picos da onda. A relação entre a frequência e o comprimento de onda é dado por:

$$\nu = c / \lambda \quad (2)$$

ν = frequência em ciclos por segundo (unidade é o Hz=1 c.p.s.)

c = velocidade de propagação da onda no vácuo (essencialmente igual à velocidade de propagação da luz, 2,998x10¹⁰ cm s⁻¹)

λ = comprimento de onda (unidade é o cm)

O espectro eletromagnético pode ser desmembrado em várias partes de acordo com a energia do fóton e do seu efeito sobre a estrutura da matéria. A figura 6.1 representa o diagrama esquemático do espectro eletromagnético.

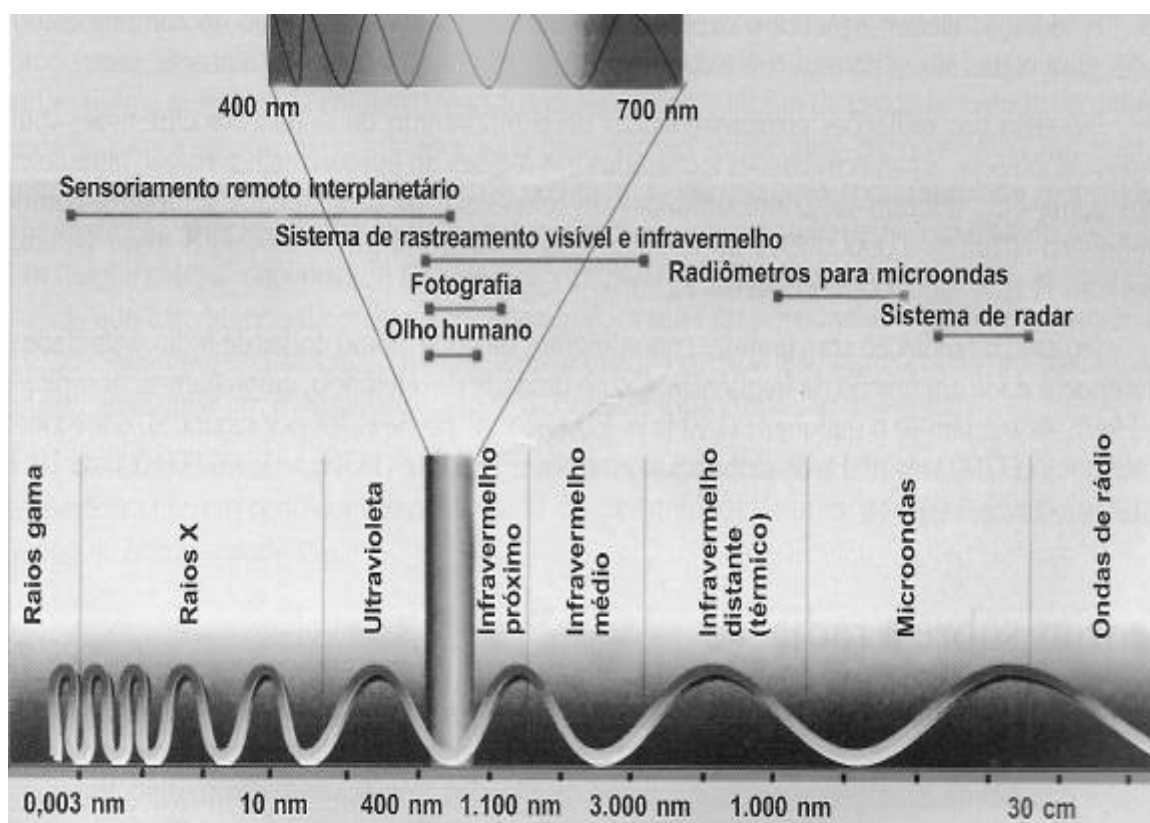


Figura: 6.1 - Diagrama esquemático do espectro eletromagnético
(<http://www.geog.ufpr.br/disciplinas/espectro1.doc>)

6.1.1.2 - Ultravioleta e Visível

Medidas de absorção baseadas em radiação ultravioleta e visível encontram vasta aplicação para identificação e determinação de uma miríade de espécie inorgânicas e orgânicas. Os métodos de absorção molecular talvez, sejam os mais amplamente usados dentre todas as técnicas de análise quantitativa em laboratórios químicos e clínicos em todo o mundo. A espectroscopia absorção UV-Visível compreende a região do espectro eletromagnético de comprimentos de onda entre

200nm a 800nm As intensidades das bandas são expressas como transmitância (T) ou absorbância (A). A transmitância é a razão entre a energia radiante transmitida por uma amostra e a energia radiante que nela incide. A absorbância é o logaritmo, na base 10, do recíproco da transmitância, isto é, $A = \log_{10} (1/T)$ (SILVERSTEIN, 1979).

O método utilizado para determinar de um modo quantitativo a concentração de substâncias em solução que absorvem radiação, é usando a **Lei de Beer-Lambert**. A tradução matemática desta lei implica a definição dos parâmetros: a Absorbância (A) e a Transmitância (T). A percentagem de radiação que atravessa uma solução homogênea é designada por transmitância (Equação 3) e apresenta unidades (%). Contudo, os resultados espectrofotométricos são expressos geralmente em absorbância (Equação 4) que corresponde ao logaritmo do inverso da transmitância. Este parâmetro é desprovido de unidades e apresenta sobre a transmitância a vantagem de variar linearmente com a concentração das amostras desde que se trabalhe em condições que não tenham outros fatores interferindo na absorção das moléculas, segundo a lei de Beer-Lambert (VOGEL, 1992). Estas expressões, extremamente úteis do ponto de vista prático, deixam em aberto a relação entre radiação absorvida e concentração, que foi condensada na expressão de Beer-Lambert (Equação 5) (SILVERSTEIN, 1979; e SKOOG, 2002).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (3)$$

Onde T é a transmitância, I_0 é a luz incidente na amostra, I é a luz que atravessou a amostra.

$$\text{Log } 10 \left[\frac{I}{I_0} \right] = kcb = A \quad (4)$$

Onde:**k** = a constante característica do soluto**c** = concentração do soluto**b** = comprimento da cubeta**A** = absorbância **ϵ** = absortividade molar

$$A = \epsilon bc \quad (5)$$

A absorção de radiação ultravioleta ou visível por uma espécie atômica ou molecular M pode ser considerada um processo de duas etapas, a primeira das quais envolve excitação eletrônica, como mostrada pela equação (SKOOG, 2002).



O produto da reação entre M e o fóton $h\nu$ é uma espécie excitada eletronicamente, simbolizada por M^* . O tempo de vida da espécie excitada é breve (10^{-8} a 10^{-9} s), sendo sua existência terminada por um dos vários processos de *relaxação*. O tipo mais comum de relaxação envolve conversão da energia da excitação em calor, isto é,



A absorção de radiação ultravioleta ou visível geralmente resulta da excitação de elétrons de ligação; como consequência, os comprimentos de onda dos picos de absorção podem ser correlacionados com os tipos de ligações nas espécies em estudo. A espectroscopia de absorção molecular, portanto, valiosa para identificar grupos funcionais em uma molécula. Mais importantes, no entanto, são as aplicações da

espectroscopia de absorção ultravioleta e visível na determinação quantitativa de compostos contendo grupos absorventes. A maioria dos compostos que absorvem na região do Ultravioleta-Visível, possuem um ou mais grupos insaturados na sua estrutura, estes grupos são caracterizados por seus elétrons π , facilmente deslocados, isto é, exigem menos energia para se promoverem (SKOOG, 2002).

Para esta discussão, é útil reconhecer três tipos de transições eletrônicas e categorizar as espécies nessa base. Essas três transições envolvem: elétrons π , σ e n ; elétrons d e f e transferência de carga. A absorção de radiação visível e de ultravioleta de maior comprimento de onda está restrita a um número limitado de grupos funcionais (chamados *cromóforos*) que contém elétrons de valência com energias de excitação relativamente baixas (SKOOG, 2002).

A figura 6.2 mostra os níveis de energias dos tipos de orbitais moleculares que diferem significativamente. Quase sempre o nível de energia de um elétron não-ligante situa-se entre os níveis de energia dos orbitais σ e π ligantes e antiligantes. As transmissões eletrônicas entre certos níveis de energia podem ocorrer por absorção de radiação. Quatro tipos de transmissões são possíveis: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$ (SKOOG, 2002).

Transições: $\sigma \rightarrow \sigma^*$: em relação a outras transições possíveis, a energia necessária para induzir uma transição $\sigma \rightarrow \sigma^*$ é alta, correspondendo à frequência na região ultravioleta de vácuo.

Transições $n \rightarrow \sigma^*$: essas transições requerem menor energia que o tipo $\sigma \rightarrow \sigma^*$ e podem ser produzidas por radiação na região entre 150 e 250 nm, com a maior parte dos picos aparecendo abaixo de 200 nm.

Transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$: A maioria das aplicações da espectroscopia de absorção, a composição orgânicos está baseada em transições de elétrons n e π para o estado excitado π^* , porque as energias necessárias para essas processos situam-se em uma região espectral experimentalmente conveniente (200nm a 700 nm) (VOGEL, 1992 e SKOOG,2002). Ambas as transições requerem a presença de um grupo funcional insaturado para fornecer os orbitais π . Precisamente, é a estes centros de absorção insaturados que o termo cromóforo se aplica.

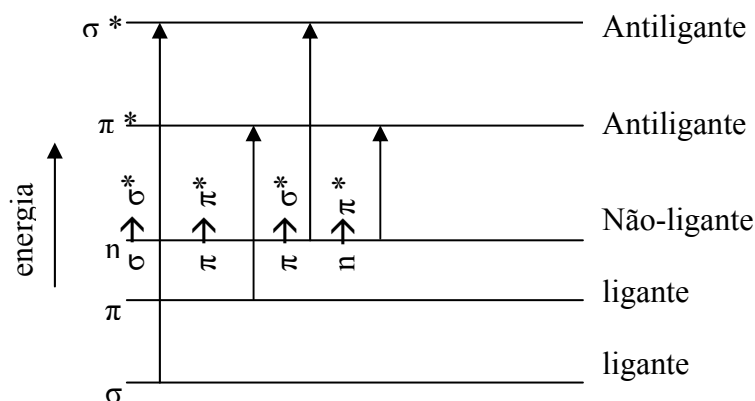


Figura: 6.2 – Níveis de Energia eletrônica molecular (Skoog, 2002)

Termos frequentemente utilizados na discussão de espectros eletrônicos:

CROMÓFORO: grupo insaturado covalente, responsável pela absorção eletrônica (por exemplo: $C=C$, $C=O$, ou NO_2).

AUXÓCROMO: grupo saturado que, quando ligado a um cromóforo altera tanto o comprimento de onda com a intensidade de absorção (exemplo: OH , NH_2 e Cl).

DESLOCAMENTO BATOCRÔMICO: É o deslocamento de uma absorção para um comprimento de onda maior devido a efeitos de substituição ou dissolvente (isto é, deslocamento para a região do vermelho).

DESLOCAMENTO HIPSOOCRÔMICO: É um deslocamento de uma absorção para um comprimento de onda menor devido a efeitos de substituição ou de solvente, isto é, um deslocamento para a região do azul.

EFEITO HIPERCRÔMICO: É um aumento da intensidade de absorção.

EFEITO HIPOCRÔMICO: É uma diminuição na quantidade de absorção.

6.1.1.3 - Infravermelho

O espectro no infravermelho fornece um rico agregado de bandas de absorção, a espectrometria de infravermelho mede a transição entre estados vibracionais que ocorrem quando uma molécula absorve energia na região do infravermelho do espectro eletromagnético. Os diferentes grupos funcionais e os seus tipos de ligações têm frequências e intensidades de absorção distintas no infravermelho.

Tanto o comprimento de onda (μ) como número de onda (cm^{-1}) são usados para medir a posição de uma determinada absorção de infravermelho. A espectroscopia de infravermelho (IV) compreende a região do espectro eletromagnético de comprimentos de onda se estendem de 2,5 a 15 μ (4000 a 667 cm^{-1}); a região entre 0,8 a 2,5 μ (12,500 a 4,000 cm^{-1}) é chamada *infravermelho próximo* e a região de 15 a 200m μ (667 a 50 cm^{-1}) é chamada *infravermelho afastado*. Como no caso da espectroscopia ultravioleta absorções que ocorrem em comprimentos de onda menores (maior frequência) são as de maior energia. (MILMAN, 2006; SKOOG, 2002). O número de ondas é diretamente

proporcional a energia absorvida ($K = E/hc$) é o comprimento de onda inversamente proporcional a energia absorvida ($\lambda = hc/E$); ($\lambda = 1/k$).

Absorções de energia desta magnitude provocam perturbações nas frequências específicas das diferentes ligações químicas. Ou seja, a frequência de cada ligação corresponde a um nível vibracional e depende da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular, das massas dos átomos e eventualmente do acoplamento vibrônico (MILMAN, 2006; SKOOG, 2002).

A partir de 1980 a técnica de infravermelho evoluiu bastante, destacando-se a substituição gradual de espectrômetros dispersivos, por espectrômetros com transformada de Fourier (FTIR) e o desenvolvimento de aplicações na região do infravermelho próximo e distante, (Figura 6.3) (KAROU, 2006; BODECCHI, 2005; BAULSIR, 1996).

Região	Técnica	Tipo de Análise	Tipo de Amostra
IV próximo	Reflexão difusa	Quantitativa	Misturas sólidas ou líquidas
	Absorção	Quantitativa	Misturas gasosas
IV médio	Absorção	Qualitativa	Compostos puros sólidos, líquidos ou gasosos
	Absorção	Quantitativa	Misturas complexas
	Reflexão	Qualitativa	Compostos puros sólidos ou líquidos
	Emissão	Quantitativa	Amostras atmosféricas
IV distante	Absorção	Qualitativa	Espécies puras inorgânicas ou organometálicas

Figura 6.3 – Principais aplicações da espectrometria no infravermelho

Os diferentes grupos funcionais e os seus tipos de ligações têm frequências e intensidades de absorção distintas no infravermelho. As ligações C-H na moléculas absorvem energia num comprimento de onda específico resultando em vibrações moleculares. Há dois modos fundamentais de vibração das moléculas: *estiramento*, em

que a distância entre dois átomos aumenta ou diminui, mas os átomos ficam no mesmo eixo de ligação, e *deformação*, em que a posição do átomo muda em relação ao eixo original da ligação. As vibrações de estiramento e de deformação de uma ligação apenas ocorrem em frequências quantizadas. Quando incide na molécula luz infravermelha de mesma frequência, há absorção de energia e aumento de amplitude daquela vibração, Dyer(1969). Algumas entre as vibrações de estiramento e de deformação que podem existir em uma molécula estão esquematizadas na figura 6.4.

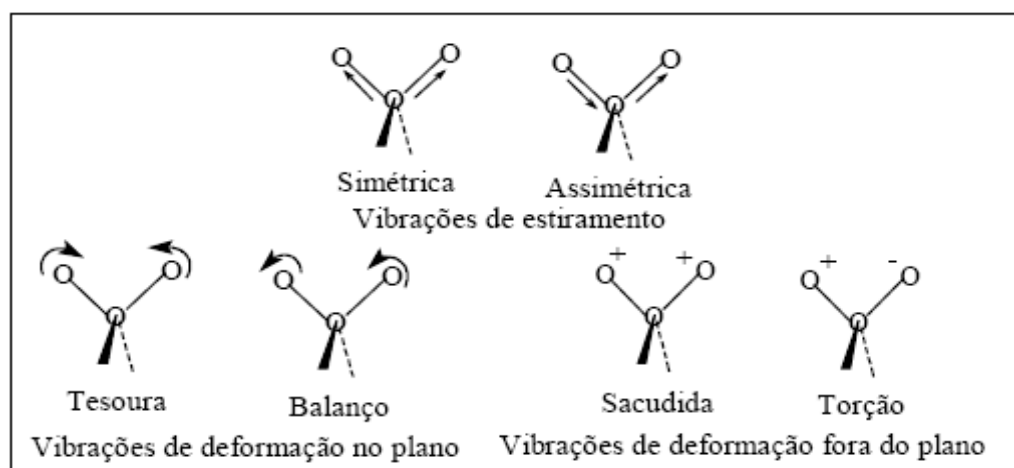


Figura 6.4 - Vibrações de um grupo de átomos (+ e - significam vibrações perpendiculares ao plano do papel) (Dyer , 1969).

Segundo Dyer (1969), um valor aproximado para a frequência do estiramento (ν , em cm^{-1}) de uma ligação é relacionado às massas dos dois átomos (M_x e M_y , em gramas), à velocidade da luz (c), e constante de força da ligação (k , em dina/cm):

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{M_x M_y / (M_x + M_y)}} \quad (6)$$

Ligações simples, duplas e triplas têm constantes de força que são aproximadamente 5,10 e 15 x 10⁵ dina/cm, respectivamente. O valor do coeficiente de extinção molar na espectroscopia infravermelha varia de quase zero até ao redor de 2.000. O valor é proporcional ao quadrado da variação do momento dipolar na molécula causado por uma determinada vibração. Picos de absorção devidos à vibração de estiramento são geralmente os picos mais intensos do espectro (DYER, 1969).

Talvez a mais poderosa finalidade da espectroscopia no infravermelho seja a de estabelecer com segurança a identidade de duas amostras que apresentam o mesmo espectro quando determinado do mesmo modo. A região de 7-11 μ (1430 - 910cm⁻¹) contém muitas absorções causadas por vibrações de deformação assim como absorções causadas por vibrações de estiramento C-C, C-O e C-N. Como a muitas mais vibrações de deformação do que de estiramento em uma molécula, esta região do espectro é muito rica em bandas de absorções e inflexões. Ajuda a identificação o fato de que de a molécula tem, comumente, uma série complexa de bandas de absorção em uma determinada faixa de comprimento de onda, essa região é chamada região de *impressões digitais* do espectro, mas sua presença a substância por comparação do espectro com uma coleção de espectros (DYER, 1969; ATKINS, 2002).

6.2 – Apêndice (B)

6.2.1 – Resoluções

Portaria nº 02-DINAL/MS, de 28 de janeiro de 1987

(D.O. de 09.02.87)

O Diretor da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos/DINAL da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, no uso das atribuições que lhe confere o item III do Artigo nº 39 da Portaria nº 270/Bsb, de 19 de julho de 1978, e considerando:

1- Que as informações toxicológicas sobre os corantes Amarelo Ácido ou Amarelo Sólido (13015) Azul de Indantreno ou Azul de Alizarina (69.800) Laranja GGN (15980) Vermelho Sólido e (16045) e Escarlata GN (14815), usados como aditivos em alimentos, são insuficientes para uma avaliação do grau de risco toxicológico, especialmente quanto ao metabolismo, efeitos sobre a reprodução, embriotoxicidade, carcinogenicidade, mutagenicidade e teratogenicidade;

2- Que o Grupo de Peritos em Aditivos Alimentares da FAO/OMS (JECFA) não estabeleceu IDA (Ingestão Diária Aceitável) para os referidos corantes (aditivos) tendo em vista a insuficiência de dados para se concluir quanto ao risco toxicológico que estes apresentam;

3- Que a ausência de informações toxicológicas representa risco potencial a saúde pública;

Resolve:

I- Excluir da Tabela I do Decreto 55871/65, os corantes Amarelo Ácido ou Amarelo Sólido (13015) Azul de Indantreno ou Azul de Alizarina (69800) Laranja GGN (15980) Vermelho Sólido E (16045) E Escarlata GN (14815) para uso em alimentos.

II- Conceder o prazo de 60 (sessenta) dias a partir da data de publicação desta Portaria para as Empresas requererem junto a DINAL a substituição dos Corantes proibidos por sucedâneos permitidos na Tabela I do Decreto 55871/65.

III- Fica estabelecido o prazo de 180 (cento e oitenta) dias a partir da data de publicação desta Portaria para definir as averbações de substituições dos corantes proibidos, bem como as alterações necessárias nos rótulos.

IV- Decorrido o prazo de 180(cento e oitenta) dias da data de publicação desta Portaria, ficam proibidos os corantes citados no item I, para uso em alimentos.

V- Esta Portaria entrará em vigor na data de sua publicação revogadas as disposições em contrário.

Resolução - CNNPA nº 44, de 1977

Publicada DOU - Seção I, 01/02/78 e 24/04/78

A Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos, do Ministério da Saúde, em reunião realizada em 25 de novembro de 1977, com fundamento nos artigos 5º, item 1 e 10º, do Decreto-Lei nº 986, de 21 de outubro de 1969, resolveu estabelecer as condições gerais de elaboração, classificação, apresentação, designação, composição e fatores essenciais de qualidade dos corantes empregados na produção de alimentos(e bebidas).

1. DEFINIÇÃO

Para os efeitos desta Resolução, considera-se corante a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento(e bebida).

1.1. Excluem-se da definição acima, os sucos e/ou os extratos de vegetais e outros ingredientes utilizados na elaboração de alimentos (e bebidas) que possuem coloração própria, salvo se adicionados com a finalidade de conferir ou intensificar a coloração própria do produto.

2. CLASSIFICAÇÃO

Os corantes serão classificados como:

2.1. Corante orgânico natural - aquele obtido a partir de vegetal, ou eventualmente, de animal, cujo princípio corante tenha sido isolado com o emprego de processo tecnológico adequado.

2.2. Corante orgânico sintético - aquele obtido por síntese orgânica mediante o emprego de processo tecnológico adequado.

2.2.1. Corante artificial - é o corante orgânico sintético não encontrado em produtos naturais.

2.2.2. Corante orgânico sintético idêntico ao natural - é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural.

2.3. Corante inorgânico - aquele obtido a partir de substâncias minerais e submetido a processos de elaboração e purificação adequados a seu emprego em alimento.

2.4. Caramelo - o corante natural obtido pelo aquecimento de açúcares à temperatura superior ao ponto de fusão.

2.5. Caramelo (processo amônia) - é o corante orgânico sintético idêntico ao natural obtido pelo processo amônia, desde que o teor de 4-metil, imidazol não exceda no mesmo a 200mg/kg (duzentos miligramas por quilo).

RESOLUÇÃO Nº 388, DE 5 DE AGOSTO DE 1999

O Diretor-Presidente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária -. ANVISA, no uso de suas atribuições e considerando: a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos visando a proteção à saúde da população; a importância de compatibilizar a legislação nacional, com base nos instrumentos harmonizados no Mercosul relacionados a aditivos alimentares (Resolução GMC nº54/98); que é indispensável o estabelecimento de regulamentos técnicos sobre aditivos em alimentos, com vistas a minimizar os riscos à saúde humana; que é necessário aprovar o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas Funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 19 : Sobremesas, resolve:

Art. 1º Aprovar o "REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES, ESTABELECENDO SUAS FUNÇÕES E SEUS LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS 19 - SOBREMESAS", constante do Anexo desta Resolução. .

Art. 2º O descumprimento desta Resolução constitui infração sanitária sujeitando os infratores às penalidades da Lei n.º 6.437, de 20 de agosto de 1977 e demais disposições aplicáveis.

Art. 3º Revogam-se as disposições em contrário, especialmente, os itens da Tabela I - Aditivos Intencionais por Classe Funcional anexa da Resolução CNS/MS n.º de 24/11/88, da Portaria DINAL/MS n.º 38 de 15/12/89, da Portaria DETEN/MS n.º 13 de 11/01/96, referentes aos seguintes alimentos: sobremesas de gelatina, outras sobremesas e seu pós para preparo, pudins e flans e seus pós para o preparo.

Art. 4º Esta Resolução entrará em vigor na data de sua publicação.

GONZALO VECINA NETO

ANEXO

"REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES, ESTABELECENDO SUAS FUNÇÕES E SEUS LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS 19 - SOBREMESAS"

GRUPO 19 - Sobremesas		
Número	FUNÇÃO / NOME	Limite máximo
INS		g/100g
19.1. sobremesas de gelatina		
19.1.1. PRONTAS PARA O CONSUMO		
	CORANTE	
100 i	Curcumina, cúrcuma	0,015 (como curcumina)
101 i	Riboflavina	<i>quantum satis</i>
101 ii	Riboflavina 5'- fosfato de sódio	<i>quantum satis</i>
102	Tartrazina	0,015
110	Amarelo crepúsculo	0,01
120	Carmim/cochonilha/Ácido carmínico	0,015
122	Azorrubina	0,01
123	Amaranto, Bordeaux S	0,01
124	Ponceau 4 R	0,01
127	Eritrosina	0,005
129	Vermelho 40	0,015
131	Azul patente V	0,015
132	Indigotina	0,015
133	Azul brilhante FCF	0,015
140 i	Clorofila	<i>quantum satis</i>
140 ii	Clorofilina	<i>quantum satis</i>
141 i	Clorofila cúprica	<i>quantum satis</i>
141 ii	Clorofilina cúprica	<i>quantum satis</i>
143	Verde rápido FCF	0,015
150 a	Caramelo I - Simples	<i>quantum satis</i>
150 b	Caramelo II - processo sulfito cáustico	<i>quantum satis</i>
150 c	Caramelo III - processo amônia	<i>quantum satis</i>
150 d	Caramelo IV - processo sulfito amônia	<i>quantum satis</i>
160 a i	Caroteno: beta - caroteno sintético	<i>quantum satis</i>
160 a ii	Carotenos naturais (alfa, beta e gama)	<i>quantum satis</i>
160 b	Urucum/bixina/norbixina	0,001 (como bixina)
160 c	Páprica/capsorubina/capsantina	<i>quantum satis</i>
160 e	Beta-apo-8?carotenal	0,015
160 f	Éster etílico ou metílico do ácido beta-apo-8?carotenóico	0,015
162	Vermelho de beterraba, betanina	<i>quantum satis</i>
163 i	Antocianinas	<i>quantum satis</i>
171	Dióxido de titânio	<i>quantum satis</i>

RESOLUÇÃO Nº 389, DE 5 DE AGOSTO DE 1999

O Diretor-Presidente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, no uso de suas atribuições e considerando: a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos visando a proteção à saúde da população; que é indispensável o estabelecimento de regulamentos técnicos sobre aditivos em alimentos, com vistas a minimizar os riscos à saúde humana; que é necessário aprovar o uso de Aditivos Alimentares, estabelecendo suas Funções e seus Limites Máximos para a Categoria de Alimentos 16: Bebidas - Subcategoria 16.2.2 - Bebidas Não Alcoólicas Gaseificadas e Não Gaseificadas, resolve:

Art. 1º Aprovar o "REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES, ESTABELECENDO SUAS FUNÇÕES E SEUS LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS 16: BEBIDAS - SUBCATEGORIA 16.2.2 - BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS GASEIFICADAS E NÃO GASEIFICADAS", constante do Anexo desta Resolução.

Art. 2º O descumprimento desta Resolução constitui infração sanitária sujeitando os infratores às penalidades da Lei n.º 6.437, de 20 de agosto de 1977 e demais disposições aplicáveis.

Art. 3º Revogam-se as disposições em contrário, especialmente, os itens da Tabela I - Aditivos Intencionais por Classe Funcional anexa da Resolução CNS/MS n.º 04 de 24/11/88 e da Portaria DETEN/MS n.º 97 de 06/03/96, referentes aos seguintes alimentos: preparados para refrescos e refrigerantes, bebidas não alcoólicas gaseificadas ou não gaseificadas e seus pós para preparo.

Art. 4º Esta Resolução entrará em vigor na data de sua publicação.

GONZALO VECINA NETO

ANEXO

REGULAMENTO TÉCNICO QUE APROVA O USO DE ADITIVOS ALIMENTARES, ESTABELECENDO SUAS FUNÇÕES E SEUS LIMITES MÁXIMOS PARA A CATEGORIA DE ALIMENTOS 16 : BEBIDAS - SUBCATEGORIA 16.2.2 - BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS GASEIFICADAS E NÃO GASEIFICADAS

CATEGORIA 16 - BEBIDAS		
Número	FUNÇÃO / NOME	Limite máximo
INS		g/100mL
16.2.2. BEBIDAS NÃO ALCOÓLICAS GASEIFICADAS E NÃO GASEIFICADAS		
16.2.2.1 PRONTAS PARA O CONSUMO		
	CORANTE	
100 i	Curcumina, cúrcuma	0,01
101 i	Riboflavina	<i>quantum satis</i>
101 ii	Riboflavina 5'- fosfato de sódio	<i>quantum satis</i>
102	Tartrazina	0,01
110	Amarelo crepúsculo	0,01
120	Carmim/cochonilha/ácido carmínico	0,01
123	Amaranto, Bordeaux S	0,005
124	Ponceau 4R	0,005
127	Eritrosina	0,001
129	Vermelho 40	0,01
131	Azul patente V	0,005
132	Indigotina	0,01
133	Azul Brilhante FCF	0,01
140 i	Clorofila	<i>quantum satis</i>
140 ii	Clorofilina	<i>quantum satis</i>
141 i	Clorofila cúprica	<i>quantum satis</i>
141 ii	Clorofilina cúprica	<i>quantum satis</i>
143	Verde rápido FCF	0,005
150 a	Caramelo I - simples	<i>quantum satis</i>
150 b	Caramelo II - processo sulfito cáustico	<i>quantum satis</i>
150 c	Caramelo III - processo amônia	<i>quantum satis</i>
150 d	Caramelo IV - processo sulfito-amônia	<i>quantum satis</i>
160 a i	Caroteno: beta - caroteno sintético	<i>quantum satis</i>
160 a ii	Carotenos naturais (alfa, beta e gama)	<i>quantum satis</i>
160 b	Urucum/bixina/norbixina	0,005
160 c	Páprica/capsorubina/capsantina	<i>quantum satis</i>
160 d	Licopeno	0,01
160 e	Beta-apo-8?carotenal	0,01
160 f	Éster etílico ou metílico do ácido beta-apo-8?carotenóico	0,01
161 b	Luteína	0,01
162	Vermelho de beterraba, betanina	<i>quantum satis</i>
163 i	Antocianinas	<i>quantum satis</i>
171	Dióxido de titânio	<i>quantum satis</i>

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

7 – Referências Bibliográficas

ALMEIDA, V. L., LEITÃO A., REINA L. C. B., MONTANARI, C. A., DONNICI, C.L., LOPES M. T. P.; *Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. Química Nova*, vol. 28, nº. 1, 118-129, 2005.

AMES, B.N. *Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. Science*, Washington DC, v.221, n.4617, p.1256-1264, 1983.

ANDRUSHCHENKO, V.V., KORNILOVA, S.V., KAPINOS, L.E., HACKL, E.V., GALKIN, V.L., GRIGORIEV, D.N., BLAGOI, Yu P.; *IR - Spectroscopic Studies Of Divalent Metal on Effects On DNA Hydration. Journal of Molecular Structure* 408/409, 225-228, 1997.

ANIKOVSKY, M. Y., TATIKOLOV A. S., KUZMIN V. A.; *Complex formation between 3;3'-diethylthiacarbocyanine iodide and DNA and its investigation in aqueous solution. International Journal of Photoenergy*, vol. nº.1 , 1999.

ANTUNES, L.M.G; ARAÚJO, M.C.P.; *Mutagenicity And Antimutagenicity Of The Main Food Colorings. Revista Nutrição*, Campinas, 13(2)p. 81-88, 2000.

ATKINS, P.W.; LORETTA,J., **Chemistry: (Molecules,Matter and Changes)**. New York, 426-429, 1997.

ATKINS, P.W.; LORETTA, J., **Princípios de Química, questionando a vida moderna e o meio ambiente**, 1.ed, Porto Alegre: Artmed, p.195, 2002.

BARBOSA, R. A.; **Intercalação dos corantes alimentícios Vermelho-40 e Tartrazina em Ácidos Desoxirribonucléico**, Tese de Mestrado UFU, 2002.

BARICATTI, R. A.; **Estudos espectroscópicos sobre as substâncias Alaranjado de Acridina e Daunomicina intercaladas em DNA**, Dissertação de Mestrado UNICAMP, 1993.

BARICATTI, R. A.; **Estudos sobre a estabilidade e a estrutura do DNA através da fotofísica de corantes intercalados**, Tese de Doutorado UNICAMP, 1998.

BODECCHI, L. M., COCCHI M., MALAGOLI M., MANFREDINI M., MARCHETTI A.; *Application of infrared spectroscopy and multivariate quality-control methods in PVC manufacturing*. **Analytica Chimica Acta**, v.554, issues 1-2, p. 207-217, 2005.

BRADFORD, M.M.; *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BAULSIR, C. F.; SIMLER, R. J.; *Design and evaluation of IR sensors for pharmaceutical testing*. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 21, issue 3, p. 191-203, 1996.

CALIL R., AGUIAR A., **Aditivos nos Alimentos**, São Paulo, Ed. do autor, p.140, 1999.

CARVALHO, D., FERREIRA R.A., OLIVEIRA L.M., OLIVEIRA A.F., GEMAQUE R.C.R.; *Eletroforese de proteínas e isoenzimas em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae caesalpinioideae) envelhecidas artificialmente*. **Revista Árvore**. Viçosa-Mg, v. 30, n. 1, p. 19-24, 2006.

CASSIANO, N. M. CASS Q.B., DEGANI A.L., WAINER I.W.; *Determination of the plasma levels of metyrapone and its enantiomeric metyrapol metabolites by direct plasma injection and multidimensional achiral-chiral chromatography*. **Chirality**, vol.14, p. 731-735, 2002.

Committee Food Chemicals Codex, **“FOOD CHEMICALS CODEX, Second Suprement to the third edition”** National Academic Press, Washington, D. C.,p.43-44,1986.

CONN, E. E.; STUMPF, P. K.; **Introdução a bioquímica**. 4 ed. Ed. Edgard Blücher, São Paulo, p.93-110, 1980.

CONSTANT, P.B.L., STRINGHETA P.C., SANDI D.; *Corantes Alimentícios*. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 20, nº 2, p.203-220, 2002.

DAMASCENO, V. ; *Guerra dos corantes sintéticos ressuscita os naturais*, **Revista, Química e Derivados**, v. 24, n. 250, p.10-21, 1988.

DEVLIN, TM.; **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations**. 4th. Ed.. Wiley-Liss. New York. 1997.

DYER., J.R.; **Aplicações da Espectroscopia de Absorção aos Compostos Orgânicos**, Ed. Edgard Blucher Ltda. São Paulo, Sp, 1969.

FLURY. M., FLÜHLER.H.; *Brilliant Blue FCF as a dye tracer for solute transport studies - toxicological overview*, **J. Environ. Qual**, v.23 p. 1108-1112, 1994.

FRAZÃO, A. S., STEPHAN M. P.; *Utilização de eletroforese (SDS-PAGE) de proteínas de tecido muscular de lula in natura e processada*. **Boletim CEPPA**. Curitiba, v.23, n. 2, p. 31-328, jul./dez. 2005.

FUKUI, K., TANAKA K.; *The acridine ring selectively intercalated into a DNA helix at various types of abasic sites: double strand formation and photophysical properties*, **Nucleic Acids Research**, Vol. 24, nº 20 Oxford University Press, p.3962–3967, 1996.

FURTADO, S.T. F.; **Geração de Oxigênio Singlete na Degradação de Malonaldeído por peroxidase** , Tese de Mestrado, UNICAMP,1982.

GIACOMELLI, E.; **Estudos sobre a intercalação dos corantes: Amaranto e Eritrosina em DNA**, Dissertação de Mestrado , UFU, 2003.

GOREN, M.P.; LI, J.T. L. ;*The coomassie brilliant blue method underestimates drug-induced tubular proteinuria*. **Clinical Chemistry**, v.32, p.386-388, 1986.

HACKL, V.E., S.V. KORNILOVA, V.S., KAPINOS, E.L, ANDRUSHCHENKO, V.V., GALKIN, L.V., GRIGORIEV, N.D. , BLAGOI, Yu.P.; *Study of Ca^{2+} , Mn^{2+} and Cu^{2+} binding to DNA in solution by means of IR spectroscopy.* **Journal of Molecular Structure** 408/409, 229-232 (1997).

HEINS, J. G., FLURY M. ; *Sorption of Brilliant Blue FCF in soils as affected by pH and ionic strength.* **Geoderma**, v. 97p.87–101, 2000.

KAPOR, M. A.; YAMANAKA, H.; CARNEIRO, P. A.; ZANONI, M. V. B. *Eletroanálise de corantes alimentícios: determinação de índigo carmim e tartrazina.* **Eclética Química**, São Paulo, v.26, p.53-68, 2001.

KAROUI, R.; BAERDEMAEKER, J.; *A review of the analytical methods coupled with chemometric tools for the determination of the quality and identity of dairy products.* **Food Chemistry**, In Press., 2006.

KRUGH, T. R.; *Drug-DNA interactions.* **Curr. Opin. Struct. Biol.**, 4(3): 351-364, 1994.

KUBISTA, M. AKERMAN B., NORDÉN B.; *Characterization of interaction between DNA and 4',6-diamidino-2-phenylindole by optical spectroscopy.* **Biochemistry**, 26, 4545, 1987.

KURE N., SANO T. , HARADA S. , YASUNAGA T. ; *Kinetics of the interaction between DNA and acridine orange,* **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, 61, 643, 1988.

KURODA, R., TANAKA H.; *DNA porphyrin interactions probed by induced CD spectroscopy.* *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1575-1576, 1994.

LERMAN, L. S. ; *Structural considerations in the interaction of DNA and acridines,* **J. Mol. Biol.** 3, 18, 1961.

LEHNINGER, A.L., NELSON D.L., COX M. M ; **Principles of Biochemistry**, 3ª edição, Ed. Salvier, São Paulo, p-250-276, 2002.

MAGA, J.A.; TU, A.T.; **Food Additive Toxicology**, Fort Collins, Colorado, EUA, p-196,1994.

MONTANARI, M.L.C. , MONTANARI, C.A. , VELOSO D. P., BEEZER A. E., MITCHELL J. C. ; *Sistemas transportadores de drogas*. **Química Nova**, 21(4) ,1998.

MILMAN, B. L.; *Identification of chemical compounds*, **Analytica Chimica Acta**, v. 24, Issue 6, p. 493-508, 2005.

OZAKI, A., KITANO M., ITOH N., KURODA K., FURUSAWA N., MASUDA T.,YAMAGUCHI H.; *Mutagenicity and DNA-damaging Activity of Decomposed Products of Food Colours under UV Irradiation*, **Food and Chemical Toxicology** 36 811-817, 1998.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; **Introduction to spectroscopy: A guide for students of organic chemistry**. Philadelphia: Editora Saunders, 1996.

POOT, M., KILLER, K-H.; *Distinct patterns of cell cycle disturbance elicited by compounds interfering with DNA topoisomerase I and II activity*. **Experimental Cell Research** 218, p.326-330, 1995.

PRADO, M.A.; GODOY, H.T.; *Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência*. **Quim. Nova**, Vol. XY, No. 00, 1-x, 200http://quimicanova.sbq.org.br/Prelo_QN_Artigos.htm publicado na web em 26/9/06. Acesso em: 27.11.2006.

RAUF, M.A., ASHRAF S., ALHADRAMI S.N.; *Photolytic oxidations of Coomassie Brilliant Blue with H₂O₂*, **Dyes and Pigments**,66,197-200, 2005.

RENNER, H.W.; *“In vivo” effects of single or combined dietary antimutagens on mutagen-induced chromosomal aberrations*. **Mutation Research**, Amsterdam, v.244, n.2, p.185-188, 1990.

SCHABERLE F.A.; **Estudos das características espectroscópicas dos corantes ciânicos com dois cromóforos na interação com DNA: efeitos força iônica**, Dissertação de Mestrado, USP, Ribeirão Preto-SP, 2002.

SCHVARTSMAN S.; **Aditivos alimentares**: Pediatria (São Paulo) Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, vol. 4 (3) p.202-210, 1982.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRILL, T.C.; **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.299, 1979.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A.; **Princípios de Análise Instrumental**,. 5ª. ed. Porto Alegre: Editora Bookman-SBQ, p.277-383,2002.

SMITH. E. L., **Bioquímica: aspectos gerais**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro,p. 120-142, 1985.

STRYER L.; **Bioquímica**, 4ª edição,Ed. Guanabara Koogan S/A ,Rio de Janeiro – RJ, p-776-780, 1996.

VOET D., VOET G. ; **Fundamentals of Biochemistry**. Ed ,John Wiley & Sons Inc, p. 797,1990.

VOGEL, A. I.; **Análise Química Quantitativa**, 6ª. ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2002.

VORLÍČKOVÁ M., KYPR J. SKLENÁŘV.;**Nucleic Acids: Spectroscopic Methods**, Encyklopedia of Analytical Science, vol. 6, sec. ed., Elsevier, Oxford, p.391-399, 2005.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C.; *Molecular Struture of Nucleic Acids* , **Nature**, 171, 737, 1953.

WHO (**World Health Organization**). Quality Assurance of pharmaceuticals, v. 1, 1997.

ZAIA, D.A.M., ZAIA C.T.B.V., LICHTIG J.; *Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes*, **Química. Nova**, 21(6), 767-793, 1998.

[http:// www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br) acesso em: 12.02.2007.

http://en.wikipedia.org/wiki/Brilliant_Blue_FCF acesso em 27.01.2007.

[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/ legis/especifica/aditivos.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/aditivos.htm) acesso em 13.12.2006.

http://en.wikipedia.org/wiki/Image:A-B-Z-DNA_Side_View.png acesso em 14.02.2007.

<http://www.geog.ufpr.br/disciplinas/espectro1.doc> acesso em 16.02.2007.

