



Universidade Estadual Paulista – UNESP

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDOS DA LESÃO AO DNA POR CORANTES TÊXTEIS E DA
CAPACIDADE PROTETORA DE FLAVONÓIDES EMPREGANDO
BIOSENSOR ELETROQUÍMICO**

Carolina Venturini Uliana

Araraquara

2013

Carolina Venturini Uliana

**Estudos da Lesão ao DNA por Corantes Têxteis e da Capacidade Protetora
de Flavonóides Empregando Biossensor Eletroquímico**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Química.

Orientadora: Prof^a Dr^a Hideko Yamanaka

Araraquara

2013

FICHA CATALOGRÁFICA

U39e Uliana, Carolina Venturini
Estudos da lesão ao DNA por corantes têxteis e da
capacidade protetora de flavonóides empregando biossensor
eletroquímico / Carolina Venturini Uliana. –
Araraquara : [s.n], 2013
152 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Hideko Yamanaka


1. Química analítica. 2. Biossensor eletroquímico.
3. DNA. 4. Corantes têxteis. 5. Flavonóides. I. Título.


CAROLINA VENTURINI ULIANA

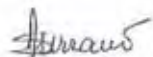
Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Araraquara, 08 de março de 2013.

BANCA EXAMINADORA


Profª Drª Hideko Yamanaka (Orientadora)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP


Profª Drª Maria Valnice Boldrin
Instituto de Química – UNESP, Araraquara - SP


Profª Drª Silvia Helena Pires Serrano
Instituto de Química – USP, São Paulo - SP


Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCAR, São Carlos - SP


Prof. Dr. Paulo Roberto Brasil de Oliveira Marques
Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Codó -MA

DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Gustavo, por seu amor, seu incentivo e por estar presente em todos os momentos.

Aos meus pais, Cláudia e João, pelo amor, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Jeová Deus, por me dar a força e a sabedoria necessárias todos os dias;

À Prof^a Dr^a Hideko Yamanaka, pelos anos de convivência, ensinamentos e amizade;

Aos Professores Nelson R. Stradiotto, Maria Valnice B. Zanoni e Maria Del Pilar T. Sotomayor pelos ensinamentos, discussões e convívio; ao Prof. Dr. Assis V. Benedetti e Dr^a Carla dos Santos Riccardi, pelas valiosas sugestões no exame de qualificação;

Aos integrantes e ex-integrantes do grupo de Eletroanalítica do IQ, pela convivência;

Ao Instituto de Química da Unesp de Araraquara, que foi praticamente minha segunda casa nesses últimos onze anos;

Aos meus queridos amigos Ana Beatriz, Rebeca, João Neto, Regina, João Bezerra, Diva Marques, Aline e Noeli Bessi, Angela Marassi e toda a Congregação Sul pelo encorajamento e por compartilharmos momentos tão alegres e ensinamentos tão valiosos;

À toda a minha família, minha avó Antônia, meus tios Tita e Fortuna, a Fernanda, Valmir, Isabela, Sheila e Ronaldo. Também à minha sogra Sônia, meu sogro Henrique, o Vitor e a Jô, e o Nathan; não posso me esquecer da Francisca, do Lenin e do Ozzi. Também o Loiro, nosso gatinho, que foi tão companheiro por 14 anos.

Ao meu irmão João Henrique, pelas conversas científicas, nas quais ele sempre me dá um baile; ao meu pai, João, por me apoiar em minhas decisões;

À minha mãe, Cláudia, por seu amor, sua preocupação, compreensão e grande amizade. Obrigada por me fazer “desligar” quando era necessário!

Ao meu marido Gustavo, por seu amor, por seus conselhos práticos e sua confiança em mim, mais do que eu mesma. Por seu imenso profissionalismo, sendo ao mesmo tempo uma pessoa tão sensível e amável. Sem ele, tudo teria sido muito mais difícil.

À FAPESP pela bolsa concedida.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Carolina Venturini Uliana

Data de Nascimento: 05 de maio de 1981

Naturalidade: Tambaú – SP

Nacionalidade: Brasileira

Estado Civil: Casada

Filiação:

Cônjuge: Gustavo Stoppa Garbellini

pai – João Batista Uliana

mãe – Cláudia Donizetti Venturini Uliana

Profissão: Licenciada em Química

Endereço para Correspondência:

Rua Militão Nogueira de Carvalho, 668 – Bairro Alvorada – Cep: 13710-000

Tambaú – SP

e-mail: ca_uliana@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2009 – 2013: Doutorado em Química junto ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Araraquara-SP, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Hideko Yamanaka.

Projeto: “Estudos da lesão ao DNA por corantes têxteis e da capacidade protetora de flavonóides empregando biossensor eletroquímico”.

2007 – 2009: Mestrado em Química, junto ao Departamento de Química Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Araraquara-SP, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Hideko Yamanaka.

Projeto: “Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para a detecção do vírus da Hepatite C”.

2002 – 2006: Graduação em Licenciatura em Química junto ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP. Iniciação Científica realizada junto ao Departamento de Química

Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – Araraquara-SP, sob a orientação da Prof^a. Dr^a. Hideko Yamanaka.

Projeto: “Desenvolvimento de genossensor para detecção do vírus da Hepatite C”

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS

01. ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. Voltammetric analysis of flavonoids-DNA interactions based on guanine and adenine signals. **IN: 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry**, Praga, República Tcheca, 2012.
02. GARBELLINI, G. S.; ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. Immobilization strategies of ss-DNA onto boron doped diamond electrode anodically pre-treated. **IN: 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry**, Praga, República Tcheca, 2012.
03. ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. Estudos sobre a interação do corante têxtil Disperso Orange 1 e seus produtos de eletrólises com DNA utilizando biossensor eletroquímico. **IN: I Escola Internacional de Corantes: Análise, Degradação e Toxicidade**, Araraquara-SP, 2012.
04. ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. Oxidação e redução eletroquímica do corante têxtil Disperso Red 1: possível formação de compostos tóxicos. **IN: XX Congresso da Sociedade Iberoamericana de Eletroquímica**, Fortaleza-CE, 2012.
05. ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. Comportamento eletroquímico do corante Disperso Orange 1 sobre eletrodo de diamante dopado com boro. **IN: XVIII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Bento Gonçalves-RS, 2011.
06. ULIANA, C. V.; GONÇALES, N. S. L.; YAMANAKA, H. Construção de biossensor descartável usando CDtrodo de ouro para detecção de Hepatite C. **IN: XIX Congreso de la Sociedad Iberoamericana de Electroquímica**, Alcalá, Espanha, 2010.
07. ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. Avaliação espectrofotométrica da solubilidade e da interação dos corantes têxteis Disperso Orange 1 e Disperso Red 1 com ds-DNA. **IN: 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 2010.

08. GARBELLINI, G. S.; ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. Oxidation of guanosine 5'-monophosphate on the carboxyl terminated boron doped diamond electrode. **IN: 33^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 2010.
09. ROCHA, C. G.; ULIANA, C. V.; TOMAZ, P. R. U.; YAMANAKA, H. Estudo da imobilização da enzima peroxidase sobre eletrodos de grafite utilizando diferentes matrizes de sol-gel. **IN: 17^o Encontro Regional da SBQ**, Araraquara-SP, 2009.
10. ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; SALAZAR-BANDA, G. R.; YAMANAKA, H. Determinação voltamétrica do ácido 5-aminossalicílico em formulações farmacêuticas empregando eletrodos de grafite. **IN: XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Fortaleza-CE, 2009.
11. ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. Estudo da interação do mediador de elétrons ácido 5-aminossalicílico e a enzima peroxidase. **IN: XVII Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Fortaleza-CE, 2009.
12. ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. Utilização da monocamada auto-organizada de ácido lipóico para imobilização da enzima peroxidase sobre CDtrodo de ouro. **IN: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 2008.
13. TOMAZ, P. R. U.; ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. Imobilização da enzima peroxidase sobre eletrodo de grafite utilizando sol-gel de titânia. **IN: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 2008.
14. TOMAZ, P. R. U.; ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. Estudo da estabilidade da enzima HRP imobilizada sobre eletrodo de grafite. **IN: XX Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, São José dos Campos-SP, 2008.
15. TOMAZ, P. R. U.; ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. Avaliação da deposição de filme de sol-gel sobre a superfície de eletrodos de grafite por meio da voltametria cíclica. **IN: XIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, Presidente Prudente-SP, 2007.
16. ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. Determinação voltamétrica do ácido 5-aminossalicílico sobre eletrodo de grafite. **IN: XVI Encontro Regional da SBQ**, Franca-SP, 2007.

17. ULIANA, C. V.; TOGNOLLI, J. O.; YAMANAKA, H. Desenvolvimento de genossensor amperométrico para Hepatite C utilizando planejamento fatorial fracionado. **IN: XVI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Águas de Lindóia-SP, 2007.
18. ULIANA, C. V.; TOGNOLLI, J. O.; YAMANAKA, H. Aplicação de planejamento fatorial fracionado no desenvolvimento de biossensor para Hepatite C. **IN XVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, Bauru-SP, 2006.
19. ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Estudo comparativo dos mediadores ácido 5-aminossalicílico e iodeto de potássio para monitoramento da enzima peroxidase. **IN: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Águas de Lindóia-SP, 2006.
20. ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; SANTILLI, C. V.; YAMANAKA, H. Imobilização de peroxidase em matriz híbrida siloxano-poli(propileno óxido). **IN: XV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Londrina-PR, 2005.
21. ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Imobilização da enzima peroxidase em eletrodos modificados com filme sol-gel. **IN: XVII Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, Araraquara -SP, 2005.
22. OLIVEIRA, M. S.; ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Estudo do comportamento eletroanalítico do ácido 5-aminossalicílico na presença de peróxido de hidrogênio e da enzima peroxidase. **IN: XIV Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**, Teresópolis-RJ, 2004.
23. ULIANA, C. V.; OLIVEIRA, M. S.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Utilização do sistema ácido 5-aminossalicílico e peróxido de hidrogênio para detecção da enzima peroxidase. **IN: XVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**, Ilha Solteira-SP, 2004.
24. ULIANA, C. V.; OLIVEIRA, M. S.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Utilização do sistema ácido 5-aminossalicílico / peróxido de hidrogênio para detecção da enzima peroxidase. **IN: XXXIV Semana da Química do Instituto de Química da Unesp de Araraquara**, Araraquara-SP, 2004.

PUBLICAÇÕES

01. FERREIRA, A. A. P.; ULIANA, C. V.; CASTILHO, M. S.; PESQUERO, N. C.; FOGUEL, M. V.; SANTOS, G. P.; FUGIVARA, C. S.; BENEDETTI, A.V.; YAMANAKA, H. Chapter title: Amperometric biosensor for diagnosis of disease. In: RINKEN, T. (Ed.). **State of the art in biosensors: Environmental and Medical Applications**. Rijeka: InTech, 2013, p. 253-285.
02. ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. Evaluation of the interactions of DNA with the textile dyes Disperse Orange 1 and Disperse Red 1 and their electrolysis products using an electrochemical biosensor. **Sensors and Actuators, B**, v. 178, p. 627-635, 2013.
03. ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. Spectrophotometric evaluation of the behavior of Disperse Red 1 dye in aqueous media and its interaction with calf thymus ds-DNA. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, p. 1469-1475, 2012.
04. ULIANA, C. V ; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. Electrochemical reduction of disperse orange 1 textile dye at a boron-doped diamond electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 42, p. 297-304, 2012.
05. GARBELLINI, G. S.; ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H. Detection of DNA nucleotides on pretreated boron doped diamond electrodes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1241-1245, 2011.
06. ULIANA, C. V.; TOGNOLLI, J. O.; YAMANAKA, H. Application of factorial design experiments to the development of a disposable amperometric DNA biosensor. **Electroanalysis**, v. 23, p. 2607-2615, 2011.
07. ULIANA, C. V.; YAMANAKA, H; GARBELLINI, G. S.; SALAZAR-BANDA, G.R. Determination of 5-aminosalicylic acid in pharmaceutical formulations by square wave voltammetry at pencil graphite electrodes. **Química Nova**, v. 33, p. 964-967, 2010.
08. FOGUEL, M. V.; ULIANA, C. V.; TOMAZ, P. R. U. ; MARQUES, P. R. B. O. ; YAMANAKA, H.; FERREIRA, A. A. P. Avaliação da limpeza de CDtrodo

- construídos a partir de CD de ouro gravável/fita adesiva de galvanoplastia. **Eclética Química**, v. 34, p. 59-66, 2009.
09. ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; TOGNOLLI, J. O.; YAMANAKA, H. Optimization of an amperometric biosensor for the detection of Hepatitis C virus using fractional factorial designs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, p. 782-787, 2008.
10. ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; YAMANAKA, H. Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e ácido 5-aminossalicílico. **Eclética Química**, v. 33, p. 57-62, 2008.
11. GARBELLINI, G. S.; ULIANA, C. V. Toxidez, degradação no meio-ambiente e métodos eletroanalíticos de detecção do pesticida carbaril. **Pesticidas (UFPR)**, v. 17, p. 29-36, 2007.

BOLSAS E ESTÁGIOS

- Bolsa de Doutorado concedida pela FAPESP (Processo 2008/08990-1)
- Estágio de cinco meses na Universidade da Flórida, Center for Research at the Bio/Nano Interface Department of Chemistry – Gainesville, EUA , sob supervisão do Prof. Dr. Charles R. Martin.
- Bolsa de Mestrado concedida pela CAPES e CNPq.
- Bolsa de Iniciação Científica concedida pela FAPESP (Processo 04/09535-5).

PRÊMIOS

2012: Menção honrosa na I Escola Internacional de Corantes.

2010: Menção honrosa no XXII Congresso de Iniciação Científica da UNESP.

2006: Honra ao mérito por contribuições à empresa júnior “Química Júnior Projetos e Consultorias”, Instituto de Química da Unesp de Araraquara.

2004: Trabalho premiado na área de química analítica da XXXIV Semana da Química – Instituto de Química da Unesp de Araraquara.

RESUMO

A molécula do DNA pode ser modificada por substâncias eletrofílicas, tanto de origem exógena quanto endógena. As lesões geradas podem ser mutagênicas e contribuir para o processo de carcinogênese. Assim, desvios significativos da estrutura da dupla hélice desempenham um papel importante no metabolismo do DNA. Um biossensor voltamétrico baseado na imobilização de DNA de fita dupla (dsDNA) sobre eletrodos descartáveis foi desenvolvido para aplicação nos estudos de interação entre corantes têxteis e a molécula do DNA, na ausência e na presença de flavonóides em solução. Os eletrodos modificados foram colocados em contato com soluções de corantes têxteis da classe dos dispersos, o Disperso Orange 1 (DO1) e o Disperso Red 1 (DR1), e seus produtos de eletrólise por oxidação e por redução. A variação dos sinais de oxidação das bases guanina e adenina presentes no dsDNA imobilizado, obtidos antes e após cada interação, foi utilizada como parâmetro de análise dos resultados. O tempo para que a interação DNA:corante ocorresse foi avaliado utilizando o biossensor e estabeleceu-se 180 s. A concentração dos corantes foi analisada na faixa de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, sendo que a variação do sinal voltamétrico das bases foi mais intensa para DR1 (sinais da guanina e adenina decresceram 48% e 51% do seu valor original, respectivamente), enquanto que na presença de DO1, as intensidades de corrente da guanina e adenina diminuíram 30% e 10% de seu valor original, respectivamente, quando comparada a mesma concentração dos corantes de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Além da diminuição da intensidade de corrente das bases guanina e adenina, o aparecimento de novos picos e deslocamentos do potencial de pico das bases foram observados após as interações com produtos de eletrólises. Estudos de interação também foram realizados por meio de espectrofotometria UV-Vis em fase aquosa e observaram-se diferentes efeitos de hipocromismo e hiperchromismo da banda referente ao DNA em solução após as interações. A análise dos resultados indicou que a

interação dos corantes com o DNA ocorre por intercalação dos compostos na fita dupla da biomolécula. Esta intercalação pode induzir mudanças estruturais no DNA, incluindo a abertura da dupla hélice e o alongamento da cadeia de DNA, conferindo aos corantes uma tendência em causar danos ao DNA. O biossensor foi aplicado também para a interação do DNA com o corante não-mutagênico Reativo Blue 15 (RB15) e os resultados indicaram que este corante não causa alterações significativas nos sinais eletroquímicos das bases. Os estudos de interação com os corantes DO1 e DR1 foram conduzidos na presença dos flavonóides miricetina e apigenina e observou-se que os flavonóides apresentaram uma possível capacidade de proteger as bases guanina e adenina de interação com os corantes, visto que o decaimento das intensidades de corrente foi menor. Nos estudos nos quais os flavonóides foram substituídos por soluções de chá verde ou chá de camomila, observou-se também uma capacidade protetora, uma vez que os chás impediram que as bases guanina e adenina sofressem algum tipo de interação ou dano por parte dos corantes DO1 e DR1. Os resultados mostraram que o biossensor desenvolvido, em combinação com a técnica de voltametria de onda quadrada, é adequado para se estudar a interação dos corantes têxteis com o DNA, indicando que estes podem causar danos à molécula de DNA e que tais danos podem ser minimizados por flavonóides e também por chás verde e de camomila, fontes naturais dos flavonóides miricetina e apigenina, respectivamente.

Palavras-chave: Biossensor eletroquímico. DNA. Corantes têxteis. Danos ao DNA. Flavonóides.

ABSTRACT

DNA molecule may be modified by electrophilic substances, either from endogenous or exogenous origin. Lesions generated may be mutagenic and contribute to the process of carcinogenesis. In this way, significant deviations on the double helix structure play an important role in the DNA metabolism. A biosensor based on double-stranded DNA (dsDNA) immobilization on disposable electrodes has been developed for application in interaction studies between textile dyes and DNA molecule in the absence and presence of flavonoids in solution. The modified electrodes were placed in solutions of disperse textile dyes, Disperse Orange 1 (DO1) and Disperse Red 1 (DR1), and their products of electrolyses by oxidation and reduction. The variation of the oxidation signals of guanine and adenine bases of the immobilized dsDNA, obtained before and after each interaction, was used as a parameter for analyzing the results. The time for DNA:dye interaction was evaluated using the biosensor and 180 s was established. The concentration of dyes was analyzed in the range from 1.0×10^{-8} to 1.0×10^{-4} mol L⁻¹, and the bases voltammetric signal variation was more intense for DR1 (signals of guanine and adenine decreased 48% and 51% of its original value, respectively), whereas in the presence of DO1, the current intensities of guanine and adenine decreased by 30% and 10% of its original value, respectively, when compared the same dyes concentration of 1.0×10^{-6} mol L⁻¹. Besides adenine and guanine current intensities decrease, the appearance of new peaks and peaks potential shifts were also observed after interactions with electrolysis products. Interaction studies were also performed by means of UV-Vis spectrophotometry in aqueous phase showed different effects of hypochromism and hiperchromism of DNA band after interactions. The results indicated that the interaction of dyes with DNA occurs by intercalation of the compounds into the DNA double helix. This intercalation can induce structural changes in DNA, including unwinding of the double helix

and lengthening of the DNA strand, which provides to the dyes a tendency to cause DNA damage. The biosensor was also applied for DNA interaction with the non-mutagenic dye Reactive Blue 15 (RB15) and the results indicated that this dye did not cause changes in the bases electrochemical signals. Studies of interaction with the dyes DO1 and DR1 conducted in the presence of flavonoids myricetin and apigenin showed that the flavonoids had a capacity to protect the bases adenine and guanine of the interaction with the dyes, since the current intensity decrease was lower. In studies where the flavonoids were replaced by solutions of green or chamomile teas, a protective capacity was also observed, since teas prevented guanine and adenine bases to suffer some kind of interaction or damage by the dyes DO1 and DR1. The results showed that the developed biosensor, in combination with the square wave voltammetry technique, is suitable for studying the interaction of textile dyes with DNA, indicating that these dyes can cause damage to the DNA molecule and such damage can be minimized by flavonoids and also green and chamomile teas, natural sources of the flavonoids myricetin and apigenin, respectively.

Keywords: Electrochemical biosensor. DNA. Textile dyes. DNA damage. Flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ligações de hidrogênio entre as bases complementares em um fragmento da molécula de DNA.	28
Figura 2: Estrutura do pareamento da 8-oxoGua na conformação anti com citosina (C) e na conformação sin com adenina (A). Fonte: Gallego, 2003 (Adaptada) ¹⁹	30
Figura 3: Alguns tipos de danos à molécula de DNA. Fonte: Fojta, 2005 (Adaptada) ²⁸	31
Figura 4: Estrutura química dos corantes Disperso Orange 1 (DO1) e Disperso Red 1 (DR1).	36
Figura 5: Núcleo fundamental dos flavonóides constituído pelos anéis A, B, C e posições de substituições.	39
Figura 6: Estrutura química dos flavonóides miricetina e kaempferol (flavonóis) e luteolina e apigenina (flavonas).	40
Figura 7: Esquema da célula eletroquímica montada em uma cubeta de quartzo para medidas de absorvância imediatamente após os estudos eletroquímicos.	57
Figura 8: Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização do dsDNA sobre PGE; potencial: aplicado ao PGE para ativação; tempo 1: tempo de aplicação do potencial de ativação; tempo 2: tempo de aplicação de +0,5 V para acumulação do dsDNA; dsDNA: concentração do DNA de <i>calf thymus</i>	64
Figura 9: Gráfico dos efeitos principais do planejamento fatorial completo 2 ⁴ para imobilização de dsDNA sobre PGE; potencial 1: aplicado ao PGE para ativação; tempo 1: tempo de aplicação do potencial de ativação; tempo 2: tempo de aplicação de +0,5 V para acumulação do dsDNA; dsDNA: concentração do DNA de <i>calf thymus</i>	65
Figura 10: Voltamogramas de onda quadrada em meio de solução tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0 utilizando PGE não-modificado (1) e PGE modificado com dsDNA (2). Condições voltamétricas: $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV e $\Delta E_s= 2$ mV.	66
Figura 11: Espectro UV-Vis da solução de dsDNA 0,5 mg mL ⁻¹ em água pura.	68
Figura 12: Variação da absorvância do dsDNA 0,05 mg mL ⁻¹ em 280 nm em diferentes valores de pH.	68
Figura 13: Variação da intensidade de corrente (■) e do potencial de pico (●) com o valor de pH para guanina (A) e adenina (B) do biossensor. Condições: solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0, $a= 50$ mV, $f= 100$ Hz, $\Delta E_s= 2$ mV.	69

- Figura 14: Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o biossensor em solução tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de fosfato-citrato (1); PBS (2); fosfato (3) e BR (4) como eletrólito de suporte. Condições voltamétricas: $a= 50 \text{ mV}$, $f= 100 \text{ Hz}$, $\Delta E_s= 2 \text{ mV}$ 71
- Figura 15: Variação da frequência de aplicação do pulso por voltametria de onda quadrada em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 utilizando o PGE modificado com dsDNA, sendo 10 (1); 50 (2); 100 (3); 150 (4); 200 (5); 250 (6) e 300 Hz (7); $a= 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s= 2 \text{ mV}$ 72
- Figura 16: Variação da amplitude do pulso por voltametria de onda quadrada em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 utilizando o PGE modificado com dsDNA, sendo 10 (1); 20 (2); 30 (3); 40 (4); 50 (5) e 60 mV (6); $f= 250 \text{ Hz}$, $\Delta E_s= 2 \text{ mV}$ 73
- Figura 17: Variação do incremento de potencial por voltametria de onda quadrada em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 utilizando o PGE modificado com dsDNA, sendo 2 (1); 4 (2); 6 (3) e 8 mV (4); $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$ 73
- Figura 18: Voltamograma de onda quadrada obtido em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 utilizando eletrodo modificado com dsDNA pela aplicação de +1,4 V por 300 s em solução tampão acetato pH 5,0 ao eletrodo limpo, seguido da imersão do eletrodo ativado na solução tampão acetato pH 5,0 contendo $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de dsDNA e aplicação de +0,5 V por 180 s. Condições voltamétricas otimizadas, sendo $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s= 4 \text{ mV}$; na qual G se refere ao pico de oxidação da guanina e A ao pico da adenina. 74
- Figura 19: Espectros UV-Vis da solução individual 5,0% de Fongranal[®] FB (1) e das soluções de DO1 (A) e DR1 (B) em concentração final $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ contendo o dispersante Fongranal[®] FB em porcentagens de 0,2% (2); 0,5% (3); 1,0% (4); 2,5% (5) e 5,0% (6), em água na solução estoque. 77
- Figura 20: Voltamogramas de onda quadrada obtidos após acumulação de DO1 (A) e DR1 (B) em concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ por 60 s na presença do dispersante Fongranal[®] FB sobre eletrodos PGE não-modificado. Condições voltamétricas: $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$, $\Delta E_s= 4 \text{ mV}$ 79
- Figura 21: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 após acumulação do dispersante Fongranal[®] FB 0,05 % por 60 s sobre PGE não-modificado. Condições voltamétricas: $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$, $\Delta E_s= 4 \text{ mV}$ 80
- Figura 22: Voltamogramas de onda quadrada obtidos após acumulação do DO1 e do DR1 $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ por 60 s, após solubilização em 50% de AcN sobre PGE não-modificado. Inserção: voltamogramas de onda quadrada sobre PGE não-modificado após acumulação

dos corantes, seguido de enxágue do eletrodo em acetonitrila. Condições voltamétricas: $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV, $\Delta E_s= 4$ mV.....	82
Figura 23: Voltamogramas de onda quadrada na direção anódica obtidos em solução $5,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ do corante DO1 (A) e DR1 (B) em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0 como eletrólito de suporte, sobre PGE não-modificado. Condições voltamétricas: $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV, $\Delta E_s= 2$ mV.....	84
Figura 24: Voltamogramas de onda quadrada na direção catódica obtidos em solução $5,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ do corante DO1 (A) e DR1 (B) em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0 como eletrólito de suporte, sobre PGE não-modificado. Condições voltamétricas: $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV, $\Delta E_s= 2$ mV.....	85
Figura 25: Espectros de absorção UV-Vis obtidos a cada 10 min de eletrólise a +1,0 V vs. Ag AgCl _(KCl_{sat}) do corante DO1 sobre PGE em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0. Inserção: linhas 1 e 2: antes e após 90 min de eletrólise, respectivamente.	86
Figura 26: Voltamogramas de onda quadrada na direção anódica obtidos em solução $5,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ do corante DO1 antes (1) e após 90 min de eletrólise a +1,0 V (2) em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0 como eletrólito de suporte, sobre PGE. Condições voltamétricas: $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV, $\Delta E_s= 2$ mV.....	87
Figura 27: Espectros de absorção UV-Vis obtidos a cada 10 min de eletrólise a +1,2 V vs. Ag AgCl _(KCl_{sat}) do corante DR1 sobre PGE em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0. Inserção: linhas 1 e 2: antes e após 180 min de eletrólise, respectivamente.	88
Figura 28: Voltamogramas de onda quadrada na direção anódica obtidos em solução $5,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ do corante DR1 antes (1) e após 180 min de eletrólise a +1,2 V (2) em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0, sobre PGE. Condições voltamétricas: $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV, $\Delta E_s= 2$ mV.....	88
Figura 29: Espectros de absorção UV-Vis obtidos antes a cada 10 min de eletrólise a -1,15 V vs. Ag AgCl _(KCl_{sat}) do corante DO1 sobre PGE em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0. Inserção: linhas 1 e 2: antes e após 120 min de eletrólise, respectivamente.	89
Figura 30: Voltamogramas de onda quadrada na direção catódica obtidos em solução $5,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ do corante DO1 antes (1) e após 120 min de eletrólise a -1,15 V (2) em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0 como eletrólito de suporte, sobre PGE. Condições voltamétricas: $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV, $\Delta E_s= 2$ mV.....	90

- Figura 31: Espectros de absorção UV-Vis obtidos a cada 10 min de eletrólise a -1,0 V vs. Ag|AgCl_(KCl_{sat}) do corante DR1 sobre PGE em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. Inserção: linhas 1 e 2: antes e após 120 min de eletrólise, respectivamente. 91
- Figura 32: Voltamogramas de onda quadrada na direção catódica obtidos em solução 5,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ do corante DR1 antes (1) e após 120 min de eletrólise a -1,0 V (2) em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, sobre PGE. Condições voltamétricas: $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV, $\Delta E_s= 2$ mV..... 91
- Figura 33: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 utilizando eletrodo não-modificado após imersão em solução dos flavonóides miricetina (A), kaempferol (B), luteolina (C) e apigenina (D), na concentração 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. Condições voltamétricas: $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV, $\Delta E_s= 4$ mV..... 97
- Figura 34: Estrutura dos possíveis produtos de oxidação dos flavonóides miricetina (A), kaempferol (B), luteolina (C) e apigenina (D). 98
- Figura 35: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR pH 7,0 com o biossensor antes (1) e após interação por 180 s com o corante DO1 (2) e DR1 (3), na concentração de 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹, seguido dos procedimentos de enxágue dos eletrodos, sendo G o pico de oxidação da guanina e A o pico da adenina. Condições voltamétricas: $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV, $\Delta E_s= 4$ mV..... 100
- Figura 36: Dependência da intensidade da corrente de pico normalizada de oxidação da guanina (-■-) e da adenina (-●-) em função do tempo de interação do corante DO1 (A) e DR1 (B) em concentração de 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. 101
- Figura 37: Dependência da corrente de pico normalizada de oxidação da guanina (-■-) e da adenina (-●-) em função de concentrações crescentes de DO1 (A) e DR1 (B), após o tempo de interação de 180 s no intervalo de concentração de 1,0 x 10⁻⁸ a 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. 103
- Figura 38: Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor antes (1) e após interação por 180 s com o produto da eletrólise por oxidação (2) e por redução (3) do corante DO1 (A) e DR1 (B) em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, sendo G o pico de oxidação da guanina e A o pico da adenina. Condições voltamétricas: $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV, $\Delta E_s= 4$ mV..... 106
- Figura 39: Espectros UV-Vis da solução de dsDNA 0,01 mg mL⁻¹ antes (1) e após interação (outros espectros) com corantes DO1 (A), DR1 (B), DO1_{ox} (C), DR1_{ox} (D), DO1_{red} (E) e DR1_{red} (F). Inserções: variação da absorbância do dsDNA em 260 nm em função do aumento do tempo de interação com corantes em sua forma original ou após eletrólises. A

absorbância de cada corante foi subtraída dos espectros da mistura DNA:corante ou DNA:produto de eletrólise.....	109
Figura 40: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0 com eletrodos modificados com dsDNA antes da interação (1), não-modificado após adsorção do corante RB15 (2) e modificado com dsDNA após interação por 180 s com o corante RB15 (3). Inserção: estrutura química do corante RB15. Condições voltamétricas: $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV, $\Delta E_s= 4$ mV.....	113
Figura 41: Variação da intensidade da corrente de pico normalizada das bases guanina (■) e adenina () após a interação com os flavonóides na concentração $5,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ por 180 s.....	114
Figura 42: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0 utilizando PGE não-modificado após imersão em solução dos chás verde (1) e de camomila (2). Condições voltamétricas: $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV, $\Delta E_s= 4$ mV.....	116
Figura 43: Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor antes da interação (1) e após interação por 180 s (2) com amostras de chá verde (A) e chá de camomila (B). Condições voltamétricas: $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV, $\Delta E_s= 4$ mV.....	117
Figura 44: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR 0,1 mol L ⁻¹ pH 7,0 com eletrodos modificados com dsDNA antes da interação (1), após interação por 180 s com DR1 $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ (2), após interação por 180 s com miricetina $5,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ (3) e após interação por 180 s com a mistura DR1 $1,0 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹ + miricetina $5,0 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹ (4). Condições voltamétricas: $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV, $\Delta E_s= 4$ mV.....	119
Figura 45: Comparação entre as intensidades de corrente normalizadas da guanina (A) e da adenina (B) antes e após interação com o DO1, seus produtos de eletrólise, flavonóides miricetina e apigenina e as misturas correspondentes. Siglas: DO1 _{ox} – corante após eletrólise por oxidação, DO1 _{red} – corante após eletrólise por redução, M – miricetina, A – apigenina.....	121
Figura 46: Comparação entre as intensidades de corrente normalizadas da guanina (A) e da adenina (B) antes e após interação com o DR1, seus produtos de eletrólise, flavonóides miricetina e apigenina e as misturas correspondentes. Siglas: DR1 _{ox} – corante após eletrólise por oxidação, DR1 _{red} – corante após eletrólise por redução, M – miricetina, A – apigenina.....	122

- Figura 47: Espectros de absorção UV-Vis obtidos em solução de miricetina $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (1), corante $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (2) e da mistura miricetina + corante nas concentrações $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente (3), sendo DO1 (A) e DR1 (B). . 125
- Figura 48: Espectros de absorção UV-Vis obtidos em solução de apigenina $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (1), corante $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (2) e da mistura apigenina + corante nas concentrações $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente (3), sendo DO1 (A) e DR1 (B). . 126
- Figura 49: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 com eletrodos modificados com dsDNA antes da interação (1), após interação por 180 s com DO1 $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (2), com chá de camomila diluído 200x (3) e com a mistura DO1 $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ + chá de camomila diluído 200x (4). Condições voltamétricas: $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$, $\Delta E_s= 4 \text{ mV}$ 127
- Figura 50: Comparação entre as intensidades de corrente normalizadas da guanina (A) e da adenina (B) antes e após interação com os corantes DO1 e DR1, chá verde e chá de camomila e as misturas correspondentes. Siglas: CV – chá verde, CC – chá de camomila. 129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Matriz de planejamento fatorial completo de quatro variáveis e dois níveis (2^4). ...	54
Tabela 2: Porcentagens de decaimento da corrente de pico de oxidação das bases guanina e adenina após a interação com os corantes DO1 e DR1 e seus produtos de eletrólises na ausência e na presença dos flavonóides miricetina e apigenina.	123
Tabela 3: Porcentagens de decaimento da corrente de pico de oxidação das bases guanina e adenina após a interação com os corantes DO1 e DR1 na ausência e na presença de chá verde e chá de camomila.	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a – Amplitude de potencial

A – Resíduo de adenina do dsDNA imobilizado

A' – Apigenina

CC – Chá de camomila

CV – Chá verde

ΔE_s – Incremento de potencial

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dsDNA – Double stranded DNA (DNA de fita dupla)

DO1 – Corante Disperso Orange 1

DO1_{ox} – Corante Disperso Orange 1 após eletrólise por oxidação

DO1_{red} – Corante Disperso Orange 1 após eletrólise por redução

DR1 – Corante Disperso Red 1

DR1_{ox} – Corante Disperso Red 1 após eletrólise por oxidação

DR1_{red} – Corante Disperso Red 1 após eletrólise por redução

f – Frequência de aplicação do pulso de potencial

G – Resíduo de guanina do dsDNA imobilizado

I_p – Corrente de pico de oxidação

K_b – Constante de ligação

M – Miricetina

PGE – Pencil graphite electrode (eletrodo de grafite de lapiseira)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	27
<i>1.1. A MOLÉCULA DO DNA: LESÃO E SUAS CONSEQUÊNCIAS</i>	<i>27</i>
<i>1.2. CORANTES TÊXTEIS.....</i>	<i>33</i>
<i>1.3. PROTEÇÃO AO DNA: O PAPEL DOS FLAVONÓIDES</i>	<i>38</i>
<i>1.4. BIOSSENSOR: O DNA IMOBILIZADO</i>	<i>42</i>
1.4.1. Biossensores para detecção de danos e proteção ao DNA	43
2. OBJETIVOS	49
3. PARTE EXPERIMENTAL	50
<i>3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES</i>	<i>50</i>
<i>3.2. INSTRUMENTAÇÃO.....</i>	<i>51</i>
<i>3.3. METODOLOGIA.....</i>	<i>52</i>
<i>3.3.1. PARTE 1: DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR.....</i>	<i>52</i>
3.3.1.1. Construção dos eletrodos de grafite de lapiseira (PGE).....	52
3.3.1.2. Imobilização do dsDNA sobre PGE.....	53
3.3.1.3. Otimização do sinal analítico de oxidação da guanina e adenina do dsDNA imobilizado sobre PGE.....	55
<i>3.3.2. PARTE 2: CORANTES E FLAVONÓIDES – PREPARO DE SOLUÇÕES E ESTUDOS SOBRE PGE.</i>	<i>56</i>
3.3.2.1. Estudo da solubilidade dos corantes DO1 e DR1 por espectrofotometria UV-Vis....	56
3.3.2.2. Eletrólises dos corantes DO1 e DR1 por oxidação e por redução.....	56
3.3.2.3. Efeito do solvente sobre a adsorção do corante na superfície do eletrodo não-modificado.....	58
3.3.2.4. Estudo da adsorção dos flavonóides sobre PGE.....	59
<i>3.3.3. PARTE 3: APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR NOS ESTUDOS DE INTERAÇÃO DO DNA COM CORANTES, COM PRODUTOS DE ELETRÓLISES, COM FLAVONÓIDES E COM CHÁS.....</i>	<i>59</i>
3.3.3.1. Variação do tempo de interação e da concentração dos corantes DO1 e DR1 utilizando o biossensor.....	59

3.3.3.2. Estudo da interação dos produtos de eletrólises por oxidação e por redução dos corantes DO1 e DR1 com dsDNA utilizando o biossensor.....	60
3.3.3.3. Avaliação da interação dos flavonóides miricetina, kaempferol, luteolina e apigenina e de chás com dsDNA utilizando o biossensor.....	61
3.3.4. <i>PARTE 4: APLICAÇÃO DO BIOSENSOR NOS ESTUDOS DE INTERAÇÃO DO DNA COM MISTURAS DE CORANTE E FLAVONOIDE OU CHÁ.</i>	62
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1. <i>PARTE 1: DESENVOLVIMENTO DO BIOSENSOR.</i>	63
4.1.1. Imobilização do dsDNA sobre PGE.....	63
4.1.2. Otimização do sinal analítico de oxidação da guanina e adenina do dsDNA imobilizado sobre PGE.....	67
4.1.2.1. Efeito da variação do valor de pH e eletrólito de suporte.	67
4.1.2.2. Variação dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.	71
4.2. <i>PARTE 2: CORANTES E FLAVONÓIDES – ESTUDO DO COMPORTAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO E/OU ELETROQUÍMICO INDIVIDUAL EM SOLUÇÃO.</i>	75
4.2.1. Estudo da solubilidade dos corantes DO1 e DR1 por espectrofotometria UV-Vis.....	75
4.2.2. Comportamento eletroquímico dos corantes DO1 e DR1 sobre PGE: efeito da adsorção sobre o eletrodo não-modificado.	78
4.2.2.1. Solubilização dos corantes DO1 e DR1 em dispersante Fongranal® FB.	78
4.2.2.2. Solubilização dos corantes DO1 e DR1 em acetonitrila.....	80
4.2.3. Comportamento eletroquímico dos corantes DO1 e DR1 sobre PGE: eletrólises por oxidação e por redução.	83
4.2.3.1. Oxidação monitorada por espectroeletroquímica.	86
4.2.3.2. Redução monitorada por espectroeletroquímica.	89
4.2.3.3. Considerações sobre o comportamento eletroquímico dos corantes.....	92
4.2.4. Comportamento eletroquímico dos flavonóides sobre PGE.....	96
4.3. <i>PARTE 3: APLICAÇÃO DO BIOSENSOR NOS ESTUDOS DE INTERAÇÃO DNA:CORANTES E DNA:FLAVONÓIDES.</i>	99
4.3.1. Variação do tempo de interação dos corantes DO1 e DR1 com dsDNA utilizando o biossensor.	99
4.3.2. Variação da concentração dos corantes DO1 e DR1 para interação com dsDNA utilizando o biossensor.	102

4.3.3. Estudo da interação dos produtos de eletrólises por oxidação e por redução dos corantes DO1 e DR1 com dsDNA utilizando o biossensor.	105
4.3.4. Estudo da interação dos corantes DO1 e DR1 e seus produtos de eletrólise com DNA em solução por espectrofotometria UV-Vis.	108
4.3.5. Teste de interação do dsDNA imobilizado com corante não-mutagênico.	112
4.3.6. Avaliação da interação dos flavonóides miricetina, kaempferol, luteolina e apigenina e de chás com DNA utilizando o biossensor.	113
<i>4.4. PARTE 4: APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR NOS ESTUDOS DE INTERAÇÃO DNA:CORANTES:FLAVONÓIDES.</i>	<i>118</i>
4.4.1. Interação do DNA com as misturas corante:flavonóide e produto de eletrólise dos corantes:flavonóide utilizando o biossensor.	118
4.4.2. Interação do DNA com a mistura corante:chá utilizando o biossensor.	127
5. CONCLUSÕES.....	130

1. INTRODUÇÃO

1.1. A MOLÉCULA DO DNA: LESÃO E SUAS CONSEQUÊNCIAS

Desde a descoberta de sua estrutura pelos pesquisadores James Watson e Francis Crick [1], em 1953, a molécula do DNA tem sido alvo de intensos estudos nas mais variadas áreas, como por exemplo, projeto genoma [2], análises forenses [3,4] e desenvolvimento de terapias gênicas [5,6]. O ácido desoxirribonucleico (DNA – *deoxyribonucleic acid*) é o componente cromossômico responsável pela armazenagem e transmissão da informação genética, com a qual é possível construir uma célula ou todo um organismo multicelular.

A cadeia principal do DNA é composta por fosfato e resíduos de açúcar 2-desoxirribose, dispostos alternadamente. Os açúcares são unidos por grupos fosfato que formam ligações fosfodiéster entre o terceiro e quinto átomos de carbono dos anéis de açúcar adjacentes. Ao açúcar é ligada uma das quatro bases nitrogenadas, que são classificadas em dois tipos; a adenina (A) e guanina (G) que são compostos heterocíclicos denominados purinas, enquanto que a citosina (C) e timina (T) são pirimidinas.

Watson e Crick apresentaram um modelo para explicar a estrutura do DNA. Esse modelo estrutural é conhecido como dupla hélice, que consiste de duas fitas helicoidais de DNA (dsDNA – *double stranded DNA*). As bases nitrogenadas purinas e pirimidinas de fitas complementares emparelham-se na parte interna da dupla hélice por formação de ligações de hidrogênio (Figura 1). O pareamento é feito entre uma guanina e uma citosina (GC) e entre adenina e timina (AT) [1]. A cadeia de fosfato confere uma carga líquida negativa ao DNA, uma propriedade importante para a análise eletroforética.

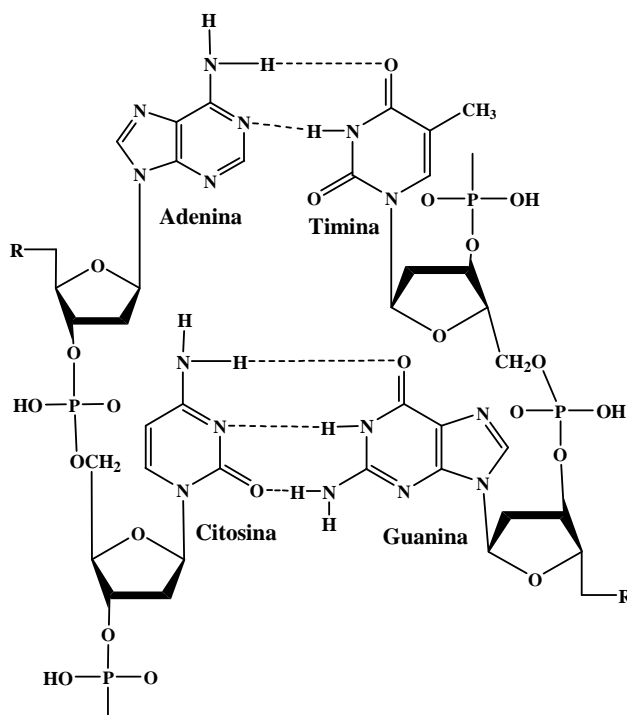


Figura 1: Ligações de hidrogênio entre as bases complementares em um fragmento da molécula de DNA.

Uma característica do DNA é a sua capacidade de ser desnaturado e renaturado. Ao elevar a temperatura ou usar desnaturantes químicos, é possível romper as ligações de hidrogênio entre as bases. O processo é reversível se as condições forem favoráveis e a formação da dupla fita ocorre de forma eficiente apenas quando as sequências de pares de bases são complementares. A associação de sequências complementares de fita simples é também chamada de hibridização ou hibridação de DNA [7]. A estabilidade da dupla hélice do DNA em relação à separação das fitas depende da composição das bases. Essa estabilidade fornece uma relação linear entre o conteúdo GC do DNA e sua temperatura de fusão (temperatura na qual metade das fitas de DNA está na forma de fitas simples e a outra metade na forma de dupla hélice), ocasionada pelo maior número de ligações de hidrogênio [8].

Sabe-se que o DNA, juntamente com outros componentes celulares, pode ser modificado por substâncias eletrofílicas, tanto de origem exógena quanto endógena. As lesões

geradas podem ser mutagênicas e contribuir para o processo de carcinogênese. Assim, desvios significativos da estrutura da dupla hélice desempenham um papel importante no metabolismo do DNA. Algumas dessas lesões podem ser causadas por intermediários ou subprodutos do metabolismo celular, enquanto outros são induzidos por agentes genotóxicos que ocorrem no ambiente.

Em relação às fontes endógenas, embora não em todos os casos, danos ao DNA podem ser induzidos por espécies reativas de oxigênio (ROS – *reactive oxygen species*) e espécies reativas de nitrogênio (RNS – *reactive nitrogen species*). Estas espécies podem ser classificadas em radicais e não-*radicais* [9], sendo que as espécies radicais podem ser definidas como moléculas ou fragmentos moleculares com pelo menos um elétron não emparelhado, conferindo determinadas características e propriedades, tais como paramagnetismo e alta reatividade química [10]. ROS e RNS radicais incluem ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}), radical óxido nítrico (NO^{\bullet}), radical peroxila (ROO^{\bullet}), radical alcóxila (RO^{\bullet}) e ânion peroxinitrito ($ONOO^-$) [11,12], entre outros. O grupo de compostos não-*radicais* contém uma grande variedade de substâncias, algumas das quais são extremamente reativas. Entre estes compostos produzidos em altas concentrações em célula viva estão o ácido hipocloroso (HClO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peróxidos orgânicos, aldeídos, ozônio (O_3) e oxigênio (O_2) [9,13,14]. Intracelularmente, ROS são criadas como um subproduto natural do metabolismo oxidativo e inclui o metabolismo do citocromo P450, a ativação de células inflamatórias e também como subprodutos da respiração mitocondrial (1-5% do O_2 consumido), sendo esta em geral, aceita como a principal fonte de lesão oxidativa em organismos aeróbios [15,16].

O ataque dos radicais livres ao DNA gera uma série de danos à biomolécula, entre eles a modificação das bases de DNA. Algumas destas bases modificadas têm considerável capacidade de danificar a integridade do genoma. Por exemplo, lesões causadas pelo radical

hidroxila podem levar à formação de um grande número de derivados das pirimidinas e purinas. Entre estes, a 8-Oxo-7,8-dihidroguanina (8-oxoGua) é um dos derivados mais amplamente estudados e é formado pela oxidação de guanina. A 8-oxoGua é capaz de emparelhar com uma citosina (na conformação anti) ou com uma adenina (na conformação sin), como observado na Figura 2, gerando transversões GC → TA. A menos que seja reparado antes da replicação do DNA, a 8-oxoGua pode ser facilmente incorporada ao DNA, levando a mutações pontuais [17-19].

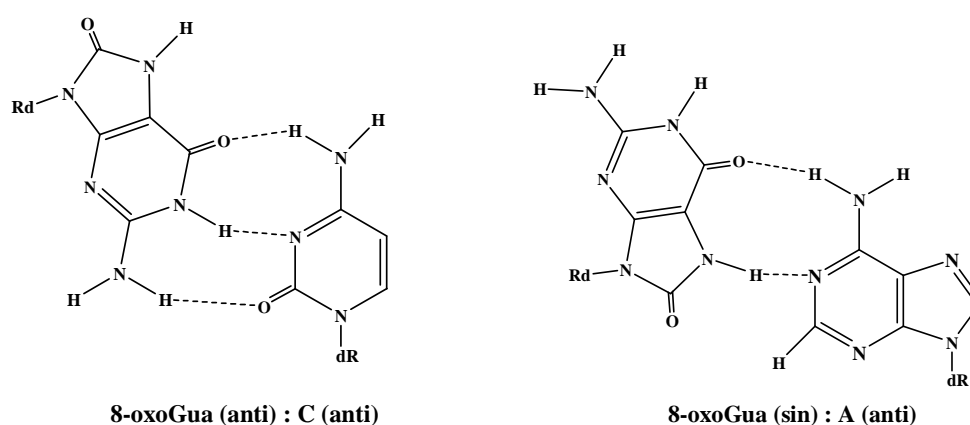


Figura 2: Estrutura do pareamento da 8-oxoGua na conformação anti com citosina (C) e na conformação sin com adenina (A). Fonte: Gallego, 2003 (Adaptada)¹⁹.

Como fontes exógenas, a radiação ionizante, agentes alquilantes, produtos químicos e poluentes são importantes geradores de ROS em sistemas biológicos. Podem ser citados os metais de transição, quinonas, corantes, pesticidas, compostos nitro-aromáticos, entre outros [20,21]. Interações do ácido nucleico com substâncias químicas e também com a radiação podem resultar em diversos tipos de danos ao DNA [22-24]. Esses danos incluem quebra da cadeia de açúcar-fosfato da biomolécula [25,26], interações não-covalentes reversíveis, como intercalação nos sulcos da cadeia e interações eletrostáticas [27,28]. A Figura 3 apresenta algumas lesões provenientes de interrupção das ligações fosfodiéster na cadeia de açúcar-

fosfato do DNA ou a partir da hidrólise das ligações N-glicosídicas que ligam os nucleotídeos com os resíduos de açúcar e pela intercalação de moléculas na fita dupla.

Apesar de quebras de fita dupla estarem entre as formas mais prejudiciais de lesões ao DNA, a maior diversidade de danos ocorre no nível das bases [29]. Adenina, citosina, guanina e timina podem ser modificadas devido à oxidação [30,31], desaminação [32,33], alquilação [33,34] ou pela formação de adutos [35,36]. Por exemplo, dímeros de pirimidina podem surgir de radiação ultravioleta (UV) da luz solar [37]. Diferentes adutos podem ser formados devido à interação do DNA com compostos cancerígenos metabolicamente ativos, como aminas aromáticas ou hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [38-40]. A persistência do dano ao DNA pode resultar em alterações da informação genética (substituições de base, mutações) ou dificultar os processos vitais tais como a replicação do DNA ou a transcrição, que podem posteriormente ter graves impactos sobre as funções celulares e vida dos organismos [41].

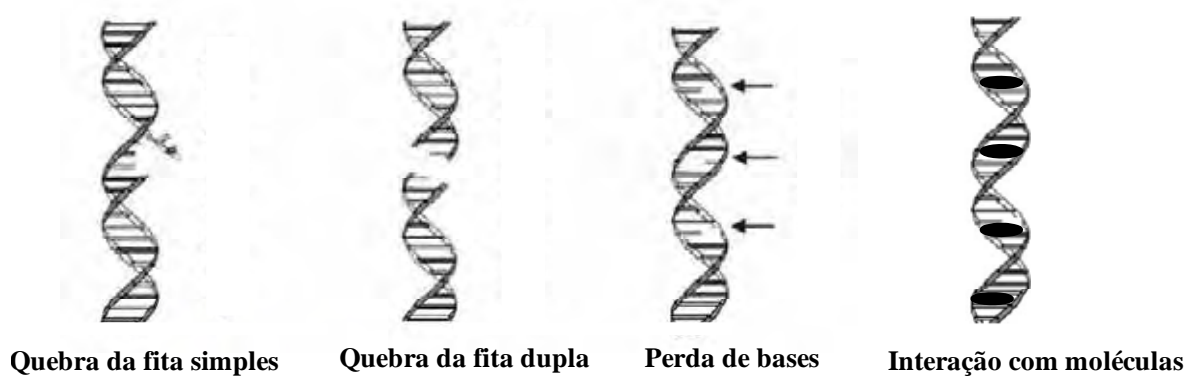


Figura 3: Alguns tipos de danos à molécula de DNA. Fonte: Fojta, 2005 (Adaptada)²⁸.

É importante notar que o dano químico ao DNA em si não é um evento mutagênico. É necessário que ocorra a replicação do DNA e subsequente divisão celular para converter o dano em uma mudança hereditária no DNA, chamada de mutação. Assim, a proliferação é um fator vital na formação de mutações e na expansão de clones de células que possuem tais mutações [42]. Dependendo do tipo de mutação, o comportamento das células pode ser

alterado, levando a um crescimento não regulado que, potencialmente, se transforma em câncer. Até agora, foram identificados mais de 350 genes mutantes relacionados ao desenvolvimento de câncer [43]. Além disso, danos persistentes ao genoma, devido sua reparação defeituosa ou ineficiente, podem estar relacionados a doenças neurológicas, incluindo o Mal de Alzheimer, o Mal de Parkinson, a doença de Huntington, a esclerose lateral amiotrófica e também o envelhecimento [44].

Com a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais, o organismo possui diferentes mecanismos de ação classificados como enzimáticos (por exemplo, superóxido dismutase, glutathione peroxidase e catalase) e não-enzimáticos (como ácido ascórbico, tocoferol, glutathione e carotenóides). Esse sistema de defesa age impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicaais, impedindo a ação dessas ou favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas que sofreram a lesão [45]. As pessoas são continuamente expostas a diferentes fontes exógenas que apresentam propriedades mutagênicas ou carcinogênicas. Essa exposição pode ocorrer quando tais agentes estão presentes em alimentos, ar ou água e, tem-se estimado que, como citado, possa contribuir significativamente no desenvolvimento de diferentes tipos de câncer. Por exemplo, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO) [46], o uso de tabaco é o maior fator de risco evitável de mortalidade por câncer, responsável por 22% das mortes por câncer por ano no mundo, enquanto que a poluição ambiental do ar, água e solo com produtos químicos cancerígenos é responsável por 1-4% de todos os cânceres.

Dentre inúmeras substâncias químicas de origem industrial presentes no meio ambiente, os corantes têxteis surgem como uma importante classe de compostos que merece atenção. Devido à produção em grande escala e aplicação extensiva, os corantes sintéticos têm se tornado motivo de preocupação pública e um sério desafio para cientistas e ambientalistas.

1.2. CORANTES TÊXTEIS

Corantes sintéticos são usados extensivamente pela indústria têxtil e de curtimento de couro, alimentícia, gráfica, fotográfica, como aditivos em derivados de petróleo, na produção de papel e de produtos agrícolas. Especificamente, os corantes têxteis apresentam considerável diversidade estrutural, podendo ser classificados de acordo com o grupo cromóforo, tais como azo, antraquinona, indigóide, trifenilmetil, entre outros, ou conforme o método pelo qual é fixado à fibra têxtil, sendo classificados como diretos, básicos, ácidos, reativos, dispersos, etc. [47,48].

Poucas são as informações exatas referentes à produção e utilização de corantes têxteis. Estima-se que 700.000 a 850.000 toneladas de corantes são produzidas no mundo por ano, sendo que 26.500 toneladas são consumidas no Brasil [47]. O grupo mais representativo e largamente empregado pertence à família dos azocorantes, que se caracterizam por apresentarem um ou mais grupamentos azo ($-N=N-$) ligados a sistemas aromáticos. Os azocorantes representam cerca de 60 % dos corantes atualmente utilizados no mundo, sendo amplamente utilizados no tingimento de fibras têxteis [49].

A principal via pela qual os corantes entram no meio ambiente é por meio de águas residuais. De 2 a 50% dos corantes têxteis, dependendo da classe, são descartados em efluentes devido a perdas ocorridas durante o processo de fixação da tintura às fibras [50-52]. Alguns corantes são visíveis em água em concentrações tão baixas como $0,005 \text{ mg L}^{-1}$, mas águas residuais provenientes de processamento têxtil apresentam geralmente um teor de corante no intervalo de 10 a 200 mg L^{-1} , caracterizando, portanto, os efluentes das indústrias têxteis como altamente coloridos [52]. Uma vez que os corantes são desenvolvidos para ser quimicamente e fotoliticamente estáveis, eles são persistentes em ambientes naturais, o que torna esses compostos potenciais causadores de impacto ambiental e de riscos à saúde

humana. Além disso, as tecnologias de tratamento de águas residuais tradicionais têm se mostrado ineficazes na remoção dos corantes têxteis e sua descarga em um rio utilizado no abastecimento de água pode ser impactante na qualidade da água potável [53,54].

Neste sentido, estudos têm demonstrado que águas residuais provenientes das indústrias têxteis podem conter substâncias mutagênicas ou carcinogênicas [55-57]. Diferentes tipos de testes são empregados para avaliar a mutagenicidade e carcinogenicidade de compostos [58], tais como o teste de micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo* [59], ensaio de mutação em linfoma em ratos [60], estudos de aberrações cromossômicas [61]. Entre eles, destaca-se o teste de Ames, que consiste em avaliar a atividade mutagênica de compostos químicos, utilizando linhagens de bactérias *Salmonella thiphimurium* com mutações no operon histidina (his-), que as impossibilitam de crescerem em um meio sem histidina. A avaliação da mutagenicidade pelo teste de Ames baseia-se na quantidade de colônias de bactérias (revertentes) que cresceram em placa de ágar deficiente em histidina, devido a uma reversão genética, 48 horas após a inoculação juntamente com o composto a ser analisado [62]. Um teste comumente utilizado é o ensaio cometa. É uma técnica rápida e eficiente usada para quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas de mamíferos. As células, encapsuladas em gel e espalhadas sobre uma lâmina, são submetidas a uma corrente elétrica proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo redondo são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos e ainda estar associados ao núcleo por uma cadeia simples [63,64].

Jäger e col. [60] utilizaram o teste de Ames com *Salmonella typhmuri* na avaliação do efeito mutagênico de 53 corantes têxteis. Os resultados indicaram que 15 dentre os 53 corantes foram positivos no teste de Ames, sendo estes estudados também por meio de testes em linfomas de ratos. Destes corantes, 67% apresentaram respostas positivas em ambos os testes.

Um estudo realizado por Masuda e col. [65] demonstrou através de ensaios cometa e teste de micronúcleo (*in vivo*) a genotoxicidade de PBTA-6, um composto derivado do corante Disperso Blue 75, em peixes dourados. Os resultados mostraram que houve indução da fragmentação do DNA em eritrócitos periféricos 6 horas após a injeção de PBTA-6.

Lima e col. [54] identificaram o efluente de uma fábrica de processamento de corantes têxteis da classe dos azocorantes como uma fonte de atividade mutagênica no Rio Cristais, uma fonte de água potável no Brasil. O estudo avaliou, por ensaio *Salmonella*/microsomo com as linhagens TA98 e YG1041 e por pesquisa de focos de cripta aberrante em ratos Wistar, o potencial mutagênico e carcinogênico dos corantes aminoazobenzenos CI Disperso Blue 373, CI Disperso Violet 93, CI Disperso Orange 37 e a benzidina, presentes no efluente. Em outro trabalho, Tsuboy e col. [66] analisaram os efeitos mutagênicos, citotóxicos e genotóxicos do corante azo Disperso Blue 291 e os resultados mostraram claramente que o corante azo apresenta efeitos dependentes da concentração, incluindo a formação de micronúcleos (MNs), fragmentação do DNA e aumento do índice apoptótico de células de hepatoma humano (HepG2).

Dentre os diferentes tipos de corantes têxteis, os corantes dispersos constituem uma classe de corantes pouco solúveis em água. São compostos aromáticos não iônicos que, em sua maioria contém grupos azo como cromóforo e são aplicados em fibras sintéticas, tais como, acetato celulose, nylon, poliéster, poliacrilonitrila e outras fibras hidrofóbicas por meio de suspensão [48]. Usualmente o processo de tintura ocorre na presença de agentes

dispersantes com longas cadeias que normalmente estabilizam a suspensão do corante, facilitando o contato entre o corante e a fibra hidrofóbica. Incluem-se na classe dos dispersos os corantes Disperso Orange 1 (DO1) e Disperso Red 1 (DR1), cujas estruturas são mostradas na Figura 4. Ambos apresentam como cromóforo o grupo azo.

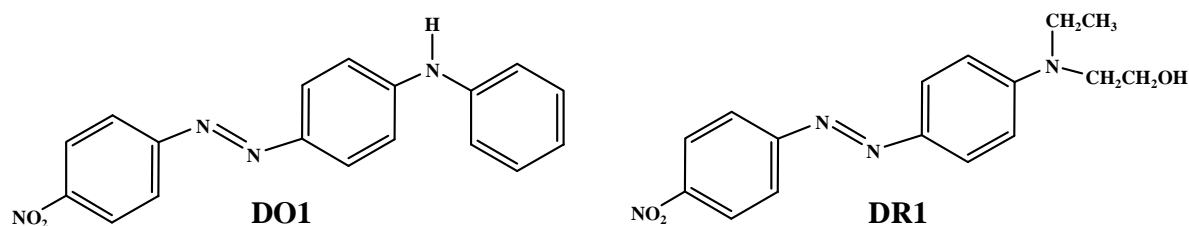


Figura 4: Estrutura química dos corantes Disperso Orange 1 (DO1) e Disperso Red 1 (DR1).

Tanto o DO1 quanto o DR1 têm apresentado resultados positivos de toxicidade utilizando diferentes parâmetros [67-72]. Por exemplo, Osugi e col. [67] avaliaram a potencialidade mutagênica dos corantes DO1 e DR1 utilizando *Salmonella*/microsossoma da linhagem TA98, na presença e na ausência de ativação metabólica por meio da fração S9 (fração obtida a partir de um órgão, geralmente fígado, que contém isoformas do citocromo P450 e outras enzimas). Os resultados indicaram que o corante DR1 é mais mutagênico (4 revertentes/g) em comparação com o DO1 (0,2 revertentes /g). Adicionalmente, Oliveira et al. [69] observaram que após a cloração, um tratamento complementar para remover ou reduzir a cor de efluentes industriais, tanto DO1 como DR1 permaneceram genotóxicos, embora com um menor índice de dano. O ensaio utilizando *Salmonella* mostrou que a cloração reduziu a mutagenicidade dos corantes em linhagens YG1041, mas aumentou a atividade mutagênica em linhagens TA98, na presença ou na ausência de S9. Além disso, de acordo com Chequer e col. [68], os corantes Disperso Orange 1 e Disperso Red 1 aumentaram a frequência de micronúcleos de linfócitos humanos e em células HepG2, de uma forma dependente da concentração.

Um agravante problema concernente aos corantes azo é a sua ativação metabólica [73]. A exposição humana a esses corantes ocorre principalmente através da ingestão de água contaminada, da absorção dérmica devido ao uso de roupas e calçados tingidos, ou pela inalação de origem ocupacional [74]. Em mamífero, a redução de tais corantes ocorre principalmente devido à atividade bacteriana na parte inferior do trato gastrointestinal. Esta parte do organismo é colonizada por inúmeras espécies de bactérias [75]. A primeira etapa da redução envolve a clivagem das ligações azo por enzimas azorredutases, resultando na formação de aminas aromáticas, geralmente incolores, mas potencialmente mais perigosas, que são absorvidas pelo intestino e excretadas na urina. A toxicidade de aminas aromáticas está relacionada à carcinogênese, especialmente o câncer de bexiga. O mecanismo para o desenvolvimento do câncer, provavelmente, inclui a formação de aminas acilóxi (possui o grupo acilo ligado ao oxigênio: $R-C=O-O-R'$), por meio de N-hidroxilação e N-acetilação das aminas aromáticas, seguido por O-acilação. Estas aminas acilóxi podem ser convertidas em íons carbônio e nitrênio, que se ligam ao DNA e RNA, induzindo a mutações e formação de tumores [76].

Diante das informações, é possível inferir que as células do corpo humano são continuamente atacadas por diferentes espécies, geradas como subprodutos naturais da produção de energia celular ou a partir do metabolismo de xenobióticos, entre eles os corantes azo. Para manter o genoma intacto, o organismo possui uma complexa rede de mecanismos de reparo e proteção ao DNA, como por exemplo, a reparação de ligações cruzadas entre cadeias, a defesa contra a oxidação por eliminar as espécies reativas de oxigênio, entre outros [77]. Neste sentido, a introdução de uma dieta com potenciais benefícios para a saúde humana pode ter um importante papel nesta defesa. Nos últimos anos os flavonóides e outros compostos fenólicos têm recebido atenção devido ao seu potencial para evitar o desenvolvimento de

diversas doenças crônicas e degenerativas, incluindo câncer e doenças cardiovasculares [78,79].

1.3. PROTEÇÃO AO DNA: O PAPEL DOS FLAVONÓIDES

Os flavonóides são substâncias fenólicas isoladas de uma série de plantas vasculares, com aproximadamente 8000 compostos individuais conhecidos. Pertencem ao mais comum e amplamente distribuído grupo de compostos fenólicos de plantas, principalmente na forma glicosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcares, sendo normalmente o-glicosídeos. As moléculas desprovidas de açúcares são denominadas agliconas. Os flavonóides ocorrem praticamente em todas as partes da planta, particularmente nas células que participam da fotossíntese [80], embora, até o momento, não haja clara evidência do envolvimento direto destes compostos na fotossíntese [81]. Por outro lado, o papel dos flavonóides na regulação do gene e do metabolismo de crescimento é conhecido, atuando também nas plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atrativos visuais e também como repelentes. Além de sua relevância em plantas, fazem parte da alimentação humana e animal e, sendo fitoquímicos, os flavonóides não são sintetizados por seres humanos e animais.

Os flavonóides são compostos de baixo peso molecular com uma estrutura base C6-C3-C6 (dois anéis fenil - A e B - ligados por meio de um anel pirano - C), conforme Figura 5.

Dependendo da substituição e do nível de oxidação do carbono 3 do anel C, os flavonóides podem ser divididos em 14 classes, entre elas, flavonóis, flavonas, antocianidinas, isoflavonóides e flavononas [82].

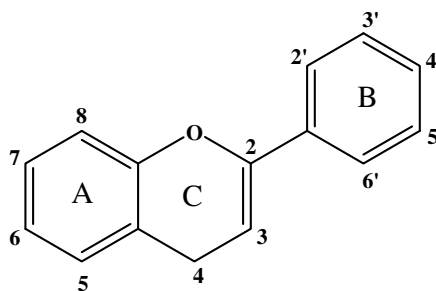


Figura 5: Núcleo fundamental dos flavonóides constituído pelos anéis A, B, C e posições de substituições.

Os flavonóides estão presentes em alimentos e bebidas de origem vegetal, tais como frutas, legumes, chá e vinho. As principais fontes brasileiras de flavonóides incluem as frutas como acerola, maçã, pitanga; hortaliças como alface, couve, cebola, rúcula; e os chás, entre eles chá preto, chá verde e camomila [83,84]. Dentro dos subgrupos dos flavonóis e das flavonas, a quercetina é o composto que ocorre mais frequentemente em alimentos. Também são comuns o a miricetina, kaempferol, a luteolina e a apigenina [78] cujas suas estruturas são mostradas na Figura 6. A diferença entre flavonóis e flavonas é que as flavonas não possuem um grupamento hidroxila no C3.

Há vários desafios associados com a determinação da quantidade ingerida de flavonóides na dieta humana. A formação dos flavonóides nas plantas é influenciada por inúmeros fatores, incluindo luz, genética vegetal, condições ambientais, germinação, grau de maturação bem como variedade de espécies [78]. Outro fator é que, embora sejam estáveis ao calor, podem perder suas propriedades ao cozinhar e fritar os alimentos. Levando tais questões em consideração, estima-se que a ingestão de flavonóides varie de 100 a 1000 mg / dia [80]. No Brasil, no entanto, o consumo de flavonóides pela população com idade entre 17-88 anos é, em média, 79 mg / dia para mulheres e 86 mg / dia para homens [85].

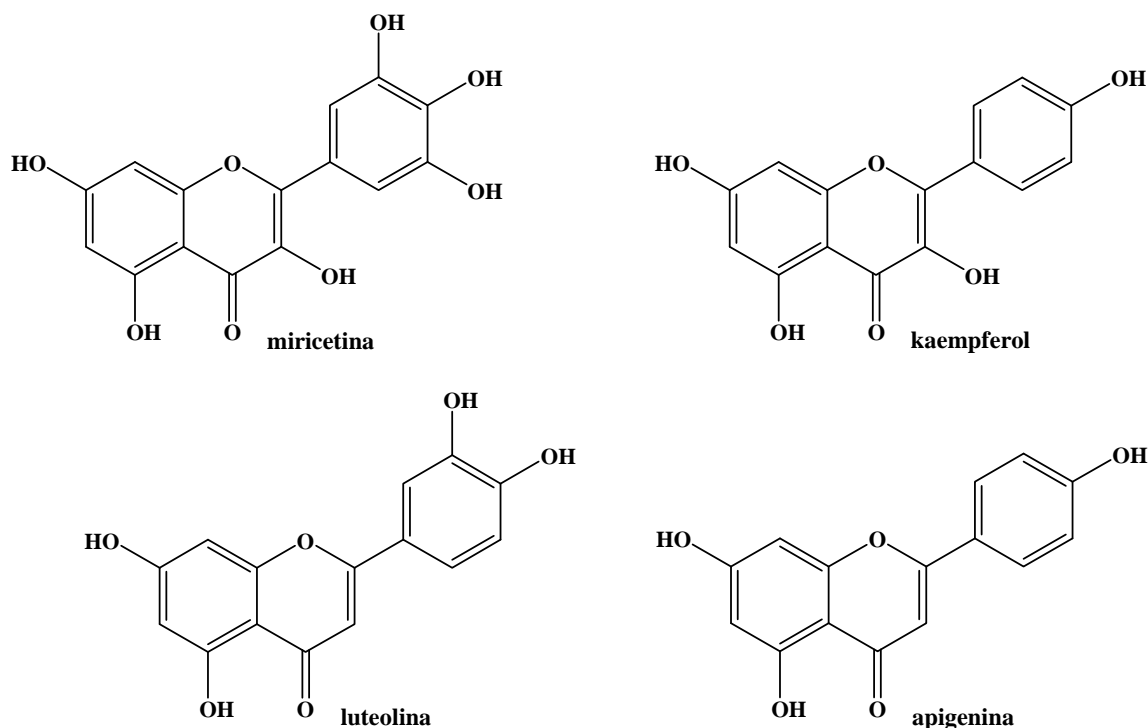


Figura 6: Estrutura química dos flavonóides miricetina e kaempferol (flavonóis) e luteolina e apigenina (flavonas).

Os mecanismos precisos pelos quais os flavonóides exercem seus efeitos benéficos à saúde ainda não estão totalmente elucidados. Estudos têm relatado que alguns flavonóides possuem uma variedade de atividades biológicas, incluindo atuação como antialérgicos, anti-inflamatórios, antivirais, antidiabéticos, antiestrogênicos, entre outras [80,86]. Podem agir como antioxidante por sequestrar os radicais livres envolvidos nos processos oxidativos por meio de hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes [80,87]. Essa capacidade pode estar relacionada com a facilidade com que um átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila ser doado a um radical livre e com a capacidade de um composto aromático para suportar um elétron desemparelhado, como resultado de deslocalização. Além da capacidade antioxidante, alguns flavonóides podem quelar os metais de transição responsáveis pela geração de espécies reativas de oxigênio [78,87], protegendo assim o DNA de danos oxidativos. Podem inibir a

carcinogênese, afetando os eventos moleculares na iniciação, promoção e estágios de evolução, o mecanismo pelo qual os flavonóides podem exercer seus efeitos *in vivo* é por meio da inibição de enzimas de fase I, por exemplo, citocromo P450, evitando a ativação metabólica de xenobióticos que levaria a formação de intermediários reativos que provocam carcinogênese [88]. Podem também interferir em outras etapas, como induzir a apoptose (morte programada) de células malignas e induzir a ação de enzimas pelas quais compostos carcinogênicos são detoxificados e, portanto, mais prontamente eliminados do organismo [88].

Embora os flavonóides exerçam uma grande variedade de efeitos benéficos, a ingestão de tais compostos deve ser conduzida com cautela. Estudos têm demonstrado que as atividades biológicas de alguns flavonóides podem desempenhar um papel duplo na mutagênese e carcinogênese. Eles podem agir como antimutagênicos / pró-mutagênicos e antioxidantes / pró-oxidantes, dependendo dos níveis consumidos, bem como das condições fisiológicas no corpo [89]. Por exemplo, flavonóides com substituinte –OH no anel B, como apigenina e naringenina, aumentaram a formação de espécies oxidantes reativas em 30-50 vezes, quando incubados na presença de glutathione e enzimas como peroxidases, podendo gerar um aumento da peroxidação lipídica e atuar como pró-oxidantes em concentrações nas quais outros flavonóides ainda apresentavam atividade antioxidante [90].

A avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante de diferentes substâncias (flavonóides e outros compostos fenólicos, extratos de plantas, entre outras) têm sido realizada por métodos cromatográficos [91,92], espectroscopia de infravermelho [93], métodos espectrofotométricos e fluorimétricos [94,95], quimiluminescência [96], ensaios FRAP (poder antioxidante pela redução do ferro) [97,98], ensaios TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao trolox) [98,99] e também utilizando eletrodos modificados com enzimas [100-102], citocromo c [103] e nanotubos de carbono [104].

Uma alternativa viável para avaliar tanto as lesões causadas ao DNA com a capacidade antioxidante de diferentes compostos é o uso de biossensores. Tais biossensores são altamente sensíveis, de baixo custo, fáceis de usar e compatíveis com tecnologias de microfabricação [105]. Métodos eletroquímicos são muito promissores para estudos de lesões no DNA [106-110]. Em particular, biossensores a base de DNA, também chamados de genossensores [111-113], têm sido excelentes ferramentas para se investigar o efeito de fontes endógenas e exógenas no material genético, permitindo uma determinação rápida e de baixo custo da lesão [114] e proteção [115] ao DNA.

1.4. BIOSENSOR: O DNA IMOBILIZADO

Os biossensores são definidos como um sensor que utiliza um material biológico, como por exemplo, enzimas, DNA, anticorpos, antígenos, microrganismos, tecido animal e vegetal, células, organelas, etc, imobilizado junto a um transdutor adequado o qual converte um sinal biológico em sinal mensurável [116]. São classificados de acordo com o mecanismo de reconhecimento do analito, podendo ser eletroquímicos, ópticos, térmicos ou piezelétricos. Os biossensores eletroquímicos podem, ainda, ser classificados como potenciométrico, voltamétrico/amperométrico, condutométrico e impedimétrico, dependendo do sinal utilizado para monitorar a concentração do analito [117].

A molécula de DNA apresenta características estruturais que permitem sua imobilização nas superfícies de eletrodos na forma de fita simples (ssDNA) ou fita dupla (dsDNA) [118,119], constituindo os genossensores eletroquímicos. Diversos materiais eletródicos podem ser modificados com DNA, entre eles, ouro [120], grafite [121], pasta de carbono [122], diamante dopado com boro (DDB) [123], etc. Muitas são as formas de imobilização de ácidos nucleicos sobre eletrodos, entre elas, por ligação covalente, afinidade,

monocamadas auto-organizadas, adsorção física e adsorção eletroquímica. Os genossensores são uma alternativa para a determinação de diferentes analitos em diversas amostras, e como citado anteriormente, são também uma interessante ferramenta para avaliação de danos e proteção à biomolécula devido a suas características eletroquímicas.

1.4.1. Biossensores para detecção de danos e proteção ao DNA

As alterações na estrutura química do DNA, que levam a mutações genéticas e carcinogênese, podem ser detectadas por mudanças na eletroatividade dos ácidos nucleicos [22]. Esses danos podem levar a mudanças na conformação da molécula, causando a exposição dos seus sítios eletroativos e, conseqüentemente, alterações nos sinais eletroquímicos medidos. A guanina e a adenina são mais frequentemente analisadas devido à maior facilidade de detecção do sinal. Uma vez que DNA naturais contêm muitos resíduos de guanina, uma diminuição do sinal da guanina é normalmente observada, dependendo da extensão dos danos ao DNA [114]. A diminuição dos sinais da guanina, por exemplo, pode ser causada também pela liberação da base das cadeias polinucleotídicas, geralmente devido a modificações no anel imidazol [28]. As técnicas eletroanalíticas, como amperométricas e as voltamétricas de pulso diferencial (DPV – *differential pulse voltammetry*), de onda quadrada (SWV – *square wave voltammetry*) e cíclica (CV – *cyclic voltammetry*) são comumente empregadas.

Diversos trabalhos utilizam DNA imobilizado na superfície de eletrodos com o intuito de detectar lesões ao ácido nucleico e/ou interações com moléculas de baixo peso molecular [28], tais como pesticidas [110], nicotina [124], quinazolinas [125,126], bisfenol [127], nitro-derivados [128], entre outros [129-132].

O uso de eletrodos descartáveis na construção de biossensores de DNA é vantajoso pois apresentam baixo custo de construção, boa reprodutibilidade da área de diferentes sensores e a possibilidade de produção em larga escala, além da ausência do problema de inativação da superfície. Existem diferentes eletrodos descartáveis como impressos (screen printed) de ouro, carbono e filmes de metais [133], eletrodos construídos a partir de CDs graváveis de ouro, denominados CDtrodos [134] e os eletrodos obtidos de grafites de lapiseira (PGE – *pencil graphite electrodes*) [135,136].

Especificamente no caso dos PGEs, genossensores têm sido desenvolvidos com o objetivo de detecção de analitos de interesse como medicamentos [137-139], reações de hibridização com sequências específicas de DNA [140,141] e avaliação de danos ao DNA. A seguir são descritos alguns trabalhos que analisam a interação de compostos com DNA imobilizado sobre eletrodos de grafite de lapiseira.

Karadeniz e col. [142] avaliaram a interação de licorina, um alcalóide com atividade citotóxica, com DNA de *calf thymus* de fita dupla e de fita simples. Os autores imobilizaram o DNA sobre PGE por adsorção e estudaram a interação por DPV com base nos sinais de oxidação de guanina e adenina. Como resultado da interação, o sinal voltamétrico de guanina e adenina diminuiu consideravelmente, sendo essa variação atribuída à ligação da licorina com os grupos oxidáveis das bases.

A interação do agente quimioterápico cis-bis(3-aminoflavona)dicloroplatina(II) (cis-BAFDP) com dsDNA de *calf thymus* foi estudada por Erdem e col. [143] e comparada com outro agente, o cis-diaminodicloroplatina(II) (cis-DDP). O DNA foi imobilizado na superfície de PGE por adsorção eletroquímica pela aplicação de potenciais e parâmetros como a concentração de cada composto, bem como reprodutibilidade e limite de detecção foram estudados usando DPV. Após a interação de cis-DDP com dsDNA, os sinais da guanina e adenina diminuíram. Em comparação com cis-DDP, uma diminuição drástica no sinal da

adenina também foi obtida após a interação com cis-BAFDP. Esse resultado pode ser devido aos compostos de platina se ligarem covalentemente ao DNA, com ligações cruzadas entre duas bases em fitas opostas do DNA e também por ligações cruzadas de duas bases na mesma fita de DNA.

Queiroz e col. [144] observaram a interação do composto tetracíclico aromático benzotienoindol (BTIN) com o dsDNA de espermatozoides de peixe immobilizado sobre PGE por DPV. Os autores avaliaram somente o sinal da adenina, uma vez que o composto apresentou resposta em potencial próximo ao da guanina. Após a interação, observaram uma diminuição de 95% do sinal referente ao BTIN e em torno de 89% do sinal da adenina, o que pode ser atribuído à intercalação do composto no DNA. Este fenômeno pode ser explicado pela proteção de grupos oxidáveis da adenina e a diminuição do sinal de oxidação do BTIN indica um possível dano aos grupos oxidáveis deste composto após a intercalação.

Utilizando o DNA de espermatozoides de peixe immobilizado sobre PGE, Yardim e col. [145] avaliaram a interação com 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA), após o estudo da oxidação eletroquímica de tal composto. Uma diminuição do sinal de oxidação da base adenina foi detectada usando a DPV. Segundo os autores, essa diminuição do sinal poderia ser atribuída à intercalação do DMBA na dupla hélice do DNA (interação não-covalente) causando uma mudança na conformação do DNA; ou devido à formação de adutos através de ligações covalentes com o DNA.

PGE e PGE modificados com nanotubos de carbono foram utilizados por Karadeniz e col. [146]. Os autores immobilizaram dsDNA de *calf thymus* sobre os eletrodos e estudaram sua interação com 4-nonilfenol, um produto industrial formado durante alquilação de fenóis. Os resultados mostraram uma significativa diminuição do sinal de oxidação da guanina por DPV quando o DNA interage com diferentes concentrações de 4-nonilfenol, o que caracteriza possíveis danos nos grupos oxidáveis da guanina.

Ensaifi e col. [147] utilizaram o DNA de esperma de salmão imobilizado sobre PGE para avaliar a interação do corante azo Sudan II com o DNA. Os decaimentos da intensidade de corrente das bases guanina e adenina foram proporcionais ao aumento da concentração do corante. O biossensor mostrou-se adequado tanto para analisar o dano causado à biomolécula quanto para a detecção do corante em amostras comerciais de pimenta e molho de ketchup.

Embora o açúcar presente na estrutura também possa ser lesionado, as bases do DNA são os principais alvos de espécies que causam lesão. Assim, o papel protetor de antioxidantes pode ser estudado por meio do monitoramento da integridade do DNA. Vários sensores eletroquímicos utilizando DNA imobilizado têm sido desenvolvidos para a avaliação da capacidade antioxidante dos diferentes compostos [115]. Pode-se citar o trabalho de Bucková e col. [148] que utilizou um eletrodo impresso de carbono modificado com dsDNA para a detecção voltamétrica da lesão no DNA e para a avaliação da proteção do material biológico por antioxidantes, no caso, os polissacarídeos. O íon $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ foi utilizado com marcador redox do DNA e os complexos $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ e $[\text{Fe}(\text{EDTA})]^-$, empregados como agentes causadores da lesão no DNA na presença do ácido ascórbico. A atividade antioxidante dos polissacarídeos foi determinada por fotoquimiluminescência e comparada com o método Trolox.

Em outro estudo, Labuda e col. [149] investigaram as propriedades antioxidantes da quercetina, da rutina glicosídeo, da catequina e da epigallocatequina galato por meio de um biossensor a base de DNA. A lesão no DNA foi realizada usando uma mistura do complexo $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^{2+}$ e do ácido ascórbico. O poder antioxidante dos flavonóides foi dependente da presença de oxigênio atmosférico e apresentou a seguinte ordem: quercetina > rutina > epigallocatequina galato > catequina.

Korbut e col. [150] avaliaram também a capacidade antioxidante desses quatro flavonóides por meio de um eletrodo de pasta de carbono com a superfície modificada por

DNA. O aquecimento do eletrodo com DNA imobilizado durante o tempo de incubação na mistura geradora de radicais livres ($\text{Cu}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{ácido ascórbico}$) melhorou significativamente a sensibilidade da detecção da lesão no DNA e também da proteção do DNA pelos flavonóides antioxidantes.

Ferancová e col. [151] desenvolveram um eletrodo impresso de carbono modificado com DNA aliado a um complexo $[\text{Co}(\text{phen})_3]^{3+}$ como um marcador eletroquímico de DNA, usado para a avaliação das propriedades antioxidantes do α -tocoferol, β -caroteno, quercetina, kaempferol, miricetina e extratos de chá. Espécies reativas de oxigênio foram geradas usando uma mistura do complexo e do ácido ascórbico. Os resultados foram comparados com o método envolvendo o reagente DPPH (2,2-difenil-picrilhidrazil).

Liu e col. [152] utilizaram azul de metileno como intercalador da fita de DNA imobilizado na superfície de eletrodos de TiO_2/ITO . Os radicais livres foram gerados por fotocatalise e a lesão ocasionada ao DNA foi monitorada por meio da redução do azul de metileno, usando a SWV. O sensor eletroquímico foi aplicado na avaliação das propriedades antioxidantes do ácido gálico e da glutathione, sendo que os resultados indicaram que o ácido gálico é um antioxidante mais eficiente que a glutathione.

No trabalho realizado por Mello e col. [153], a avaliação das propriedades antioxidantes de extratos de plantas foi conduzida usando um biossensor eletroquímico a base de DNA por meio de lesões *in vitro* da biomolécula. O biossensor consistia de um eletrodo impresso de grafite com o dsDNA imobilizado. A lesão no DNA foi ocasionada pela geração de radicais $\text{OH}\cdot$ por meio de uma reação do tipo Fenton. A interação entre as espécies radicalares com o DNA imobilizado na ausência e na presença de antioxidantes foi avaliada por alterações na intensidade da corrente do pico de oxidação da guanina usando a SWV. Os resultados mostraram que o biossensor a base de DNA é adequado para uma avaliação rápida das propriedades antioxidantes das amostras.

Ao invés de usar o dsDNA, Barroso, M. F. [154-157] utilizou a eletro-imobilização das bases purinas (guanina e adenina) sobre eletrodos para construção de biossensores. Os dispositivos foram, então, utilizados para avaliar a capacidade antioxidante total de águas aromatizadas frente às lesões causadas por diferentes radicais livres. Quando comparada com a resposta eletroquímica das bases nitrogenadas após a lesão pelos radicais, a adição de antioxidantes ao sistema reativo causou uma diminuição da lesão, o que fez com que um número maior de moléculas de adenina ou guanina estivesse disponível para a oxidação, aumentando a intensidade da corrente. Segundo os autores, os biossensores desenvolvidos são descartáveis e sua construção é fácil, rápida e reprodutível.

Diante do exposto, nota-se a importância de estudos sobre a interação de compostos com o DNA, ampliando o conhecimento tanto da atividade genotóxica de substâncias como em termos de capacidade de proteção a biomolécula. Nesse contexto, o uso de um biossensor eletroquímico para avaliar a interação de corantes têxteis com DNA, o que levaria a danos à molécula, bem como a capacidade de flavonóides em proteger o DNA de tal dano é de grande relevância.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar as lesões ao DNA causadas pela interação com corantes têxteis bem como a capacidade protetora de flavonóides na presença de tais corantes utilizando biossensor eletroquímico. Para atingir esse fim, adotou-se a seguinte estratégia:

- Estudo da interação dos corantes têxteis **Disperso Orange 1 (DO1)** e **Disperso Red 1 (DR1)** e seus produtos de eletrólise por oxidação e por redução com o DNA imobilizado sobre a superfície de eletrodos;
- Uso do biossensor para avaliar a interação dos flavonóides **kaempferol**, **miricetina**, **luteolina** e **apigenina** e dos chás **verde** e de **camomila** com o DNA imobilizado, na ausência dos corantes DO1 e DR1;
- Análise da resposta eletroquímica do biossensor após a interação com as diferentes misturas **corante:flavonóide**, **produtos de eletrólises do corante:flavonóide** ou **corante:chá**

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Fosfato monobásico de sódio (NaH_2PO_4), fosfato dibásico de sódio (Na_2HPO_4), ácido sulfúrico (H_2SO_4), cloreto de sódio (NaCl), hidróxido de sódio (NaOH), ácido fosfórico (H_3PO_4) e cloreto de potássio (KCl) fornecidos pela Mallinckrodt; ácido cítrico ($\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2$), ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$), corantes dispersos Orange 1 (DO1, CAS nº 2581-69-3) e Red 1 (DR1, CAS nº 2872-52-8), corante reativo Blue 15 (RB15, CAS nº 12225-39-7), dsDNA de *calf thymus* (ou timo de bezerro, composição estimada em 42 % de GC e 58 % de AT) e os flavonóides padrões kaempferol, miricetina, luteolina e apigenina obtidos da Sigma-Aldrich; ácido bórico (H_3BO_3), ácido acético (CH_3COOH), etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), acetona ($\text{OC}(\text{CH}_3)_2$), acetonitrila (ACN) e N,N-dimetilformamida (DMF) da J.T. Baker; dispersantes Tamol[®] e Setamol[®] da Basf e dispersante Fongranal[®] FB da Clariant, gentilmente cedidos pela Indústria Lupo S.A, Araraquara.

Para a preparação da solução tampão Britton-Robinson (BR) utilizou-se duas soluções, sendo a solução 1 composta de uma mistura de $0,04 \text{ mol L}^{-1}$ dos ácidos fosfórico, acético e bórico e a solução 2 de hidróxido de sódio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ empregada para o ajuste do pH. As soluções tampão fosfato, fosfato-citrato, e PBS (*phosphate buffered saline*, contendo 0,9% de NaCl) foram preparadas a partir de seus respectivos sais, segundo Gomori [158]. Todas as soluções citadas foram preparadas empregando-se água purificada por sistema Milli-Q ($\rho = 18,2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$).

3.2. INSTRUMENTAÇÃO

Empregou-se o sistema Milli-Q ultra pure water system da marca Millipore, para a obtenção de água ultrapura. Todos os experimentos foram realizados a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$.

As medidas eletroquímicas foram obtidas empregando-se o Potenciostato-Galvanostato da Autolab modelo PGSTAT 30. Uma célula eletroquímica de compartimento único de volume de 5 mL foi utilizada para as medidas, juntamente com um sistema de três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho (PGE com área geométrica de $0,091\text{ cm}^2$), eletrodo de referência ($\text{Ag}|\text{AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$) e eletrodo auxiliar (Pt, área de 1 cm^2). Para as eletrólises empregou-se o Potenciostato-Galvanostato μ Autolab tipo III, uma cubeta de quartzo de volume de 3 mL e 1 cm de caminho óptico empregada como célula eletroquímica, sendo os eletrodos empregados um PGE de $0,71\text{ cm}^2$ de área geométrica como eletrodo de trabalho; um fio de Pt como eletrodo auxiliar e eletrodo de referência de $\text{Ag}|\text{AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$.

As medidas de absorvância foram obtidas utilizando um espectrofotômetro da Hewlett Packard modelo 8453 e uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

Para os estudos quimiométricos empregou-se o software de análise estatística e gráfica Minitab™ Statistical (versão 15).

3.3. METODOLOGIA

3.3.1. PARTE 1: DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR

3.3.1.1. Construção dos eletrodos de grafite de lapiseira (PGE).

Eletrodos de grafite de lapiseira têm sido utilizados em diversos estudos eletroquímicos por apresentarem diversas vantagens, tais como, alta reatividade eletroquímica, rigidez mecânica, baixo custo, amplo intervalo de potencial, facilidade na manipulação e modificação, além de miniaturização. Esses eletrodos, quando combinados com técnicas sensíveis e precisas, como voltametria de pulso diferencial e de onda quadrada, tornam-se atraentes para análises em baixas concentrações [159]. Tais grafites são geralmente compostos de grafite natural, um aglutinante polimérico e argila com diferentes percentuais de acordo com a rigidez desejada, sendo que estes componentes não produzem respostas eletroquímicas de fundo (*background*) [160].

Para a construção dos PGEs, utilizou-se grafites de lapiseira com 0,9 mm de diâmetro do tipo HB da marca Faber-Castell[®], comprados em papelarias locais. Inicialmente, os grafites foram limpos com papel absorvente para retirada de partículas sobre a superfície e, em seguida, a área geométrica foi delimitada com parafilme (American National Can[™]) a uma altura de 3,0 mm, perfazendo uma área geométrica total de 0,091 cm². Para os estudos de eletrólise, a área geométrica do eletrodo foi de 0,71 cm². O contato elétrico é feito diretamente entre o fio do equipamento e o eletrodo. Cada medida foi realizada utilizando um novo eletrodo.

3.3.1.2. Imobilização do dsDNA sobre PGE.

Uma solução estoque do dsDNA $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ foi preparada em solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 e armazenada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Para imobilização do dsDNA sobre o PGE, diversos parâmetros foram otimizados, sendo que o PGE deve, antes da imobilização, ter sua superfície ativada pela aplicação de potencial de oxidação a um determinado tempo. Assim, os experimentos realizados foram: (a) imersão do eletrodo na solução tampão acetato pH 5,0 e aplicação de dado potencial para ativação por alguns segundos; (b) imersão do eletrodo ativado na solução de dsDNA e aplicação do potencial fixo de $0,5 \text{ V}$ [138,143,145] por alguns segundos.

Para definir as melhores condições para imobilização do dsDNA sobre PGE, um estudo usando planejamento fatorial completo foi aplicado. O planejamento fatorial é classificado como um método simultâneo, no qual as variáveis de interesse que apresentam influências significativas na resposta são avaliadas ao mesmo tempo. Pode ser representado por b^k , no qual k é o número de variáveis e b é o número de níveis escolhidos. Planejamentos fatoriais do tipo 2^k são os mais comuns e o número de ensaios necessários aumenta rapidamente com k , o número total de fatores investigados. Os parâmetros avaliados foram o potencial de ativação do PGE e o tempo de aplicação de tal potencial, a concentração do dsDNA e o tempo de aplicação do potencial de $+0,5 \text{ V}$ para acumulação do DNA na superfície do PGE, em níveis alto e baixo, definidos a partir de trabalhos publicados na literatura, que estão apresentados na Tabela 1. Após cada etapa de imobilização, os eletrodos foram enxaguados por imersão em uma solução tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5,0 por 5 s para remoção das moléculas de DNA fracamente adsorvidas.

Tabela 1: Matriz de planejamento fatorial completo de quatro variáveis e dois níveis (2⁴).

Variável	Nível alto	Nível baixo
Potencial ativação/ PGE (V)	1,8	1,4
Tempo potencial / PGE (s)	300	200
Concentração dsDNA (mg mL ⁻¹)	1,0	0,5
Tempo potencial acumulação / dsDNA (s)	360	180

A avaliação da imobilização foi realizada por meio da comparação de voltamogramas cíclicos obtidos em solução de K₄Fe(CN)₆ 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ antes e após a modificação da superfície, aplicando-se o programa de potencial de -0,40 V a +0,70 V, v= 50 mV s⁻¹. Pela Equação 1 estimou-se a porcentagem de recobrimento dos eletrodos.

$$\% = 1 - x \frac{I_p(\text{eletrodo modificado})}{I_p(\text{eletrodo limpo})} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

sendo, I_p a corrente de pico de oxidação do K₄Fe(CN)₆ sobre o eletrodo.

Após a obtenção da melhor condição de imobilização do DNA, os eletrodos foram transferidos para a célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, usado como eletrólito de suporte. As medidas eletroquímicas foram obtidas por meio da SWV, com aplicação de amplitude de potencial (*a*) de 50 mV, frequência (*f*) de 100 Hz e incremento de potencial (ΔE_s) de 2 mV, entre +0,85 V e +1,4 V. A correção da linha de base foi aplicada a todas as curvas experimentais utilizando o software GPES da Autolab (*moverage application*). Este tratamento matemático melhora a visualização e identificação dos picos de oxidação ou redução dos compostos. Na sequência, realizou-se a otimização do sinal voltamétrico do DNA sobre PGE.

3.3.1.3. Otimização do sinal analítico de oxidação da guanina e adenina do dsDNA imobilizado sobre PGE.

A modificação da superfície de PGE foi conduzida pela aplicação de +1,4 V sobre o eletrodo limpo em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 por 300 s para ativação da superfície eletródica. O eletrodo foi então transferido para a solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 contendo 0,5 mg mL⁻¹ de dsDNA e aplicou-se +0,50 V por 180 s, seguido de enxágue por 5 s em solução tampão acetato pH 5,0 para remoção das moléculas fracamente adsorvidas. O sinal analítico referente à oxidação da guanina e da adenina do DNA foi avaliado por voltametria de onda quadrada no intervalo de potencial de +0,85 V a +1,4 V vs. Ag|AgCl_(KCl_{sat}), $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV e $\Delta E_s= 2$ mV.

Primeiramente, um estudo da variação do pH de 4 a 10 do eletrólito suporte foi realizado utilizando-se a solução tampão BR. Após estabelecer o valor de pH, variou-se a composição do eletrólito de suporte, empregando-se as soluções tampão 0,1 mol L⁻¹ de fosfato, fosfato-citrato, BR e PBS. Na sequência, analisou-se o efeito da variação da frequência de aplicação do pulso de potencial de 10 a 300 Hz; da variação da amplitude do pulso de 10 a 60 mV e do incremento de varredura de potencial de 2 a 8 mV por SWV. Com todos os parâmetros otimizados, sendo $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV e $\Delta E_s= 4$ mV, medidas foram realizadas em 7 eletrodos modificados para obtenção do valor de repetibilidade dos sinais.

3.3.2. PARTE 2: CORANTES E FLAVONÓIDES – PREPARO DE SOLUÇÕES E ESTUDOS SOBRE PGE.

3.3.2.1. Estudo da solubilidade dos corantes DO1 e DR1 por espectrofotometria UV-Vis.

Considerando a baixa solubilidade dos corantes dispersos em água, diferentes procedimentos para a solubilização foram empregados, sendo, a) aquecimento da solução aquosa; b) dissolução em etanol, c) em acetona, d) em dimetilformamida, e) em acetonitrila (AcN), sendo os passos de b-e seguidos de diluição em H₂O; f) dispersante Tamol[®] em concentração três vezes maior que a dos corantes; g) dispersante Setamol[®] em diversas proporções; h) dispersante Fongranal[®] FB em diferentes porcentagens; i) ácido sulfúrico em diferentes porcentagens. Em cada estudo foi calculada a massa de corante de modo que a solução estoque apresentasse concentração em torno de $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.2.2. Eletrólises dos corantes DO1 e DR1 por oxidação e por redução.

Para realização da eletrólise de um composto é necessário obter informações sobre os potenciais redox do analito. Assim, um estudo prévio por meio da SWV tanto por oxidação quanto por redução foi realizado para ambos os corantes na concentração $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ obtida a partir da diluição no eletrólito da solução estoque $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 50% de AcN. Para o estudo anódico, uma varredura de potencial na faixa de +0,40 a +1,4 V foi aplicada, sendo $f= 100 \text{ Hz}$, $a= 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s= 2 \text{ mV}$, enquanto que para o estudo catódico a varredura foi realizada de 0,0 a -1,4 V, nas mesmas condições dos parâmetros voltamétricos. O eletrólito de suporte empregado foi uma solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0; eletrodo de trabalho PGE $0,71 \text{ cm}^2$ e uma cubeta de quartzo de 3,0 mL de volume como célula

eletroquímica. O sistema eletroquímico foi montado para se obter os espectros de absorção da região UV-Vis imediatamente após as varreduras no mesmo compartimento (espectroeletroquímica), conforme a Figura 7. Tal configuração não influencia na passagem do feixe de luz, o que poderia causar distorções no espectro de absorbância UV-Vis.

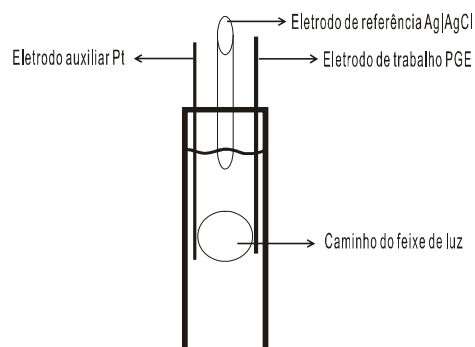


Figura 7: Esquema da célula eletroquímica montada em uma cubeta de quartzo para medidas de absorbância imediatamente após os estudos eletroquímicos.

Os estudos por SWV permitiram obter os potenciais a serem aplicados na eletrólise dos corantes DO1 e DR1.

Para as eletrólises por oxidação, uma solução $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cada corante, obtida a partir da diluição da solução estoque ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 50% de AcN) em solução tampão BR pH 7,0, foi colocada na cubeta e espectros foram obtidos antes e após cada 10 min de eletrólise, a um tempo total de 90 min para o DO1 e de 180 min para o DR1, aplicando-se os potenciais de +1,0 V e +1,2 V, respectivamente.

As eletrólises por redução foram conduzidas de modo similar. A solução $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de cada corante obtida a partir da diluição da solução estoque foi colocada na cubeta e deaerada por borbulhamento de N_2 por 5 min. Medidas de absorbância foram obtidas antes e após cada 10 min de eletrólise, utilizando os potenciais de redução de -1,15 V para o DO1 e de -1,0 V para o DR1, por um tempo total de eletrólises de 120 min. Ao final das eletrólises,

um voltamograma de onda quadrada nas condições de $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV e $\Delta E_s= 2$ mV foi obtido para cada corante.

3.3.2.3. Efeito do solvente sobre a adsorção do corante na superfície do eletrodo não-modificado.

Antes dos estudos de interação DNA:corantes utilizando o biossensor, é necessário avaliar se os corantes adsorvem diretamente sobre a superfície dos eletrodos não-modificados. Essa adsorção poderia influenciar nas medidas voltamétricas do dsDNA e dificultar a análise da interação.

Os corantes DO1 ou DR1 na concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foram solubilizados em solução contendo 5,0 % do dispersante Fongranal[®] FB, seguido de diluição em água pura a $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Primeiramente, os eletrodos sem qualquer modificação foram imersos por 60 s em solução (a) do corante DO1; (b) do corante DR1 ou (c) solução contendo apenas o dispersante Fongranal[®] FB em porcentagem equivalente à solução dos corantes, para avaliar se ocorreu a acumulação dos compostos diretamente sobre a superfície dos eletrodos. Em seguida, os eletrodos foram enxaguados por imersão em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 por 5 s para retirada do excesso de corante ou dispersante. Na sequência, os eletrodos foram transferidos para a célula eletroquímica contendo o eletrólito suporte e voltamogramas de onda quadrada foram registrados nas condições de $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV e $\Delta E_s= 4$ mV para avaliar a eletroatividade dos corantes.

Para a solubilização dos corantes DO1 e DR1 em acetonitrila, as soluções estoque de cada corante foram preparadas em concentração fixa de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em diferentes porcentagens (5; 10; 15; 25; 50 e 100%) de AcN. Cada solução foi então diluída em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 a uma concentração de $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. Após obtenção da

porcentagem ótima de AcN, estudos da acumulação dos corantes em concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ sobre eletrodos não-modificados foram conduzidos. Os eletrodos foram imersos em cada solução por 60 s, enxaguados por imersão para retirada do excesso de corante e realizadas medidas por SWV nas condições otimizadas para os eletrodos modificados, ou seja, $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s= 4 \text{ mV}$.

3.3.2.4. Estudo da adsorção dos flavonóides sobre PGE.

Um estudo do efeito da adsorção dos flavonóides miricetina, kaempferol, luteolina e apigenina sobre PGE não-modificado foi conduzido. Soluções estoque de cada flavonóide foram preparadas em metanol na concentração de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, seguido de diluição em água pura obtendo-se a concentração final de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os eletrodos sem modificação foram imersos em cada solução por 60 s e, após enxágue por imersão para retirada do excesso de flavonóide, voltamogramas de onda quadrada foram registrados utilizando-se os parâmetros $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s= 4 \text{ mV}$.

3.3.3. PARTE 3: APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR NOS ESTUDOS DE INTERAÇÃO DO DNA COM CORANTES, COM PRODUTOS DE ELETRÓLISES, COM FLAVONÓIDES E COM CHÁS.

3.3.3.1. Variação do tempo de interação e da concentração dos corantes DO1 e DR1 utilizando o biossensor.

Os biossensores contendo o dsDNA foram inseridos na solução de cada corante na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ obtidas a partir da diluição da solução estoque $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$

em 50% de AcN. Primeiramente, variou-se o tempo de interação dos corantes com o DNA de 10, 30, 60, 180, 300, 600 e 1800 s. Após cada tempo de interação, os eletrodos modificados foram enxaguados em AcN 50% por 30 s para o DO1 e em AcN 100% por 5 s para o DR1. A evidência de interação DNA:corante foi caracterizada pela diferença da intensidade de corrente do pico de oxidação das bases medida por SWV antes e depois do contato com os corantes.

Os eletrodos modificados com dsDNA foram inseridos na solução de cada corante na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ obtidas a partir da diluição em água pura da solução estoque $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em 50% de AcN. Após cada interação por um tempo de 180 s, os eletrodos modificados foram enxaguados em AcN 50% por 30 s para o DO1 e em AcN 100% por 5 s para o DR1. A diferença da intensidade de corrente do pico de oxidação das bases medida por SWV antes e depois do contato com os corantes foi utilizada para avaliar a interação DNA:corante.

3.3.3.2. Estudo da interação dos produtos de eletrólises por oxidação e por redução dos corantes DO1 e DR1 com dsDNA utilizando o biossensor.

Eletrólises por oxidação e por redução de ambos os corantes foram realizadas utilizando soluções individuais dos corantes em $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ obtida por diluição da solução estoque em solução tampão BR pH 7,0. Para a oxidação aplicou-se os potenciais de +1,0 V e +1,2 V por 40 e 120 min para o DO1 e o DR1, respectivamente, e para a redução aplicou-se -1,15 V para o DO1 e -1,0 V para o DR1 por 120 min para ambos os corantes. O mesmo procedimento de interação utilizado para os corantes em sua forma original foi aplicado para os produtos gerados pelas eletrólises, em que o biossensor foi imerso em cada solução por 180 s e voltamogramas de onda quadrada foram registrados e comparados.

Adicionalmente, experimentos de interação foram conduzidos por espectrofotometria UV-Vis dos corantes DO1 e DR1 em suas formas originais e também após cada eletrólise com dsDNA em solução. Uma alíquota de solução de DNA na concentração final de $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ foi adicionada a cada solução e espectros de absorvância na região UV-Vis foram obtidos em diferentes intervalos de tempo.

3.3.3.3. Avaliação da interação dos flavonóides miricetina, kaempferol, luteolina e apigenina e de chás com dsDNA utilizando o biossensor.

Os flavonóides miricetina, kaempferol, luteolina e apigenina foram solubilizados em metanol para obtenção de uma solução estoque $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, por meio de diluição em H_2O pura, soluções na concentração de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas para o estudo de interação com o dsDNA imobilizado sobre PGE. Os biossensores foram imersos em cada solução dos flavonóides por 180 s e, após enxágue dos eletrodos por imersão em solução tampão BR por 30 s para retirada do excesso de flavonóide, voltamogramas de onda quadrada foram registrados em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 em condições voltamétricas otimizadas, sendo $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$ e $\Delta E_s= 4 \text{ mV}$.

Estudos de interação do DNA também foram conduzidos em soluções de chás verde e de camomila. As amostras de duas marcas comerciais foram obtidas em supermercado local. O procedimento de preparo dos chás consistiu em aquecimento de 200 mL de água destilada a $95 \text{ }^\circ\text{C}$ seguido de imersão dos saches de cada chá por 5 min. Durante os primeiros 30 s, os saches foram submersos 10 vezes. O procedimento foi repetido depois de 2,5 min e no final de 5 min. Os saches de chá foram cuidadosamente removidos e o chá foi imediatamente condicionado em um frasco de vidro. O frasco foi fechado para evitar a evaporação de água e, após o resfriamento, o volume da infusão foi ajustado novamente para 200 mL.

Os biossensores foram imersos por 180 s na solução de cada chá após diluição de 200x em H₂O pura e, após enxágue dos eletrodos, voltamogramas de onda quadrada foram registrados e comparados.

3.3.4. PARTE 4: APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR NOS ESTUDOS DE INTERAÇÃO DO DNA COM MISTURAS DE CORANTE E FLAVONOIDE OU CHÁ.

Após os estudos de interação do DNA imobilizado com os corantes, flavonóides e chás, individualmente, partiu-se para a avaliação do efeito da mistura corante:flavonóide ou produtos de eletrólises:flavonóide sobre o comportamento eletroquímico do dsDNA. Nesta etapa, soluções contendo os corantes DO1 ou DR1 na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (alta concentração) na presença dos flavonóides miricetina ou apigenina na concentração de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (baixa concentração) foram preparadas. No caso das soluções dos corantes após as eletrólises, a concentração inicial de cada corante foi de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, sendo as eletrólises por oxidação e redução conduzidas conforme descrito no item 3.3.3.2. As concentrações de cada reagente nas misturas visam avaliar a capacidade dos flavonóides em menor concentração em proteger o DNA de interações com os corantes em maior concentração. Os biossensores foram imersos em cada solução por 180 s e, após enxágue dos eletrodos, novamente os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos. Comparou-se os perfis voltamétricos do DNA antes e após a interação com as misturas corante:flavonóide. Na sequência, um estudo foi conduzido em soluções de mistura com corantes, substituindo-se os flavonóides por soluções de chá verde ou chá de camomila após diluição em 200x. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos após a interação por 180 s foram, então, comparados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PARTE 1: DESENVOLVIMENTO DO BIOSSENSOR.

4.1.1. Imobilização do dsDNA sobre PGE.

A imobilização de ácidos nucleicos sobre transdutores eletroquímicos por meio da adsorção eletroquímica é um método simples e que não requer reagente ou modificações especiais na molécula do DNA. Para otimização da adsorção eletroquímica do dsDNA sobre PGE, empregou-se o planejamento fatorial completo de dois níveis e quatro variáveis, 2^4 . Os valores de porcentagem de recobrimento da superfície, usando o processo redox do $K_4Fe(CN)_6$, obtidos para cada experimento (variaram de 13% a 28%) foram empregados e, utilizando o software Minitab™ Statistical foi possível identificar os efeitos de cada parâmetro sobre o sistema.

Observa-se pelo Gráfico de Pareto, na Figura 8, que o potencial aplicado para ativação da superfície eletródica é a única variável estatisticamente significativa, uma vez que apresentou valor superior a 2,052 (linha vertical).

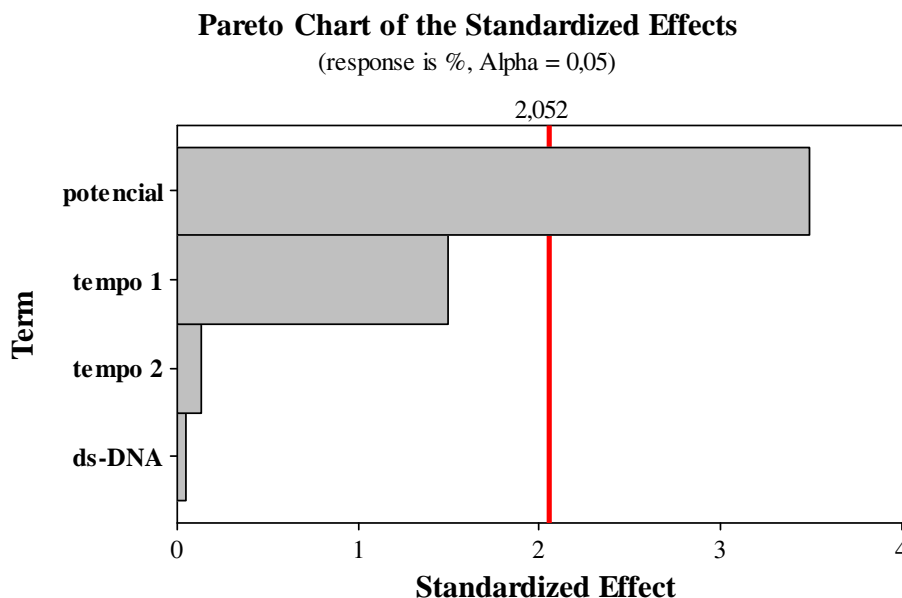


Figura 8: Gráfico de Pareto: influência dos parâmetros na imobilização do dsDNA sobre PGE; potencial: aplicado ao PGE para ativação; tempo 1: tempo de aplicação do potencial de ativação; tempo 2: tempo de aplicação de +0,5 V para acumulação do dsDNA; dsDNA: concentração do DNA de *calif thymus*.

A variação da porcentagem de recobrimento do PGE quando se altera os parâmetros dos níveis altos para os níveis baixos é apresentada na Figura 9. As inclinações das retas mostram que há maior imobilização de DNA quando se aplica +1,4 V para ativação da superfície do eletrodo limpo em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹ pH 5,0 por um tempo de 300 s, enquanto que a concentração de dsDNA e o tempo de aplicação do potencial de +0,5 V para acumulação do DNA não influenciam na porcentagem de recobrimento, optando-se pela menor concentração e menor tempo. Deste modo, as seguintes condições neste experimento foram estabelecidas: (a) aplicação de +1,4 V por 300 s para ativação da superfície do PGE seguido de (b) acumulação do dsDNA concentração 0,5 mg mL⁻¹ por aplicação de +0,5 V por 180 s.

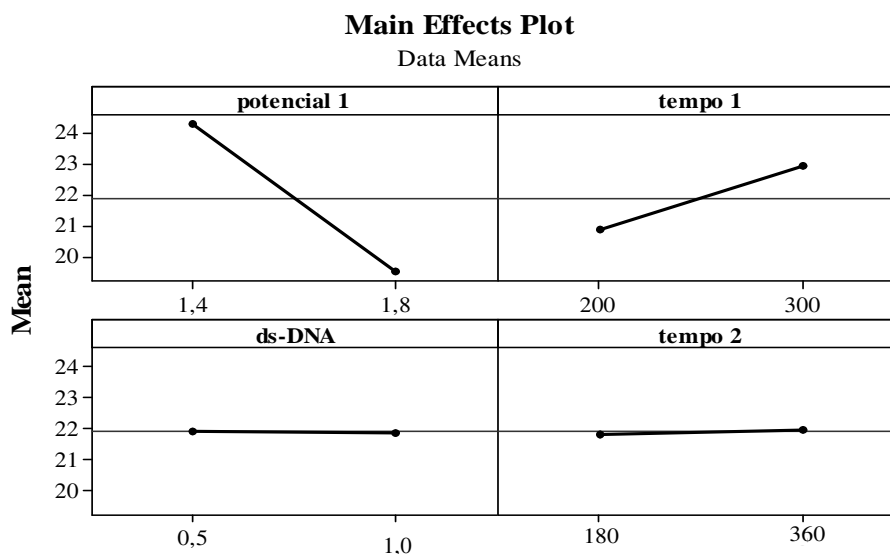


Figura 9: Gráfico dos efeitos principais do planejamento fatorial completo 2^4 para imobilização de dsDNA sobre PGE; potencial 1: aplicado ao PGE para ativação; tempo 1: tempo de aplicação do potencial de ativação; tempo 2: tempo de aplicação de +0,5 V para acumulação do dsDNA; dsDNA: concentração do DNA de *calf thymus*.

O pré-tratamento do grafite pela aplicação de altos valores de potencial produz uma superfície com maior rugosidade e hidrofilicidade devido à inserção de grupos carbonila e carboxila que melhoram a adsorção, além de promover a remoção de camadas orgânicas [161, 162]. A adsorção do DNA poderia ser alcançada sem a aplicação de potencial, no entanto, a adsorção da biomolécula pode ser facilitada pela aplicação de potenciais positivos que conferem atração eletrostática entre a superfície do grafite carregada positivamente e a cadeia de açúcar-fosfato hidrofílica negativamente carregada do DNA [22, 28]. Este procedimento leva também a um aumento da estabilidade da molécula imobilizada. O potencial de +0,5 V foi escolhido por não ser suficientemente positivo para oxidar irreversivelmente as bases do DNA no interior da molécula. Além disso, segundo Gherghi e col. [162] a corrente de pico é pouco afetada quando se aumenta o potencial de 0,0 V a 0,6 V, enquanto decresce rapidamente em maiores valores de potencial.

Na sequência, o eletrodo de grafite modificado conforme descrito foi transferido para uma célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 usado como eletrólito de suporte. O voltamograma por SWV foi registrado pela aplicação do intervalo de potencial de +0,85 V a +1,4 V, amplitude de 50 mV, frequência de 100 Hz e incremento de potencial de 2 mV e é mostrado na Figura 10. Observa-se a presença de dois picos de oxidação em +0,97 V e +1,25 V, que correspondem à oxidação dos resíduos de guanina e de adenina do DNA imobilizado, respectivamente.

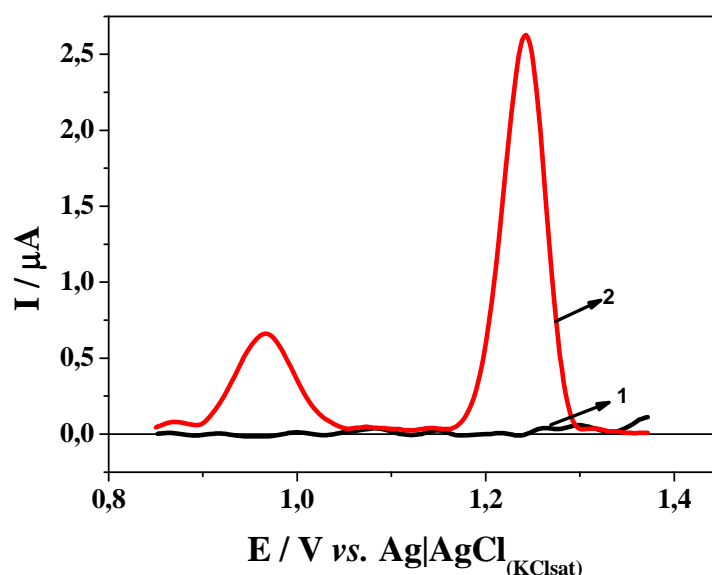


Figura 10: Voltamogramas de onda quadrada em meio de solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 utilizando PGE não-modificado (1) e PGE modificado com dsDNA (2). Condições voltamétricas: $f=100 \text{ Hz}$, $a=50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s=2 \text{ mV}$.

A oxidação eletroquímica do DNA envolve um complexo processo que ocorre em grupos específicos da guanina e da adenina, com diferentes velocidades de reações de transferência eletrônica [163]. Segundo a literatura, o mecanismo associado à oxidação da guanina envolve a perda de quatro prótons e quatro elétrons para formação da 8-oxoGua. Esta pode, então, sofrer mais uma reação de oxidação com perda de $2e^-$ e $2H^+$, seguido de hidrólise

para formação de produtos. Depois da primeira transferência de elétrons, uma espécie radical é formada e sofre dimerização. O produto da dimerização é eletroativo e pode ser oxidado a um potencial mais elevado [164,165]. A adenina, segundo Gonçalves e col. [166], sofre oxidação em um processo irreversível envolvendo a perda de seis prótons e seis elétrons.

Com o objetivo de se obter um melhor sinal analítico da oxidação da guanina e da adenina, estudou-se as condições de pH, eletrólito de suporte e os parâmetros da voltametria de onda quadrada (f , a e ΔE_s).

4.1.2. Otimização do sinal analítico de oxidação da guanina e adenina do dsDNA imobilizado sobre PGE.

4.1.2.1. Efeito da variação do valor de pH e eletrólito de suporte.

O DNA de *calf thymus* é constituído por duas fitas longas e tem sido utilizado em estudos de interação de compostos com DNA, tanto por técnicas eletroquímicas como espectroscópicas [124,125]. Observa-se pela Figura 11 o perfil espectrofotométrico do dsDNA 0,5 mg mL⁻¹ em meio aquoso, apresentando duas bandas características em 260 nm e 280 nm. A razão entre os valores da intensidade da absorbância foi $A_{260}/A_{280} = 1,8$, indicando que não contém contaminações por proteínas, RNA ou outros materiais [167].

Para avaliar a influência do pH do meio sobre a estabilidade da cadeia dupla do DNA, um estudo espectrofotométrico do dsDNA 0,05 mg mL⁻¹ foi conduzido variando-se o valor do pH de 2 a 12, utilizando uma solução tampão Britton-Robinson 0,1 mol L⁻¹. Pela Figura 12 pode-se observar que houve um aumento da absorbância em 280 nm nos valores extremos de pH (2, 3, 11 e 12). Nesses valores de pH pode ter ocorrido uma desnaturação das fitas duplas do DNA, causando uma maior exposição das bases nitrogenadas, levando a um aumento da

absorbância. Nos valores de pH de 4 a 10, a molécula se mantém estável, apresentando intensidades de absorbância similares.

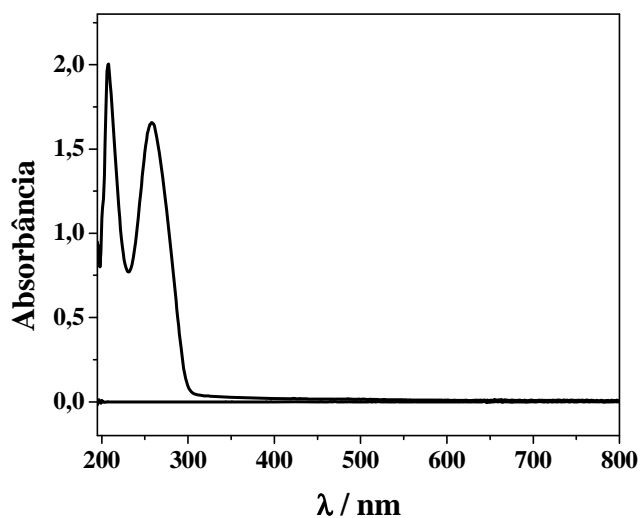


Figura 11: Espectro UV-Vis da solução de dsDNA $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ em água pura.

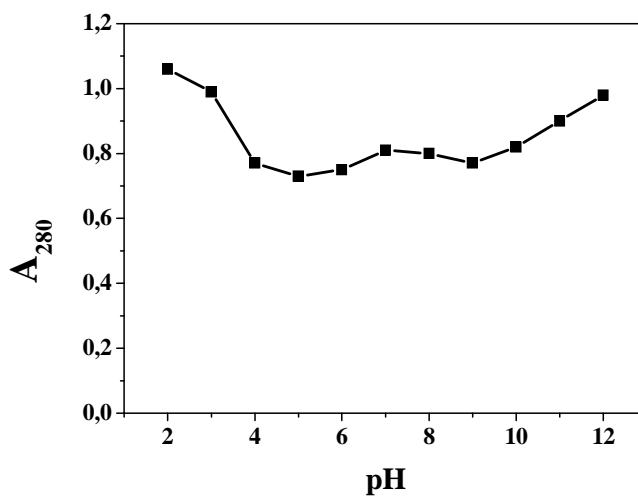


Figura 12: Variação da absorbância do dsDNA $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$ em 280 nm em diferentes valores de pH.

Na sequência, o efeito da variação do valor de 4 a 10 do pH do eletrólito de suporte para as medidas da oxidação do dsDNA imobilizado sobre PGE foi avaliado. A Figura 13 apresenta a variação do potencial e da corrente de pico de oxidação das bases em função do valor de pH. É possível notar que há um deslocamento do potencial de pico para valores

menos positivos com o aumento do pH para ambas as bases, enquanto que a corrente de pico apresenta maiores intensidades no intervalo de pH de 5,0 a 8,0. Com base nos resultados, o pH 7,0 foi escolhido por apresentar boa intensidade de corrente e potencial de pico adequado para as duas bases.

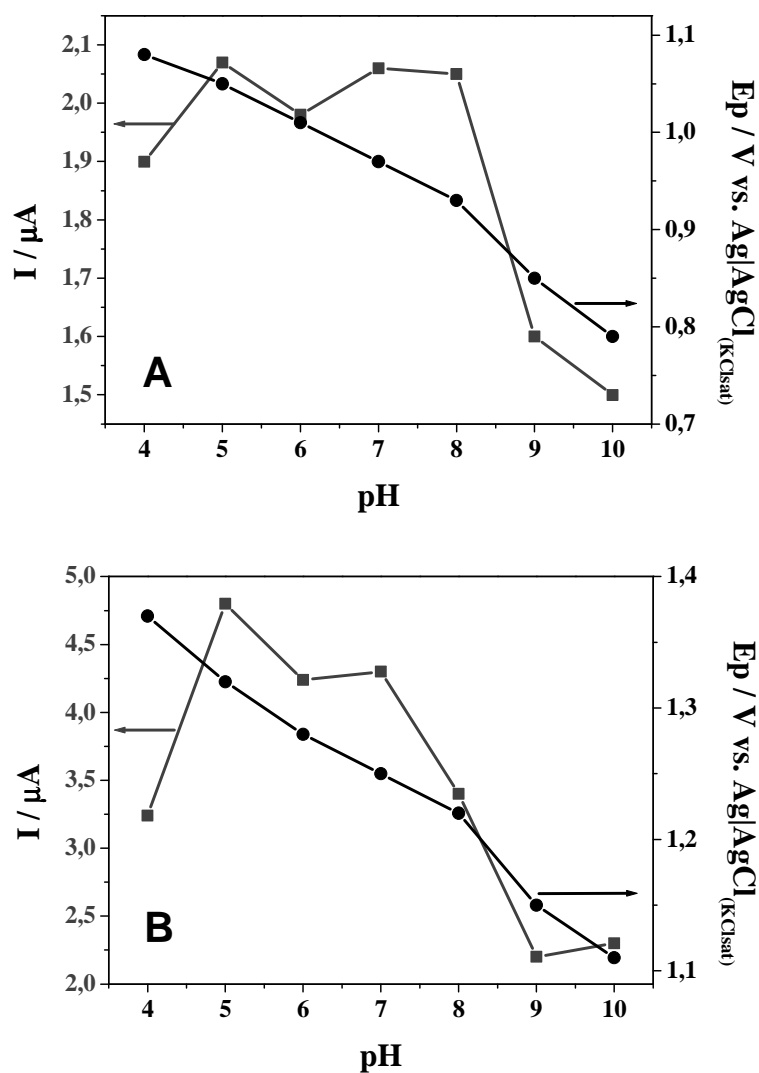


Figura 13: Variação da intensidade de corrente (■) e do potencial de pico (●) com o valor de pH para guanina (A) e adenina (B) do biossensor. Condições: solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, $a= 50 \text{ mV}$, $f= 100 \text{ Hz}$, $\Delta E_s= 2 \text{ mV}$.

A variação do eletrólito de suporte foi avaliada em pH 7,0 para as soluções tampão fosfato, fosfato-citrato e BR e em pH 7,2 para o PBS. Nenhum dos eletrólitos apresentou

resposta eletroquímica sobre o PGE não-modificado. A Figura 14 mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos com PGE modificado com DNA em cada eletrólito. Nota-se que o pico de oxidação da guanina apresentou intensidades de corrente similares para os eletrólitos fosfato-citrato, PBS e fosfato e cerca de três vezes maior para a solução tampão BR. No caso da oxidação da adenina, não houve intensidade de corrente na presença do fosfato-citrato e uma corrente baixa para o PBS, enquanto que na presença do BR, a corrente foi cerca de 1,5 vezes maior que em fosfato, confirmando a influência do eletrólito no comportamento eletroquímico das bases do DNA. Uma possível explicação para a supressão do pico da adenina na presença do eletrólito fosfato-citrato é que, de acordo com Calzuola e col. [168], o ânion citrato contém três carboxilas e poderia representar uma estrutura peptidomimética, ou seja, simular um peptídeo flexível, capaz de se ligar ao DNA, e neste caso, impossibilitando a reação eletrodica da base adenina.

Desta maneira, com base nos resultados obtidos, estabeleceu-se a solução tampão Britton-Robinson pH 7,0 como eletrólito de suporte para as medidas por SWV com PGE modificado com dsDNA.

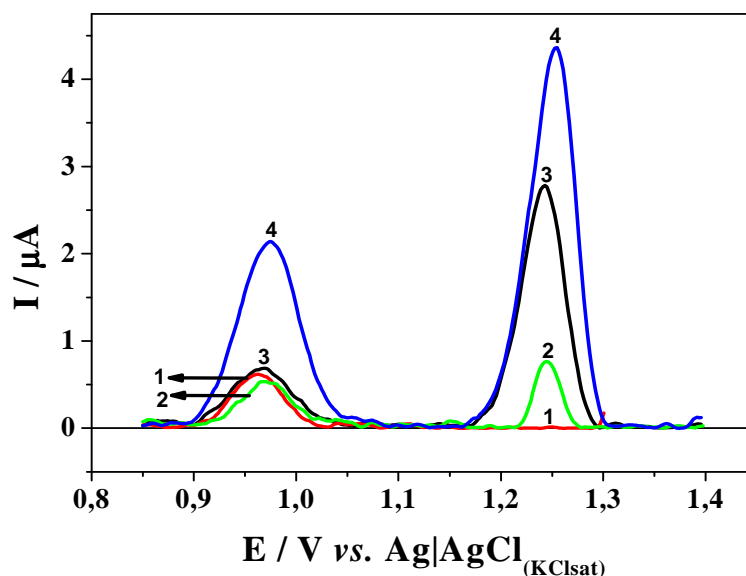


Figura 14: Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o biossensor em solução tampão $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de fosfato-citrato (1); PBS (2); fosfato (3) e BR (4) como eletrólito de suporte. Condições voltamétricas: $a= 50 \text{ mV}$, $f= 100 \text{ Hz}$, $\Delta E_s= 2 \text{ mV}$.

4.1.2.2. Variação dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.

O aumento da frequência de aplicação dos pulsos de potenciais pode ser um dos artifícios utilizados para se melhorar a resposta da SWV, uma vez que se todas as outras variáveis forem fixadas, a sensibilidade é dada em função apenas da frequência da onda. Variar a amplitude de aplicação dos pulsos de potenciais também pode melhorar a sensibilidade analítica na SWV com processos redox totalmente irreversíveis porque, para valores de amplitudes maiores que 20 mV , a largura de meia-altura ($\Delta E_p/2$) se mantém constante. O aumento do incremento de potencial também melhora a sensibilidade [169]. Deste modo, inicialmente um estudo da variação da frequência da aplicação de pulsos de potencial na faixa de 10 a 300 Hz , mantendo-se constante a amplitude em 50 mV e o incremento de potencial em 2 mV foi realizado. A Figura 15 ilustra os voltamogramas obtidos com a variação de f , nos quais houve um aumento da intensidade de corrente e deslocamento

do potencial de pico para valores mais positivos com o aumento da frequência aplicada. No entanto, em valores acima de 250 Hz, ocorreu um significativo decaimento da intensidade de ambos os picos. Desta maneira, fixou-se o valor da frequência em 250 Hz.

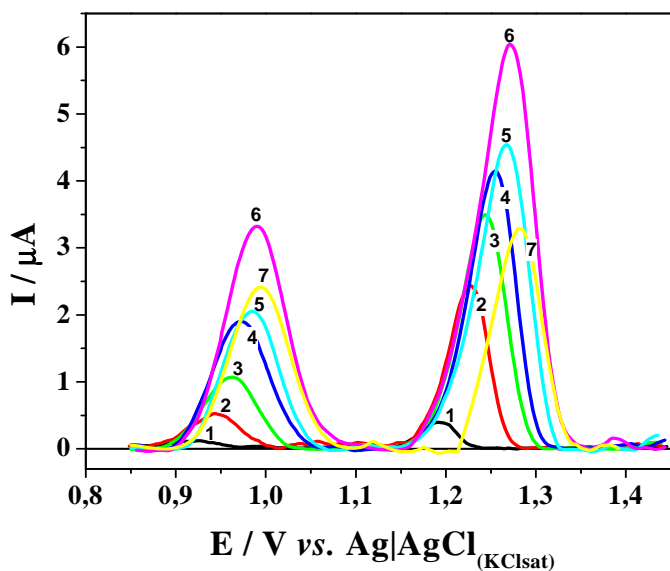


Figura 15: Variação da frequência de aplicação do pulso por voltametria de onda quadrada em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 utilizando o PGE modificado com dsDNA, sendo 10 (1); 50 (2); 100 (3); 150 (4); 200 (5); 250 (6) e 300 Hz (7); $a=50$ mV, $\Delta E_s=2$ mV.

Em seguida, variou-se o valor da amplitude aplicada de 10 a 60 mV, fixando-se $f=250$ Hz e $\Delta E_s=2$ mV. Como pode ser visto na Figura 16, houve um aumento da intensidade de corrente com o aumento da amplitude até 60 mV para o pico da guanina e até 50 mV para o pico da adenina. Considerando a pequena diferença de intensidade de corrente da adenina entre $a=50$ mV e $a=60$ mV, optou-se pelo valor de 60 mV devido à maior sensibilidade no caso da guanina. Assim, fixou-se a amplitude e partiu-se para a variação do incremento de potencial. Pela Figura 17 observa-se que houve um aumento da intensidade de corrente com o aumento do incremento de potencial até 8 mV para a guanina e até 6 mV para a adenina. No entanto, houve um alargamento dos picos de oxidação das bases em $\Delta E_s > 4$ mV.

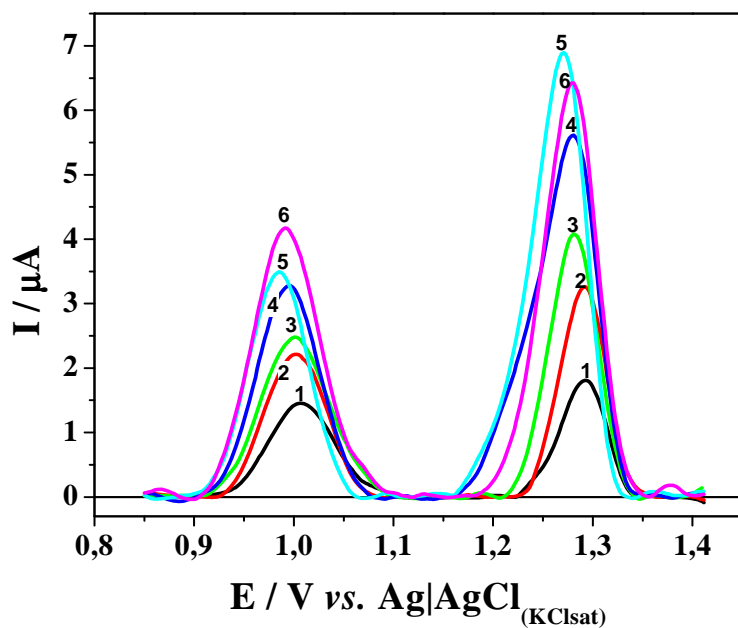


Figura 16: Variação da amplitude do pulso por voltametria de onda quadrada em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 utilizando o PGE modificado com dsDNA, sendo 10 (1); 20 (2); 30 (3); 40 (4); 50 (5) e 60 mV (6); $f = 250 \text{ Hz}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

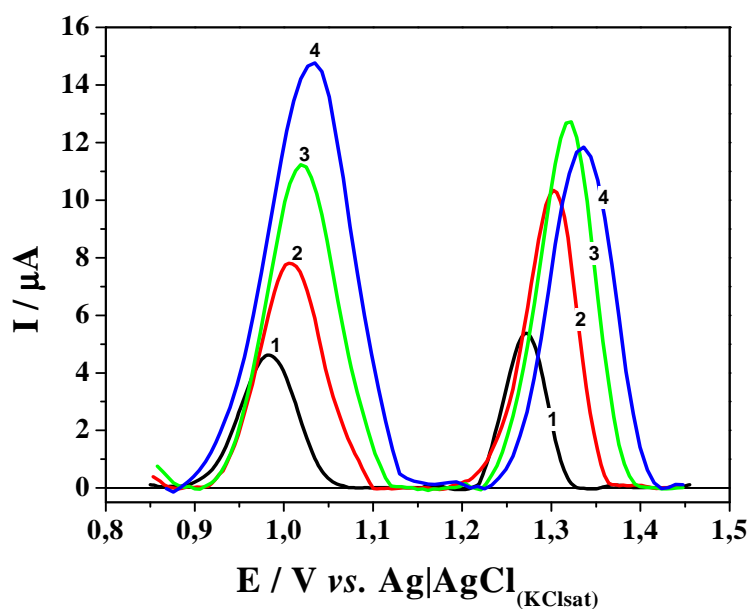


Figura 17: Variação do incremento de potencial por voltametria de onda quadrada em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 utilizando o PGE modificado com dsDNA, sendo 2 (1); 4 (2); 6 (3) e 8 mV (4); $f = 250 \text{ Hz}$, $a = 60 \text{ mV}$.

Baseando-se nos resultados obtidos, os parâmetros da SWV foram assim definidos: $f=250$ Hz, $a=60$ mV e $\Delta E_s=4$ mV. Estudos de repetibilidade ($n=7$) da corrente e do potencial de pico de ambas as bases foram realizados, obtendo desvios padrão relativos (RSD) de 4,92 e 0,30% para a guanina e de 3,60 e 0,55% para a adenina, respectivamente. O voltamograma de onda quadrada obtido com os parâmetros otimizados é mostrado na Figura 18.

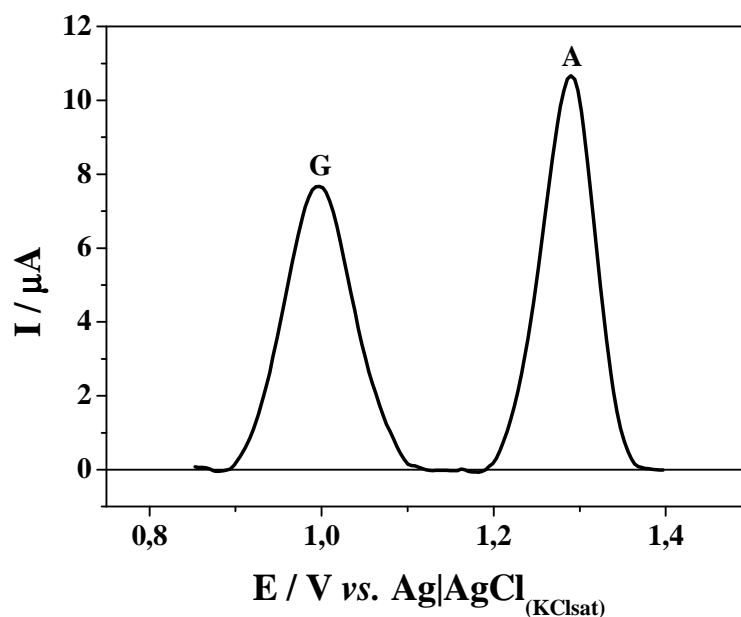


Figura 18: Voltamograma de onda quadrada obtido em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 utilizando eletrodo modificado com dsDNA pela aplicação de +1,4 V por 300 s em solução tampão acetato pH 5,0 ao eletrodo limpo, seguido da imersão do eletrodo ativado na solução tampão acetato pH 5,0 contendo $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de dsDNA e aplicação de +0,5 V por 180 s. Condições voltamétricas otimizadas, sendo $f=250$ Hz, $a=60$ mV e $\Delta E_s=4$ mV; na qual G se refere ao pico de oxidação da guanina e A ao pico da adenina.

4.2. PARTE 2: CORANTES E FLAVONÓIDES – ESTUDO DO COMPORTAMENTO ESPECTROFOTOMÉTRICO E/OU ELETROQUÍMICO INDIVIDUAL EM SOLUÇÃO.

4.2.1. Estudo da solubilidade dos corantes DO1 e DR1 por espectrofotometria UV-Vis.

Os corantes dispersos DO1 e DR1 possuem uma banda de absorção característica em comprimento de onda em torno de 490 a 505 nm que corresponde às transições $n_s \rightarrow \pi$ do grupo azo. Sendo assim, a intensidade da banda de absorção nesta região do espectro foi utilizada como parâmetro de comparação da solubilidade das soluções.

As soluções estudadas utilizando aquecimento, etanol, acetona, dispersante Tamol[®] e Setamol[®] apresentaram pouca ou nenhuma absorção na região do visível, uma vez que não houve total solubilização dos analitos, apresentando corpo de fundo. As soluções empregando ácido sulfúrico ou dimetilformamida, embora tenham apresentado considerável absorção, não foram consideradas viáveis para estudos de interação na presença de DNA. O pH da solução de ácido sulfúrico poderia interferir na estabilidade da estrutura da fita dupla do DNA, enquanto que o solvente dimetilformamida, embora não haja provas suficientes sobre sua carcinogenicidade em animais, pode estar relacionado com alguns tipos de câncer desenvolvidos por trabalhadores expostos a esse solvente [170].

Os melhores resultados espectrofotométricos foram obtidos utilizando a solução do dispersante Fongranal FB[®]. Este dispersante é produto de oxietilação, de caráter não iônico, incolor, pH neutro e solúvel em água [171]. É utilizado na indústria têxtil como agente igualizante (permite uma uniformização no tingimento), penetrante e dispersante para a tinturaria e estamparia em geral, aplicado na concentração de 0,5 a 2 mL L⁻¹ (0,05% a 0,2%) [171], sendo sua estrutura química protegida por patente.

Um estudo da porcentagem de 0,2% a 5,0% do dispersante foi realizado para solubilização dos corantes, utilizando a solução estoque em $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A concentração dos corantes para as medidas foi de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 19 apresenta os espectros em diferentes porcentagens do dispersante para o DO1 e DR1.

Observa-se que há um aumento da intensidade da banda de absorção em 492 nm para o DO1 e em 505 nm para o DR1 com o aumento da porcentagem de dispersante, obtendo-se um espectro com boa resolução na porcentagem de 5,0%. Considerando que esta porcentagem está acima daquela empregada pela indústria têxtil, maiores concentrações do dispersante não seriam adequadas. Portanto, os estudos posteriores foram realizados empregando-se Fongranal[®] FB 5,0% na solução estoque de cada corante. Importante salientar que o dispersante não apresenta absorbância na região do espectro referente à absorção do grupo cromóforo dos corantes.

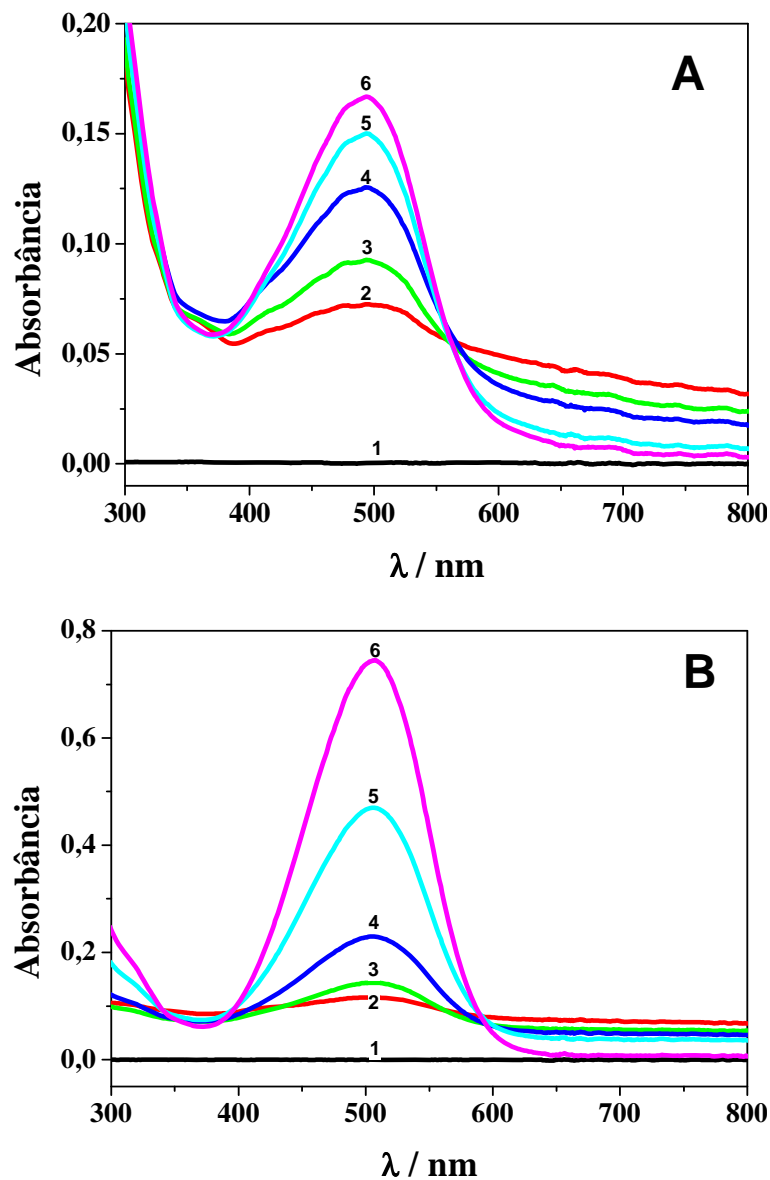


Figura 19: Espectros UV-Vis da solução individual 5,0% de Fongranal® FB (1) e das soluções de DO1 (A) e DR1 (B) em concentração final $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ contendo o dispersante Fongranal® FB em porcentagens de 0,2% (2); 0,5% (3); 1,0% (4); 2,5% (5) e 5,0% (6), em água na solução estoque.

4.2.2. Comportamento eletroquímico dos corantes DO1 e DR1 sobre PGE: efeito da adsorção sobre o eletrodo não-modificado.

4.2.2.1. Solubilização dos corantes DO1 e DR1 em dispersante Fongranal[®] FB.

Primeiramente, os eletrodos limpos foram imersos na solução do corante DO1 $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ na presença de Fongranal[®] FB por 60 s. Após enxágue dos eletrodos, foram realizadas as medidas por SWV. Como pode ser observado na Figura 20A ocorreram dois picos de oxidação em +0,58 V e em +1,15 V. O mesmo procedimento foi realizado para o corante DR1 e nota-se que ocorrem três picos anódicos em +0,59 V, +0,98 V e em +1,21 V (Figura 20B).

Quando se realiza a acumulação em solução contendo apenas o dispersante em porcentagem equivalente àquela contida na solução dos corantes (ou seja, 0,05%) observa-se a presença de dois picos em +0,60 V e em +1,21 V, Figura 21. Com base nos resultados, pode-se afirmar que o dispersante apresenta forte adsorção sobre a superfície dos eletrodos, pois os picos de oxidação referente a este composto estão presentes também quando se acumulam os corantes. No caso do DO1, há uma diminuição da intensidade de corrente do pico em +0,58 V quando comparado com o pico em +0,60 V do dispersante. Isto ocorre porque provavelmente o DO1 também se adsorve e dificulta o processo eletródico do dispersante. No caso do DR1, além dos picos referentes ao Fongranal[®] FB, o pico em +0,98 V pode ser atribuído à oxidação do corante.

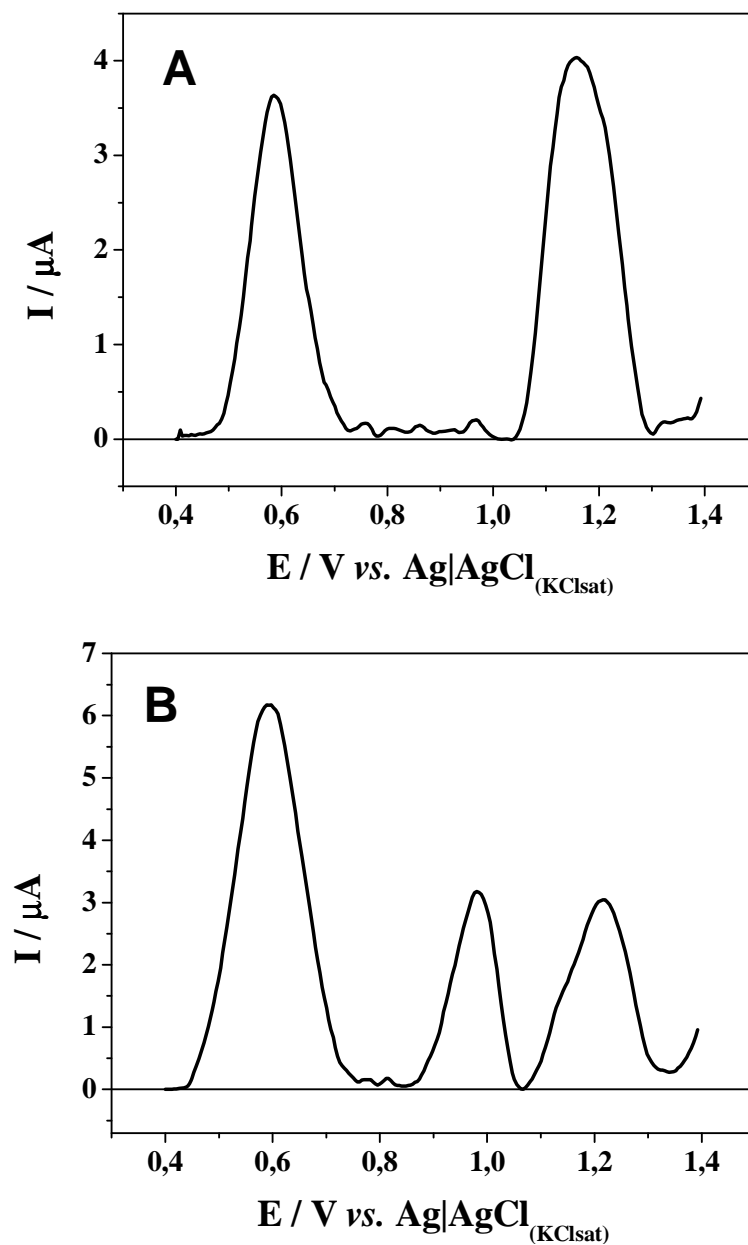


Figura 20: Voltamogramas de onda quadrada obtidos após acumulação de DO1 (A) e DR1 (B) em concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ por 60 s na presença do dispersante Fongranal[®] FB sobre eletrodos PGE não-modificado. Condições voltamétricas: $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$, $\Delta E_s= 4 \text{ mV}$.

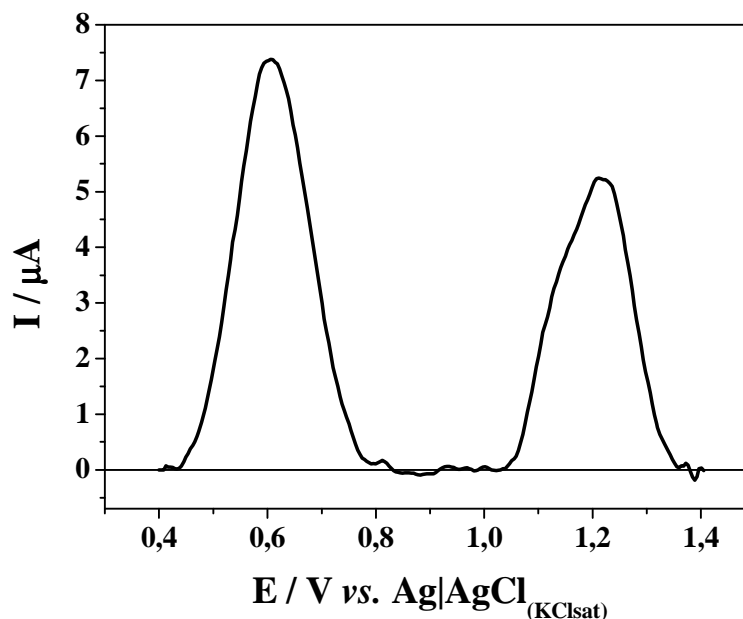


Figura 21: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 após acumulação do dispersante Fongranal[®] FB 0,05 % por 60 s sobre PGE não-modificado. Condições voltamétricas: $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV, $\Delta E_s= 4$ mV.

É importante salientar que os picos referentes ao dispersante e corantes ocorrem em potenciais similares àqueles obtidos para o dsDNA imobilizado. Desta maneira, torna-se impraticável um estudo de interação DNA:corante nessas condições, uma vez que não é possível discriminar quais processos estão ocorrendo. Os corantes sofreram forte adsorção na superfície dos eletrodos apenas pela imersão em cada solução, influenciada pela presença do dispersante. Assim, estudos da solubilização dos corantes em acetonitrila, solvente que não apresenta adsorção sobre os eletrodos, foram conduzidos.

4.2.2.2. Solubilização dos corantes DOI e DRI em acetonitrila.

Nesta etapa, as soluções estoque dos corantes na concentração $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ foram preparadas em AcN em diversas porcentagens, seguida de diluição em água pura a $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e avaliadas por espectrofotometria UV-Vis. As maiores intensidades de

absorção foram obtidas com 50% de AcN para ambos os corantes. A absorvidade molar (ϵ) dos corantes foi calculada, sendo de $3.340 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para o DO1 e de $11.174 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ para o DR1.

O estudo sobre a adsorção dos corantes solubilizados em AcN foi conduzido sobre o PGE não-modificado. A solução estoque de cada corante foi obtida pela solubilização de DO1 ou DR1 $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em 50% de AcN e 50% de água, seguido de diluição em água pura a $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Os eletrodos não-modificados foram imersos na solução dos corantes por um tempo de 60 s para acumulação. Em seguida, os eletrodos foram enxaguados em solução tampão BR pH 7,0 para retirada do excesso de corante e transferidos para a célula eletroquímica contendo a solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. Os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos nas mesmas condições otimizadas para eletrodos modificados com dsDNA. Estudos da adsorção somente de AcN foram realizados por imersão dos eletrodos não-modificados na solução por 60 s e não apresentaram respostas voltamétricas, indicando que não há acúmulo do solvente diretamente sobre o PGE.

A Figura 22 apresenta os voltamogramas obtidos após a imersão dos eletrodos na solução dos corantes solubilizado em 50% AcN e observa-se que picos de oxidação ocorrem +0,55 V para o DO1 e +0,90 V para o DR1. Considerando que o solvente não apresentou picos de oxidação individualmente, os picos obtidos se referem à oxidação dos corantes DO1 ou DR1 que sofreram adsorção sobre o eletrodo.

É possível observar que os corantes ainda se adsorvem na superfície dos eletrodos mesmo em solvente que não contribua no processo de adsorção. No caso do DO1, o pico de oxidação do composto ocorre em +0,55 V e não apresentaria influência sobre o potencial de oxidação das bases guanina e adenina do dsDNA imobilizado que ocorrem em +1,0 V e +1,3 V, respectivamente. No entanto, o pico de oxidação do DR1 ocorre em +0,90 V e se sobreporia ao potencial de oxidação da base guanina. Sendo assim, um estudo do enxágue do

eletrodo após a acumulação na solução dos corantes foi realizado. A inserção da Figura 22 mostra os voltamogramas obtidos após o enxágue para retirada do excesso de corante realizado em AcN 50% por 30 s para o DO1 e em AcN 100% por 5 s para o DR1. Para o DO1, houve uma significativa diminuição da intensidade de corrente, enquanto que para o DR1 não houve a detecção do pico de oxidação do corante após o enxágue. Tal procedimento foi aplicado aos estudos de interação com o eletrodo modificado com DNA. Uma vez que os picos dos corantes não são detectados após o enxágue, este procedimento garante que qualquer alteração dos sinais de oxidação da guanina e da adenina seja atribuída à interação dos corantes com o DNA imobilizado na superfície do PGE.

O efeito do enxágue em AcN foi avaliado sobre os eletrodos modificados com dsDNA e observou-se que não houve mudanças nas intensidades de corrente das bases guanina e adenina, indicando que este procedimento não altera a conformação do DNA imobilizado ou influencia no comportamento eletroquímico das bases.

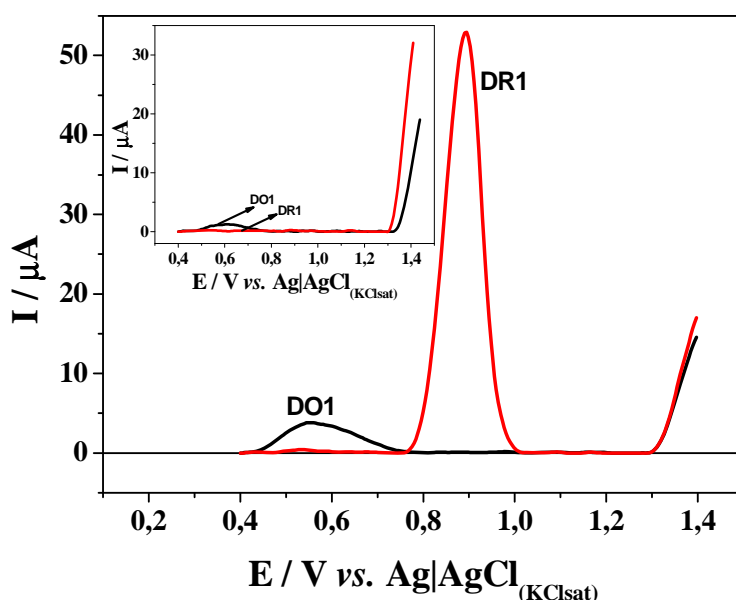


Figura 22: Voltamogramas de onda quadrada obtidos após acumulação do DO1 e do DR1 $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ por 60 s, após solubilização em 50% de AcN sobre PGE não-modificado. Inserção: voltamogramas de onda quadrada sobre PGE não-modificado após acumulação dos corantes, seguido de enxágue do eletrodo em acetonitrila. Condições voltamétricas: $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV, $\Delta E_s= 4$ mV.

4.2.3. Comportamento eletroquímico dos corantes DO1 e DR1 sobre PGE: eletrólises por oxidação e por redução.

Para determinar o potencial a ser aplicado durante a eletrólise de cada corante, um estudo por voltametria de onda quadrada foi conduzido tanto na varredura anódica quanto na varredura catódica, utilizando $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV e $\Delta E_s= 2$ mV. A Figura 23 apresenta os voltamogramas obtidos pela oxidação dos corantes DO1 (A) e DR1 (B). Observa-se a presença de um único pico anódico com intensidades de corrente máximas em +0,71 V para o DO1 (sendo este precedido por um ombro) e em +0,90 V para o DR1.

Com base neste resultado, definiram-se os potenciais no final de cada pico para realização das eletrólises por oxidação, sendo +1,0 V para o DO1 e +1,2 V para o DR1.

Para a redução dos corantes, os voltamogramas de onda quadrada são mostrados na Figura 24. Nota-se a presença de três picos de redução para cada composto, sendo estes em potenciais de -0,42 V, -0,78 V e -1,06 V para o DO1 (Figura 24A) e de -0,42 V, -0,75 V e -0,95 V para o DR1 (Figura 24B). Assim, definiram-se os potenciais de redução para eletrólises após o final do terceiro pico, sendo -1,15 V para o DO1 e -1,0 V para o DR1.

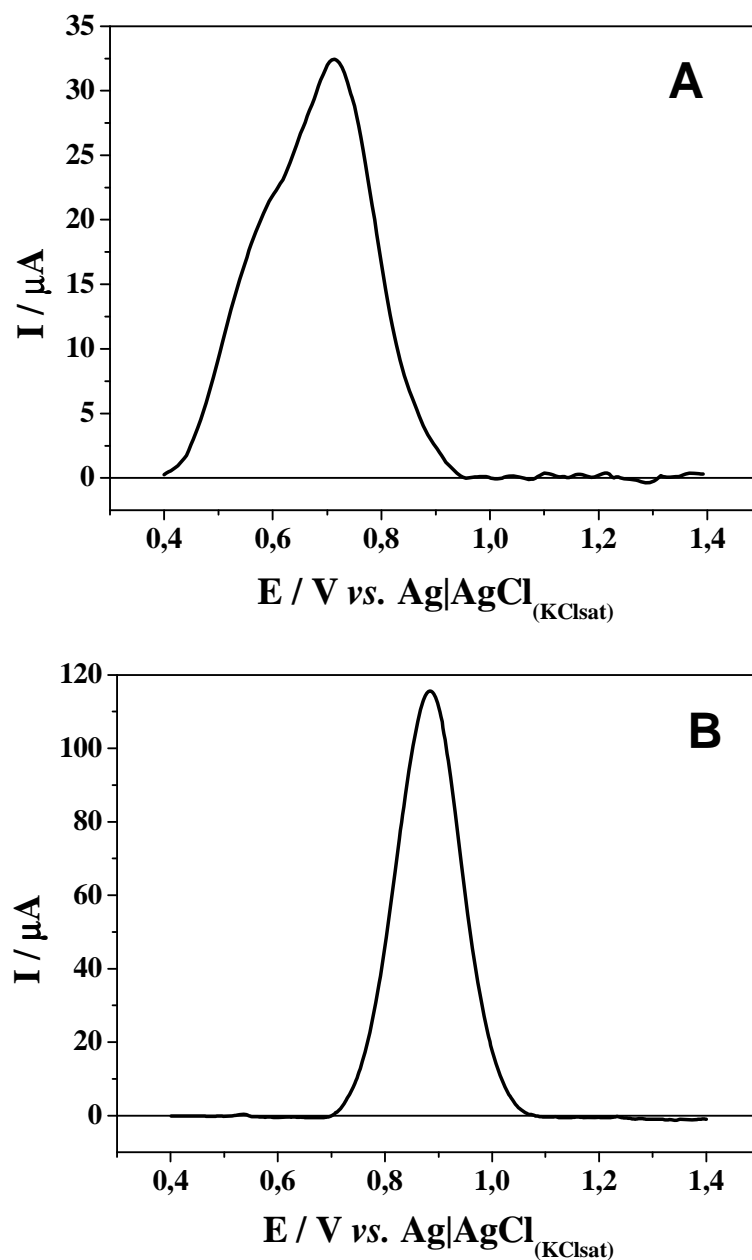


Figura 23: Voltamogramas de onda quadrada na direção anódica obtidos em solução $5,0 \times 10^5 \text{ mol L}^{-1}$ do corante DO1 (A) e DR1 (B) em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 como eletrólito de suporte, sobre PGE não-modificado. Condições voltamétricas: $f= 100 \text{ Hz}$, $a= 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s= 2 \text{ mV}$.

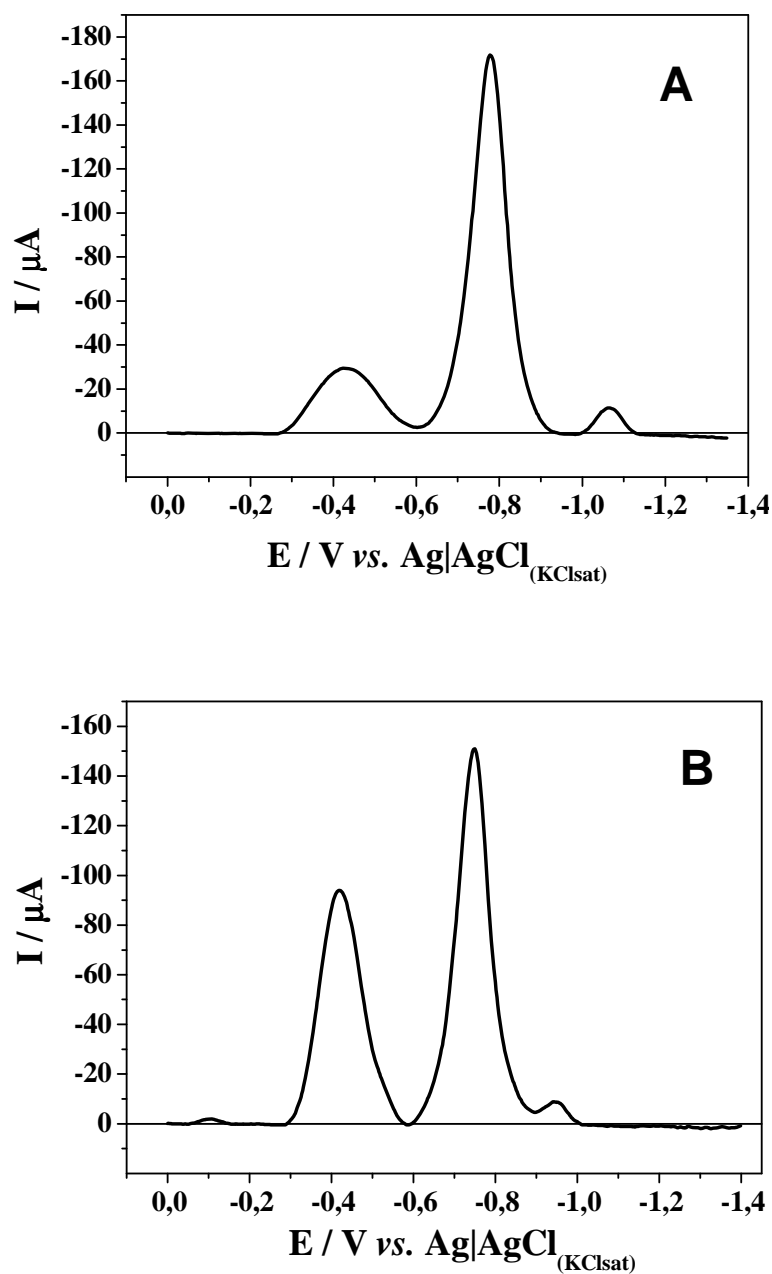


Figura 24: Voltamogramas de onda quadrada na direção catódica obtidos em solução $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do corante DO1 (A) e DR1 (B) em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 como eletrólito de suporte, sobre PGE não-modificado. Condições voltamétricas: $f= 100 \text{ Hz}$, $a= 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s= 2 \text{ mV}$.

4.2.3.1. Oxidação monitorada por espectroeletróquímica.

Eletrólises a potencial constante de +1,0 V e +1,2 V foram conduzidas para os corantes DO1 e DR1, respectivamente, e espectrofotometria UV-Vis foi utilizada para o monitoramento da eletrólise dos corantes a cada 10 min.

A Figura 25 apresenta os espectros UV-Vis obtidos a cada 10 min da eletrólise do corante DO1 em +1,0 V. Observa-se o decaimento de todas as bandas de absorção do corante com o aumento do tempo de eletrólise. Uma diminuição da absorbância até 40 min de eletrólise foi verificada para todas as bandas, sendo mais intensa em 475 nm que corresponde ao grupo cromóforo azo. Após 90 min de eletrólise ocorreu a supressão da banda do cromóforo (Inserção Figura 25).

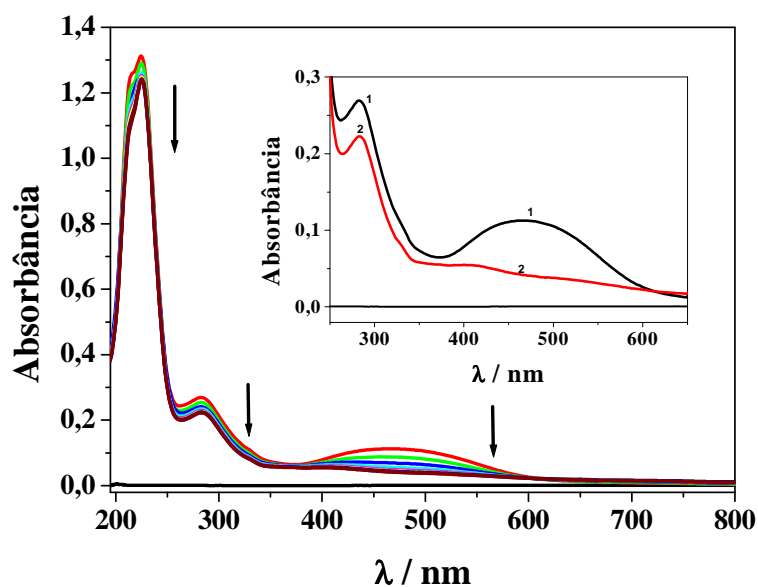


Figura 25: Espectros de absorção UV-Vis obtidos a cada 10 min de eletrólise a +1,0 V *vs.* Ag|AgCl_(KCl_{sat}) do corante DO1 sobre PGE em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. Inserção: linhas 1 e 2: antes e após 90 min de eletrólise, respectivamente.

Um voltamograma de onda quadrada foi obtido após a etapa de 90 min de eletrólise deste corante (Figura 26) e observou-se uma expressiva diminuição da intensidade de corrente de pico de oxidação do DO1, sem o aparecimento de novos picos.

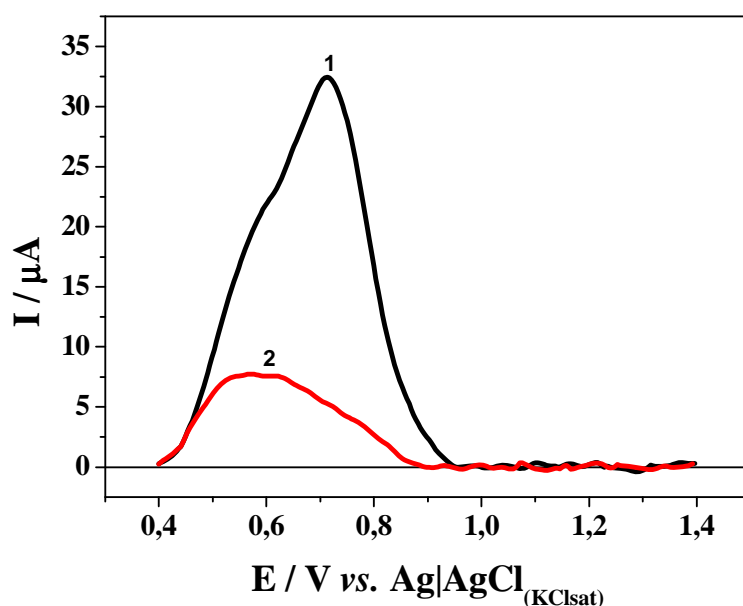


Figura 26: Voltamogramas de onda quadrada na direção anódica obtidos em solução $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} do corante DO1 antes (1) e após 90 min de eletrólise a +1,0 V (2) em solução tampão BR 0,1 mol L^{-1} pH 7,0 como eletrólito de suporte, sobre PGE. Condições voltamétricas: $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV, $\Delta E_s= 2$ mV.

Estudos similares foram conduzidos para o corante DR1. Pela observação dos espectros UV-Vis na Figura 27, verifica-se a diminuição de todas as bandas do composto com o aumento do tempo de eletrólise. A absorvância atingiu um valor mínimo em aproximadamente 120 min e não apresentou significativa variação em maiores tempos de eletrólise. No entanto, como é possível notar na inserção da Figura 27, neste caso não houve o total desaparecimento da banda referente ao grupo cromóforo em 415 nm.

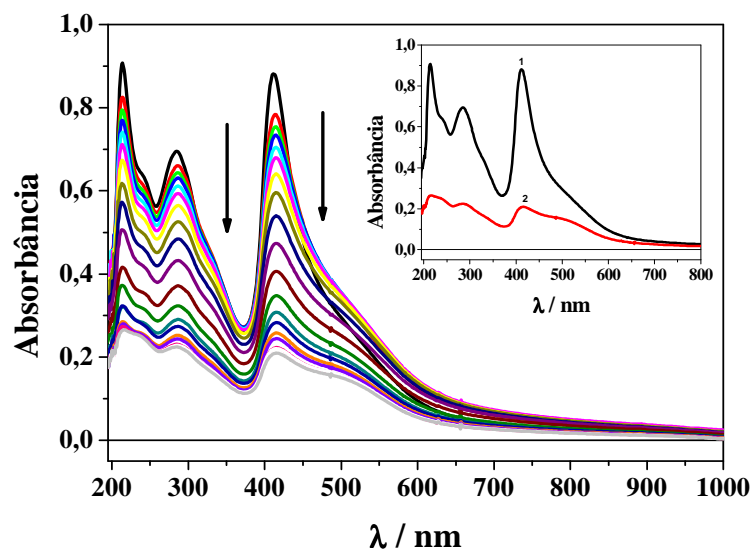


Figura 27: Espectros de absorção UV-Vis obtidos a cada 10 min de eletrólise a +1,2 V *vs.* Ag|AgCl_(KCl_{sat}) do corante DR1 sobre PGE em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. Inserção: linhas 1 e 2: antes e após 180 min de eletrólise, respectivamente.

O voltamograma de onda quadrada obtido após 180 min de eletrólise por oxidação do DR1, apresentado na Figura 28, mostra uma significativa diminuição da intensidade de corrente de pico de oxidação.

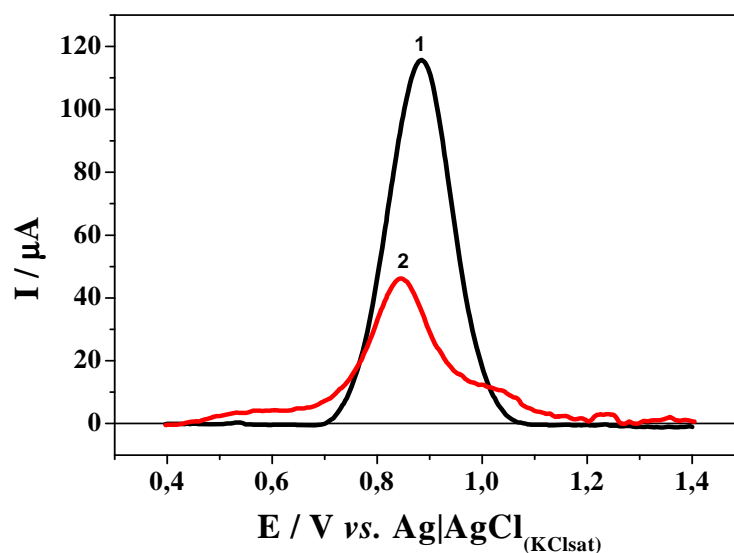


Figura 28: Voltamogramas de onda quadrada na direção anódica obtidos em solução $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ do corante DR1 antes (1) e após 180 min de eletrólise a +1,2 V (2) em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, sobre PGE. Condições voltamétricas: $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV, $\Delta E_s= 2$ mV.

4.2.3.2. Redução monitorada por espectroeletróquímica.

Na etapa de redução, eletrólises foram realizadas a cada 10 min pela aplicação de -1,15 V para o DO1 e -1,0 V para o DR1, sendo as etapas monitoradas por espectrofotometria UV-Vis.

Os espectros obtidos a cada 10 min de eletrólise do corante DO1 são mostrados na Figura 29. Observa-se que ocorreu o desaparecimento da banda de absorção do grupo cromóforo em 475 nm, o aumento da intensidade das bandas em 226 e 283 nm e o aparecimento de uma nova banda em 370 nm que aumentou com o tempo de eletrólise.

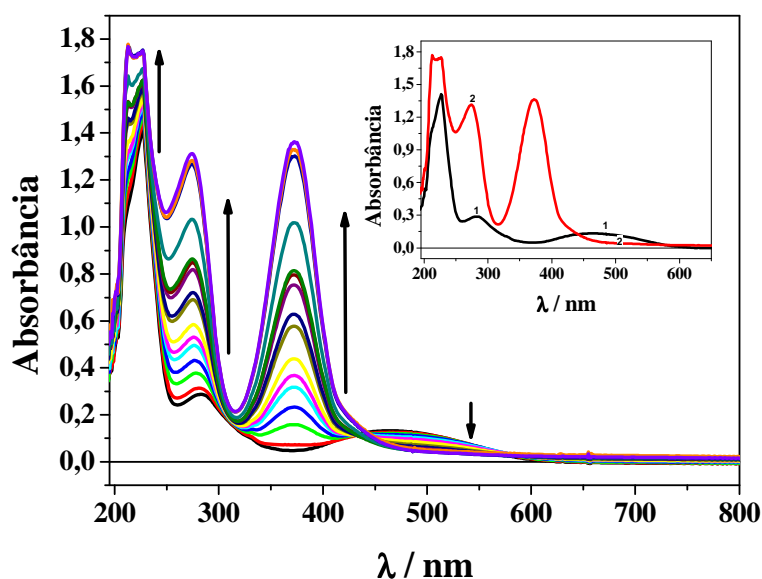


Figura 29: Espectros de absorção UV-Vis obtidos antes a cada 10 min de eletrólise a -1,15 V vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$ do corante DO1 sobre PGE em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. Inserção: linhas 1 e 2: antes e após 120 min de eletrólise, respectivamente.

A comparação entre os voltamogramas de onda quadrada obtidos antes e após a eletrólise, Figura 30, evidencia uma significativa variação na intensidade de corrente dos picos de redução. Adicionalmente, ocorreu um deslocamento de 100 mV para potenciais mais

positivos para o primeiro pico e um acoplamento do segundo e terceiro picos, ocasionando um deslocamento de 100 mV para potenciais mais negativos.

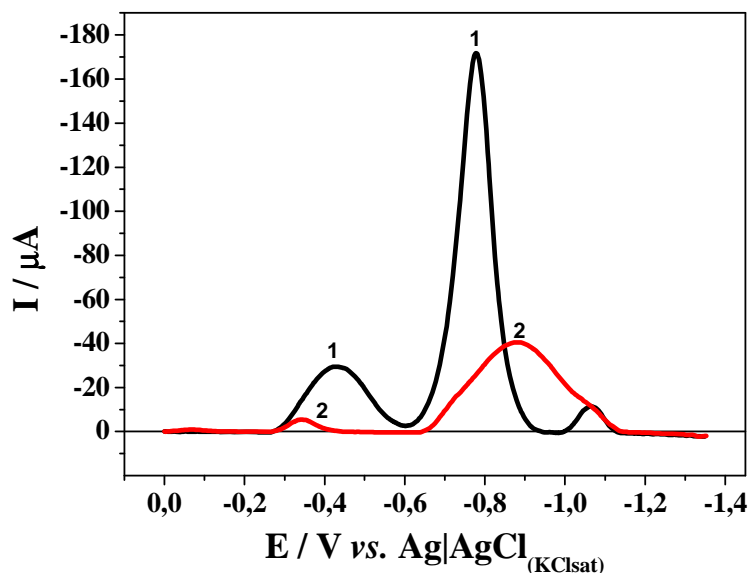


Figura 30: Voltamogramas de onda quadrada na direção catódica obtidos em solução $5,0 \times 10^{-5}$ mol L^{-1} do corante DO1 antes (1) e após 120 min de eletrólise a $-1,15$ V (2) em solução tampão BR $0,1$ mol L^{-1} pH 7,0 como eletrólito de suporte, sobre PGE. Condições voltamétricas: $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV, $\Delta E_s= 2$ mV.

Os experimentos de eletrólise do corante DR1 foram conduzidos de maneira similar ao corante DO1. A Figura 31 apresenta os espectros do DR1 obtidos a cada 10 min de eletrólise a $-1,0$ V por um tempo total de 120 min. Nota-se que houve uma diminuição da banda do cromóforo que se manteve constante em tempos maiores. As bandas em 209 e 272 nm sofreram um aumento da intensidade de absorbância. Assim como no caso do DO1, houve o surgimento da banda 370 nm que aumentou com o tempo de eletrólise. A banda referente ao grupo azo sofreu diminuição, no entanto, passou a ter interferência da banda em 370 nm em tempos maiores.

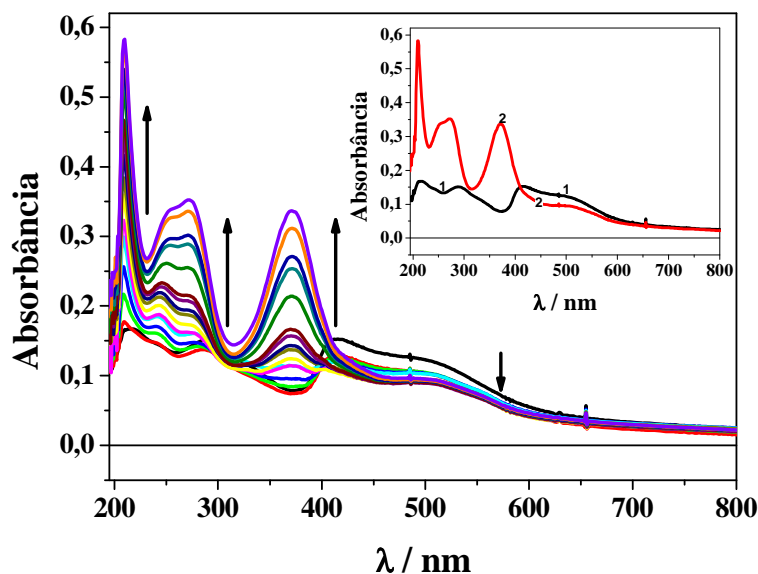


Figura 31: Espectros de absorção UV-Vis obtidos a cada 10 min de eletrólise a $-1,0$ V vs. $\text{Ag}|\text{AgCl}_{(\text{KCl}_{\text{sat}})}$ do corante DR1 sobre PGE em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0. Inserção: linhas 1 e 2: antes e após 120 min de eletrólise, respectivamente.

A Figura 32 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos antes e após a eletrólise por redução. Nota-se uma considerável diminuição do sinal do primeiro e do segundo pico e a total supressão do terceiro pico após 120 min de eletrólise.

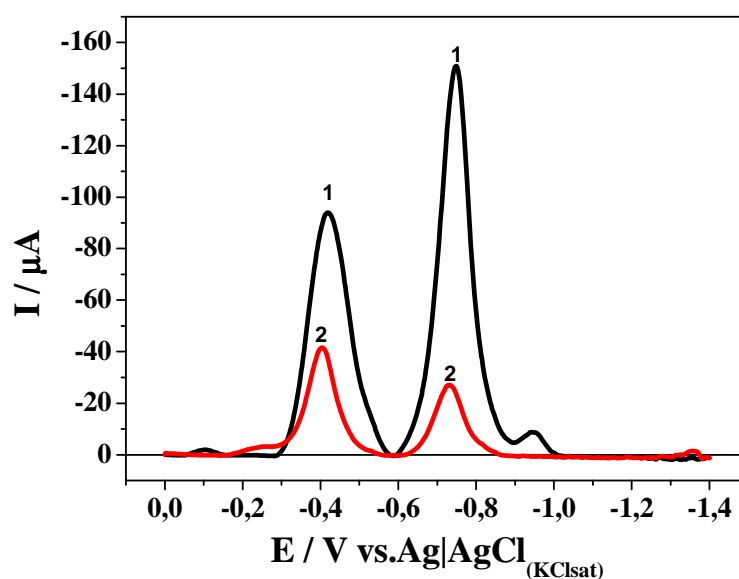


Figura 32: Voltamogramas de onda quadrada na direção catódica obtidos em solução $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ do corante DR1 antes (1) e após 120 min de eletrólise a $-1,0$ V (2) em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0, sobre PGE. Condições voltamétricas: $f= 100$ Hz, $a= 50$ mV, $\Delta E_s= 2$ mV.

Após a realização de eletrólises por oxidação e por redução dos corantes DO1 e DR1, experimentos foram conduzidos por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS). As soluções dos corantes em sua forma original e após as eletrólises foram submetidas ao processo de extração líquido-líquido com uma solução de diclorometano/ MeOH (2,5:1), a mistura foi levada ao vortex por 1 min. Após a separação de fases recolheu-se a fração orgânica que foi seca e ressuspensa em MeOH/ H₂O (90:10) com 0,1% de ácido fórmico. As soluções foram injetadas em um cromatógrafo Agilent Technologies 1200 Series equipado com um detector de UV Agilent 1260 DAD VL e auto injetor Agilent HiP-ALS, acoplado a um espectrômetro de massas (Applied Biosystems Sciex) 3200 Q TRAP LC/MS/MS System (híbrido triplo quadrupolo - Ion Trap linear) equipado com uma fonte Turbo Ion Spray (ESI), sendo a coluna Agilent - ZORBAX Eclipse XDB-C18 (4,6 x 150 mm; 5 µm). Uma análise preliminar dos resultados foi realizada (Apêndice A), no entanto, ainda serão necessárias interpretações mais aprofundadas que, provavelmente, fornecerão informações importantes para elucidar quais são os produtos gerados pelas eletrólises.

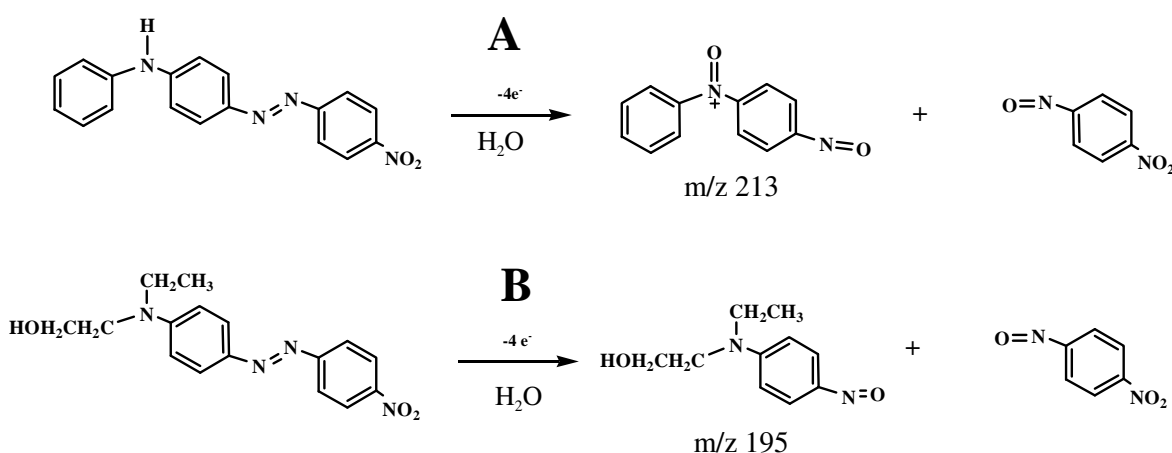
4.2.3.3. Considerações sobre o comportamento eletroquímico dos corantes.

Oxidação

Os resultados espectrofotométricos obtidos após as eletrólises por oxidação mostram o decaimento da banda referente ao cromóforo, sugerindo que o grupo azo sofra algum tipo de alteração. Osugi e col. [67] estudaram a oxidação de ambos os corantes em meio não-aquoso e sugeriram que ocorre a clivagem indireta do grupo azo via delocalização de elétrons. Chequer e col. [72] realizaram eletrólises do corante DR1 a potencial controlado, também em meio não-aquoso, e perceberam a diminuição da banda referente ao cromóforo. A análise dos

produtos da eletrólise por HPLC com detector de arranjo de diodo mostrou a presença de nitrobenzeno e 2-[(4-aminofenil)etilamino]-etanol, ambos produtos da clivagem da ligação azo. Uma avaliação da literatura mostrou que não existem estudos da oxidação dos corantes DO1 e DR1 em meio aquoso. No entanto, a oxidação química de compostos contendo grupo azo tem sido estudada [172,173].

Resultados preliminares obtidos por espectrometria de massas mostraram a detecção do íon 4-nitroso-N-oxo-N-fenilanelino no caso do DO1 (estrutura mostrada no Esquema 1A) e de 2-[etil(4-nitrosifenil)amino]etanol (estrutura mostrada no Esquema 1B). Considerando por meio dos voltamogramas de onda quadrada que a oxidação dos corantes ocorre em uma única etapa e também que há a diminuição da banda de absorção do cromóforo após a eletrólise, sugere-se que ocorra a oxidação do grupo amina dos corantes, promovendo a descoloração do corante devido à clivagem indireta do grupo azo através de delocalização de elétrons, levando a formação de derivados nitrosos. A facilidade para a oxidação de cada corante é dependente de sua estrutura química. O DO1 possui um grupo amina com substituinte desativador na molécula (fenil), requerendo um potencial menos positivo para ser oxidado, enquanto que o DR1 possui substituintes ativadores, sendo necessário um potencial mais alto de oxidação. O Esquema 1 sugere o mecanismo de oxidação dos corantes dispersos estudados.

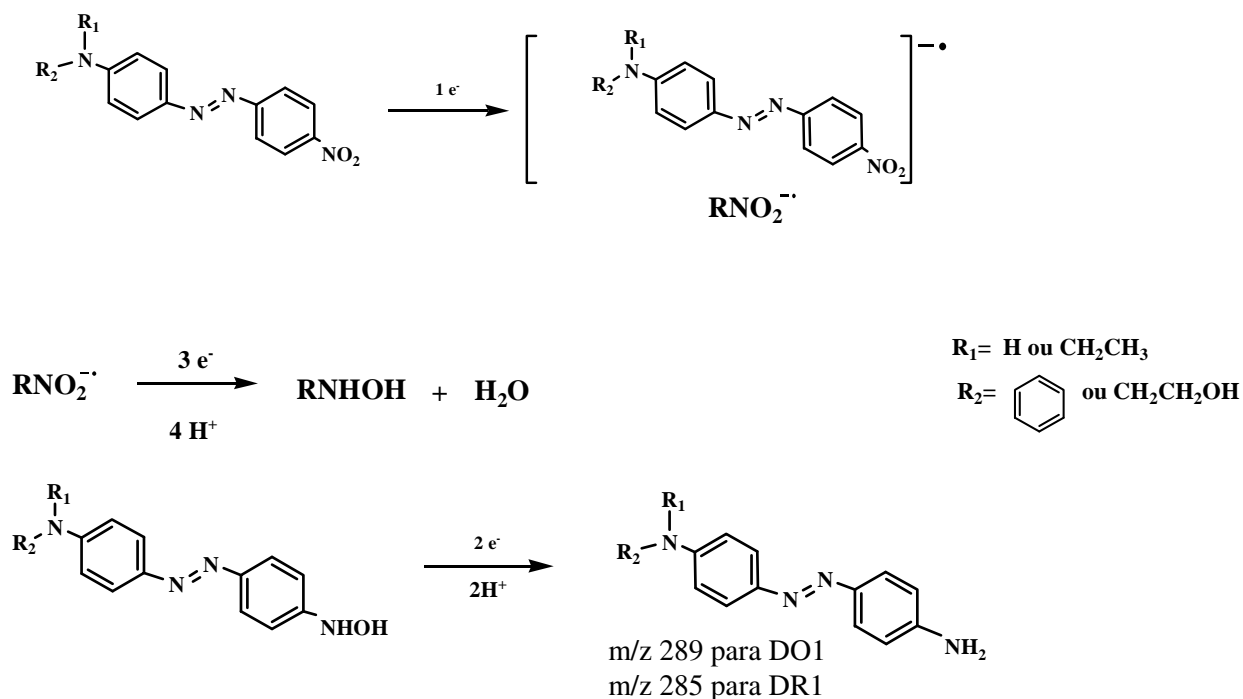


Esquema 1: Proposta de mecanismo de oxidação do corante DO1 (A) e DR1 (B).

Redução

Ambos os corantes possuem em sua estrutura os grupos nitro (-NO₂) e azo (-N=N-) passíveis de redução. De acordo com a literatura, o grupo nitro é mais suscetível à redução e nitrobenzenos apresentam dois picos de redução [174]. Assim, a primeira etapa do processo envolve a transferência de 1e⁻, levando a formação do nitro radical ânion RNO₂^{•-} [175]. Embora a primeira transferência eletrônica ocorra via grupo -NO₂, este elétron adicional poderia estar delocalizado sobre a molécula, incluindo a ligação -N=N-, aumentando a reatividade da molécula e causando a diminuição da banda de absorção do grupo azo em 475 nm e 415 nm para DO1 e DR1, respectivamente [176]. A formação do nitro radical ânion poderia ser responsável pelo aparecimento da banda de absorção em comprimento de onda de 370 nm, levando ao aumento da absorbância nessa região. Enquanto que para o DO1 essa banda apresenta uma alta intensidade de absorbância (em torno de 1,4 após 120 min), para o DR1 a banda em 370 nm apresenta baixa absorbância, cerca de 0,35 após 120 min de eletrólise. Isto indica que os substituintes que diferem na estrutura de ambas as moléculas, mostradas na Figura 4, apresentam forte influência na redução de cada composto. Esta condição se torna evidente quando se compara as intensidades da banda de absorção referente ao grupo cromóforo após cada eletrólise. Para o DO1, tal banda sofre total supressão após 60 min de eletrólise, enquanto que para o DR1 a banda em 415 nm ainda apresenta intensidade após a eletrólise por 120 min.

Após a formação do nitro radical ânion (RNO₂^{•-}), em meio de pH neutro, a molécula sofre uma redução adicional com a geração da hidroxilamina correspondente (RNHOH) [177]. A etapa seguinte da reação eletroquímica envolve a redução da hidroxilamina com formação da amina correspondente. Ambos os produtos (hidroxilamina e amina) foram detectados nos experimentos de espectrometria de massas. As reações envolvidas nesta etapa estão incluídas no Esquema 2.



Esquema 2: Proposta de mecanismo para a redução dos corantes DO1 e DR1.

É conhecido que a redução de compostos azoaromáticos envolvendo a quebra da ligação N=N é dificultada em meio neutro [178,179]. Em geral, a redução de azocompostos envolve dois elétrons com formação dos correspondentes hidrazos em meio ácido e quatro elétrons com quebra da ligação azo e formação das aminas correspondentes em meio básico [180-183]. A presença de grupos substituintes doadores de elétrons, como o grupo amino presente em ambos corantes, pode desestabilizar o hidrazo formado e promover a redução com geração de aminas em soluções fracamente ácidas [184]. Apesar disso, os resultados mostram que não ocorreu a quebra da ligação azo após a redução dos corantes.

Os espectros UV-Vis obtidos após redução do corante DO1 mostraram o desaparecimento da banda referente ao cromóforo e o aparecimento de uma banda em 370 nm que parece estar relacionada com o aumento da banda em 283 nm. Um comportamento análogo, embora menos pronunciado, foi encontrado para o DR1, com diminuição da banda do cromóforo, aparecimento da banda em 370 nm e aumento das bandas em 209 e 272nm.

Assim, o aparecimento da banda extra em 370 nm nos espectros de absorção dos corantes após a eletrólise por redução poderia ser atribuído aos produtos formados.

Paralelamente, um estudo do comportamento eletroquímico do DO1 sobre eletrodo de diamante dopado com boro (DDB) foi conduzido [185]. O corante, dissolvido em Fongranal[®] FB, foi analisado por voltametria de onda quadrada e voltametria cíclica na região catódica. Os voltamogramas apresentaram quatro picos catódicos irreversíveis, sendo três picos referentes ao corante e o quarto pico atribuído à redução do dispersante sobre o DDB. Os resultados indicaram que o dispersante forneceu um ambiente aquoso micelar que, neste caso específico, favoreceu a clivagem da ligação N=N, levando a formação de aminas aromáticas correspondentes.

Os resultados eletroquímicos e espectrofotométricos permitiram sugerir os produtos gerados pelas eletrólises tanto por oxidação como por redução dos corantes DO1 e DR1. Tais estudos poderiam indicar os possíveis compostos que possam ser produzidos durante a degradação dos corantes pela ação de enzimas do intestino humano, sugerindo a formação de compostos perigosos como derivados nitrosos e aminas aromáticas.

4.2.4. Comportamento eletroquímico dos flavonóides sobre PGE.

Após a imersão dos eletrodos não-modificados na solução de cada flavonóide, voltamogramas de onda quadrada foram obtidos em solução tampão Britton-Robinson pH 7,0 e são mostrados na Figura 33.

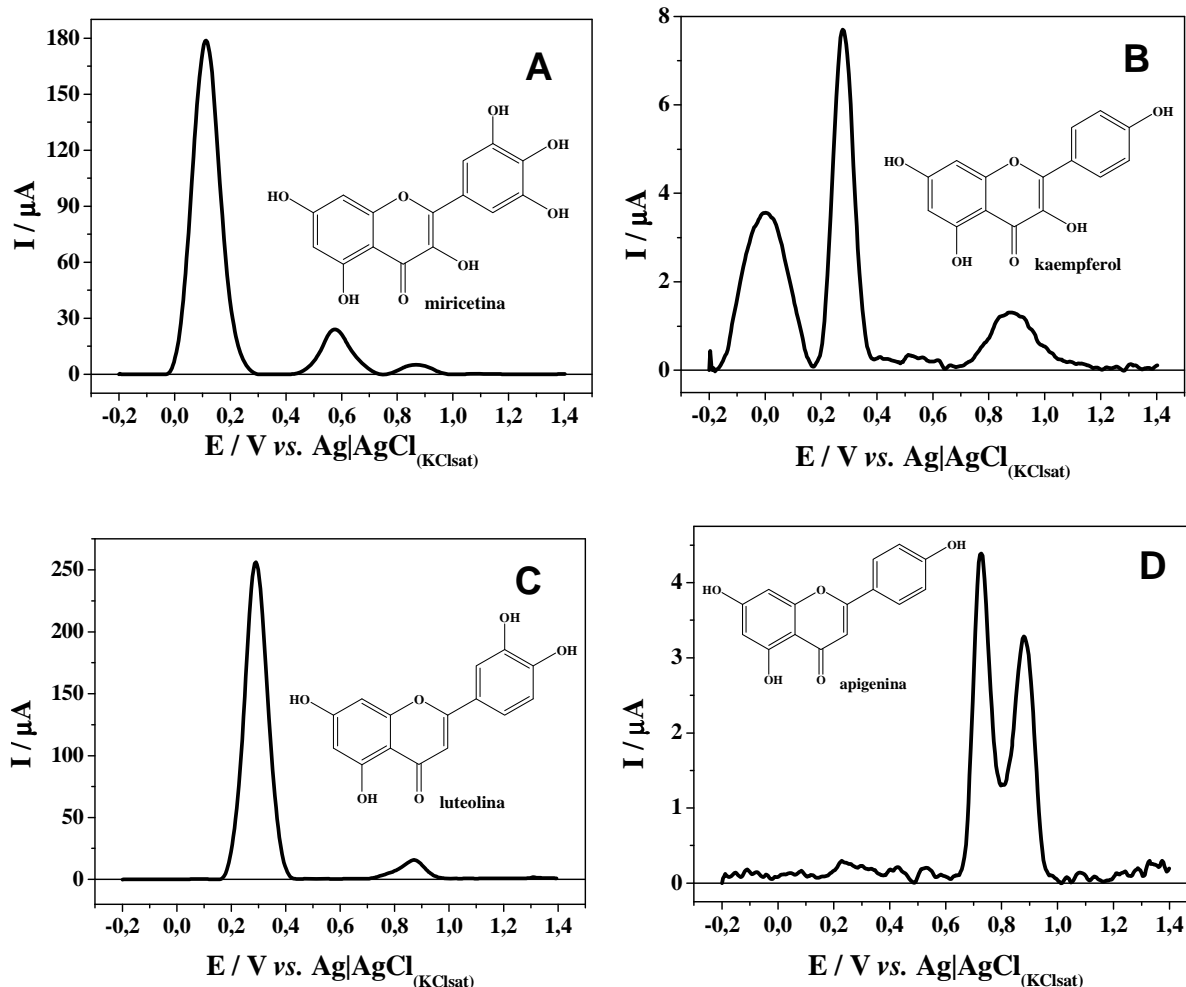


Figura 33: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 utilizando eletrodo não-modificado após imersão em solução dos flavonóides miricetina (A), kaempferol (B), luteolina (C) e apigenina (D), na concentração 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. Condições voltamétricas: $f=250$ Hz, $a=60$ mV, $\Delta E_s=4$ mV.

Por meio da Figura 33, é possível observar a presença de três picos anódicos para os flavonóis (miricetina e kaempferol) e dois picos anódicos para as flavonas (luteolina e apigenina).

O processo eletródico da miricetina ocorre devido a oxidação dos grupos 3',4'-dihidroxil no anel B e do kaempferol é atribuído à oxidação dos grupos 4-hidroxil no anel B, 3-hidroxil no anel C e 7-hidroxil no anel A. Os picos de oxidação da luteolina são atribuídos à oxidação dos grupos 3',4'-dihidroxil no anel B [186], enquanto que a apigenina sofre

oxidação dos grupos 4-hidroxil no anel B e 5-hidroxil no anel A [187]. Os prováveis produtos de oxidação dos flavonóides são mostrados na Figura 34.

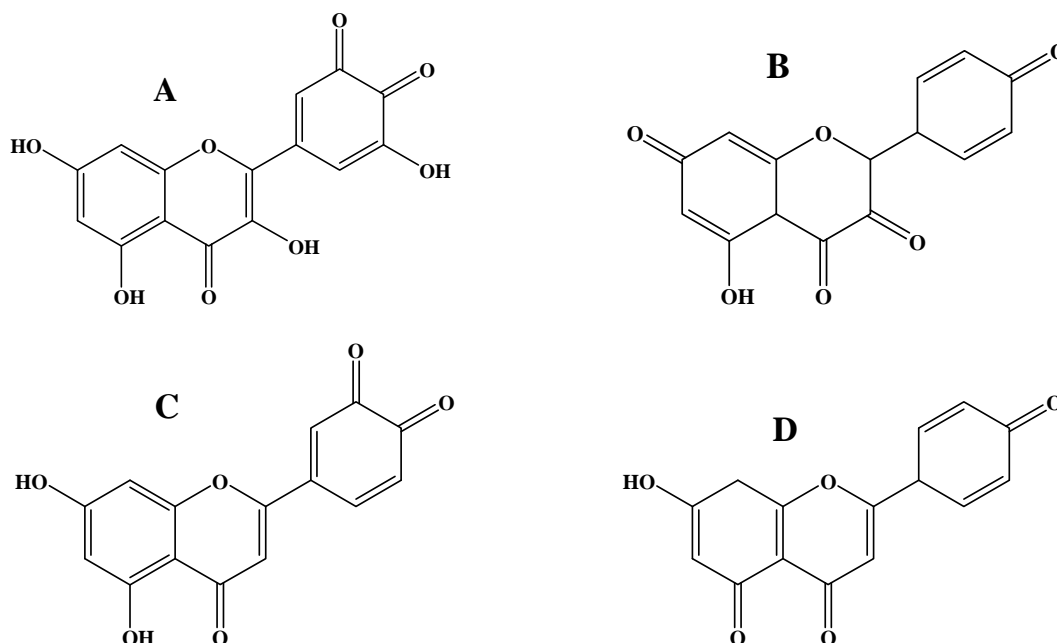


Figura 34: Estrutura dos possíveis produtos de oxidação dos flavonóides miricetina (A), kaempferol (B), luteolina (C) e apigenina (D).

Notou-se que, mesmo após enxágue dos eletrodos em solução tampão BR, houve a adsorção dos flavonóides diretamente sobre a superfície eletródica não-modificada. Os procedimentos de enxágue otimizados para os corantes DO1 e DR1 foram aplicados para cada flavonóide (sendo 30 s em 50% de ou 5 s em 100% de AcN, respectivamente) e, comparando-se as correntes dos picos mais intensos, observou-se uma diminuição de até 88% do sinal referente à miricetina, 45% ao kaempferol, 98% à luteolina e a total supressão dos picos referentes à oxidação da apigenina. Esses resultados indicam que o enxágue em AcN possibilita a remoção de grande parte dos flavonóides adsorvidos sobre o PGE, sendo que tais procedimentos foram aplicados nos estudos de interação com o DNA imobilizado.

Após os estudos dos reagentes (corantes e flavonóides) individuais em solução com PGE não-modificado, experimentos foram conduzidos para avaliar a interação desses compostos com o dsDNA imobilizado sobre a superfície dos eletrodos.

4.3. PARTE 3: APLICAÇÃO DO BIOCSENSOR NOS ESTUDOS DE INTERAÇÃO DNA:CORANTES E DNA:FLAVONÓIDES.

4.3.1. Variação do tempo de interação dos corantes DO1 e DR1 com dsDNA utilizando o biossensor.

Os biossensores foram colocados em contato com a solução de cada corante na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e variou-se o tempo de interação. Voltamogramas de onda quadrada foram registrados após cada interação e, a fim de compensar as eventuais diferenças nas propriedades individuais dos eletrodos modificados com DNA, o sinal referente à oxidação das bases foi expresso pela relação I/I_0 , no qual I_0 é a corrente de pico referente à oxidação dos resíduos de adenina (corrente máxima no voltamograma) antes das interações.

A Figura 35 apresenta a comparação dos voltamogramas antes e após a interação com cada corante. Observa-se uma diminuição na resposta voltamétrica da guanina e da adenina após interação com ambos os corantes, sendo mais intensa no caso de DR1. Nenhuma alteração nos potenciais de pico foi observada.

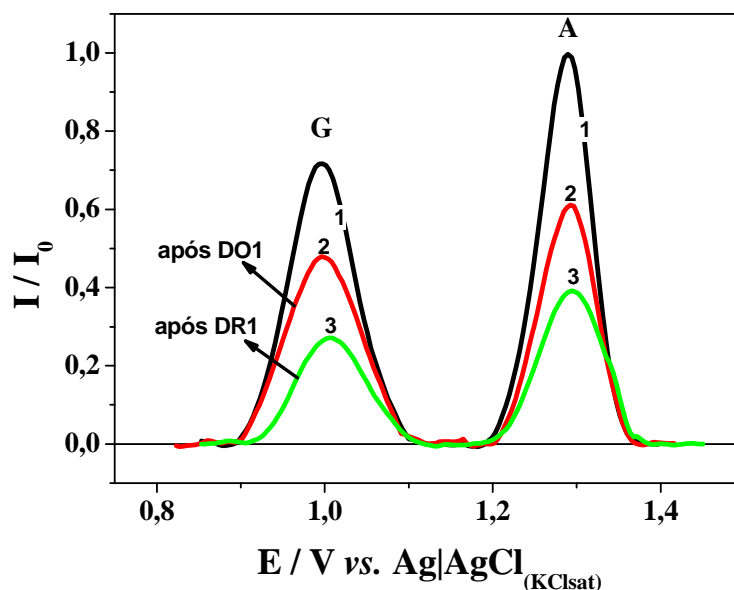


Figura 35: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR pH 7,0 com o biossensor antes (1) e após interação por 180 s com o corante DO1 (2) e DR1 (3), na concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, seguido dos procedimentos de enxágue dos eletrodos, sendo G o pico de oxidação da guanina e A o pico da adenina. Condições voltamétricas: $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$, $\Delta E_s= 4 \text{ mV}$.

A variação das intensidades de corrente normalizadas da guanina e da adenina em função de diferentes tempos de interação é mostrada na Figura 36. Nota-se que a interação é dependente do tempo e ocorre de modo não-linear. Significativa diminuição no sinal de oxidação das bases ocorreu até o tempo de 180 s e um ligeiro aumento do sinal das bases ocorreu em 300 s. Isto poderia ocorrer devido a um rearranjo da molécula do DNA após a interação, sendo que em tempos mais elevados a resposta permaneceu praticamente constante devido a uma estabilização da estrutura. Por conseguinte, o tempo de 180 s foi escolhido para a interação do DO1 e do DR1 com DNA.

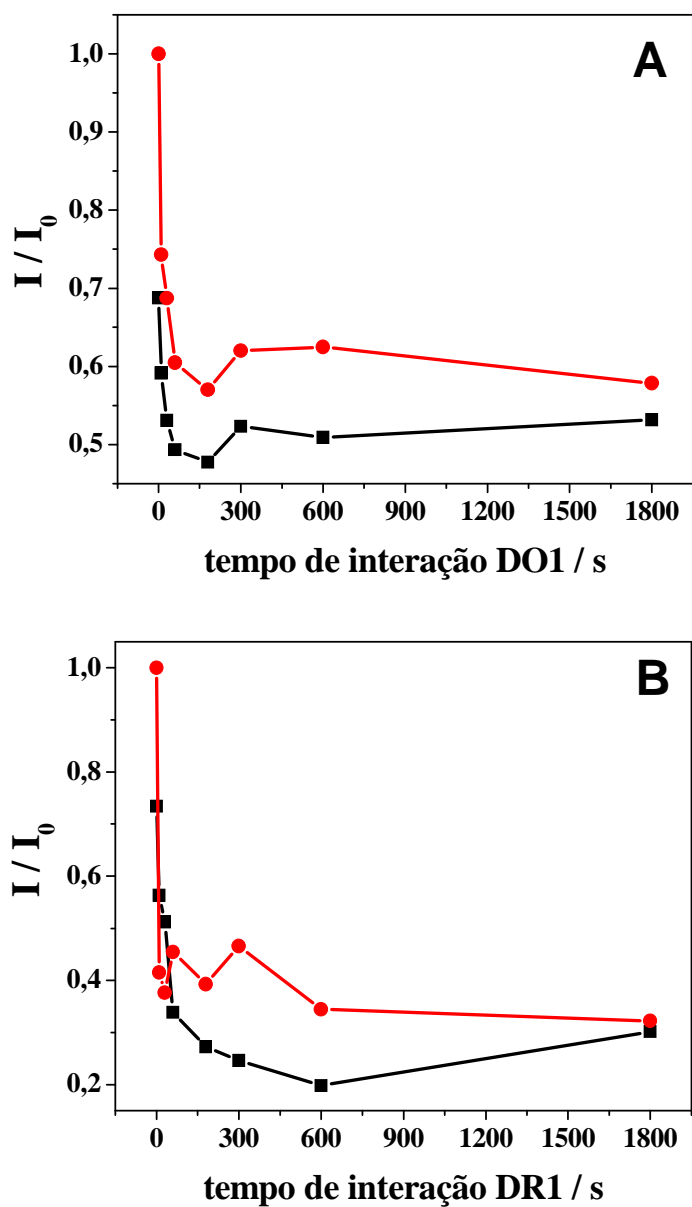


Figura 36: Dependência da intensidade da corrente de pico normalizada de oxidação da guanina (-■-) e da adenina (-●-) em função do tempo de interação do corante DO1 (A) e DR1 (B) em concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.2. Variação da concentração dos corantes DO1 e DR1 para interação com dsDNA utilizando o biossensor.

Após estabelecer o tempo de 180 s para a interação do DNA imobilizado sobre o eletrodo com a solução dos corantes, estudos foram conduzidos variando-se a concentração dos corantes, na faixa de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Após enxágue para retirada do corante adsorvido na superfície do eletrodo, voltamogramas de onda quadrada foram registrados. Como ilustrado na Figura 37, verificou-se que a corrente de pico de oxidação (I_p) da guanina e da adenina diminuiu com o aumento das concentrações de até $5,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o DO1 e até $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para o DR1. As intensidades de corrente atingiram um valor mínimo e não foram observadas variações significativas em níveis mais elevados de concentração de ambos os corantes. A variação do sinal voltamétrico das bases foi mais intensa para DR1 (sinais da guanina e adenina decresceram 48% e 51% do seu valor original, respectivamente), enquanto que na presença de DO1, as intensidades de corrente da guanina e adenina diminuiram 30% e 10% de seu valor original, respectivamente, quando comparada a mesma concentração dos corantes de $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Tais alterações dos sinais de oxidação da guanina e da adenina podem ser atribuídas à ligação dos corantes têxteis às bases do DNA imobilizado na superfície do PGE. Esta interação poderia levar a alterações conformacionais na estrutura da biomolécula, atenuando o sinal eletroquímico dos resíduos de guanina e adenina. Este fenômeno pode ser explicado como uma blindagem dos grupos oxidáveis dos resíduos das bases enquanto os corantes interagem com o dsDNA [28,139,147].

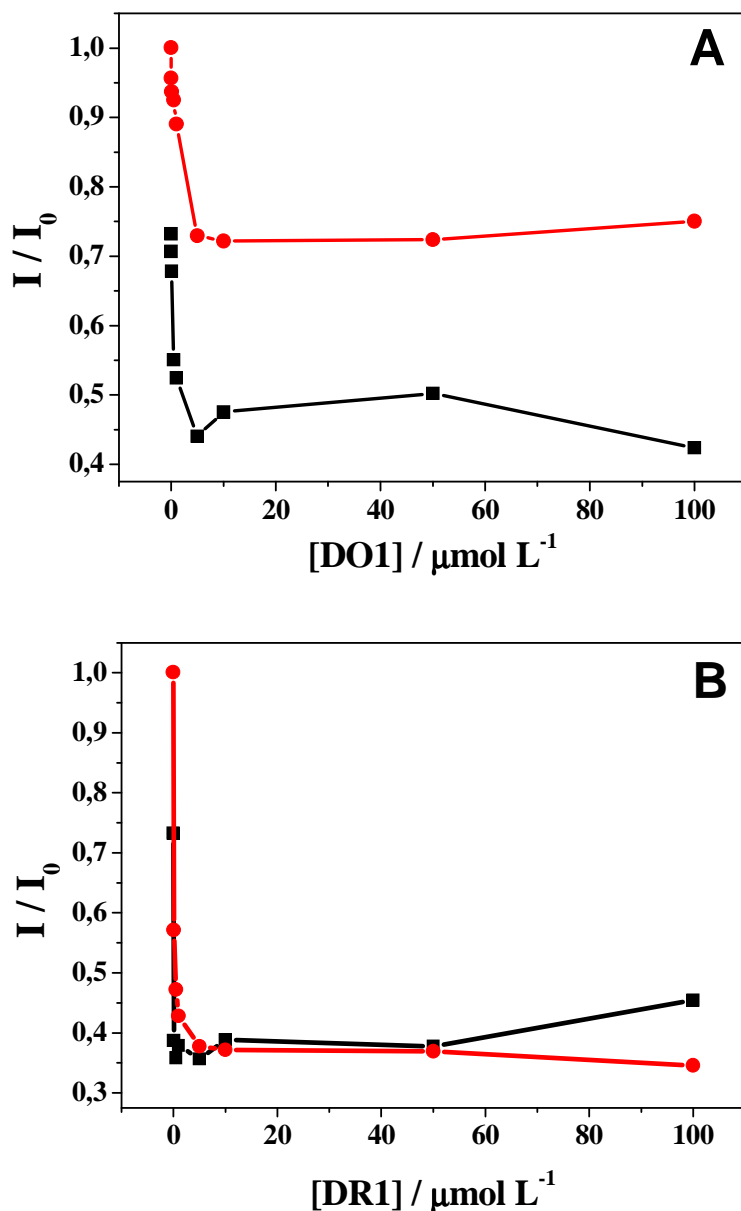


Figura 37: Dependência da corrente de pico normalizada de oxidação da guanina (-■-) e da adenina (-●-) em função de concentrações crescentes de DO1 (A) e DR1 (B), após o tempo de interação de 180 s no intervalo de concentração de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹.

A diferença de resposta eletroquímica do DNA quando se compara a interação com DO1 e DR1 pode estar relacionada com a estrutura química de cada corante. Ambos os corantes têm o mesmo grupo nitro como substituinte, mas a eletrofilicidade do grupo azo é reduzida no DO1 e a deslocalização de elétrons devido à presença do grupo fenil leva a uma

diminuição da densidade eletrônica do grupo nitro (Figura 4). Assim, um caráter eletrofílico maior de uma molécula pode aumentar a reação com sítios nucleofílicos do DNA [67], sendo esta característica responsável pelo DR1 causar dano mais intenso à biomolécula. Este resultado está de acordo com o estudo sobre a genotoxicidade do DO1 e DR1 desenvolvido por Osugi et al. [67]. Os autores demonstraram que o DR1 apresentou maior atividade mutagênica no teste de Ames, em comparação com DO1 e sugerem que a reatividade do grupo azo é um fator muito importante.

A constante de ligação dos corantes com DNA pode ser estimada quando a queda da corrente de pico tende a alcançar um valor de saturação, aplicando o método descrito por Banitaba e col. [188] e a Equação 2:

$$\frac{1}{I} = \frac{1}{I_{\text{sat}}} + \frac{1}{K_b I_{\text{sat}} C} \quad (\text{Equação 2})$$

na qual, I_{sat} , K_b e C são a corrente de saturação, a constante de ligação e a concentração do corante, respectivamente. Pelo gráfico de $1/I$ vs. $1/C$ obtém-se uma linha reta com $1/K_b I_{\text{sat}}$ como o coeficiente angular e $1/I_{\text{sat}}$ como o coeficiente linear. A partir desses valores, K_b e I_{sat} podem ser obtidas. O procedimento foi aplicado para os dois corantes, mas resultados consistentes foram obtidos apenas para DR1, sendo que os valores calculados para I_{sat} normalizada e K_b foram 0,35 e $8,78 \times 10^6 \text{ L mol}^{-1}$, respectivamente, utilizando valores referentes à oxidação da adenina.

Um estudo adicional foi conduzido para analisar a interação do corante DR1 com o dsDNA em solução por espectrofotometria UV-Vis na presença do dispersante Fongranal[®] FB [189]. Primeiramente o corante foi quantificado em águas provenientes dos rios Tietê e Jacaré-Guaçu e também em água de torneira. Em seguida, estudos de interação tanto com o corante quanto com o dispersante foram realizados. Os resultados indicaram que o corante na

presença do dispersante (DR1+dispersante) apresenta interação levando a efeitos de hipercromismo da banda referente ao DNA. O dispersante também apresentou interação com o DNA, embora tal interação tenha sido mais fraca, em comparação com o corante. A constante de ligação foi calculada por meio do gráfico $1/(A-A_0)$ vs. $1/[\text{DR1+dispersante}]$, na qual A_0 é a absorvância inicial em 260 nm do dsDNA livre e A é a absorvância do DNA na presença de diferentes concentrações do corante, sendo que o valor encontrado foi de $3,11 \times 10^5 \text{ L mol}^{-1}$.

O valor da constante de ligação encontrado pelo método eletroquímico foi mais elevado do que a encontrada nos estudos espectrofotométricos, provavelmente devido a efeitos do dispersante. Segundo Palchauthuri e Hergenrother [190], constantes de ligação da ordem de 10^5 a $10^{11} \text{ L mol}^{-1}$ resultam de interações por meio de intercalação. Embora a intercalação tenha sido associada a moléculas que contenham estruturas de anéis fundidos, intercaladores atípicos com sistemas de anéis não fundidos também pode ocorrer, o que poderia ser o caso dos corantes DO1 e DR1.

Para se obter maiores informações sobre as interações dos corantes com DNA, um estudo utilizando seus produtos de eletrólise por oxidação e por redução foi realizado.

4.3.3. Estudo da interação dos produtos de eletrólises por oxidação e por redução dos corantes DO1 e DR1 com dsDNA utilizando o biossensor.

Os corantes na concentração de $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foram submetidos a eletrólises a potencial controlado para oxidação e para a redução de cada corante, individualmente. Os eletrodos modificados com dsDNA foram imersos durante 180 s na solução dos produtos gerados e os voltamogramas de onda quadrada obtidos no estudo são apresentados na Figura 38A para DO1 e Figura 38B para DR1.

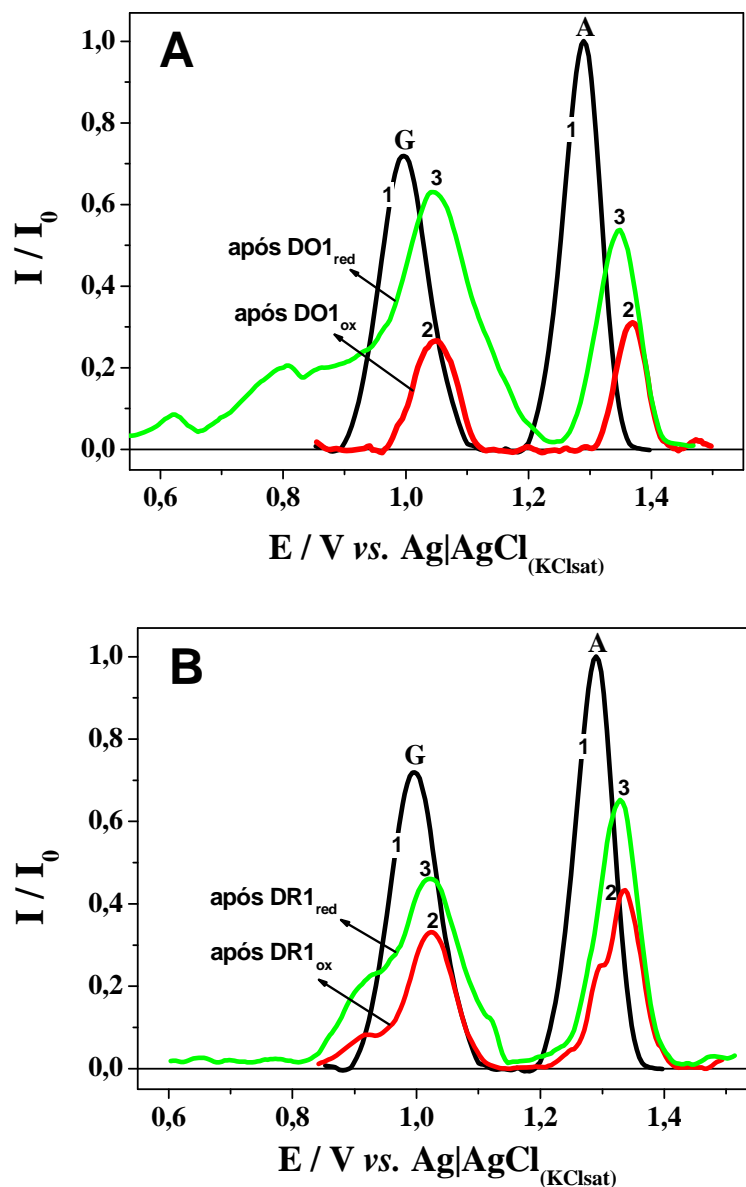


Figura 38: Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor antes (1) e após interação por 180 s com o produto da eletrólise por oxidação (2) e por redução (3) do corante DO1 (A) e DR1 (B) em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0, sendo G o pico de oxidação da guanina e A o pico da adenina. Condições voltamétricas: $f=250$ Hz, $a=60$ mV, $\Delta E_s=4$ mV.

A diminuição da intensidade da corrente das bases foi mais pronunciada após a interação com os corantes oxidados (linha 2, Figura 38) quando comparada com os corantes reduzidos (linha 3, Figura 38). Ao contrário dos corantes em sua forma original, na qual o

DR1 causou maior diminuição das correntes de pico das bases, o decréscimo do sinal voltamétrico foi maior após a interação com o DO1 oxidado ($DO1_{ox}$) em comparação com o DR1 oxidado ($DR1_{ox}$). Para $DO1_{ox}$, a diminuição da I_p inicial da guanina e da adenina foi de 65% e 68%, respectivamente, e para $DR1_{ox}$ foi de 55% e 57%, respectivamente. No que diz respeito à interação com os corantes após redução, a diminuição da I_p da guanina foi de 12% para DO1 reduzido ($DO1_{red}$) e 35% para DR1 reduzido ($DR1_{red}$) e a diminuição da I_p da adenina foi 46% e 36% para $DO1_{red}$ e $DR1_{red}$, respectivamente.

Um aspecto interessante é o aparecimento de dois picos (em +0,62 V e +0,80 V) no voltamograma após a interação com $DO1_{red}$, um pico (em +0,92 V) após $DR1_{red}$ e dois picos (em +0,92 V e +1,30 V) após $DR1_{ox}$. Nenhum pico adicional foi observado após a interação com $DO1_{ox}$.

De acordo com a literatura [28,108,119], o aparecimento de um sinal que não é produzido pelo DNA sem interação pode ser um indicativo de danos no DNA, uma vez que alguns produtos advindos de danos às bases produzem respostas eletroquímicas que diferem dos sinais da base sem lesão. Um tipo de dano que pode fornecer novas respostas eletroquímicas é a formação de adutos [191]. É importante mencionar que os procedimentos de enxágue foram realizados para se certificar de que esses novos picos não sejam referentes às respostas do produto de eletrólises sobre PGE. Outra evidência de dano ao DNA é a ocorrência de deslocamento nos potenciais de pico das bases [108]. Deslocamentos para valores mais positivos foram observados, sendo estes mais pronunciados para o DO1 reduzido e oxidado (6,0 mV para guanina e 8,0 mV para adenina), em comparação com DR1 após as eletrólises (3,0 mV e 5,0 mV para guanina e adenina, respectivamente). A mudança nos potenciais de pico para valores mais positivos pode ocorrer quando moléculas de baixo peso molecular interagem com o DNA devido à intercalação [124, 145].

Com o intuito de se obter maiores informações sobre as interações DNA:corantes, um estudo por espectrofotometria UV-Vis em solução foi conduzido.

4.3.4. Estudo da interação dos corantes DO1 e DR1 e seus produtos de eletrólise com DNA em solução por espectrofotometria UV-Vis.

Experimentos de interação com DNA foram conduzidos por espectrofotometria UV-Vis com os corantes DO1 e DR1 em suas formas originais e após as eletrólises por oxidação e redução. Espectros foram obtidos utilizando a solução da mistura DNA:corante por diferentes tempos de interação até atingir 60 min. Considerando que ambos corantes individualmente apresentam bandas de absorção na mesma região que o DNA, um procedimento matemático de subtração do espectro referente ao corante individual (ou corante após eletrólise) foi aplicado aos espectros da mistura com o DNA [189].

A Figura 39 mostra os espectros resultantes do DNA após a interação com DO1, DR1, DO1_{ox}, DR1_{ox}, DO1_{red} e DR1_{red}. As variações da absorbância do DNA em 260 nm em função do tempo de interação estão incluídas nas inserções da Figura 39.

Diferentes efeitos de hipercromismo e hipocromismo na banda do DNA foram observados após interação com os corantes originais e após eletrólises. Um aumento em torno de 10% na absorbância em 260 nm foi observado após 10 min de interação com o corante DO1, caracterizando hipercromismo (Figura 39A). Um efeito contrário ocorreu para DO1_{ox}, no qual a absorbância em 260 nm sofreu uma redução de cerca de 33% após 10 min (hipocromismo) (Figura 39C), e para o DO1_{red}, em que a diminuição da absorbância foi de 25% após o primeiro minuto (Figura 39E). Não foram detectadas alterações significativas no valor de absorbância em maiores tempos de interação com DO1_{ox} ou DO1_{red}.

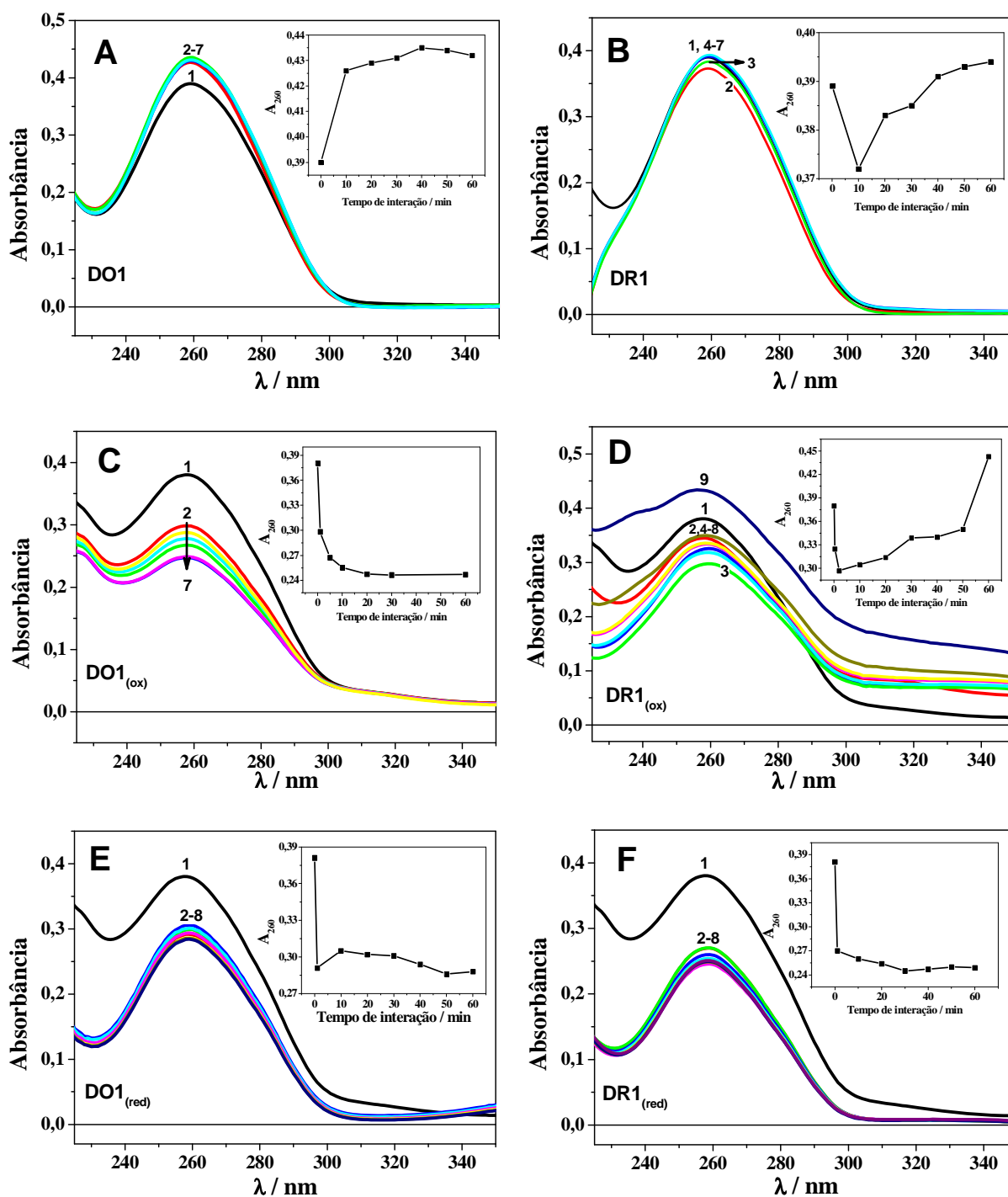


Figura 39: Espectros UV-Vis da solução de dsDNA $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$ antes (1) e após interação (outros espectros) com corantes DO1 (A), DR1 (B), DO1_{ox} (C), DR1_{ox} (D), DO1_{red} (E) e DR1_{red} (F). Inserções: variação da absorvância do dsDNA em 260 nm em função do aumento do tempo de interação com corantes em sua forma original ou após eletrólises. A absorvância de cada corante foi subtraída dos espectros da mistura DNA:corante ou DNA:produto de eletrólise.

No caso do DR1, após 10 min de interação houve uma diminuição negligenciável na absorvância do DNA (cerca de 5%), seguida de um pequeno aumento até 60 min (Figura 39B). Variação mais intensa na absorvância do dsDNA foi observada no estudo envolvendo o DR1 na presença do dispersante Fongranal[®] FB [189]. Comportamento similar ocorreu após interação com DR1_{ox} (Figura 39D) porém com maiores variações. A absorvância diminuiu aproximadamente 20% em 10 min (hipocromismo) e no final de 60 min, o sinal foi cerca de 15% superior ao valor inicial (hipercromismo). Por outro lado, após a interação com DR1_{red} (Figura 39F), uma diminuição da absorvância de 32% ocorreu em 10 min e permaneceu praticamente constante após tempos de interação mais longos.

Alterações nas intensidades de absorvância (efeitos hipercrômicos e hipocrômicos) estão relacionadas com as características e a estrutura de dupla hélice do DNA. Mudanças no espectro refletem alterações correspondentes na conformação do DNA e a sua estrutura após a interação com outras moléculas [192]. O hipocromismo pode resultar de danos à estrutura de dupla hélice do DNA, sendo que a intercalação envolvendo uma interação entre anéis aromáticos de moléculas e os pares de bases de DNA podem levar a uma diminuição da absorvância [193-195]. O hipercromismo, principalmente devido ao aumento na absorvância em 260 nm sem efeito hipsocrômico (deslocamento da banda para comprimentos de onda mais baixos), pode ser atribuído à ruptura de ligações de hidrogênio entre cadeias complementares, devido a intercalações que conduzem à abertura da dupla hélice [195,196].

Com base nos resultados obtidos por eletroquímica e espectrofotometria, há indícios de que o tipo de interação dos corantes com DNA seja por intercalação na fita dupla. A intercalação pode resultar da inserção de um substituinte aromático planar entre os pares de base do DNA com concomitante descontracção e alongamento da hélice [197]; os corantes dispersos azo apresentam a forma planar trans como a mais estável, sendo que o ângulo de ligação carbono-nitrogênio é de aproximadamente 120° [198]. No entanto, para se confirmar o

tipo de ligação, são necessários estudo mais aprofundados, como por dicroísmo linear e também pela medida da viscosidade do DNA na presença dos corantes.

Apesar da simples intercalação de compostos não ser o fator principal que leva à genotoxicidade, a ação de intercaladores pode induzir mudanças estruturais no DNA, incluindo a abertura da dupla hélice e o alongamento da cadeia de DNA. Estas modificações estruturais podem levar ao retardo ou à inibição da transcrição e replicação, o que confere aos intercaladores um potencial mutagênico e carcinogênico [199].

Embora DO1 e DR1 possuam estruturas muito semelhantes, é evidente que os diferentes grupos substituintes das moléculas apresentam influência sobre como ocorre a interação com o dsDNA. Além disso, os produtos da eletrólise também desempenham diferentes papéis na interação com a molécula de DNA. Portanto, os resultados obtidos por estudos de UV-Vis estão em concordância com os resultados eletroquímicos e demonstram que ambos os corantes e os respectivos produtos de eletrólise interagem com DNA. Estes resultados estão publicados na *Sensors and Actuators, B* [200].

Como anteriormente citado, os corantes DO1 e DR1 apresentaram resultados positivos em estudos de mutagenicidade e genotoxicidade [67-72] e, os presentes resultados eletroquímicos utilizando o biossensor e os espectrofotométricos mostraram que tais corantes causam mudanças na molécula de DNA.

Com o objetivo de se avaliar o desempenho do biossensor desenvolvido frente à interação com corante não mutagênico, um estudo foi conduzido utilizando o corante Reativo Blue 15.

4.3.5. Teste de interação do dsDNA imobilizado com corante não-mutagênico.

Estudos sobre a mutagenicidade do corante têxtil Reativo Blue 15 (RB15) foram realizados pelo laboratório da Prof^a Dr^a Danielle de Palma Oliveira por meio do teste de Ames e ensaio cometa. Os resultados (ainda não publicados) indicaram que este corante não é mutagênico.

Assim, um estudo de interação do dsDNA imobilizado sobre PGE foi conduzido com o corante RB15 utilizando os mesmos procedimentos descritos para os corantes DO1 e DR1. O corante RB15 pertence à classe dos reativos que contém um grupo eletrofílico (reativo) capaz de formar ligação covalente com grupos hidroxila das fibras celulósicas, com grupos amino, hidroxila e tióis das fibras protéicas e também com grupos amino das poliamidas [48]. A Figura 40 apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos antes e após a interação do dsDNA com o corante na concentração $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ por 180 s, bem como a estrutura química do RB15. Pode-se observar que a diminuição da intensidade de corrente da guanina foi de apenas 13%, enquanto que não houve variação da intensidade de corrente da adenina após a interação com RB15. Os corantes DO1 e DR1 na mesma concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, mostrados na Figura 35, causaram mudanças muito mais significativas no perfil voltamétrico do dsDNA. Assim, tal resultado indica que o corante não-mutagênico RB15 não tem interação com o dsDNA imobilizado sobre PGE e também que é possível fazer uma correlação entre os estudos de mutagenicidade e eletroquímicos. Além disso, mostra a aplicabilidade do biossensor voltamétrico desenvolvido.

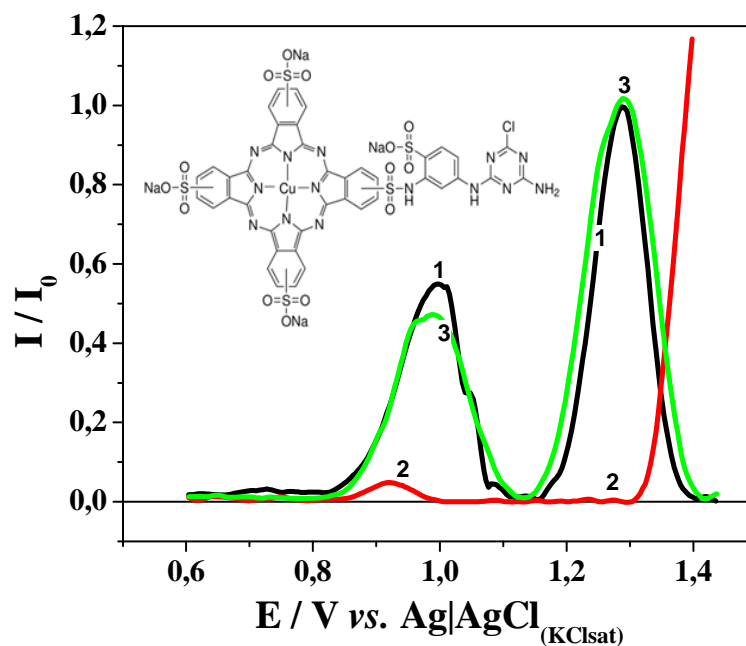


Figura 40: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 com eletrodos modificados com dsDNA antes da interação (1), não-modificado após adsorção do corante RB15 (2) e modificado com dsDNA após interação por 180 s com o corante RB15 (3). Inserção: estrutura química do corante RB15. Condições voltamétricas: $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$, $\Delta E_s= 4 \text{ mV}$.

4.3.6. Avaliação da interação dos flavonóides miricetina, kaempferol, luteolina e apigenina e de chás com DNA utilizando o biossensor.

Com o intuito de se avaliar a resposta eletroquímica do dsDNA após interação com os flavonóides miricetina, kaempferol, luteolina e apigenina em baixa concentração, os biossensores foram imersos por 180 s em solução contendo $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de cada flavonóide. A Figura 41 mostra as intensidades de corrente normalizadas das bases antes e após a interação com cada flavonóide.

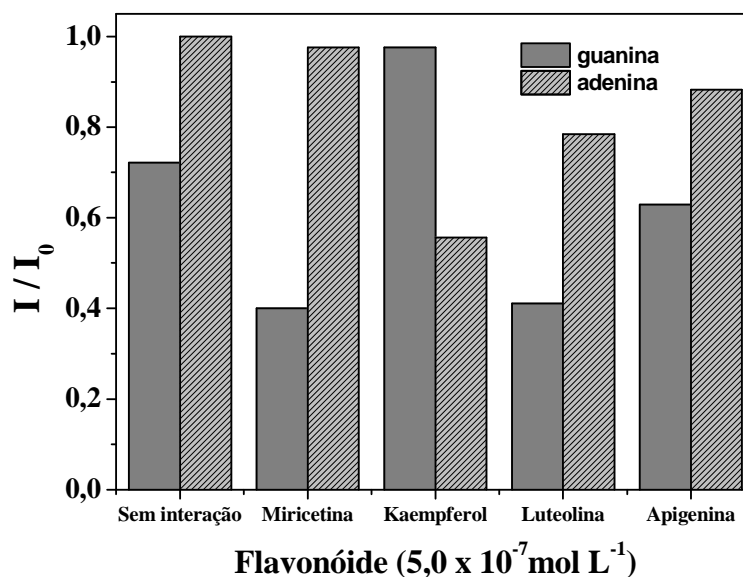


Figura 41: Variação da intensidade da corrente de pico normalizada das bases guanina (■) e adenina (▨) após a interação com os flavonóides na concentração $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ por 180 s.

A comparação das intensidades de corrente das bases mostra que após a interação do dsDNA com (i) miricetina: houve um decréscimo na corrente da guanina mas não houve alteração significativa da intensidade de corrente da adenina; (ii) kaempferol: um aumento na I_p da guanina foi observado, provavelmente devido a adsorção do flavonóide sobre o eletrodo, visto que este composto apresenta um pico na mesma região de potencial. Por outro lado, a I_p da adenina sofreu uma diminuição de aproximadamente 45% do valor inicial; (iii) luteolina: a intensidade de corrente da guanina diminuiu similarmente ao ocorrido após interação com a miricetina, no entanto, a diminuição da corrente de pico da adenina foi mais intensa e (iv) apigenina: pequena diminuição da intensidade de corrente de ambas as bases, sendo de 12% para a guanina e de 11% para a adenina.

A estrutura planar dos flavonóides permite que tais compostos se insiram entre os pares de base da dupla hélice do DNA, interagindo por intercalação [199] e levando a uma diminuição da intensidade de corrente das bases, dependendo das condições e da concentração dos compostos. Mesmo em baixas concentrações, os flavonóides kaempferol e luteolina

apresentaram significativa interação com o DNA. Deste modo, os estudos de interação utilizando corante:flavonóide foram conduzidos utilizando a miricetina e a apigenina, que resultaram em menor interação com o DNA imobilizado.

Diversas são as fontes naturais de flavonóides, entre elas os chás [78]. Os chás verde (*Camellia sinensis*) e de camomila (*Matricaria chamomilla L.*) foram então testados, uma vez que são fontes de miricetina e apigenina, respectivamente [201,202]. Inicialmente, os eletrodos sem modificação foram imersos por 180 s na solução dos chás verde e camomila após diluição em 200x, seguido de obtenção dos voltamogramas de onda quadrada somente em solução tampão BR pH 7,0 nas condições otimizadas da SWV, sendo $f = 250$ Hz, $a = 60$ mV, $\Delta E_s = 4$ mV, mostrados na Figura 42. Dois picos em +0,65 V e em +0,87 V podem ser vistos para o chá verde (Figura 42, linha 1) e dois picos em +0,52 V e +0,75 V são observados no voltamograma do chá de camomila (Figura 42, linha 2). Como nenhum dos picos interfere no sinal analítico das bases do DNA imobilizado, partiu-se para os estudos de interação DNA:chá. Os voltamogramas de onda quadrada obtidos antes e após a interação do DNA imobilizado sobre PGE com as amostras de chá verde e chá de camomila são ilustrados na Figura 43A e Figura 43B, respectivamente. Uma variação negligenciável da intensidade de corrente da guanina foi observada, enquanto que uma diminuição de aproximadamente 50% do valor inicial da corrente referente à adenina ocorreu após a interação com chá verde. Nota-se também um intenso pico em +0,71 V que se refere ao processo eletródico do chá verde após sofrer deslocamento de potencial devido à modificação do eletrodo, comparado ao PGE não-modificado. Com relação à interação com o chá de camomila, ocorreu um aumento de cerca de 20% do sinal da guanina e um alargamento do pico; a intensidade de corrente da adenina sofreu uma diminuição de apenas 15%. O pré-pico que pode ser visto em +0,83 V ocorre devido à oxidação do chá de camomila, que também sofreu deslocamento de potencial, assim como o chá verde, devido ao eletrodo estar modificado com o DNA. Portanto, pode-se

dizer que os chás interagem com a molécula do DNA imobilizado, sendo que a maior variação foi observada na adenina após interação com o chá verde. Os chás em geral apresentam uma mistura de diversas substâncias, incluindo diferentes compostos fenólicos. Ainda que a amostra de chá esteja diluída 200x, a concentração total de flavonóides presentes pode estar elevada, acima de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (concentração que mostrou haver pouca interação com DNA no caso da miricetina e apigenina). Experimentos foram também conduzidos utilizando amostras dos chás após diluição de 20x. Os efeitos sobre o perfil dos voltamogramas (ou seja diminuição da I_p das bases no caso do chá verde e o aumento da intensidade de corrente da guanina no caso do chá de camomila) foram significativamente maiores quando comparados com os chás após diluição de 200x, confirmando que a concentração dos chás é um fator importante.

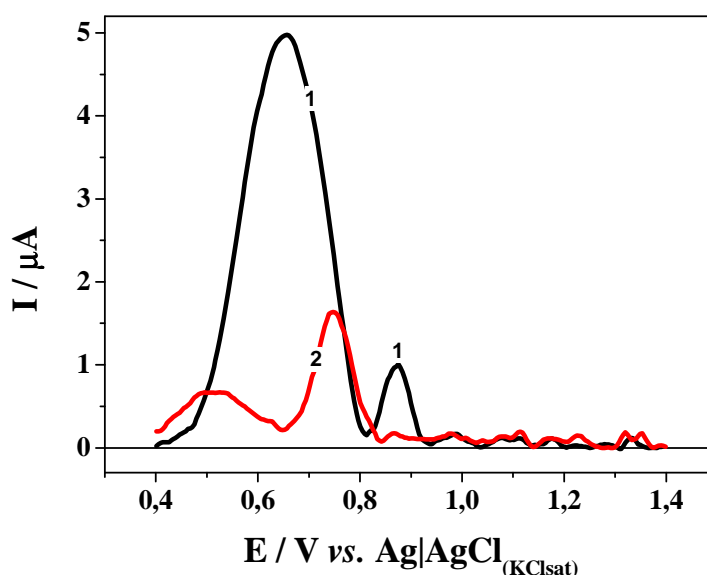


Figura 42: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 utilizando PGE não-modificado após imersão em solução dos chás verde (1) e de camomila (2). Condições voltamétricas: $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$, $\Delta E_s= 4 \text{ mV}$.

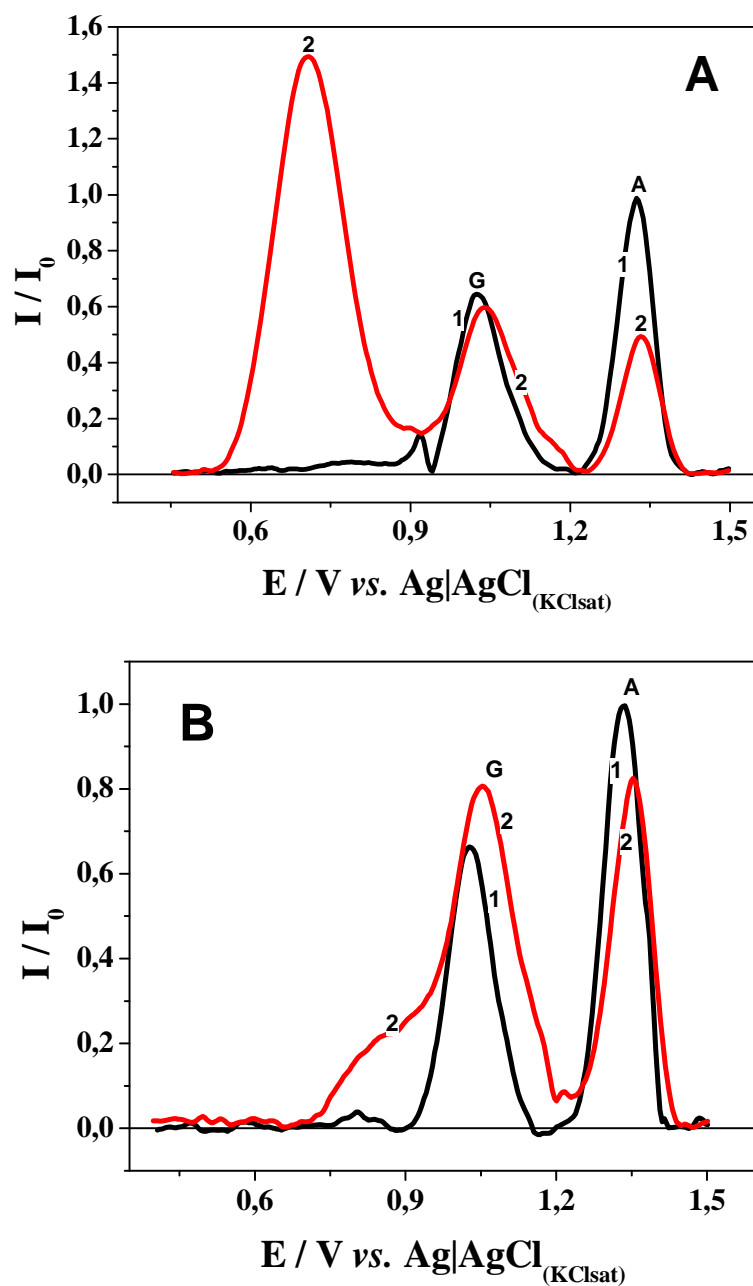


Figura 43: Voltamogramas de onda quadrada obtidos com o biossensor antes da interação (1) e após interação por 180 s (2) com amostras de chá verde (A) e chá de camomila (B). Condições voltamétricas: $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV, $\Delta E_s= 4$ mV.

Os estudos de interação DNA:corantes e DNA:flavonóides mostraram que a molécula do DNA sofre alterações em sua conformação após contato com tais compostos, sendo dependentes da concentração. Os corantes e seus produtos de eletrólises, mesmo em baixas concentrações, causam danos à molécula do DNA, evidenciados pela diminuição da

intensidade de corrente das bases guanina e adenina, formação de novos picos e deslocamentos de potencial. Os flavonóides também causaram decréscimos na corrente de pico das bases, no entanto, a mudança nos perfis dos voltamogramas do DNA após interação com a miricetina e apigenina foram bem mais sutis em comparação com os demais flavonóides. Deste modo, buscando avaliar a capacidade dos flavonóides miricetina e apigenina de proteger a molécula do DNA de lesões causadas pelos corantes DO1 e DR1, experimentos foram realizados utilizando-se misturas corante:flavonóide, produto de eletrólise:flavonóide e também misturas com os corantes originais nas quais os flavonóides foram substituídos por chás.

4.4. PARTE 4: APLICAÇÃO DO BIOSENSOR NOS ESTUDOS DE INTERAÇÃO DNA:CORANTES:FLAVONÓIDES.

4.4.1. Interação do DNA com as misturas corante:flavonóide e produto de eletrólise dos corantes:flavonóide utilizando o biossensor.

Os biossensores foram imersos por 180 s em soluções contendo misturas dos corantes DO1 ou DR1 em alta concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e miricetina ou apigenina em concentração de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Após o enxágue dos eletrodos, conforme otimizado, os voltamogramas de onda quadrada foram registrados e comparados com aqueles obtidos sem a interação e após interação com os corantes e flavonóides individualmente. A Figura 44 apresenta um conjunto de voltamogramas como exemplo da comparação dos resultados, mostrando os sinais referentes à interação com a mistura DR1 + miricetina. Neste caso, pode-se observar que, no que se refere à guanina, tanto o DR1 como a miricetina individualmente causam uma diminuição do sinal desta base (Figura 44, linhas 2 e 3). Quando a interação é

realizada com a mistura (Figura 44, linha 4), a intensidade de corrente da guanina foi similar à obtida após a interação apenas com o DR1. Por outro lado, ao analisar o pico de oxidação da adenina, nota-se que após a interação com a mistura, a intensidade de corrente foi muito próxima ao pico da adenina sem interação, demonstrando que a integridade desta base foi mantida. Este resultado pode ser um indicativo de que a miricetina cause uma diminuição na acessibilidade do corante aos grupos eletroativos dos resíduos de adenina do DNA imobilizado, protegendo a base.

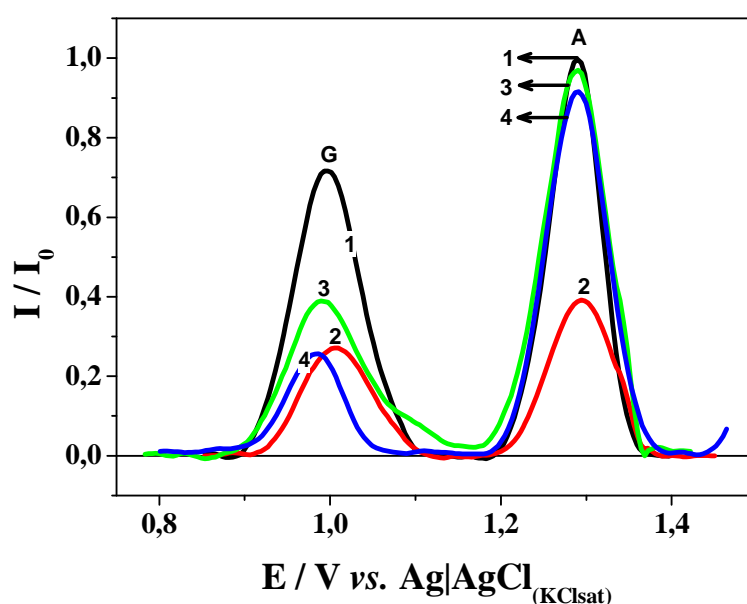


Figura 44: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 com eletrodos modificados com dsDNA antes da interação (1), após interação por 180 s com DR1 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ (2), após interação por 180 s com miricetina 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹(3) e após interação por 180 s com a mistura DR1 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ + miricetina 5,0 x 10⁻⁷ mol L⁻¹ (4). Condições voltamétricas: $f= 250$ Hz, $a= 60$ mV, $\Delta E_s= 4$ mV.

Estudos envolvendo tanto o DR1 quanto o DO1 e seus produtos de eletrólise na presença de miricetina ou apigenina foram conduzidos. A Figura 45 apresenta as comparações das intensidades de corrente normalizadas para a guanina (Figura 45A) e para a adenina (Figura 45B) antes de qualquer tipo de interação e após interações com o corante DO1,

produtos de eletrólises, flavonóides e as correspondentes misturas. A Figura 46 mostra as intensidades de correntes obtidas nos experimentos realizados com o corante DR1, para a guanina (Figura 46A) e adenina (Figura 46B). Cada estudo de interação foi realizado em quatro replicatas, sendo que o *rsd* máximo foi de 15%. Levando em conta a variação intrínseca da imobilização de DNA e da interação com os corantes ou flavonóides, o desvio padrão relativo máximo obtido pode ser considerado um valor realista [28].

Analisando-se as intensidades de corrente médias da guanina e da adenina obtidas após a interação do DNA com os reagentes individuais e suas respectivas misturas, observam-se efeitos diferentes. Por exemplo, ao comparar-se o valor de I_p após a interação com o DO1, nota-se que o corante individual foi responsável pela queda de aproximadamente 33% e 38% da corrente inicial da guanina e adenina, respectivamente. Após a interação com a mistura DO1+M (corante em sua forma original na presença da miricetina) houve um decréscimo de 55% do sinal da guanina e de 23% da I_p da adenina, ou seja, 22% maior para o caso da guanina e 15% menor para o caso da adenina quando comparado com os resultados na ausência da miricetina. Esta diferença entre o decaimento das correntes das bases ocorreu uma vez que a miricetina, individualmente, também apresenta interação com a guanina, levando a uma perda de 45% do sinal da guanina. Por outro lado, este flavonóide não interage com a adenina. Assim, a queda da corrente da adenina após a mistura DO1+M foi devido à interação apenas do corante que, quando na presença da miricetina, causa menor decaimento da I_p em comparação com o DO1 individual. Comparando-se a mesma mistura, mas no caso do DR1, conforme os voltamogramas mostrados na Figura 44 e o gráfico de barras da Figura 46, a diminuição da I_p da adenina foi de 62% na ausência da miricetina e de apenas 8% na presença do flavonóide. Tais resultados indicam uma possível capacidade da miricetina em proteger a base adenina de interação com os corantes DO1 e DR1.

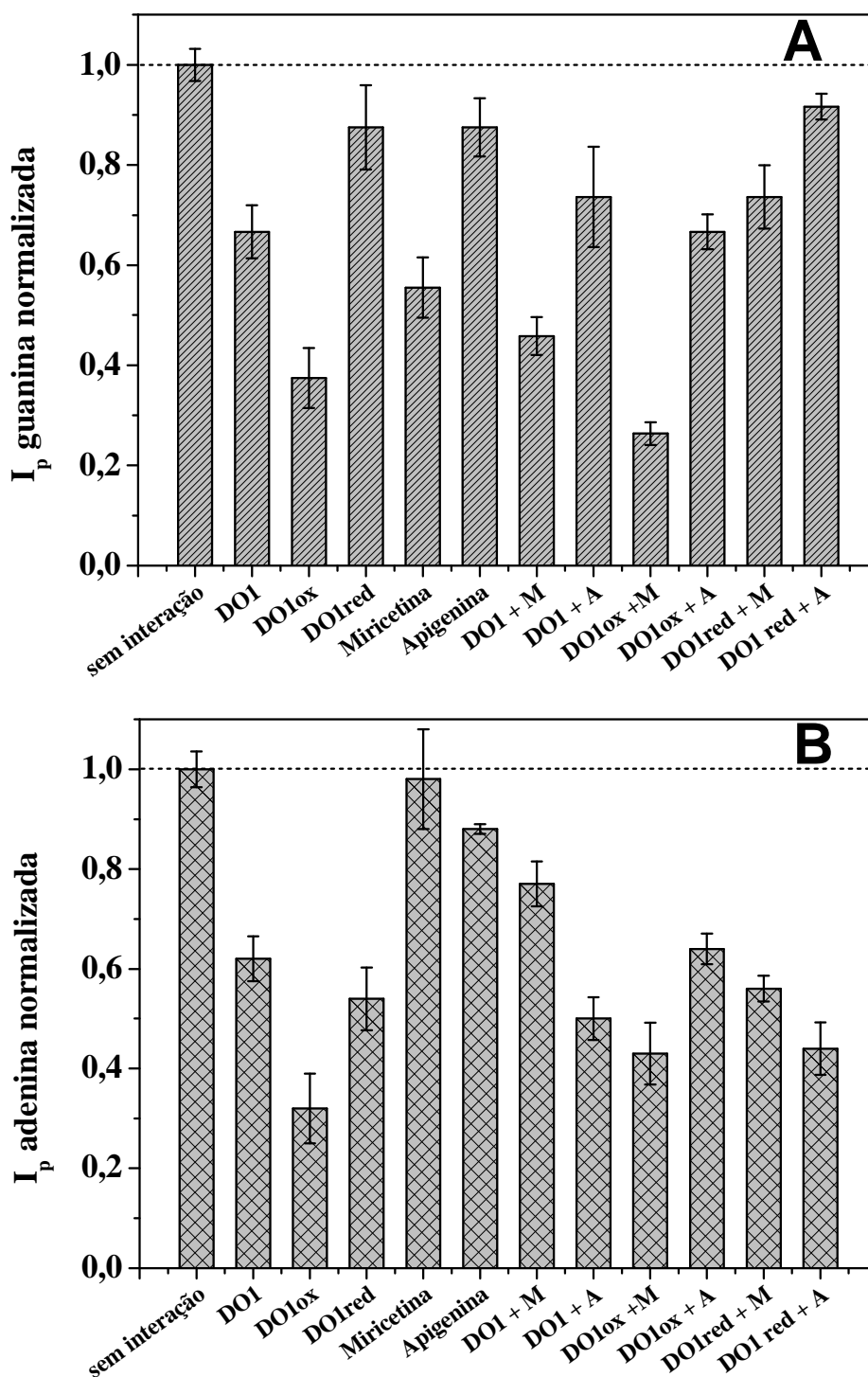


Figura 45: Comparação entre as intensidades de corrente normalizadas da guanina (A) e da adenina (B) antes e após interação com o DO1, seus produtos de eletrólise, flavonóides miricetina e apigenina e as misturas correspondentes. Siglas: DO1_{ox} – corante após eletrólise por oxidação, DO1_{red} – corante após eletrólise por redução, M – miricetina, A – apigenina.

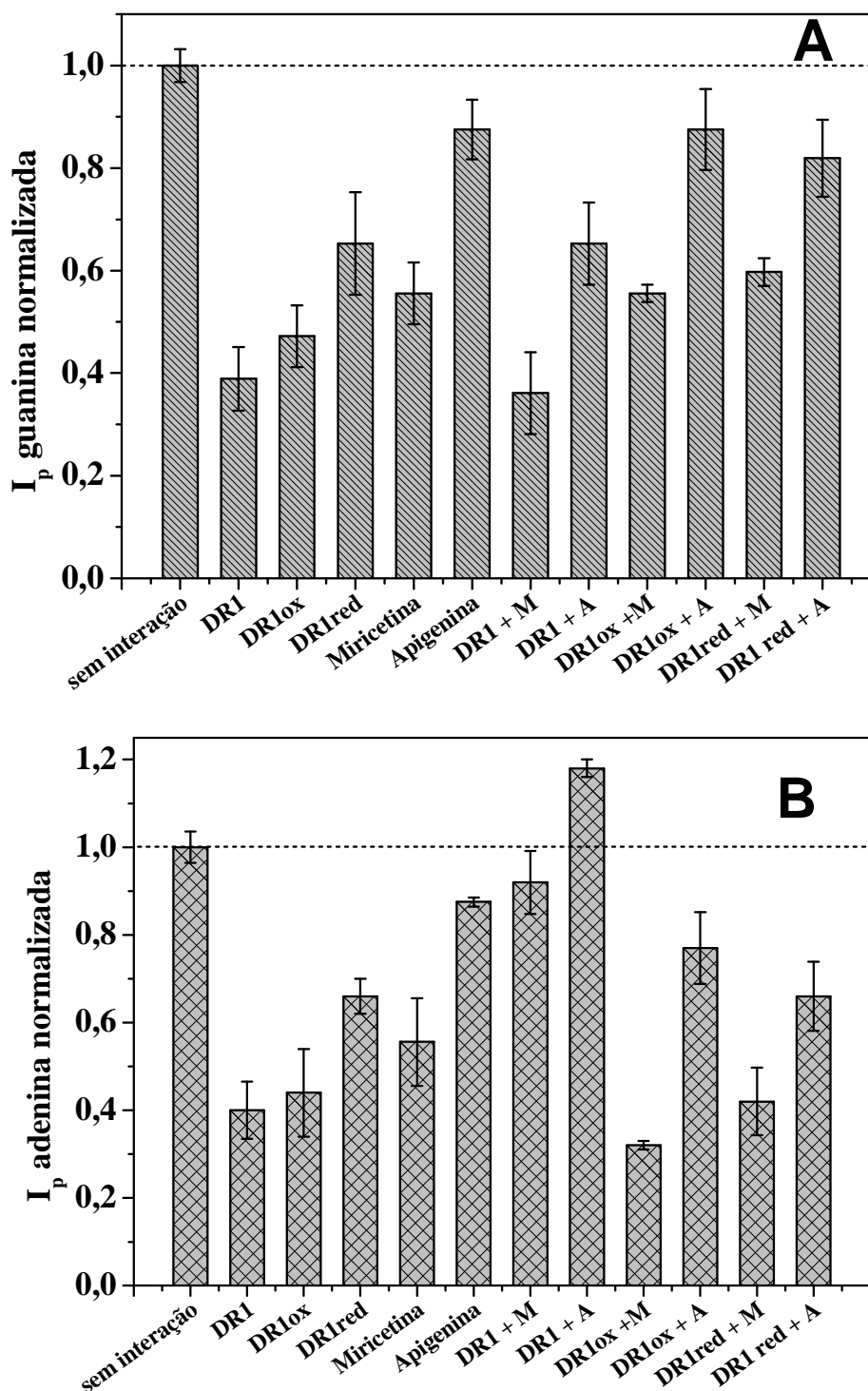


Figura 46: Comparação entre as intensidades de corrente normalizadas da guanina (A) e da adenina (B) antes e após interação com o DR1, seus produtos de eletrólise, flavonóides miricetina e apigenina e as misturas correspondentes. Siglas: DR1_{ox} – corante após eletrólise por oxidação, DR1_{red} – corante após eletrólise por redução, M – miricetina, A – apigenina.

Seguindo este sistema, compararam-se também as intensidades de corrente das bases guanina e adenina na ausência e presença da miricetina ou apigenina para os corantes após as eletrólises, sendo que as porcentagens de diminuição da I_p das bases estão incluídas na Tabela 2.

Tabela 2: Porcentagens de decaimento da corrente de pico de oxidação das bases guanina e adenina após a interação com os corantes DO1 e DR1 e seus produtos de eletrólises na ausência e na presença dos flavonóides miricetina e apigenina.

	Miricetina				Apigenina			
	%↓ I_p Guanina		%↓ I_p Adenina		%↓ I_p Guanina		%↓ I_p Adenina	
	<i>Ausência</i>	<i>Presença</i>	<i>Ausência</i>	<i>Presença</i>	<i>Ausência</i>	<i>Presença</i>	<i>Ausência</i>	<i>Presença</i>
DO1	33	55	38	23	33	26	38	50
DO1_{ox}	62	74	68	57	62	34	68	36
DO1_{red}	12	26	46	44	12	9	46	56
DR1	62	64	60	8	62	35	60	+18
DR1_{ox}	53	45	56	68	53	13	56	23
DR1_{red}	35	40	34	58	35	18	34	34

Conforme mostrado na Tabela 2 nas áreas sombreadas, observa-se que o efeito de proteção à guanina foi mais significativo quando os corantes e seus produtos de eletrólise estão na presença da apigenina, visto que em todos os casos a porcentagem de decaimento da I_p foi menor que na ausência do flavonóide. No caso da miricetina, apenas a mistura DR1_{ox}+M apresentou menor decaimento, em relação a DR1_{ox} individual. Para a base adenina, nota-se que ambos os flavonóides apresentaram proteção para algumas misturas, no entanto, em alguns casos, os flavonóides não foram capazes de promover menor decaimento da I_p .

Com o objetivo de se verificar o efeito dos flavonóides sobre os corantes em solução, espectros UV-Vis foram obtidos utilizando as soluções individuais de cada flavonóide na concentração de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, de cada corante em $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e da mistura flavonóide+corante, nas mesmas condições. A Figura 47 e a Figura 48 apresentam os espectros obtidos com a mistura de (A) DO1 ou (B) DR1 com miricetina e apigenina, respectivamente. Observa-se um significativo decréscimo na intensidade da absorbância na região referente ao grupo cromóforo azo dos corantes na presença da miricetina, quando comparado com o espectro obtido na ausência do flavonóide (Figura 47 A e B). Por outro lado, tal decréscimo ocorreu apenas para o corante DR1 na presença da apigenina (Figura 48B), sendo que no caso do DO1, a banda referente ao cromóforo em torno de 475 nm não sofreu alteração e houve um aumento da absorbância nas regiões próximas de 225 nm e 285 nm (Figura 48A). O hipocromismo observado nos espectros dos corantes na presença dos flavonóides indica que um tipo de interação ocorre entre as substâncias. Essa interação pode ocorrer devido à atração eletrostática entre os hidrogênios presentes nas hidroxilas dos flavonóides e os átomos de nitrogênio do grupo azo dos corantes, o que levaria a uma diminuição da banda referente ao cromóforo. Tal interação seria mais fraca entre a apigenina e o DO1, uma vez que este flavonóide apresenta apenas um grupo hidroxila no anel B e o DO1 poderia apresentar um impedimento estérico por parte do grupo fenil, o que resultaria na ausência do decaimento da banda do corante na presença da apigenina.

O fato de ocorrer algum tipo de ligação entre os corantes e os flavonóides poderia levar a formação de um complexo que não apresenta interação com o DNA, preservando as bases. Isso levaria, então, ao menor decaimento da I_p das bases em comparação com os corantes na ausência dos flavonóides.

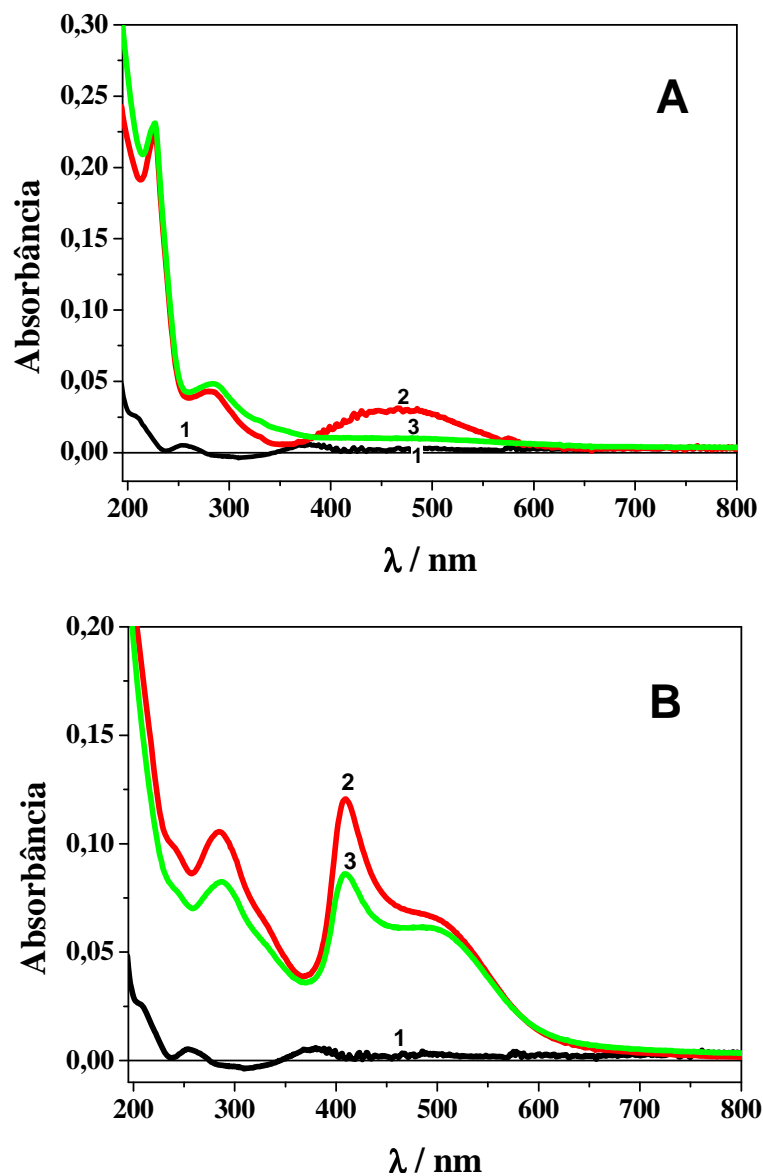


Figura 47: Espectros de absorção UV-Vis obtidos em solução de miricetina $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (1), corante $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (2) e da mistura miricetina + corante nas concentrações $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente (3), sendo DO1 (A) e DR1 (B).

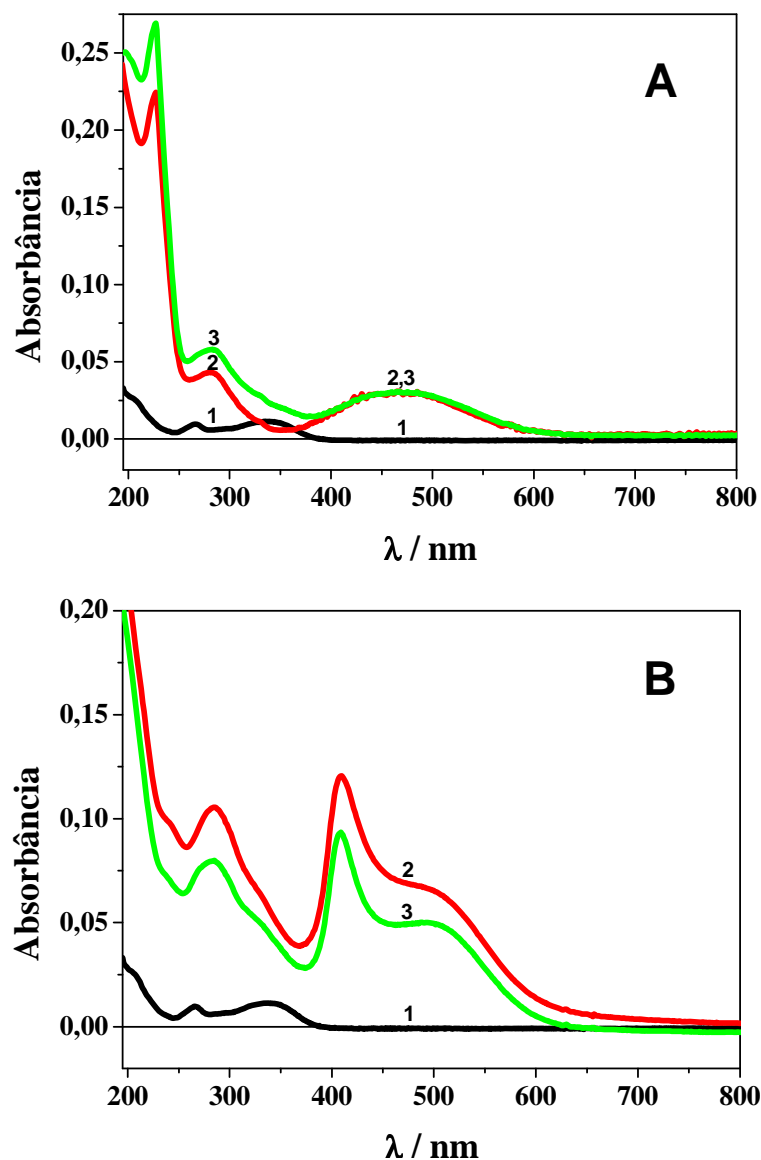


Figura 48: Espectros de absorção UV-Vis obtidos em solução de apigenina $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ (1), corante $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (2) e da mistura apigenina + corante nas concentrações $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente (3), sendo DO1 (A) e DR1 (B).

Finalmente, com o intuito de verificar a capacidade de chás em proteger as bases guanina e adenina, experimentos foram conduzidos utilizando a mistura corante:chá para a interação com o dsDNA imobilizado sobre PGE.

4.4.2. Interação do DNA com a mistura corante:chá utilizando o biossensor.

Assim como realizado com os flavonóides puros, voltamogramas de onda quadrada foram registrados após a imersão dos biossensores em soluções contendo misturas dos corantes DO1 ou DR1 em alta concentração de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e chá verde ou chá de camomila após diluição de 200x. Um exemplo da comparação dos voltamogramas antes e após as interações com corantes e chás individuais e suas respectivas misturas é ilustrado na Figura 49, que mostra o corante DO1 e o chá de camomila. A intensidade de corrente de ambas as bases foi maior após a interação com a mistura DO1+chá de camomila em comparação com a I_p após interação somente com o DO1, na ausência do chá, evidenciando que o chá de camomila impede que o DO1 interaja com o dsDNA, preservando as bases guanina e adenina.

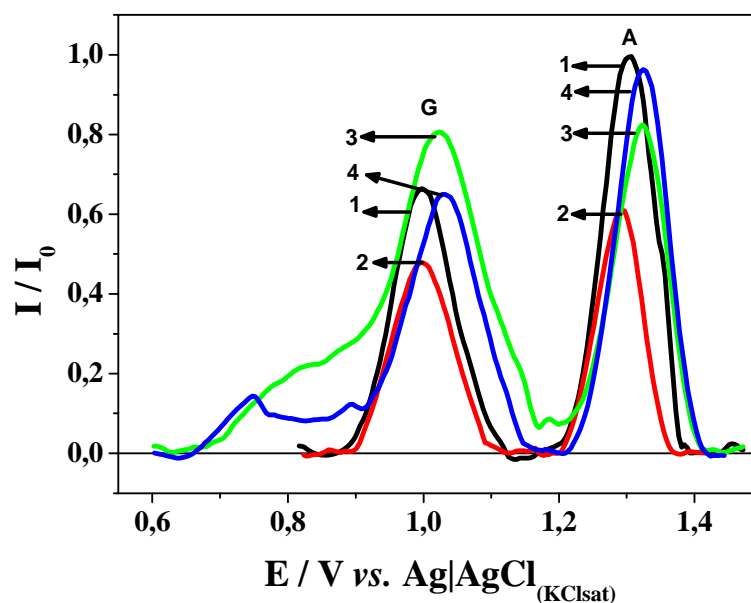


Figura 49: Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão BR $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0 com eletrodos modificados com dsDNA antes da interação (1), após interação por 180 s com DO1 $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (2), com chá de camomila diluído 200x (3) e com a mistura DO1 $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ + chá de camomila diluído 200x (4). Condições voltamétricas: $f= 250 \text{ Hz}$, $a= 60 \text{ mV}$, $\Delta E_s= 4 \text{ mV}$.

As comparações das intensidades de corrente normalizadas para a guanina e para a adenina antes das interações e após interações com os corantes, com os chás e as misturas correspondentes são apresentadas na Figura 50 e as porcentagens do decaimento da corrente de pico das bases após interação com os corantes na ausência e na presença dos chás verde e de camomila estão inseridas na Tabela 3.

Tabela 3: Porcentagens de decaimento da corrente de pico de oxidação das bases guanina e adenina após a interação com os corantes DO1 e DR1 na ausência e na presença de chá verde e chá de camomila.

	Chá verde				Chá de camomila			
	%↓ I _p Guanina		%↓ I _p Adenina		%↓ I _p Guanina		%↓ I _p Adenina	
	<i>Ausência</i>	<i>Presença</i>	<i>Ausência</i>	<i>Presença</i>	<i>Ausência</i>	<i>Presença</i>	<i>Ausência</i>	<i>Presença</i>
DO1	33	15	38	9	33	1	38	1
DR1	62	40	60	25	62	53	60	1

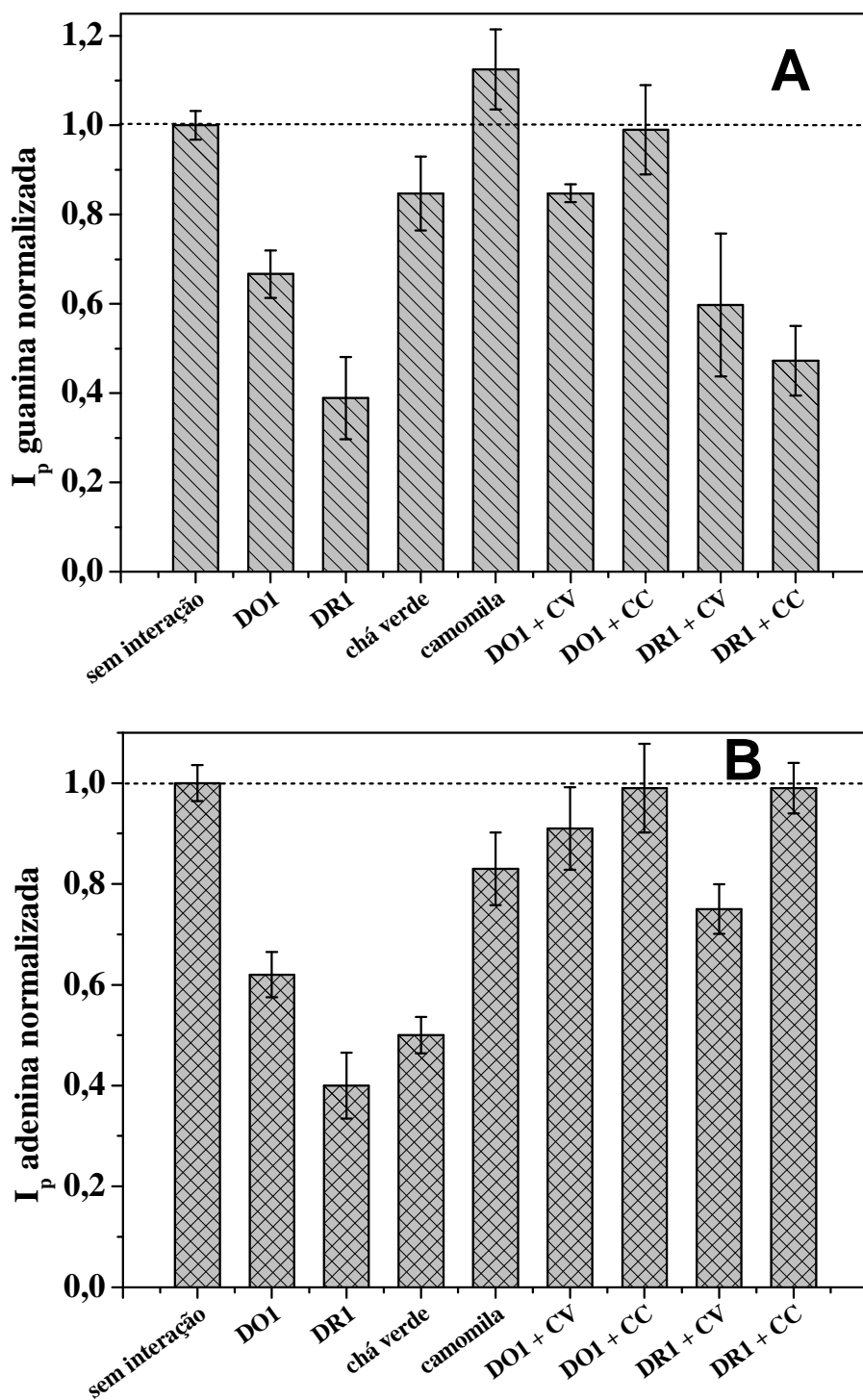


Figura 50: Comparação entre as intensidades de corrente normalizadas da guanina (A) e da adenina (B) antes e após interação com os corantes DO1 e DR1, chá verde e chá de camomila e as misturas correspondentes. Siglas: CV – chá verde, CC – chá de camomila.

Considerando as médias das intensidades de corrente de pico das bases, é observada uma significativa diminuição da porcentagem de decaimento da I_p das bases na presença de ambos os chás, sendo esta mais expressiva para a I_p da adenina na presença do chá de camomila. Portanto, os chás apresentaram uma importante capacidade protetora, impedindo que as bases guanina e adenina sofressem algum tipo de interação ou dano por parte dos corantes DO1 e DR1.

Embora a miricetina e a apigenina possam ser encontradas nas infusões de chá verde e de camomila, respectivamente, os chás em geral apresentam uma complexa composição. Esta varia de acordo com clima, estação, práticas de horticultura, a variedade e a idade da folha. Dentre as substâncias presentes em chás, além dos flavonóides, estão os alcalóides (por exemplo, a cafeína), outros derivados de ácidos fenólicos, pigmentos, carboidratos, aminoácidos, vitaminas e metais, entre outros [203]. Estudos têm demonstrado que os chás apresentam inúmeros benefícios para a saúde humana, tais como, efeitos protetores contra diversos tipos de câncer, doenças renais e cardiovasculares, hipertensão, colesterol, diabetes, entre outros [204]. Isto se dá devido aos chás ser uma fonte de moléculas farmacologicamente ativas e sua grande variedade de fitoquímicos. Neste sentido, sua complexa composição poderia levar a uma interação com os corantes DO1 e DR1, protegendo a molécula do DNA de sofrer mudanças em sua conformação, o que poderia levar a danos.

5. CONCLUSÕES

Os estudos eletroquímicos sobre as interações dos corantes têxteis DO1 e DR1, bem como seus produtos de eletrólise por oxidação e por redução, com a molécula de DNA permitiram detectar mudanças na estrutura da biomolécula. Ambos os corantes, em sua forma original e após sofrerem eletrólises, causaram mudanças no perfil voltamétrico do dsDNA imobilizado, incluindo diminuição da intensidade de corrente das bases guanina e adenina, o

aparecimento de novos picos que não são produzidos pelo DNA sem interação e deslocamentos do potencial de pico das bases. Além disso, os estudos espectrofotométricos mostraram que, após a interação do DNA em solução com os corantes e seus produtos de eletrólise, efeitos de hipocromismo e hiperchromismo da banda referente ao DNA foram observados.

Tais resultados indicam que os corantes interagem com o dsDNA por meio de intercalação, sendo que este tipo de interação pode induzir mudanças estruturais no DNA, incluindo a abertura da dupla hélice e o alongamento da cadeia de DNA. Estas modificações estruturais podem levar ao retardo ou à inibição da transcrição e replicação, o que confere aos corantes uma tendência em causar danos ao DNA. Por outro lado, o corante não-mutagênico RB15 não apresentou interação com o DNA, uma vez que não foram observadas mudanças significativas no perfil do voltamograma após a interação utilizando o biossensor.

A avaliação da interação dos corantes DO1 e DR1 com o DNA na presença dos flavonóides miricetina e apigenina mostrou uma possível capacidade desses flavonóides em proteger as bases guanina e adenina de interação com os corantes. O efeito de proteção à guanina foi mais significativo quando os corantes e seus produtos de eletrólise estão na presença da apigenina, enquanto que para a base adenina, ambos os flavonóides apresentaram proteção para algumas misturas corante:flavonóide. Quando os flavonóides foram substituídos por soluções de chá verde ou chá de camomila, uma importante capacidade protetora foi observada. Os chás impediram que as bases guanina e adenina sofressem algum tipo de interação ou dano por parte dos corantes DO1 e DR1.

Portanto, o biossensor eletroquímico descartável utilizando dsDNA imobilizado em combinação com a técnica de voltametria de onda quadrada mostrou ser adequado para os estudos de interação e permitiu compreender que os corantes DO1 e DR1 podem causar danos à molécula de DNA e que tais danos podem ser minimizados por flavonóides e também por chás.

REFERÊNCIAS

- 1 WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids - a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738, Apr. 1953.
- 2 SAWICKI, M. P.; SAMARA, G.; HURWITZ, M.; PASSARO, E. Jr. Human genome project. **Am. J. Surg.**, v. 165, n. 2, p. 258-264, Feb. 1993.
- 3 ALAEDDINI, R.; WALSH, S. J.; ABBAS, A. Forensic implications of genetic analyses from degraded DNA - a review. **Foren. Sci. Int.: Genet.**, v. 4, n. 3, p. 148-157, Apr. 2010.
- 4 TAMAKI, K.; JEFFREYS, A. J. Human tandem repeat sequences in forensic DNA typing. **Legal Med.**, v. 7, n. 4, p. 244-250, July 2005.
- 5 LEUNG, P. S. C.; DHIRAPONG, A.; WU, P. Y.; TAO, M. H. Gene therapy in autoimmune diseases: challenges and opportunities. **Autoimm. Rev.**, v. 9, n. 3, p. 170-174, Jan. 2010.
- 6 EMERY, D. W. Gene therapy for genetic diseases: on the horizon. **Clin. Appl. Immunol. Rev.**, v. 4, n. 6, p. 411-422, Oct. 2004.
- 7 KADKOL, S. S.; GAGE, W. R.; PASTERNAK, G. R. *In situ* hybridization - theory and practice. **Mol. Diagn.**, v. 4, n. 3, p. 169-183, Sept. 1999.
- 8 YAKOVCHUK, P.; PROTOZANOVA, E.; FRANK-KAMENETSKII, M. D. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, n. 2, p. 564-574, Feb. 2006.
- 9 KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol. Pathol.**, v. 30, n. 6, p. 620-650, Dec. 2002.
- 10 SLATER, T. F. Free-radical mechanisms in tissue injury. **Biochem. J.**, v. 222, n. 1, p. 1-15, Aug. 1984.
- 11 OHSHIMA, H. Genetic and epigenetic damage induced by reactive nitrogen species: implications in carcinogenesis. **Toxicol. Lett.**, v. 140-141, n. 11, p. 99-104, Apr. 2003.
- 12 DEDON, P. C.; TANNENBAUM, S. R. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. **Archiv. Biochem. Biophys.**, v. 423, n. 1, p. 12-22, Mar. 2004.
- 13 VALAVANIDIS, A.; VLAHOGIANNI, T.; DASSENAKIS, M.; SCOULLOS, M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 64, n. 2, p. 178-189, June 2006.
- 14 FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: ménage à trios. **Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 674, n. 1/2, p. 3-22, Mar. 2009.

- 15 KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 711, n. 1/2, p. 193-201, June 2011.
- 16 FRANCO, R.; SCHONEVELD, O.; GEORGAKILAS, A. G.; PANAYIOTIDIS, M. I. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis. **Cancer Lett.**, v. 266, n. 1, p. 6-11, July 2008.
- 17 OLINSKI, R.; GACKOWSKI, D.; ROZALSKI, R.; FOKSINSKI, M.; BIALKOWSKI, K. Oxidative DNA damage in cancer patients: a cause or a consequence of the disease development? **Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 531, n. 1/2, p. 177-190, Oct. 2003.
- 18 COOKE, M. S.; EVANS, M. D.; DIZDAROGLU, M.; LUNEC, J. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.**, v. 17, n. 10, p. 1195-1214, July 2003.
- 19 GALLEGO, M. P.; SARASIN, A. Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine in human cells and its deficiency in some DNA repair diseases. **Biochimie**, v. 85, n. 11, p. 1073-1082, Nov. 2003.
- 20 KAPPUS, H. Oxidative stress in chemical toxicity. **Archiv. Toxicol.**, v. 60, n. 1/3, p. 144-149, Jan. 1987.
- 21 KOVACIC, P.; JACINTHO, J. D. Mechanisms of carcinogenesis focus on oxidative stress and electron transfer. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, n. 7, p. 773-796, June 2001.
- 22 PALEČEK, E.; FOJTA, M.; TOMSCHIK, M.; WANG, J. Electrochemical biosensors for DNA hybridization and DNA damage. **Biosens. Bioelectron.**, v. 13, n. 6, p. 621-628, Sept. 1998.
- 23 GIDRON, Y.; RUSS, K.; TISSARCHONDOU, H.; WARNER, J. The relation between psychological factors and DNA-damage: a critical review. **Biol. Psychol.**, v. 72, n. 3, p. 291-304, June 2006.
- 24 THEODORAKIS, C. W. Mutagenesis. In: JØRGENSEN, S. E. (Ed.). **Encyclopedia of Ecology**. Amsterdam: Elsevier, 2008. p. 2475-2484.
- 25 WU, Y.; YI, L.; XIE, Q.; ZHANG, Y.; YIN, F.; YAO, S. Monitoring of DNA oxidative damage with piezoelectric quartz crystal method. **Talanta**, v. 54, n. 2, p. 263-270, Apr. 2001.
- 26 URCAN, E.; SCHERTHAN, H.; STYLLOU, M.; HAERTEL, U.; HICKEL, R.; REICHL, F. X. Induction of DNA double-strand breaks in primary gingival fibroblasts by exposure to dental resin composites. **Biomaterials**, v. 31, n. 8, p. 2010-2014, Mar. 2010.
- 27 STREKOWSKI, L.; WILSON, B. Noncovalent interactions with DNA: an overview. **Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 623, n. 1/2, p. 3-13, Oct. 2007.

- 28 FOJTA, M. Detecting DNA damage with electrodes. **Persp. Bioanal.**, v. 1, p. 385-431, Feb. 2005.
- 29 CUPPLES, C. G. DNA Repair. **Encyclop. Microbiol.**, v. 1, p. 99-112, 2009.
- 30 BJELLAND, S.; SEEBERG, E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. **Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 531, n. 1/2, p. 37-80, Oct. 2003.
- 31 CADET, J.; DOUKI, T.; RAVANAT, J. L. Oxidatively generated base damage to cellular DNA. **Free Radical Biol. Med.**, v. 49, n. 1, p. 9-21, July 2010.
- 32 KOW, Y. W. Repair of deaminated bases in DNA. **Free Radical Biol. Med.**, v. 33, n. 7, p. 886-893, Oct. 2002.
- 33 HUFFMAN, J. L.; SUNDHEIM, O.; TAINER, J. A. DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves. **Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 577, n. 1/2, p. 55-76, Sept. 2005.
- 34 SEDGWICK, B.; BATES, P. A.; PAIK, J.; JACOBS, S. C.; LINDAHL, T. Repair of alkylated DNA: recent advances. **DNA Repair**, v. 6, n. 4, p. 429-442, Apr. 2007.
- 35 LOUREIRO, A. P. M.; MASCIO, P.; MEDEIROS, M. H. G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Quím. Nova**, v. 25, n. 5, p. 777-793, set.-out. 2002.
- 36 STURLA, S. J. DNA adducts profiles: chemical approaches to addressing the biological impact of DNA damage from small molecules. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 11, n. 3, p. 293-299, June 2007.
- 37 HÄDER, D. P.; SINHA, R. P. Solar ultraviolet radiation-induced DNA damage in aquatic organisms: potential environmental impact. **Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 571, n. 1/2, p. 221-233, Apr. 2005.
- 38 CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; PAWŁYK, I.; PANEK, A.; WIECHEĆ, A.; KALINA, I.; POPOV, T.; GEORGIEVA, T.; FARMER, P. B. Exposure to environmental polycyclic aromatic hydrocarbons: influences on cellular susceptibility to DNA damage (sampling Košice and Sofia). **Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 620, n. 1/2, p. 145-154, July 2007.
- 39 TURESKY, R. J. Heterocyclic aromatic amines: potential human carcinogens. In: PENNING, T. M. (Ed.). **Chemical carcinogenesis**. New York: Springer, 2011. v. 4, cap. 5, p. 95-112.
- 40 LANDVIK, N. E.; GORRIA, M.; ARLT, V. M.; ASARE, N.; SOLHAUG, A.; LAGADIC-GOSSMANN, D.; HOLME, J. A. Effects of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons and diesel exhaust particle extracts on cell signalling related to apoptosis: possible implications for their mutagenic and carcinogenic effects. **Toxicology**, v. 231, n. 2/3, p. 159-174, Mar. 2007.

- 41 ANGERER, J.; EWERS, U.; WILHELM, M. Human biomonitoring: state of the art. **Int. J. Hyg. Environ. Health**, v. 210, n. 3/4, p. 201-228, May 2007.
- 42 BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Mol. Aspects Med.**, v. 21, n. 6, p. 167-223, Dec. 2001.
- 43 FUTREAL, P. A.; COIN, L.; MARSHALL, M.; DOWN, T.; HUBBARD, T.; WOOSTER, R.; RAHMAN, N.; STRATTON, M. R. A census of human cancer genes. **Nat. Rev. Cancer**, v. 4, n. 3, p. 177-183, Mar. 2004.
- 44 HEGDE, M. L.; MANTHA, A. K.; HAZRA, T. K.; BHAKATA, K. K.; MITRA, S.; SZCZESNY, B. Oxidative genome damage and its repair: implications in aging and neurodegenerative diseases. **Mech. Ageing Dev.**, v. 133, n. 4, p. 157-168, Apr. 2012.
- 45 AHMAD, S. **Oxidative stress and antioxidant defenses in biology**. New York: Chapman & Hall, 1995.
- 46 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/prevention/en/>>. Acesso em: 08 out. 2012.
- 47 KUNZ, A.; PERALTA-ZAMORA, P.; MORAES, S. G.; DURÁN, N. Novas tendências no tratamento de efluentes têxteis. **Quím. Nova**, v. 25, n. 1, p. 78-82, jan./fev. 2002.
- 48 GUARATINI, C. C. I.; ZANONI, M. V. B. Corantes têxteis. **Quím. Nova**, v. 23, n. 1, p. 71-78, mar./abr. 2000.
- 49 FORGACS, E.; CSERHÁTI, T.; OROS, G. Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. **Environ. Int.**, v. 30, n. 7, p. 953-971, Sept. 2004.
- 50 CHATZISYMEON, E.; XEKOUKOULOTAKIS, N. P.; COZ, A.; KALOGERAKIS, N.; MANTZAVINOS, D. Electrochemical treatment of textile dyes and dyehouse effluents. **J. Hazard. Mater.**, v. B137, p. 998-1007, Sept. 2006.
- 51 ZANONI, M. V. B.; CARNEIRO, P. A. O descarte dos corantes têxteis. **Ciênc. Hoje**, v. 29, n. 174, p. 61-71, ago. 2001.
- 52 O'NEILL, C.; HAWKES, F. R.; HAWKES, D. L.; LOURENÇO, N. D.; PINHEIRO, H. M.; DELÉE, W. Colour in textile effluents – sources, measurement, discharge consents and simulation: a review. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 74, n. 11, p. 1009-1018, Oct. 1999.
- 53 UMBUZEIRO, G. A.; FREEMAN, H. S.; WARREN, S. H.; OLIVEIRA, D. P.; TERAQ, Y.; WATANABE, T.; CLAXTON, L. D. The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. **Chemosphere**, v. 60, n. 1, p. 55-64, June 2005.
- 54 LIMA, R. O. A.; BAZO, A. P.; SALVADORI, D. M. F.; RECH, C. M.; OLIVEIRA, D. P.; UMBUZEIRO, G. A. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. **Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 626, n. 1/2, p. 53-60, Jan. 2007.

- 55 SCHNEIDER, K.; HAFNER, C.; JÄGER, I. Mutagenicity of textile dye products. **J. Appl. Toxicol.**, v. 24, n. 2, p. 83-91, Mar. 2004.
- 56 GOLKA, K.; KOPPS, S.; MYSLAK, Z. W. Carcinogenicity of azo colorants: influence of solubility and bioavailability. **Toxicol. Lett.**, v. 151, n. 1, p. 203-210, June 2004.
- 57 CHEQUER F. M. D.; DORTA, D. J.; OLIVEIRA, D. P. Azo dyes and their metabolites: does the discharge of the azo dye into water bodies represent human and ecological risks? In: HAUSER, P. J. (Ed.). **Advances in treating textile effluent**. Rijeka: InTech, 2011. Cap. 2, p. 27-48.
- 58 MacGREGOR, J. T.; CASCIANO, D.; MÜLLER, L. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutat. Res.**, v. 455, n. 1/2, p. 3-20, Nov. 2000.
- 59 RAJAGURU, P.; FAIRBAIRN, L. J.; ASHBY, J.; WILLINGTON, M. A.; TURNER, S.; WOOLFORD, L. A.; CHINNASAMY, N.; RAFFERTY, J. A. Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the *in vivo* mouse bone marrow micronucleus test. **Mutat. Res.**, v. 444, n. 1, p. 175-180, July 1999.
- 60 JÄGER, I.; HAFNER, C.; SCHNEIDER, K. Mutagenicity of different textile dye products in *Salmonella typhimurium* and mouse lymphoma cells. **Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 561, n. 1/2, p. 35-44, July 2004.
- 61 CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, n. 2, p. 722-725, June 2008.
- 62 MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, v. 455, n. 1/2, p. 29-60, Nov. 2000.
- 63 FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat. Res.**, v. 339, n. 1, p. 37-59, Feb. 1995.
- 64 LIAO, W.; McNUTT, M. A.; ZHU, W. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, n. 1, p. 46-53, May 2009.
- 65 MASUDA, S.; DEGUCHI, Y.; MASUDA, Y.; WATANABE, T.; NUKAYA, H.; TERAO Y.; TAKAMURA, T.; WAKABAYASHI, K.; KINAE, N. Genotoxicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and 4-amino-3,3'-dichloro-5,4'-dinitro-biphenyl (ADDDB) in goldfish (*Carassius auratus*) using the micronucleus test and the comet assay. **Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 560, n. 1, p. 33-40, May 2004.
- 66 TSUBOY, M. S.; ANGELI, J. P. F.; MANTOVANI, M. S.; KNASMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G. A.; RIBEIRO, L. R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI disperse blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicol. In Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1650-1655, Dec. 2007.

- 67 OSUGI, M. E.; RAJESHWAR, K.; FERRAZ, E. R. A.; OLIVEIRA, D. P.; ARAUJO, A. R.; ZANONI, M. V. B. Comparison of oxidation efficiency of disperse dyes by chemical and photoelectrocatalytic chlorination and removal of mutagenic activity. **Electrochim. Acta**, v. 54, n. 7, p. 2086-2093, Feb. 2009.
- 68 CHEQUER, F. M. D.; FRIEDMANN, J. P.; ANGELI, F. P. F.; FERRAZ, E. R. A.; TSUBOY, M. S.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA, D. P. The azo dyes disperse red 1 and disperse orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. **Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 676, n. 1/2 p. 83-86, May 2009.
- 69 OLIVEIRA, G. A. R.; FERRAZ, E. R. A.; CHEQUER, F. M. D.; GRANDO, M. D.; ANGELI, F. P. F.; TSUBOY, M. S.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; OSUGI, M. O.; LIZIER, T. M.; ZANONI, M. V. B.; OLIVEIRA, D. P. Chlorination treatment of aqueous samples reduces, but does not eliminate, the mutagenic effect of the azo dyes disperse red 1, disperse red 13 and disperse orange 1. **Mutat. Res., Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.**, v. 703, n. 2, p. 200-208, Sept. 2010.
- 70 FERRAZ, E. R. A.; UMBUZEIRO, G. A.; ALMEIDA, G.; CALOTO-OLIVEIRA, A.; CHEQUER, F. M. D.; ZANONI, M. V. B.; DORTA, D. J.; OLIVEIRA, D. P. Differential toxicity of disperse red 1 and disperse red 13 in the Ames test, HepG2 cytotoxicity assay, and *Daphnia* acute toxicity test. **Environ. Toxicol.**, v. 26, n. 5, p. 489-497, Apr. 2010.
- 71 FERRAZ, E. R. A.; GRANDO, M. D.; OLIVEIRA, D. P. The azo dye disperse orange 1 induces DNA damage and cytotoxic effects but does not cause ecotoxic effects in *Daphnia similis* and *Vibrio fischeri*. **J. Hazard. Mater.**, v. 192, n. 2, p. 628-633, May 2011.
- 72 CHEQUER, F. M. D.; LIZIER, T. M.; FELÍCIO, R.; ZANONI, M. V. B.; DEBONSI, H. M.; LOPES, N. P.; MARCOS, R.; OLIVEIRA, D. P. Analyses of the genotoxic and mutagenic potential of the products formed after the biotransformation of the azo dye disperse red 1. **Toxicol. In Vitro**, v. 25, n. 8, p. 2054-2063, Aug. 2011
- 73 RAFII, F.; HALL, J. D.; CERNIGLIA, C. E. Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by *Clostridium* species from the human intestinal tract. **Food Chem. Toxicol.**, v. 35, n. 9, p. 897-901, Sept. 1997.
- 74 ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Dyes derived from benzidine and its congeners**. Boston, 2010. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppt/existingchemicals/vpubs/actionplans/DCB%20Action%20Plan_06232010.noheader.pdf>. Acesso em: 19 out. 2012.
- 75 PAN, H.; FENG, J.; HE, G. X.; CERNIGLIA, C. E.; CHEN, H. Evaluation of impact of exposure of Sudan azo dyes and their metabolites on human intestinal bacteria. **Anaerobe**, v. 18, n. 4, p. 445-453, Aug. 2012.
- 76 HUSAIN, Q.; HUSAIN, M. Peroxidases as a potential tool for the decolorization and removal of synthetic dyes from polluted water. In: MALIK, A.; GROHMANN, E. (Ed.). **Environmental protection strategies for sustainable development**. New York: Springer, 2012. Cap. 15, p. 455-456.

- 77 LOEB, L. A.; HARRIS, C. C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. **Cancer Res.**, v. 68, n. 17, p. 6863-6872, Sept. 2008.
- 78 ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 22, p. 19-34, Jan. 2002.
- 79 ÇELİK, H.; ARINÇ, E. Evaluation of the protective effects of quercetin, rutin, resveratrol, naringenin and trolox against idarubicin-induced DNA damage. **J. Pharm. Sci.**, v. 13, n. 2, p. 231-241, July 2010.
- 80 YAO, L. H.; JIANG, Y. M.; SHI, J.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; DATTA, N.; SINGANUSONG, R.; CHEN, S. S. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant Foods Hum. Nutr.**, v. 59, n. 3, p. 113-122, Summer 2004.
- 81 HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ther.**, v. 96, n. 2/3, p. 67-202, Nov. 2002.
- 82 MARTÍNEZ-FLÓREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutr. Hosp.**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.
- 83 HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Aliment. Nutr.**, v. 19, n. 1, p. 97-108, jan./mar. 2008.
- 84 MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 380-385, jun. 2006.
- 85 ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 5, p. 1124-1131, Mar. 2004.
- 86 NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E. L. S.; VAN HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 74, n. 4, p. 418-425, Oct. 2001.
- 87 PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513-523, June 2011.
- 88 GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 37, n. 3, p. 287-303, Aug. 2004.
- 89 SKIBOLA, C. F.; SMITH, M. T. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 29, n. 3/4, p. 375-383, Aug. 2000.

- 90 RIETJENS, I. M. C.; BOERSMA, M. M. G.; HAAN, L.; SPENKELINK, B.; AWAD, H. M.; CNUBBEN, N. H. P.; VAN ZANDEN, J. J.; VAN DER WOUDE, H.; ALINK, G. M.; KOEMAN, J. H. The pro-oxidant chemistry of the natural antioxidants vitamin C, vitamin E, carotenoids and flavonoids. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 11, n. 3/4, p. 321-333, July 2002.
- 91 PROESTOS, C.; CHORIANOPOULOS, N.; NYCHAS, G. J. E.; KOMAITIS, M. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 4, p. 1190-1195, Feb. 2005.
- 92 PROESTOS, C.; BOZIARIS, I. S.; NYCHAS, G. J. E.; KOMAITIS, M. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Food Chem.**, v. 95, n. 4, p. 664-671, Apr. 2006.
- 93 LAM, H. S.; PROCTOR, A.; HOWARD, L.; CHO, M. J. Rapid fruit extracts antioxidant capacity determination by Fourier transform infrared spectroscopy. **J. Food Sci.**, v. 70, n. 9, p. C545-C549, Nov. 2005.
- 94 BERETTA, G.; GRANATA, P.; FERRERO, M.; ORIOLI, M.; FACINO, R. M. Standardization of antioxidant properties of honey by a combination of spectrophotometric / fluorimetric assays and chemometrics. **Anal. Chim. Acta**, v. 533, n. 2, p. 185-191, Mar. 2005.
- 95 OZYURT, D.; DEMIRATA, B.; APAK, E. Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement. **Talanta**, v. 71, n. 3, p. 1155-1165, Feb. 2007.
- 96 NALEWAJKO-SIELIWONIUK, E.; NAZARUK, J.; KOTOWSKA, J.; KOJŁO, A. Determination of the flavonoids/antioxidant levels in *Cirsium oleraceum* and *Cirsium rivulare* extracts with cerium(IV)-rhodamine 6G chemiluminescence detection. **Talanta**, v. 96, n. 15, p. 216-222, July 2012.
- 97 HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PASCUAL-TERESA, S. Flavonoid-flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food Chem.**, v. 121, n. 3, p. 691-696, Aug. 2010.
- 98 BARRECA, D.; BELLOCCO, E.; CARISTI, C.; LEUZZI, U.; GATTUSO, G. Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterranean sweet lemon (*Citrus limetta* Risso) juice. **Food Chem.**, v. 129, n. 2, p. 417-422, Nov. 2011.
- 99 ARTS, M. J. T. J.; HAENEN, G. R. M. M.; VOSS, H.; BAST, A. Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, n. 1, p. 45-49, Jan. 2004.
- 100 JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; RUZGAS, T.; GORTON, L. Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 35, n. 2/3, p. 238-241, Aug. 2004.

- 101 MELLO, L. D.; ALVES, A. A.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Peroxidase-based biosensor as a tool for a fast evaluation of antioxidant capacity of tea. **Food Chem.**, v. 92, n. 3, p. 515-519, Sept. 2005.
- 102 CAMPANELLA, L.; BONANNI, A.; TOMASSETTI, M. Determination of the antioxidant capacity of samples of different types of tea, or of beverages based on tea or other herbal products, using a superoxide dismutase biosensor. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 32, n. 4/5, p. 725-736, Aug. 2003.
- 103 IGNATOV, S.; SHISHNIASHVILI, D.; GE, B.; SCHELLER, F. W.; LISDAT, F. Amperometric biosensor based on a functionalized gold electrode for the detection of antioxidants. **Biosens. Bioelectron.**, v. 17, n. 3, p. 191-199, Mar. 2002.
- 104 AMATATONGCHAI, M.; LAOSING, S.; CHAILAPAKUL, O.; NACAPRICHA, D. Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 97, n. 15, p. 267-272, Aug. 2012.
- 105 LUCARELLI, F.; MARAZZA, G.; TURNER, A. P. F.; MASCINI, M. Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. **Biosens. Bioelectron.**, v. 19, n. 6, p. 515-530, Jan. 2004.
- 106 BOAL, A. K.; BARTON, J. K. Electrochemical detection of lesions in DNA. **Bioconjugate Chem.**, v. 16, n. 2, p. 312-321, Feb. 2005.
- 107 PALCHETTI, I.; MASCINI, M. Nucleic acid biosensors for environmental pollution monitoring. **Analyst**, v. 133, n. 2, p. 846-854, July 2008.
- 108 FOJTA, M. Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. **Electroanalysis**, v. 14, n. 21, p. 1449-1463, Nov. 2002.
- 109 NOWICKA, A. M.; KOWALCZYK, A.; STOJEK, Z.; HEPPEL, M. Nanogravimetric and voltammetric DNA-hybridization biosensors for studies of DNA damage by common toxicants and pollutants. **Biophys. Chem.**, v. 146, n. 1, p. 42-53, Jan. 2010.
- 110 BRETT, A. M. O.; SILVA, L. A. da. A DNA-electrochemical biosensor for screening environmental damage caused by s-triazine derivatives. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 373, n. 8, p. 717-723, Aug. 2002.
- 111 MASCINI, M.; PALCHETTI, I.; MARAZZA, G. DNA electrochemical biosensors. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 369, p. 15-22, Jan. 2001.
- 112 PIVIDORI, M. I.; MERKOCI, A.; ALEGRET, S. Electrochemical genosensor design: immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. **Biosens. Bioelectron.**, v. 15, n. 5/6, p. 291-303, Aug. 2000.
- 113 TELES, F. R. R.; FONSECA, L. P. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, v. 77, n. 2, p. 606-623, Dec. 2008.

- 114 BRETT, A. M. O. ; DICULESCU, V. C. ; CHIORCEA-PAQUIM, A. M. ; SERRANO, S. H. P. DNA-electrochemical biosensors for investigating DNA damage. In: BARCELÓ, D. (Ed.). **Comprehensive analytical chemistry**. Oxford: Elsevier, 2007. v. 49, cap. 20, p. 413-437.
- 115 BARROSO, M. F.; ÁLVAREZ, N. S.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation: electrochemical (bio)sensors. **Biosens. Bioelectron.**, v. 30, n. 1, p. 1-12, Dec. 2011.
- 116 THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosens. Bioelectron.**, v. 16, n. 1/2, p. 121-131, Jan. 2001.
- 117 LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Biosensor technology: technology push versus market pull. **Biotechnol. Adv.**, v. 26, n. 5, p. 492-500, Sept. 2008.
- 118 LIU, A.; WANG, K.; WENG, S.; LEI, Y.; LIN, L.; CHEN, W.; LIN, X.; CHEN, Y. Development of electrochemical DNA biosensors. **TrAC, Trends Anal. Chem.**, v. 37, p. 101-111, July 2012.
- 119 PALEČEK, E.; FOJTA, M. Electrochemical DNA sensors. In: WILLNER, I.; KATZ, E. (Ed.). **Bioelectronics: from theory to applications**. Jerusalem: Wiley, 2006. Cap. 5, p. 127-192.
- 120 ULIANA, C. V.; TOGNOLLI, J. O.; YAMANAKA, H. Application of factorial design experiments to the development of a disposable amperometric DNA biosensor. **Electroanalysis**, v. 23, n. 11, p. 2607-2615, Nov. 2011.
- 121 ULIANA, C. V.; RICCARDI, C. S.; TOGNOLLI, J. O.; YAMANAKA, H. Optimization of an amperometric biosensor for the detection of hepatitis C virus using fractional factorial designs. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 4, p. 782-787, May 2008.
- 122 LIGAJ, M.; JASNOWSKA, J.; MUSIAŁ, W. G.; FILIPIAK, M. Covalent attachment of single-stranded DNA to carbon paste electrode modified by activated carboxyl groups. **Electrochim. Acta**, v. 51, n. 24, p. 5193-5198, July 2006.
- 123 VERMEEREN, V.; WENMACKERS, S.; WAGNER, P.; MICHIELS, L. DNA sensors with diamond as a promising alternative transducer material. **Sensors**, v. 9, n. 7, p. 5600-5636, July 2009.
- 124 WANG, L.; XIONG, H. Y.; ZHANG, X. H.; WANG, S. F. Electrochemical behaviors of nicotine and its interaction with DNA. **Electrochem. Commun.**, v. 11, n. 11, p. 2129-2132, Nov. 2009.
- 125 GALANDOVA, J.; OVADEKOVA, R.; FERANCOVA, A. Disposable DNA biosensor with the carbon nanotubes-polyethyleneimine interface at a screen-printed carbon electrode for tests of DNA layer damage by quinazolines. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 394, n. 3, p. 855-861, June 2009.

- 126 LABUDA, J.; OVADEKOVA, R.; GALANDOVA, J. DNA-based biosensor for the detection of strong damage to DNA by the quinazoline derivative as a potential anticancer agent. **Microchim. Acta**, v. 164, n. 3/4, p. 371-377, Mar. 2009.
- 127 QIU, Y.; FAN, H.; LIU, X.; AI, S.; TANG, T.; HAN, R. X. Electrochemical detection of DNA damage induced by *in situ* generated bisphenol A radicals through electro-oxidation. **Microchim. Acta**, v. 171, n. 3/4, p. 363-369, Dec. 2010.
- 128 VYSKOCIL, V.; LABUDA, J.; BAREK, J. Voltammetric detection of damage to DNA caused by nitro derivatives of fluorene using an electrochemical DNA biosensor. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 397, n. 1, p. 233-241, May 2010.
- 129 ABREU, F. C.; GOULART, M. O. F.; BRETT, A. M. O. Detection of the damage caused to DNA by niclosamide using an electrochemical DNA-biosensor. **Biosens. Bioelectron.**, v. 17, n. 11/12, p. 913-919, Dec. 2002.
- 130 OLIVEIRA, S. C. B.; DICULESCU, V. C.; PALLESCHI, G.; COMPAGNONE, D.; BRETT, A. M. O. Electrochemical oxidation of ochratoxin A at a glassy carbon electrode and *in situ* evaluation of the interaction with deoxyribonucleic acid using an electrochemical deoxyribonucleic acid-biosensor. **Anal. Chim. Acta**, v. 588, n. 2, p. 283-291, Apr. 2007.
- 131 FERANCOVA, A.; ADAMOVSKI, M.; GRUNDLER, P.; ZIMA, J.; BAREK, J.; MATTUSCH, J.; WENNRICH, R.; LABUDA, J. Interaction of tin(II) and arsenic(III) film modified bioelectrochemistry with DNA at the nanostructure electrodes. **Bioelectrochemistry**, v. 71, n. 1, p. 33-37, Sept. 2007.
- 132 ENSAFI, A. A.; HEYDARI-BAFROOEI, E.; AMINI, M. DNA-functionalized biosensor for riboflavin based electrochemical interaction on pretreated pencil graphite electrode. **Biosens. Bioelectron.**, v. 31, n. 1, p. 376-381, Jan. 2012.
- 133 RENEDO, O. D.; ALONSO-LOMILLO, M. A.; MARTINEZ, M. J. A. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. **Talanta**, v. 73, n. 2, p. 202-219, Sept. 2007.
- 134 LOWINSOHN, D.; RICHTER, E. M.; ANGNES, L.; BERTOTTI, M. Disposable gold electrodes with reproducible area using recordable CDs and toner masks. **Electroanalysis**, v. 18, n. 1, p. 89-94, Jan. 2006.
- 135 WANG, J.; KAWDE, A. N.; SAHLIN, E. Renewable pencil electrodes for highly sensitive stripping potentiometric measurements of DNA and RNA. **Analyst**, v. 125, n. 1, p. 5-7, Jan. 2000.
- 136 ERDEM, A. Nanomaterial-based electrochemical DNA sensing strategies. **Talanta**, v. 74, n. 3, p. 318-325, Dec. 2007.
- 137 PALASKA, P.; ARITZOGLU, E.; GIROUSI, S. Sensitive detection of cyclophosphamide using DNA-modified carbon paste, pencil graphite and hanging mercury drop electrodes. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 1199-1206, May 2007.

- 138 MIRMOMTAZ, E.; ENSAFI, A. A.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Determination of amiloride using a dsDNA-modified pencil graphite electrode based on guanine and adenine signals. **Electrochim. Acta**, v. 54, n. 3, p. 1141-1146, Jan. 2009.
- 139 DOGAN-TOPAL, B.; OZKAN, S. A. Electrochemical determination of anticancer drug fulvestrant at dsDNA modified pencil graphite electrode. **Electrochim. Acta**, v. 56, n. 12, p. 4433-4438, Apr. 2011.
- 140 KARA, P.; ERDEM, A.; GIROUSI, S.; OZSOZ, M. Electrochemical detection of enzyme labeled DNA based on disposable pencil graphite electrode. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 38, n. 1, p. 191-195, June 2005.
- 141 KARADENIZ, H.; ERDEM, A.; KURALAY, F.; JELEN, F. Indicator-based and indicator-free magnetic assays connected with disposable electrochemical nucleic acid sensor system. **Talanta**, v. 78, n. 1, p. 187-192, Apr. 2009.
- 142 KARADENIZ, H.; GULMEZ, B.; SAHINCI, F.; ERDEM, A.; KAYA, G. I.; UNVER, N.; KIVCAK, B.; OZSOZ, M. Disposable electrochemical biosensor for the detection of the interaction between DNA and lycorine based on guanine and adenine signals. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 33, n. 2, p. 295-302, Sept. 2003.
- 143 ERDEM, A.; KOSMIDER, B.; OSIECKA, R.; ZYNER, E.; OCHOCKI, J.; OZSOZ, M. Electrochemical genosensing of the interaction between the potential chemotherapeutic agent, cis-bis(3-aminoflavone) dichloroplatinum(II) and DNA in comparison with cis-DDP. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 38, n. 4, p. 645-652, July 2005.
- 144 QUEIROZ, M. J. R. P.; CASTANHEIRA, E. M. S.; CARVALHO, M. S. D.; ABREU, A. S.; FERREIRA, P. M. T.; KARADENIZ, H.; ERDEM, A. New tetracyclic heteroaromatic compounds based on dehydroamino acids: photophysical and electrochemical studies of interaction with DNA. **Tetrahedron**, v. 64, n. 2, p. 382-391, Jan. 2008.
- 145 YARDIM, Y.; KESKIN, E.; LEVENT, A.; OZSOZ, M.; SENTURK, Z. Voltammetric studies on the potent carcinogen, 7,12-dimethylbenz[a]anthracene: adsorptive stripping voltammetric determination in bulk aqueous forms and human urine samples and detection of DNA interaction on pencil graphite electrode. **Talanta**, v. 80, n. 3, p. 1347-1355, Jan. 2010.
- 146 KARADENIZ, H.; CALISKAN, A.; UGUZ, C. Electrochemical monitoring of the interaction between 4-nonylphenol and DNA by graphite and carbon nanotube modified graphite electrodes. **Anal. Sci.**, v. 26, n. 10, p. 1065-1069, Oct. 2010.
- 147 ENSAFI, A. A.; REZAEI, B.; AMINI, M.; HEYDARI-BAFROOEI, E. A novel sensitive DNA-biosensor for detection of a carcinogen, Sudan II, using electrochemically treated pencil graphite electrode by voltammetric methods. **Talanta**, v. 88, p. 244-251, Jan. 2012.
- 148 BUCKOVA, M.; LABUDA, J.; SANDULA, J.; KRIZKOVA, L.; STEPÁNEK, I.; DURACKOVA, Z. Detection of damage to DNA and antioxidative activity of yeast polysaccharides at the DNA-modified screen-printed electrode. **Talanta**, v. 56, n. 5, p. 939-947, Apr. 2002.

- 149 LABUDA, J.; BUCKOVÁ, M.; HEILEROVÁ, L.; SILHÁR, L.; STEPÁNEK, I. Evaluation of the redox properties and anti/pro-oxidant effects of selected flavonoids by means of a DNA-based electrochemical biosensor. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 376, n. 2, p. 168-173, May 2003.
- 150 KORBUT, O.; BUČKOVÁ, M.; LABUDA, J.; GRÜNDLER, P. Voltammetric detection of antioxidative properties of flavonoids using electrically heated DNA modified carbon paste electrode. **Sensors**, v. 3, n. 1, p. 1-10, Jan. 2003.
- 151 FERANCOVA, A.; HEILEROVA, L.; KORGOVA, E.; SILHAR, S.; STEPANEK, I.; LABUDA, J. Anti/pro-oxidative properties of selected standard chemicals and tea extracts investigated by DNA-based electrochemical biosensor. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 219, n. 4, p. 416-420, Sept. 2004.
- 152 LIU, J.; ROUSSEL, C.; LAGGER, C. G.; TACCHINI, P.; GIRAULT, H. H. Antioxidant sensors based on DNA-modified electrodes. **Anal. Chem.**, v. 77, n. 23, p. 7687-7694, Dec. 2005.
- 153 MELLO, L. D.; HERNANDEZ, S.; MARRAZZA, G.; MASCINI, M.; KUBOTA, L. T. Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. **Biosens. Bioelectron.**, v. 21, n. 7, p. 1374-1382, Jan. 2006.
- 154 BARROSO, M. F.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Electrochemical DNA-sensor for evaluation of total antioxidant capacity of flavours and flavoured waters using superoxide radical damage. **Biosens. Bioelectron.**, v. 26, n. 9, p. 3748-3754, May 2011.
- 155 BARROSO, M. F.; ÁLVAREZ, N. S.; LOBO-CASTAÑÓN, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; TUÑÓN-BLANCO, P. DNA-based biosensor for the electrocatalytic determination of antioxidant capacity in beverages. **Biosens. Bioelectron.**, v. 26, n. 5, p. 2396-2401, Jan. 2011.
- 156 BARROSO, M. F.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Evaluation of the total antioxidant capacity of flavored water and electrochemical purine damage by sulfate radicals using a purine-based sensor. **Electrochim. Acta**, v. 56, n. 24, p. 8954-8961, Oct. 2011.
- 157 BARROSO, M. F.; DELERUE-MATOS, C.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Electrochemical evaluation of total antioxidant capacity of beverages using a purine-biosensor. **Food Chem.**, v. 132, n. 2, p. 1055-1062, May 2012.
- 158 GOMORI, G. General preparative procedures. In: COLOWICK, S. P.; CAPLAN, N. O. (Ed.). **Methods in enzymology**. New York: Academic Press, 1965. v. 1, cap. 16, p. 139-146.
- 159 ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; SALAZAR-BANDA, G. R.; YAMANAKA, H. Determination of 5-aminosalicylic acid in pharmaceutical formulations by square wave voltammetry at pencil graphite electrodes. **Quím. Nova**, v. 33, n. 4, p. 964-967, mar./abr. 2010.

- 160 PIVIDORI, M. I.; ALEGRET, S. DNA adsorption on carbonaceous materials. **Top. Curr. Chem.**, v. 260, p. 1-36, Sept. 2005.
- 161 SOUZA, E.; NASCIMENTO, G.; SANTANA, N.; FERREIRA, D.; LIMA, M.; NATIVIDADE, E.; MARTINS, D.; LIMA, J. Label-free electrochemical detection of the specific oligonucleotide sequence of dengue virus type 1 on pencil graphite electrodes. **Sensors**, v. 11, n. 6, p. 5616-5629, May 2011.
- 162 GHERGHI, I. C.; GIROUSI, S. T.; VOULGAROPOULOS, A.; TZIMOU-TSITOURIDOU, R. Adsorptive transfer stripping voltammetry applied to the study of the interaction between DNA and actinomycin D. **Int. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 84, n. 11, p. 865-874, Sept. 2004.
- 163 BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P. The electrochemical oxidation of DNA. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 6, n. 1, p. 97-100, Jan. 1995.
- 164 LI, Q.; BATCHELOR-McAULEY, C.; COMPTON, R. G. Electrochemical oxidation of guanine: electrode reaction mechanism and tailoring carbon electrode surfaces to switch between adsorptive and diffusional responses. **J. Phys. Chem. B**, v. 114, n. 21, p. 7423-7428, June 2010.
- 165 BRETT, A. M. O.; DICULESCU, V. C.; PIEDADE, J. A. P. Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode. **Bioelectrochemistry**, v. 55, n. 1/2, p. 61-62, Jan. 2002.
- 166 GONCALVES, L. M.; BATCHELOR-McAULEY, C.; BARROS, A. A.; COMPTON, R. G. Electrochemical oxidation of adenine: a mixed adsorption and diffusion response on an edge-plane pyrolytic graphite electrode. **J. Phys. Chem. C**, v. 114, n. 33, p. 14213-14219, Aug. 2010.
- 167 MANCHESTER, K. L. Value A/260/A280 ratios for measurement of purity of nucleic acids. **Biotechniques**, v. 19, n. 2, p. 208-210, Aug. 1995.
- 168 CALZUOLA, I.; GIANFRANCESCHI, G. L.; MARSILI, V. Binding citrate/DNA in presence of divalent cations - potential mimicry of acidic peptides/DNA interactions. **Mol. Biol. Rep.**, v. 28, n. 1, p. 43-46, Mar. 2001.
- 169 SOUZA, D. de; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Square wave voltammetry. Part 1: theoretical aspects. **Quím. Nova**, v. 26, n. 1, p. 81-89, jan.-fev. 2003.
- 170 MIDORIKAWA, K.; MURATA, M.; OIKAWA, S.; TADA-OIKAWA, S.; KAWANISHI, S. DNA damage by dimethylformamide: role of hydrogen peroxide generated during degradation. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 13, n. 4, p. 309-315, Apr. 2000.
- 171 CLARIANT S/A. **Fongranal**[®] FB. São Paulo, 2009. 9 p. Ficha técnica.
- 172 PATAI, S. **The Chemistry of the hydrazo, azo and azoxy groups**. London: Wiley, 1975.

- 173 YANDOVSKI, V. N.; GIDASPOV, B. V.; TSELINSKI, I. V. The formation of the azoxy-group in the oxidation of compounds with nitrogen-nitrogen bonds. **Russ. Chem. Rev.**, v. 50, n. 2, p. 296-324, Apr. 1981.
- 174 GRIMSHAW, J. **Electrochemical reactions and mechanisms in organic chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2000.
- 175 CARBAJO, J.; BOLLO, S.; NÚÑEZ-VERGARA, L. J.; CAMPERO, A.; SQUELLA, J. A. Cyclic voltammetric study of the disproportionation reaction of the nitro radical anion from 4-nitroimidazole in protic media. **J. Electroanal. Chem.**, v. 531, n. 2, p. 187-194, Aug. 2002.
- 176 MONTI, S.; FLAMIGNI, L. Primary processes in the reduction of 4-nitroazobenzene. A pulse radiolysis study in alcoholic solvents. **J. Phys. Chem.**, v. 90, n. 6, p. 1179-1184, Mar. 1986.
- 177 BOLLO, S.; NUNEZ-VERGARA, L. J.; BARRIENTOS, C.; SQUELLA, J. A. Nitroradical anion formation from some iodo-substituted nitroimidazoles. **Electroanalysis**, v. 17, n. 18, p. 1665-1673, Sept. 2005.
- 178 ISSA, I. M.; ISSA, R. M.; TEMERKI, Y. M.; MAHMOUD, M. R. Reduction of azo-compounds-I. Polarographic behaviour of some 4-hydroxymonoazo compounds at the dropping mercury electrode. **Electrochim. Acta**, v. 18, n. 2, p.139-144, Feb. 1973.
- 179 FRY, A. J. **Synthetic organic electrochemistry**. New York: Wiley, 1989.
- 180 MENEK, N.; KARAMAN, Y. Polarographic and voltammetric investigation of 8-hydroxy-7-(4-sulfo-1-naphthylazo)-5-quinoline sulfonic acid. **Dyes Pigm.**, v. 67, n. 1, p. 9-14, Oct. 2005.
- 181 MENEK, N.; KARAMAN, Y. Polarographic and voltammetric investigation of 6'-butoxy-2,6-diamino-3,3'-azodipyridine. **Dyes Pigm.**, v. 68, n. 2/3, p. 101-108, Aug. 2006.
- 182 YANG, D.; ZHU, L.; JIANG, X. Electrochemical reaction mechanism and determination of Sudan I at a multi wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode. **J. Electroanal. Chem.**, v. 640, n. 1/2, p. 17-22, Mar. 2010.
- 183 GOODING, J. J.; COMPTON, R. G.; BRENNAN, C. M.; ATHERTON, J. H. The mechanism of the electro-reduction of some azo dyes. **Electroanalysis**, v. 8, n. 6, p. 519-523, June 1996.
- 184 ERIKSSON, A.; NYHOLM, L. A comparison of the electrochemical properties of some azosalicylic acids at glassy carbon electrodes by cyclic and hydrodynamic voltammetry. **Electrochim. Acta**, v. 44, n. 23, p. 4029-4040, July 1999.
- 185 ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. Electrochemical reduction of disperse orange 1 textile dye at a boron-doped diamond electrode. **J. Appl. Electrochem.**, v. 42, n. 5, p. 297-304, May 2012.

186 OZTEKINA, Y.; YAZICIGIL, Z.; RAMANAVICIENE, A.; RAMANAVICIUS, A. Polyphenol-modified glassy carbon electrodes for copper detection. **Sens. Actuators, B**, v. 152, n. 1, p. 37-48, Feb. 2011.

187 XING, T. L.; WANG, F.; MAO, Y. Y.; WANG, L. P.; YE, B. X. Electrochemical behavior of apigenin at a glassy carbon electrode and its analytical application. **J. Chin. Chem. Soc.**, v. 56, n. 2, p. 303-309, June 2009.

188 BANITABA, M. H.; DAVARANI, S. S.; MEHDINIA, A. Study of interactions between DNA and aflatoxin B1 using electrochemical and fluorescence methods. **Anal Biochem.**, v. 411, n. 2, p. 218-222, Apr. 2011.

189 ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. Spectrophotometric evaluation of the behavior of disperse red 1 dye in aqueous media and its interaction with calf thymus ds-DNA. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 8, p. 1469-1475, Aug. 2012.

190 PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P. J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 18, n. 6, p. 497-503, Dec. 2007.

191 OZKAN-ARIKSOYSAL, D.; KARA, P.; OZSOZ, M. Electrochemical DNA biosensors for detection of compound-DNA. In: OZSOZ, M. (Ed.). **Electrochemical DNA biosensors**. Singapore: Pan Stanford Publishing, 2012. Cap. 12, p. 379-402.

192 KASHANIAN, S.; DOLATABADI, J. E. N. DNA binding studies of 2-tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive. **Food Chem.**, v. 116, n. 3, p. 743-747, Oct. 2009.

193 AHMADI, F.; JAMALI, N.; JAHANGARD-YEKTA, S.; JAFARI, B.; NOURI, S.; NAJAFI, F.; RAHIMI-NASRABADI, M. The experimental and theoretical QM/MM study of interaction of chloridazon herbicide with ds-DNA. **Spectrochim. Acta, Part A**, v. 79, n. 5, p. 1004-1012, Sept. 2011.

194 CHOWDHURY, S. R.; MUKHERJEA, K. K.; BHATTACHARYYA, R. Biophysical and biochemical investigation on the binding of a manganese-cyanonitrosyl complex with DNA. **Transition Met. Chem.**, v. 30, n. 5, p. 601-604, Aug. 2005.

195 KASHANIAN, S.; GHOLIVAND, M. B.; AHMADI, F.; RAVAN, H. Interaction of diazinon with DNA and the protective role of selenium in DNA damage. **DNA Cell Biol.**, v. 27, n. 6, p. 325-332, June 2008.

196 ARJMAND, F.; MOHANI, B.; PARVEEN, S. New dihydro OO'bis(salicylidene) 2,2' aminobenzothiazolyl borate complexes: kinetic and voltammetric studies of dimethyltin copper complex with guanine, adenine, and calf thymus DNA. **Bioinorg. Chem. Appl.**, v. 2006, p. 1-10, Mar. 2006.

197 SILVEIRA NETO, B. A. D.; LAPIS, A. A. M. Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends. **Molecules**, v. 14, n. 5, p. 1725-1746, May 2009.

- 198 KOH, J. Dyeing with disperse dyes. In: HAUSER, P. J. (Ed.). **Textile dyeing**. Rijeka: InTech, 2011. Cap 10, p. 195-220.
- 199 FERGUSON, L. R.; DENNY, W. A. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators. **Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 623, n. 1/2, p. 14-23, Oct. 2007.
- 200 ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. Evaluation of the interactions of DNA with the textile dyes disperse orange 1 and disperse red 1 and their electrolysis products using an electrochemical biosensor. **Sens. Actuators, B.**, v. 178, p. 627-635, Mar. 2013.
- 201 CABALLERO, B. **Guide to nutritional supplements**. Oxford: Elsevier, 2009.
- 202 SHUKLA, S.; GUPTA, S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention. **Pharm. Res.**, v. 27, n. 6, p. 962-978, June 2010.
- 203 BANERJEE, B.; CHAUDHURI, T. C. **Therapeutic effects of tea**. Enfield: Science Publishers, 2005.
- 204 DUFRESNE, C. J.; FARNWORTH, E. R. A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. **J. Nutr. Biochem.**, v. 12, n. 7, p. 404-421, July 2001.

APÊNDICE A – Cromatogramas (LC) e espectros de massa dos corantes e seus produtos de eletrólise.

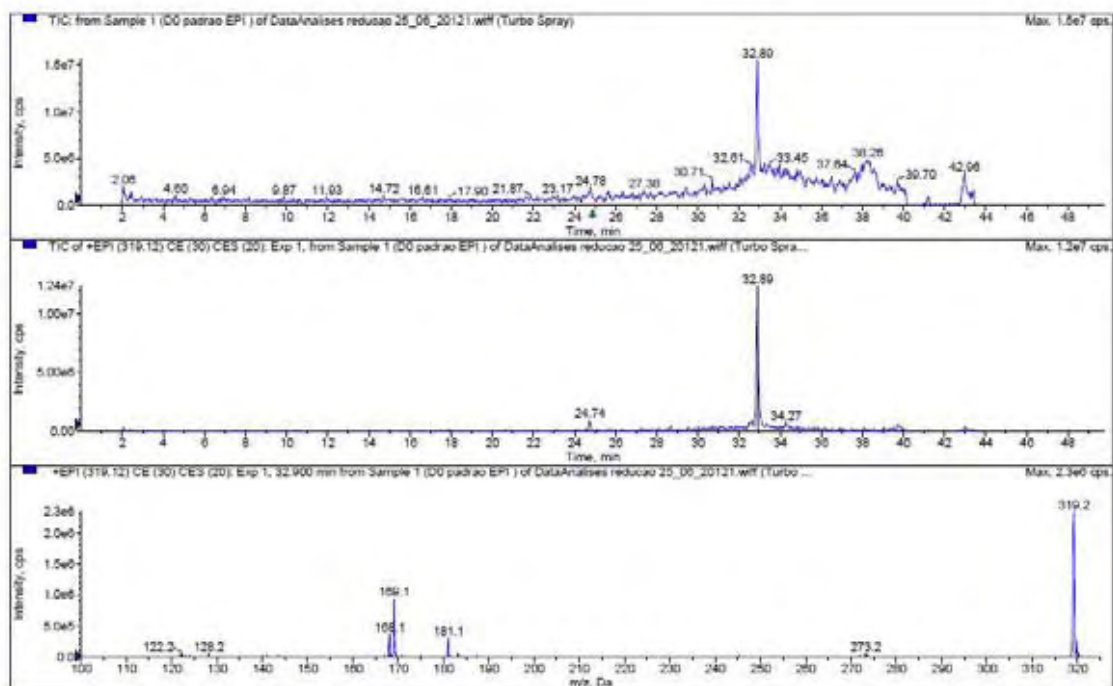


Figura 1. Corante DO1 original: cromatograma de íons totais (TIC), cromatograma em modo MS/MS e espectro de massas em EPI (Enhanced Product-Ions), no estágio MS/MS.

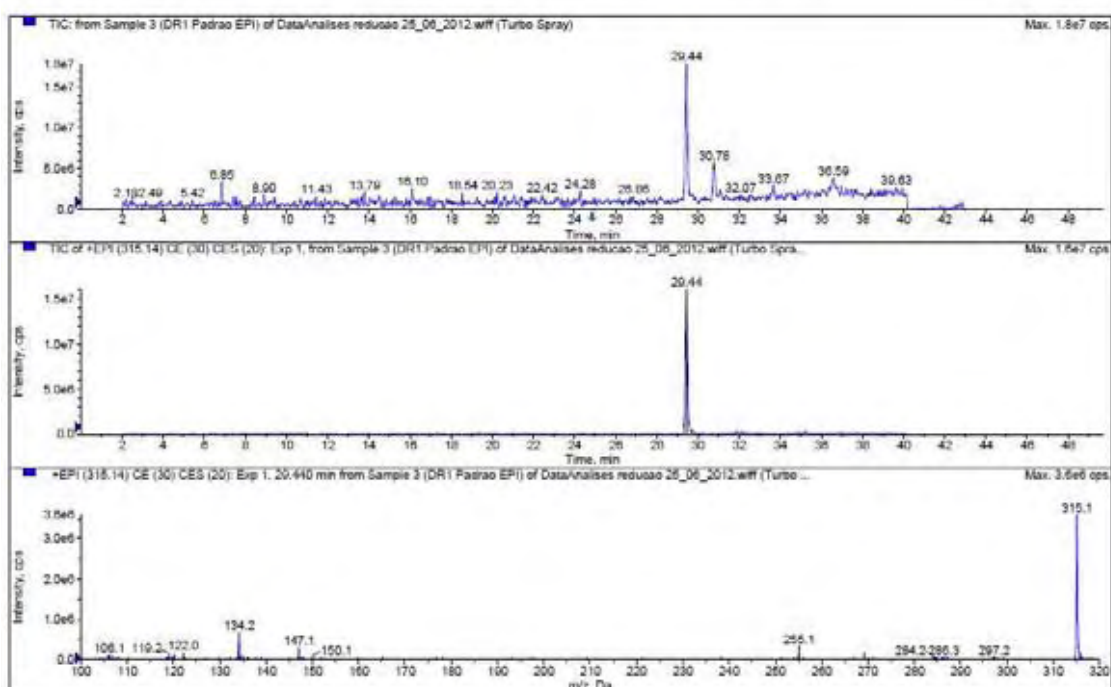


Figura 2. Corante DR1 original: cromatograma de íons totais (TIC), cromatograma em modo MS/MS e espectro de massas em EPI (Enhanced Product-Ions), no estágio MS/MS.

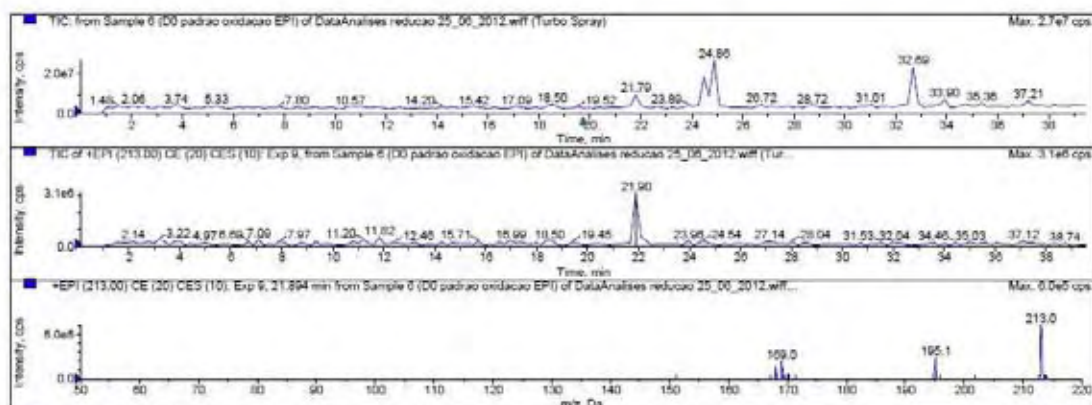


Figura 3. Corante DO1 após oxidação: cromatograma de íons totais (TIC), cromatograma em modo MS/MS e espectro de massas em EPI (Enhanced Product-Ions), no estágio MS/MS.

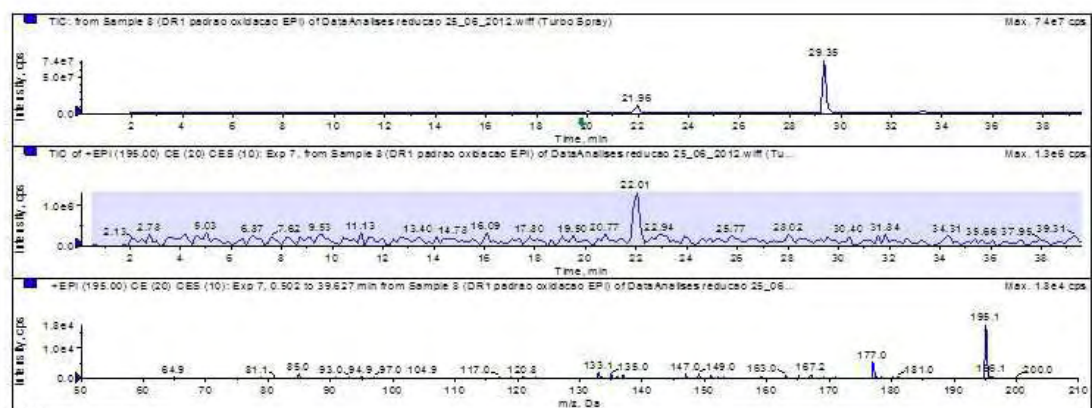


Figura 4. Corante DR1 após oxidação: cromatograma de íons totais (TIC), cromatograma em modo MS/MS e espectro de massas em EPI (Enhanced Product-Ions), no estágio MS/MS.

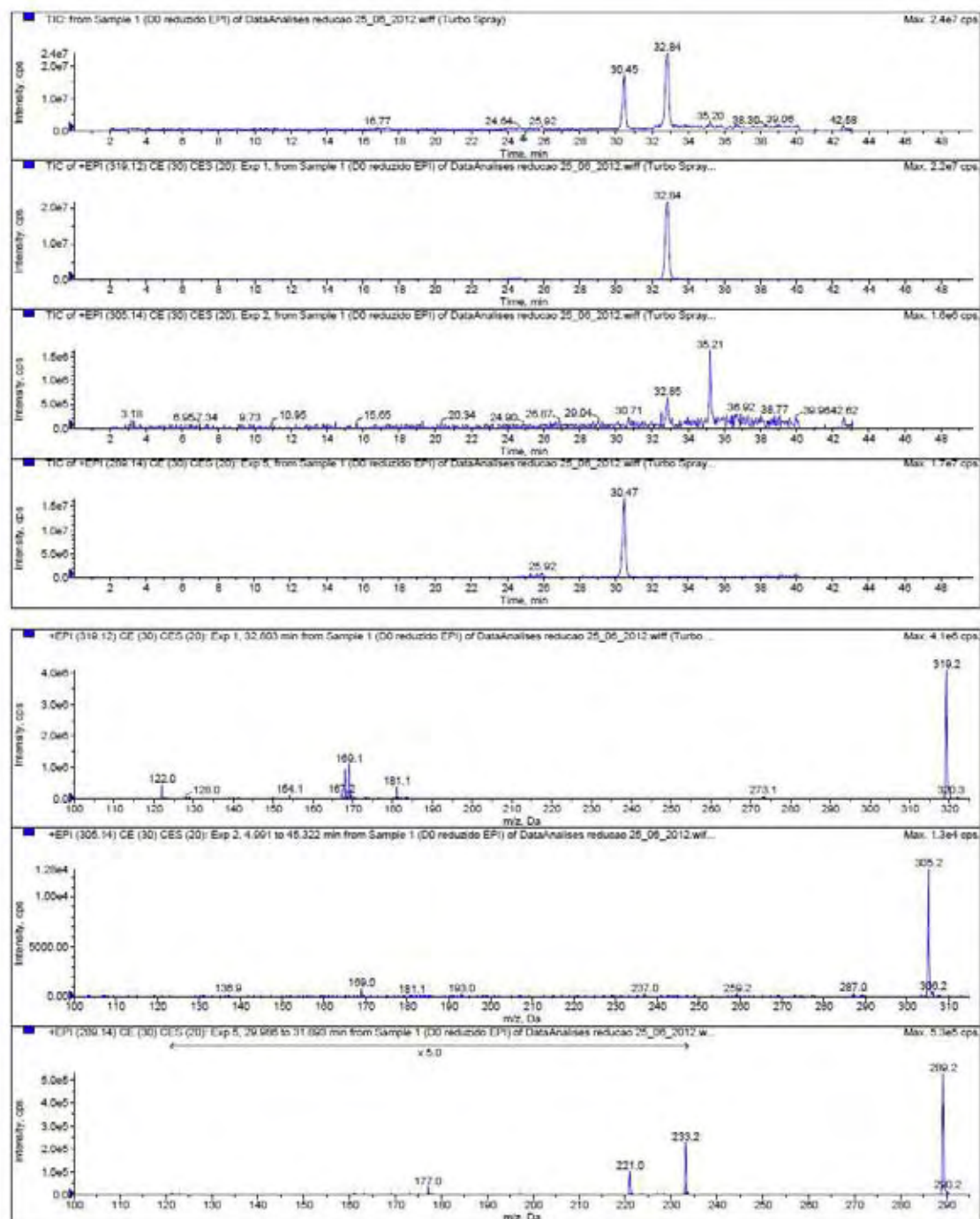


Figura 5. Corante DO1 após redução: cromatograma de ions totais (TIC), cromatograma em modo MS/MS e espectros de massas em EPI (Enhanced Product-Ions), no estágio MS/MS.

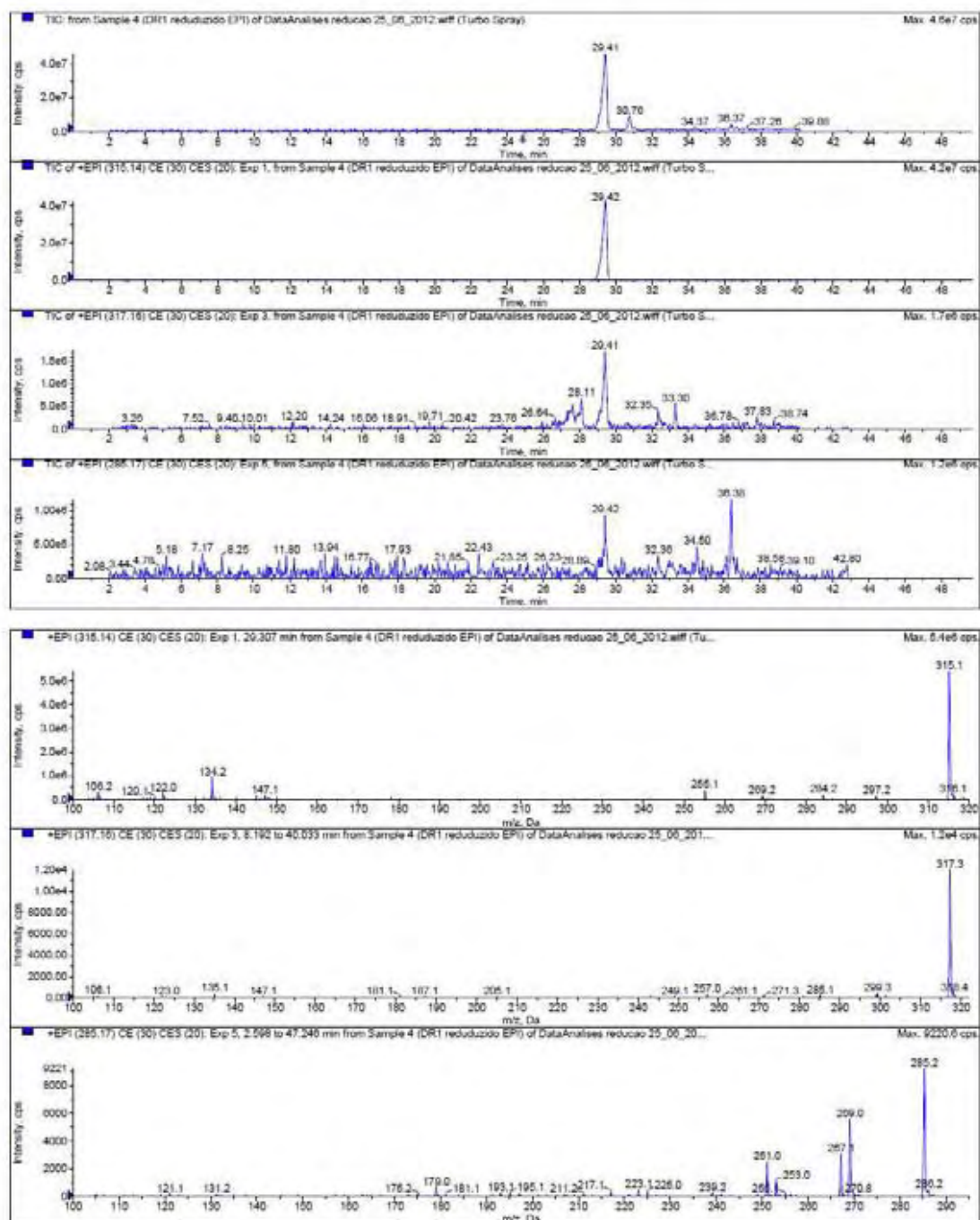


Figura 6. Corante DR1 após redução; cromatograma de íons totais (TIC), cromatograma em modo MS/MS e espectros de massas em EPI (Enhanced Product-Ions), no estágio MS/MS.