

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E FÍSICA MOLECULAR

BEATRIZ ALVES FERNANDES

Solventes eutéticos profundos como agentes modificadores de  
eletrodos aplicados à novas plataformas eletroquímicas de  
estudos de interação *in vitro* DNA-corantes alimentícios

São Carlos

2024

BEATRIZ ALVES FERNANDES

Solventes eutéticos profundos como agentes modificadores de eletrodos aplicados à novas plataformas eletroquímicas de estudos de interação *in vitro* DNA-corantes alimentícios

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica e Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Rafael Martos Buoro

**Exemplar revisado**

O exemplar original encontra-se em  
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2024

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

**Assinatura:** Beatriz Alves Fernandes  
**Data:** 27/03/2024

*Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC*

Fernandes, Beatriz Alves

Solventes eutéticos profundos como agentes modificadores de eletrodos aplicados à novas plataformas eletroquímicas de estudos de interação in vitro DNA-corantes alimentícios / Beatriz Alves Fernandes. — São Carlos, 2024.  
110 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2024.  
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Rafael Martos Buoro

1. Biosensores eletroquímicos. 2. Solventes eutéticos naturais profundos. 3. Corantes alimentícios. 4. Tartrazina. 5. Azul brilhante. I. Título.

*Sonia Alves - CRB: 4280/8*



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, Nossa Senhora de Fátima e Santo Antônio por chegar até aqui e por nunca me desampararem em todos os momentos em que pensei desistir.

Ao meu amado esposo Gustavo que teve toda paciência e amor nos dias fáceis e difíceis.

À minha querida amada vizinha materna Cida, à mãe Shirley, ao meu falecido vô Tomaz, ao meu irmão Gregory, à minha irmã Maria Eduarda e aos meus outros familiares por serem meus pilares de vida.

Aos meus afilhados queridos: Maria Clara, Nicolas e Mateus que sempre me divertem.

À Marina por ajudar a minha saúde mental.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Rafael Martos Buoro por toda aprendizagem, por me acolher e sempre estar disponível em todos os momentos do mestrado.

Ao Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavalheiro, por toda aprendizagem.

As técnicas Dra. Ana Paula Garcia e Dra. Priscila Cervini por toda ajuda.

Aos meus colegas LATEQS: Suysia, Thaís, Jailson, Carla, Matheus, Ricardo, Valdenir, Luciano e Caio.

Aos meus amigos dorameiros do coração que sempre me acompanharam e promoveram risadas nos momentos que mais precisei.

Ao Padre Toninho por sempre abençoar com água benta os meus trabalhos evitando experimentos com resultados não satisfatórios.

A todos que me ajudaram na realização do mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001.

## RESUMO

Nesse presente estudo, foi proposta uma nova plataforma eletroquímica para a realização de estudos de interação molécula alvo-ds-DNA, com base em solventes eutéticos profundos naturais (NADES) como agentes modificadores de eletrodos de pasta de carbono. As moléculas alvo escolhidas foram os corantes tartrazina (TZ), azul brilhante (AB), e a mistura deles (AB-TZ), presentes como aditivos alimentares em alimentos ultraprocessados, com possível potencial alergênico e mutagênico. A adição dos NADES em substituição a uma fração do óleo mineral (aglutinante) no eletrodo compósito, aumentou a hidrofiliabilidade e a condutividade da superfície do eletrodo, com destaque aos NADES a base de cloreto de colina. A etalina (cloreto de colina + etilenoglicol) em substituição a uma fração do óleo mineral (CPE<sub>(et)</sub>/dsDNA) se mostrou como melhor compósito ao apresentar correntes de pico referentes à oxidação dos nucleosídeos cerca de 2-3x maior quando comparado ao eletrodo base (CPE) e o eletrodo de carbono vítreo (GCE), comumente utilizado para este tipo de estudo, devido ao íon colina apresentar maior efetividade no processo de estabilização do dsDNA, pela interação direta da carga positiva do íon colina com os grupos fosfatos carregados negativamente do dsDNA e o estabelecimento de ligações de hidrogênio com os sulcos do dsDNA. A avaliação eletroquímica da interação ds-DNA-TZ, ds-DNA-AB e ds-DNA-AB-TZ foi realizada com os sensores CPE<sub>(et)</sub>/dsDNA por técnicas voltamétricas e espectroscopia de impedância eletroquímica. Ambos os corantes atuam potencialmente como compostos de intercalação, enovelando a estrutura do dsDNA. O eletrodo CPE<sub>(et)</sub>/dsDNA se mostrou mais eficiente que o GCE/ds-DNA para estudos de interação *in-vitro* entre ds-DNA e molécula alvo, trazendo uma maior aproximação da conformação do ds-DNA adsorvido a que ocorre em solução. Ademais, a plataforma proposta (CPE<sub>(et)</sub>/dsDNA) se mostrou eficiente em estudos de interação, ao garantir um alto recobrimento da superfície eletródica com o material genético, possibilitando a visualização de novas interações antes vistas apenas em solução aquosa.

Palavras-chave: Solvente eutético profundo, dsDNA, pasta de carbono, tartrazina, azul brilhante.

## ABSTRACT

In this present study, a new electrochemical platform was proposed to perform studies of target-ds-DNA molecule interaction, based on natural deep eutectic solvents (NADES) as carbon paste electrode modifiers. The target molecules chosen were the dyes tartrazine (TZ), brilliant blue (AB), and their mixture (AB-TZ), present as food additives in Ultra-processed foods, with possible allergenic and mutagenic potential. The addition of NADES to replace a fraction of the mineral oil (binder) in the composite electrode increased the hydrophilicity and conductivity of the electrode surface, especially the NADES based on choline chloride. Ethaline (choline chloride + ethylene glycol) replacing a fraction of mineral oil (CPE(et)/dsDNA) was shown to be the best composite by presenting currents referring to nucleoside oxidation about 2-3x higher when compared to the base electrode (CPE) and the glassy carbon electrode (GCE), commonly used for this type of study, because the choline ion has greater effectiveness in stabilization process of dsDNA, by the direct interaction of the positive charge of the choline ion with negatively charged dsDNA phosphate groups and establishment of hydrogen bonds with dsDNA grooves. The electrochemical evaluation of the interaction ds-DNA-TZ, ds-DNA-AB and ds-DNA-AB-TZ was performed with the CPE (et)/dsDNA sensors by voltammetric techniques and electrochemical impedance spectroscopy. Both dyes potentially act as intercalation compounds, folding the structure of dsDNA. The CPE (et)/dsDNA electrode was more efficient than GCE/ds-DNA for in-vitro interaction studies between ds-DNA and target molecule, bringing a more faithful approximation of the conformation of the adsorbed ds-DNA that occurs in solution. In addition, the proposed platform (CPE (et)/dsDNA) was efficient in interaction studies, ensuring a high coating of the electrodic surface with the genetic material, allowing the visualization of new interactions previously seen only in aqueous solution.

Keywords: Deep eutectic solvents, dsDNA, carbon paste electrodes, tartrazine, brilliant blue.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Fórmula estrutural da tartrazina (TZ) .....	20
<b>Figura 2.</b> Fórmula estrutural do corante azul brilhante (AB).....	22
<b>Figura 3.</b> Esquema da síntese dos DES .....	32
<b>Figura 4.</b> Esquema do preparo das pastas de carbono com e sem modificação .....	33
<b>Figura 5.</b> Esquema do preparo dos sensores modificados com dsDNA .....	35
<b>Figura 6.</b> Esquema do estudo de interação com dsDNA e os analitos de interesse.....	36
<b>Figura 7.</b> Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha base obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com GCE (linha preta), CPE não tratado (linha rosa) e CPET (linha verde) modificados com ds-DNA no intervalo de potencial de $E = 0$ a $+1,4$ V (vs Ag/AgCl (KCl $3,0$ mol $L^{-1}$ )).	39
<b>Figura 8.</b> Corpos de eletrodo utilizados para a produção dos eletrodos (esquerda). Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha base obtidos para CPET em PEEK e seringa de polietileno em um intervalo de potencial de $0$ a $+1,4$ V (vs Ag/AgCl (KCl $3,0$ M), em solução tampão acetato $0,1$ M, pH 4.5 (direita)..	41
<b>Figura 9.</b> Voltamogramas de pulso diferencial com correção da linha base com CPET <sub>(et)</sub> com diferentes porcentagens em a) seringa de polietileno e b) PEEK no intervalo de potencial de $E = 0,0$ a $+1,4$ V (vs Ag/AgCl (KCl $3,0$ M) / V), em solução tampão acetato $0,1$ mol $L^{-1}$ , pH 4,5. ....	43
<b>Figura 10.</b> Correntes de pico de oxidação dGuo e dAdo em função das porcentagens de etalina com os valores de desvio padrão absoluto: corpo do eletrodo seringa (A) e corpo do eletrodo peek (B).....	44
<b>Figura 11.</b> Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha base obtidos com (a) CPET <sub>(gly)</sub> e (b) CPET <sub>(men)</sub> no intervalo de potencial de $E = 0$ a $+1,4$ V (vs Ag/AgCl (KCl $3,0$ M) / V, em solução tampão acetato $0,1$ mol $L^{-1}$ pH 4.5, com aumento da porcentagem. ....	45
<b>Figura 12.</b> A) Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha base obtidos com CPET com diferentes modificadores na porcentagem de 7,5% no intervalo de potencial de $E = 0$ a $+1,4$ V (vs Ag/AgCl (KCl $3,0$ M) / V, em solução	

tampão acetato 0,1 mol L <sup>-1</sup> pH 4,5 B) Gráfico da corrente em função dos tipos de modificadores.....	47
<b>Figura 13.</b> Imagens obtidas na câmera digital Navitar para a) CPE; b) CPE <sub>(et)</sub> ; c) CPE <sub>(gly)</sub> e d) CPE <sub>(men)</sub> .....	48
<b>Figura 14.</b> Diagrama de Nyquist de espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> .3H <sub>2</sub> O contendo 0,5 mol L <sup>-1</sup> de KCl como eletrólito suporte com eletrodos sem dsDNA (A), eletrodos apenas com pré-tratamento (B), eletrodos com dsDNA sem pré-tratamento (C) e eletrodos pré-tratados com dsDNA (D) .....	50
<b>Figura 15.</b> Circuito equivalente utilizado na ferramenta de análise “electrochemical circle fit” .....	51
<b>Figura 16.</b> Curvas (Bode-fase/Bode módulo) obtidas com eletrodo sem pré-tratamento (A/B), com pré-tratamento (C/D), sem pré-tratamento com dsDNA (E/F) e com pré-tratamento e com dsDNA (G/H) a partir dos espectros de impedância eletroquímica com E <sub>fixado</sub> = + 0,22V em solução de K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> .3H <sub>2</sub> O contendo 0,5 mol L <sup>-1</sup> de KCl.....	53
<b>Figura 17.</b> Curvas (Bode-fase/Bode módulo) obtidas com eletrodo sem pré-tratamento (A/B), com pré-tratamento (C/D), sem pré-tratamento com dsDNA (E/F) e com pré-tratamento e com dsDNA (G/H) a partir dos espectros de impedância eletroquímica em E <sub>fixado</sub> = + 0,0V em solução de K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> .3H <sub>2</sub> O contendo 0,5 mol L <sup>-1</sup> de KCl. ....	56
<b>Figura 18.</b> Imagens obtidas por MEV para A, C, E e G com CPE, CPE <sub>(et)</sub> , CPE <sub>(men)</sub> e CPE <sub>(gli)</sub> , respectivamente com ampliação 500x; B, D, F e H com CPE, CPE <sub>(et)</sub> , CPE <sub>(men)</sub> e CPE <sub>(gli)</sub> , respectivamente com ampliação 2500x.....	58
<b>Figura 19.</b> Imagens de Microscopia de Força Atômica (varredura frontal) com sua representação 3D (A-F) CPE, (G-L) CPE <sub>(et)</sub> /ds-DNA.....	59
<b>Figura 20.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,0, contendo TZ 100 μmol L <sup>-1</sup> com CPE <sub>(et)</sub> (A) e GCE (B). Condições experimentais: velocidade de varredura 50 mV s <sup>-1</sup> , intervalo de potencial E= + 0,2 V a +1,4V. ....	61
<b>Figura 21.</b> Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com CPE <sub>(et)</sub> em solução de 10 μmol L <sup>-1</sup> de tartrazina em diversos valores de pH e (inset) voltamograma de pulso diferencial com linha base corrigida (A). Voltamogramas de	



pulso diferencial obtidos com GCE em solução de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TZ em diversos valores de pH e (inset) voltamograma de pulso diferencial com linha base corrigida (B). .....62

**Figura 22.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com  $\text{CPE}_{(\text{et})}$  sem dsDNA (A) e GCE sem ds-DNA (B) após incubação em solução contendo  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de tartrazina no intervalo de 2 a 60 minutos. ....63

**Figura 23.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com  $\text{CPE}_{(\text{et})}/\text{ds-DNA}$  (A,B) e GCE/ds-DNA (C,D) após incubação em solução contendo em  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TZ em vários tempos de incubação (2 a 60 minutos). Gráficos da corrente de pico normalizado em função do tempo de interação com o corante em  $\text{CPE}_{(\text{et})}$  (E) e GCE (F). .....66

**Figura 24.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com  $\text{CPE}_{(\text{et})}/\text{ds-DNA}$  (A) e GCE/ds-DNA (B) após incubação de 4 minutos em solução contendo concentrações no intervalo de 5 a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TZ. Gráficos da corrente normalizada dos picos de oxidação de dGuo e dado em função da concentração da TZ com  $\text{CPE}_{(\text{et})}$  (C) e GCE (D). .....68

**Figura 25.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte com  $\text{CPE}_{(\text{et})}$  (A), GCE (B) após incubação em solução contendo em  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TZ durante 2 a 15 minutos.  $E_{\text{fixado}} = + 0,22 \text{ V}$  .....69

**Figura 26.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte com  $\text{CPE}_{(\text{et})}/\text{ds-DNA}$  (A e C), GCE/ds-DNA (B e D) após incubação em solução contendo em  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de tartrazina durante 2 a 15 minutos. ....70

**Figura 27.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte com  $\text{CPE}_{(\text{et})}/\text{ds-DNA}$  (A), GCE/ds-DNA (B) após incubação de 12 minutos em solução contendo concentrações no intervalo de 2 a  $120 \mu\text{mol L}^{-1}$  de tartrazina. ....72

**Figura 28.** Gráfico de  $R_{\text{CT}}$  em função da concentração de TZ expressa em micromolar com  $\text{CPE}_{(\text{et})}/\text{ds-DNA}$  (A) e GCE/ds-DNA (B). .....73

**Figura 29.** Espectros UV-Vis obtidos em: solução de Tartrazina de  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  (A) e da solução de dsDNA  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 antes e após interação com a Tartrazina no intervalo de 2 a 60 minutos (B) e

variação da absorbância do dsDNA em 260 nm versus o tempo de interação do corante (B-inset).....74

**Figura 30.** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 contendo 100 μmol L<sup>-1</sup> de azul com CPE<sub>(et)</sub> (A) e GCE (B). Parâmetros experimentais: velocidade de varredura 50 mV s<sup>-1</sup>, E<sub>i</sub> = E<sub>f</sub> = +0,2V e E<sub>λ</sub> = +1,4 V.....76

**Figura 31.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com GCE para 10,0 μmol L<sup>-1</sup> de AB para diferentes valores de pH (A) e voltamograma de pulso diferencial com a linha base corrigida(inset); Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com CPE<sub>(et)</sub> para 10,0 μmol L<sup>-1</sup> de AB para diferentes valores de pH (B) e voltamograma de pulso diferencial com a linha base corrigida (inset). .....77

**Figura 32.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com CPE<sub>(et)</sub> (A) e GCE (B) após incubação em solução contendo 50 μmol L<sup>-1</sup> de Azul Brilhante no intervalo de 2 a 60 minutos.....78

**Figura 33.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA (A,B) e GCE/ds-DNA (C,D) após incubação em solução contendo em 100 μmol L<sup>-1</sup> de AB durante 2 a 60 minutos. Gráficos da corrente de pico normalizado em função do tempo de interação com o corante em CPE<sub>(et)</sub> (E) e GCE (F).....79

**Figura 34.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com a) CPE<sub>(et)</sub> e b) GCE após incubação de 2 minutos em solução contendo concentrações no intervalo de 5 a 50 μmol L<sup>-1</sup> de AB. Gráficos da corrente normalizada dos picos de oxidação de dGuo e dado em função da concentração de AB com c) CPE<sub>(et)</sub> e d) GCE.....81

**Figura 35.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O em 0,5 mol L<sup>-1</sup> de KCl como eletrólito suporte com CPE<sub>(et)</sub> (A), GCE (B) após incubação em solução contendo em 50,0 μmol L<sup>-1</sup> de AB durante 2 a 15 minutos. E<sub>fixado</sub> = +0,22 V.....82

**Figura 36.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O em 0,5 mol L<sup>-1</sup> de KCl como eletrólito suporte com CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA (A e C) e GCE/ds-DNA (B e D) após incubação em solução contendo em 50,0 μmol L<sup>-1</sup> de AB durante 2 a 15 minutos. E<sub>fixado</sub> = + 0,22 V.....84

**Figura 37.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O em 0,5 mol L<sup>-1</sup> de KCl como eletrólito suporte com CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA

(A) e GCE/dsDNA (B) após incubação de 10 minutos em solução contendo concentrações no intervalo de 2 a 70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AB. ....	86
<b>Figura 38.</b> Gráfico de $R_{CT}$ em função da concentração de AB com CPE <sub>(et)</sub> /ds-DNA (A) e GCE/ds-DNA (B). ....	87
<b>Figura 39.</b> Espectros UV-Vis obtidos em 5,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de solução de AB (A) e em solução de ds-DNA 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ antes e após interação com AB no intervalo de 2 a 60 minutos (B) e variação da absorbância do ds-DNA em 260 nm versus o tempo de interação do corante (inset). ....	88
<b>Figura 40.</b> Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão fosfato 0,1 mol $\text{L}^{-1}$ pH 7,0 contendo 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AB e TZ com CPE <sub>(et)</sub> (A) e GCE (B). Parâmetros experimentais: velocidade de varredura 50 $\text{mV s}^{-1}$ , $E_i = E_f = +0,2\text{V}$ e $E_\lambda = +1,4\text{ V}$ . ....	89
<b>Figura 41.</b> Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com CPE <sub>(et)</sub> (A) e GCE (B) após incubação em solução contendo 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AB e TZ no intervalo de 2 a 15 minutos. ....	90
<b>Figura 42.</b> Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com (a) CPE <sub>(et)</sub> /ds-DNA e (b) GCE/ds-DNA após incubação em solução contendo em 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TZ e AB durante 2 a 15 minutos. Gráficos da corrente de pico normalizado em função do tempo de interação com o corante em CPE <sub>(et)</sub> (C) e GCE (D). ....	91
<b>Figura 43.</b> Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 0,5 mol $\text{L}^{-1}$ de KCl como eletrólito suporte com CPE <sub>(et)</sub> (A), GCE (B) após incubação em solução contendo em 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de TZ e AB durante 2 a 15 minutos. ....	92
<b>Figura 44.</b> Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ em 0,5 mol $\text{L}^{-1}$ de KCl como eletrólito suporte com CPE <sub>(et)</sub> /ds-DNA (A e C), GCE/ds-DNA (B e D) após incubação em solução contendo em 50,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de AB e TZ durante 2 a 15 minutos. ....	94
<b>Figura 45.</b> Espectros UV- Vis obtidos em solução de AB e TZ de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (A e B) e da solução de ds-DNA 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ antes e após interação com a tartrazina no intervalo de 2 a 60 minutos (C) e (inset) variação da absorbância do dsDNA em 260 nm versus o tempo de interação do corante. ....	96

**Figura 46.** Voltamogramas de pulso diferencial com correção da linha base com CPE (et) com diferentes porcentagens em a) seringa de polietileno e no intervalo de potencial de  $E = 0$  a  $+ 1,4$  V (vs Ag/AgCl (KCl 3,0 M) / V), em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5. .... 110

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados e procedência dos mesmos .....	29
Tabela 2 - Parâmetros obtidos a partir do ajuste dos espectros de impedância eletroquímica ilustrados na figura 14.....	52
Tabela 3 - Valores de $R_{CT}$ normalizados em relação ao controle .....	71
Tabela 4 - Valores de $R_{CT}$ normalizados em relação ao controle .....	83
Tabela 5 - Tempos de incubação, frequências e ( $\tau_0$ ) para interação ds-DNA-AB .....	85
Tabela 6 - Valores de $R_{CT}$ normalizados em relação ao controle .....	93
Tabela 7 - Tempos de incubação, frequências e ( $\tau_0$ ) para interação ds-DNA-AB/TZ .....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- $\Delta E_p$  - Diferença entre os potenciais de pico
- AFM - Microscopia de Força Atômica (do inglês - *Atomic Force Microscopy*)
- $C_d$  - Capacitância da dupla camada elétrica
- ChCl - Cloreto de Colina
- CPE - eletrodo de pasta de carbono (do inglês *Carbon paste electrode*)
- CPE<sub>(et)</sub> - eletrodo de pasta de carbono modificado com etalina
- CPE<sub>(men)</sub> - eletrodo de pasta de carbono modificado com mentina
- CPE<sub>(gly)</sub> - eletrodo de pasta de carbono modificado com glicelina
- CPEt - eletrodo de pasta de carbono tratado (*treated Carbon paste electrode*)
- CPEt<sub>(et)</sub> - eletrodo de pasta de carbono tratado modificado com etalina
- CPEt<sub>(men)</sub> - eletrodo de pasta de carbono tratado modificado com mentina
- CPEt<sub>(gly)</sub> - eletrodo de pasta de carbono tratado modificado com glicelina
- CV - Voltametria Cíclica (do inglês - *Cyclic Voltammetry*)
- DecA - ácido decanóico
- DES - solvente eutético profundo (do inglês *Deep eutectic solvent*)
- DPV - Voltametria de pulso diferencial (do inglês - *Differential Pulse Voltammetry*)
- ds-DNA - DNA de dupla fita (*do inglês - double stranded DNA*)
- dGuo - deoxiguanosina
- dAdo - deoxiadenosina
- EIS - Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (do inglês – *Electrochemical Impedance Spectroscopy*)
- $E_{(RMS)}$  – raiz quadrada da amplitude de potencial
- $f_0$  - frequência específica
- GCE - eletrodo de carbono vítreo (do inglês - *Glassy Carbon Electrode*)
- HBA - acceptor de prótons da ligação de hidrogênio (do inglês - *Hydrogen bond acceptor*)
- HBD - doador de prótons de ligação de hidrogênio (do inglês - *Hydrogen bond donor*)
- IL- líquido iônico (do inglês - *Ionic Liquid*)
- $I_p$  - corrente de pico
- $I_{pa}$  - corrente de pico anódica
- $I_{pc}$  - corrente de pico catódica

NADES - Solvente eutético profundo natural (do inglês - *Natural deep eutectic solvent*)

QPE - Elemento de fase constante ( do inglês - *constant phase element*)

$R_s$  - Resistência ôhmica da solução

$R_{ct}$  - Resistência à transferência de carga

SEM - Microscopia eletrônica de varredura (do inglês - *Scanning Electron Microscopy*)

SWV - Voltametria de onda quadrada (do - *Square Wave Voltammetry*)

$\chi^2$  - Chi quadrado – parâmetro de resíduos do espectro ajustado ao espectro obtido

$\varphi$  - Ângulo de fase

$\tau_0$  - Constante de célula

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Corantes Alimentícios .....	18
1.1.2 Corantes Azo .....	19
1.1.3 Corantes Trifenilmetanos.....	21
1.2 Sensores modificados com DNA na avaliação de atividade mutagênica..	23
1.3 Adsorção de ds-DNA em eletrodos de pasta de carbono .....	24
1.4 Eletrodos de pasta de carbono modificados com DNA e a potencialidade da utilização de NADES como aglutinante.....	25
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Objetivos gerais .....	28
2.2 Objetivos específicos .....	28
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	29
3.1 Reagentes e soluções .....	29
3.2 Instrumentação .....	30
3.2.1 Medidas eletroquímicas .....	30
3.2.2 Caracterização das soluções (DNA e corantes) e dos compósitos .....	31
3.3 Procedimentos experimentais.....	32
3.3.1 Preparo dos solventes eutéticos profundos .....	32
3.3.2 Preparo dos compósitos à base de pasta de carbono sem/com modificação com NADES .....	33
3.3.3 Pré-tratamento mecânico e eletroquímico da superfície dos CPEs e GCE .....	34
3.3.4 Preparação dos eletrodos GCE e CPE modificados com dsDNA em solução aquosa .....	34
3.3.5 Estudos de interação <i>in vitro</i> entre azul brilhante/tartrazina e mistura dos corantes-dsDNA .....	35
3.4 Obtenção e análise de dados .....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	38
4.1 Comportamento eletroquímico dsDNA em CPE e influência do pré- tratamento da superfície e corpo do eletrodo.....	38



4.2 Comportamento eletroquímico ds-DNA em CPE modificado com NADES (etalina, glicelina e mentina).....	41
4.3 Caracterização superficial do CPEs por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica .....	49
4.4 Caracterização superficial do CPE <sub>(et)</sub> por microscopias de imagem .....	57
4.5 Estudo de interação <i>in vitro</i> CPE <sub>(et)</sub> /dsDNA-TZ.....	61
4.6 Estudo de interação <i>in vitro</i> azul brilhante-CPE <sub>(et)</sub> /dsDNA.....	75
4.7 Estudo de interação <i>in vitro</i> da mistura equimolar tartrazina/azul brilhante com CPE <sub>(et)</sub> /dsDNA .....	89
5 CONCLUSÕES.....	98
REFERÊNCIAS .....	100
APÊNDICE .....	110

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Corantes Alimentícios

O consumo de produtos alimentícios ultraprocessados contendo diferentes tipos de aditivos alimentares tem se tornado um problema nas últimas décadas devido aos malefícios que estes podem provocar a saúde humana e em ecossistemas aquáticos (ESQUERDO et al., 2014). Segundo Nilson et al. (2023), o aumento de risco de doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade, câncer e mortes prematuras pode estar associado com uma dieta nutricional baseada em alimentos ultraprocessados, com evidências de que os resíduos descartados destes alimentos em efluentes, sem o tratamento apropriado, também podem promover a contaminação nos ambientes aquáticos por bioacumulação e ocasionar problemas na saúde de organismos nestes ecossistemas (ZANONI; YAMANAKA, 2016).

Um dos principais aditivos alimentares utilizado de forma intensiva na indústria alimentícia em alimentos ultraprocessados são os corantes orgânicos sintéticos (COS) (SPELLMEIER; STULP, 2009) por apresentarem menores custos de produção e uniformidade na cor estabelecida quando comparados aos corantes naturais (RATHI; KUMAR; VO, 2021). Usados em diferentes tipos de alimentos como refrigerantes, gelatinas com sabor, sucos de caixinha entre outros (VILLANO; GARCIA; MENA, 2016), os corantes são adicionados aos alimentos com o objetivo de proporcionar melhor aspecto visual do produto devido à coloração adicionada (KONIG, 2015).

Há relatos na literatura de que alguns corantes orgânicos sintéticos apresentam riscos à saúde humana, devido a sua potencial toxicidade, tendo como principais problemas de saúde: reações alérgicas e alterações comportamentais e cognitivas (ANASTÁCIO et al., 2016; SILVA; REBOREDO; LIDON, 2022). Além disso, podem ser considerados como contaminantes de preocupação emergente, sendo classificados como micro poluentes devido sua baixa concentração em ambientes aquáticos (ng/L e µg/L) (LIPSKIKH et al., 2018). Por isso, em diferentes países, o uso de determinados corantes em alimentos é estabelecido por meio de diretrizes e recomendações de doses diárias. Nos Estados Unidos, o órgão responsável pelo controle dos corantes em alimentos é o FDA (do inglês *-Food and Drug Administration*) (FDA, 2022)

definindo diretrizes do consumo máximo diário embora não haja metodologia padrão de quantificação dos mesmos, tanto em alimentos ou efluentes.

No Brasil, a aplicação destes corantes como aditivos alimentares e as suas doses diárias recomendadas é controlada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Segundo as Resoluções nº 382 a 388, de 9 de agosto de 1999, ANVISA, os COS permitidos pela legislação brasileira são: Grupo Azo (Amarelo Tartrazina (E-102), Amaranço (E-123), Amarelo Crepúsculo (E-110), Ponceau 4R (E-124), Vermelho 40 (E-129) Azorrubina (E-122)); Trifenilmetanos (Azul Brillhante (E-133), Azul Patente V (E-131), Verde Rápido (E-143)); Xantenos (Vermelho de Eritrosina (E-127)), e Indigóides (Azul de Indigotina (E-132)). Os parâmetros avaliados para permissão do uso dos COS em alimentos segundo a ANVISA (BRASIL, 2023), são fundamentados nos critérios de segurança de uso e necessidade tecnológica definidos pela Organização Mundial da Saúde - (OMS) e da Organização para Alimentação e Agricultura - (FAO), dentre outros.

Os principais corantes orgânicos sintéticos (COS) utilizados na indústria alimentícia no Brasil são os dos grupos dos azocorantes e dos trifenilmetanos (FOOD INGREDIENTS BRAZIL, 2016).

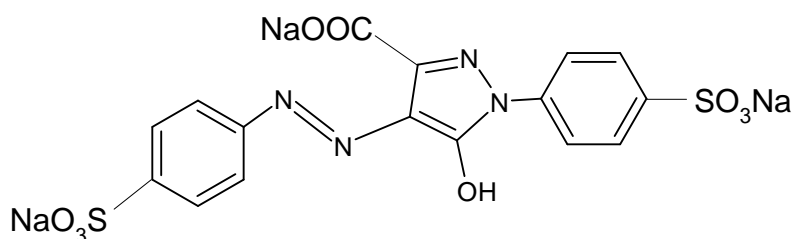
### **1.1.2 Corantes Azo**

Os corantes pertencentes ao grupo azo (-N=N-) são considerados como o principal grupo de corantes sintéticos orgânicos para a produção de alimentos do mundo, abrangendo cerca de 65% dos corantes produzidos (OKAFOR et al., 2016), com destaque a corantes de cor amarela como a tartrazina e o amarelo crepúsculo e de cor vermelha: Amaranço e o Ponceau 4R (LIPSKIKH et al., 2018). A possível mutagenicidade e toxicidade desses corantes tem sido questionada devido à possível ativação metabólica do grupo amino em gerar intermediários reativos conhecidos por causar lesões ao DNA e em proteínas (HASHEMI; KAYKAHII, 2022; BRÜSCHWEILER; MERLOT, 2017). Segundo Silva, Reboredo e Lidon (2022), a tartrazina foi principal causadora de reações alérgicas e intolerâncias dentre os corantes azo alimentícios, principalmente em pessoas com asma e intolerância a aspirina. Conforme a Resolução-RDV nº 340, de 13 de dezembro, de 2002, na lista de ingredientes de qualquer produto alimentício deve-se declarar o nome por extenso

do corante tartrazina devido a possíveis reações alérgicas em pessoas sensíveis, mesmo que, segundo a resolução (BRASIL, 2002), ainda não haja comprovação científica das reações alérgicas.

A tartrazina é classificada na IUPAC com o nome químico de sal trisódico-5-hidroxi-1-(4-sulfofenil)-4-[(4-sulfofenil) azo]-pirazol-3-carboxilato (C<sub>16</sub>H<sub>9</sub>N<sub>4</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>), e o seu pó apresenta coloração amarelo-laranja (LEULESCU et al., 2018) e sua estrutura química está ilustrada na figura 1.

**Figura 1.** Fórmula estrutural da tartrazina (TZ).



Fonte: Autora, 2023.

Conforme a RDC n° 778, 1 de março de 2023, ANVISA, a ingestão diária aceitável (IDA) é definida como o valor máximo de COS, por exemplo, ingerido normalmente durante toda a vida do indivíduo, que não tende a oferecer risco aparente a saúde. O IDA recomendado para a tartrazina é 7,5 mg/Kg.

Segundo Zanoni e Yamanaka (2016), estudos indicam uma possível atividade alergênica, carcinogênica e potencial genotóxico da tartrazina, embora não haja consenso na literatura. Um estudo em relação a possível toxicidade da tartrazina concluiu que esta pode ser classificada como não tóxica (Al-MASHHEDY; FIJER, 2016). Santos et al. (2022) avaliou o potencial citotóxico e mutagênico da tartrazina utilizando diferentes células eucarióticas e constataram efeitos tóxicos e mutagênicos.

Arvari, Dehkordi e Farhadian (2021) estudaram a interação entre apotransferrina (principal proteína responsável pelo transporte de Fe (III)) e tartrazina por meio de técnicas espectroscópicas e métodos de simulação. Os autores revelaram interações espontâneas entre a proteína e a tartrazina, além de mudanças conformacionais e estruturais da proteína após a interação. Outro estudo, realizado por Dehkordi, Farhadian e Ghasemi (2021) investigou a interação de outra proteína  $\alpha$ -

quimotripsina com a tartrazina, em que houve a formação de um complexo TZ-  $\alpha$ -quimotripsina por meio de ligações de hidrogênio. A estrutura secundária da proteína foi alterada indicando possíveis riscos à saúde humana.

Wu et al. (2021) mostraram que doses diárias de 1 a 10 mg/Kg de tartrazina podem afetar a saúde da *Carpa Cruciana* ocasionando graves alterações histopatológicas e celulares no intestino e do fígado desses organismos aquáticos.

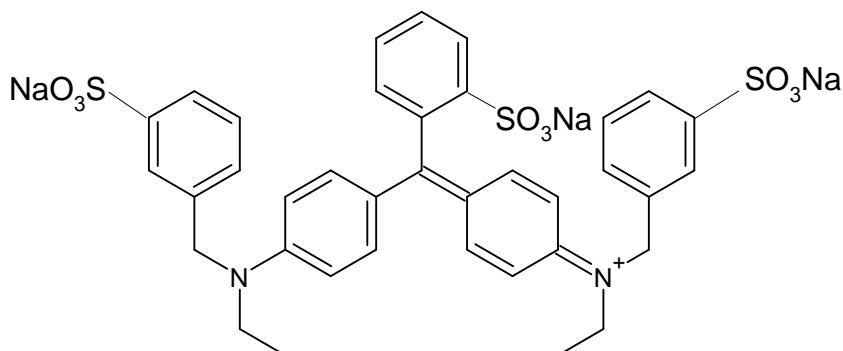
Devido a quantidade significativa de azo corantes produzida pelas indústrias, assim como o grande volume de águas residuais coloridas e diferentes resíduos pós-produção (BABU et al., 2019), estes corantes têm sido detectados em ambientes aquáticos. Isto reduz a penetração da luz nos corpos d'água (FREITAS, 2012) e afeta a atividade fotossintética, provocando desequilíbrio no ecossistema (ALI, 2010).

### 1.1.3 Corantes Trifenilmetanos

Outra classe de corante que é amplamente utilizada na indústria alimentícia é o grupo dos trifenilmetanos, principalmente devido as suas colorações azul e verde (ABADU; SIMON, 2022). Estes são encontrados em vários produtos como sorvetes, laticínios, ervilha, refrigerantes entre outros (VILLANO; VIGUERA; MENA, 2016).

O principal corante deste grupo é o azul brilhante principalmente utilizado em bebidas isotônicas e bebidas alcoólicas, sobremesas, gelatinas, sorvete entre outros (FOOD INGREDIENTS, 2016). O azul brilhante com o nome químico de sal tri-sódico de 4',4''-di (N-etil-p-sulfobenzil amino)- trifenilmetil-2-sulfonato ( $C_{37}H_{34}N_2Na_2O_9S_2$ ), é um pó azul- avermelhado (KONIG, 2015) e sua fórmula estrutural está representada na figura 2.

**Figura 2.** Fórmula estrutural do corante azul brilhante (AB)



Fonte: Autora, 2023.

Estudos recentes mostraram que altas doses de azul brilhante produz alguns efeitos significativos nos parâmetros neurocomportamentais de várias gerações em camundongos (TANAKA et al., 2012). Rambler et al. (2022) indica a necessidade de mais pesquisas para descrever a neurotoxicidade dos corantes azul brilhante, para avaliar se há correlação entre dietas nutricionais contendo o azul brilhante com o aumento dos sintomas do transtorno de déficit de atenção e hiperatividade (TDAH).

O IDA recomendado para o azul brilhante é 10 mg/Kg. Segundo Rodrigues (2021) estudos na literatura relacionados a genotoxicidade e carcinogenicidade não indicaram efeitos adversos do azul brilhante. Entretanto, segundo Kumar et al. (2017) há evidências da possibilidade de o azul brilhante apresentar potencial mutagênico, além de induzir asma e hiperatividade. Koç e Pandir (2018) realizaram um estudo de toxicidade do azul brilhante em *Allium cepa* e estudos complementares com o ensaio cometa indicando lesões ao material genético e toxicidade.

Além disso, o azul brilhante é comumente referido como substância recalcitrante, por conta de ser extremamente resistente à biodegradação (RATHI; KUMAR; VO, 2021). Mesmo com os métodos desenvolvidos para a remoção dos corantes orgânicos sintéticos em efluentes como adsorção, fotodegradação, biodegradação e ozonização (NASCIMENTO et al., 2020; KUROSUMU; KANEKO; NAKAMURA, 2007) não conseguem eliminar completamente os COS, por não serem atacados pelos processos de degradação. Estudos recentes indicaram que mesmo após a remoção de cor por processo de ozonização do azul brilhante, o mesmo apresentou efeito tóxico em crustáceos, devido à formação de subprodutos (TIRON et al., 2020).

Os corantes trifenilmetanos, como por exemplo, azul brilhante também podem ser combinados com os azo-corantes, como a tartrazina, para obtenção de colorações verdes, devido os corantes verdes serem proibidos em alguns países (CORRADINI, 2019).

## **1.2 Sensores modificados com DNA na avaliação de atividade mutagênica**

Com a possibilidade de os COS causarem lesões ao material genético que podem ser mutagênicas, é de extrema importância o estudo dos possíveis danos oxidativos que estes possam causar a biomoléculas como proteínas e DNA.

Os métodos amplamente aplicados para análise e monitoramento de mutagenicidade e/ou genotoxicidade de compostos e materiais são o teste de Ames (WOODRUFF et al., 2012), ensaio cometa (PEREIRA et al., 2012), teste *in vitro* de aberração cromossômica (CLARE, 2012), teste *in vitro* de micronúcleos (KUO et al., 2022) entre outros. Uma alternativa que também pode constituir uma ferramenta apta à análise de investigação de lesões ao material genético de corantes orgânicos sintéticos são os biossensores baseados em DNA.

Estudos com sensores modificados com DNA para análise de intermediários para produção dos corantes e os corantes orgânicos sintéticos foram aplicados com sucesso em o-dianisidina (JASNOWASKA et al., 2004), Sudan II (REZAEI; BOROUJENI; ENSAFI, 2016), Sudan II (ENSAFI et al., 2012), Corante Disperso Red 1 e Disperso Orange 1 (ULIANA; GARBELLINI; YAMANAKA, 2013) permitindo estabelecer a extensão de interação entre os corantes e DNA a partir do sinal proveniente da oxidação dos resíduos de bases do DNA. O sensor modificado com DNA é formado por um transdutor (eletrodo), material biológico (DNA) que é imobilizado na superfície do eletrodo (OLIVEIRA et al., 2018) com o objetivo de detectar possíveis mudanças conformacionais e estruturais no DNA e suas propriedades eletroquímicas após a interação entre o DNA e o analito (DICULESCU; PAQUIM; OLIVEIRA-BRETT, 2016).

Por apresentarem uma extensa janela de potencial em direção do sentido positivo do potencial, alta sensibilidade e uma boa separação nos picos de oxidação dos resíduos de base do dsDNA (OLIVEIRA et al., 2018), os eletrodos de carbono como carbono vítreo, grafite, grafite pirolítico, carbon black e pasta de carbono

(PALECEK; BARTOSIK, 2012) são amplamente utilizados para o estudo de mecanismo de interação de pequenas moléculas e o DNA. Em eletrodos de carbono vítreo (GCE), o comportamento eletroquímico do DNA é bem estabelecido: a molécula de DNA apresenta dois picos correspondentes a oxidação da guanósina (dGuo) e adenosina (dAdo) (OLIVEIRA-BRETT et al., 2006).

Uma das estratégias para a investigação de danos oxidativos com sensores modificados com DNA são baseadas em interações inespecíficas com ácido nucleico (SANZ et al., 2023), ou seja, são interações que não dependem da sequência de bases específica do DNA (REHMAN et al., 2015). O monitoramento, nestes casos, é realizado comparando as intensidades de corrente no potencial dos picos de oxidação da guanósina (dGuo) e adenosina (dAdo) de um sensor incubado sem o analito de interesse e após a interação dsDNA-analito (BRETT; OLIVEIRA-BRETT, 2012), em conjunto com o aparecimento de biomarcadores relacionados a danos de clivagem (guanina - base livre) (BUORO et al., 2014) e estresse oxidativo, 7,8-dihidroguanina (8-oxoGua), produto de oxidação da guanina (OLIVEIRA-BRETT; SILVA ;DICULESCU, 2004).

O dsDNA do timo de boi é extensivamente utilizado em estudos de interação do DNA com pequenas moléculas (geralmente abaixo de 1 kDa), por apresentarem baixo custo em relação a outras fontes de DNA e boa adsorção na superfície de eletrodos de carbono (MACHINI, 2019; OLIVEIRA-BRETT, PAQUIM, PIEDADE, 2007). Essa matriz foi bem-sucedida nos estudos da interação com fármacos antitumorais, (BUORO et al.,2014), sedativos e antiinflamatórios (Oliveira et al.,2009) e mecanismo de interação de controladores de glicemia (MACHINI; FERNANDES; BRETT, 2019).

### **1.3 Adsorção de ds-DNA em eletrodos de pasta de carbono**

Visto que os eletrodos de carbono normalmente são empregados na confecção de sensores modificados com DNA, eletrodos de pasta de carbono (CPE) surgem como uma alternativa interessante aos eletrodos sólidos por apresentarem vantagens como fácil preparo, custo relativamente baixo em comparação a outros materiais de eletrodo, boa aplicabilidade, facilidade para renovação da superfície e baixo impacto ambiental (VITRAS; SVANCARA; METELKA, 2009).



O CPE é classificado como eletrodo compósito sendo composto majoritariamente por carbono (grafite) e o aglutinante, normalmente é um líquido orgânico (SVANCARA et al., 2009). A porcentagem do aglutinante para o preparo da pasta de carbono varia entre 10 e 30% (m/m), dependendo das características físicas e químicas do aglutinante (SVANCARA et al., 2001). O caráter hidrofóbico do material da pasta de carbono não modificada é a característica físico-química mais importante (SVANCARA; SCHACHL, 1999), porque essa hidrofobicidade do CPE é refletida no chamado “efeito repelente” na superfície da pasta de carbono em direção a íons e moléculas hidrofílicas (ZIMA et al., 2009).

Devido à característica hidrofóbica do CPE, uma pré-ativação na superfície é recomendada para CPEs modificados com DNA, (PALECEK; BARTOSIK, 2012). Essa estratégia possibilita a modificação do CPE com DNA (ZHU et al., 2007; SATPATI et al., 2011; XU et al., 2014), amplificando os sinais relativos à oxidação dos nucleosídeos purínicos.

A imobilização do dsDNA na superfície eletródica ocorre via adsorção com a formação de monocamadas ou multicamadas ou filmes de adsorção (OLIVEIRA-BRETT, 2005; SCALEA; SERRANO; GUTZ, 1999) por conta das interações estabelecidas entre o dsDNA e a superfície do eletrodo hidrofílica ou carregada positivamente ou negativamente (PALECEK; BARTOSIK, 2012). Assim, predominam interações eletrostáticas do grupo fosfato carregado negativamente do dsDNA e a superfície do eletrodo (LABUDA et al., 2010), deixando os resíduos de bases disponíveis para oxidação.

#### **1.4 Eletrodos de pasta de carbono modificados com DNA e a potencialidade da utilização de NADES como aglutinante**

A fim de alterar as características da superfície do eletrodo e obter uma melhora da condutividade dos eletrodos de pasta de carbono imobilizados com dsDNA, diferentes modificadores têm sido utilizados com substituição de uma porcentagem de massa do aglutinante na pasta de carbono, (SVANCARA et al., 2009). Uma classe de modificadores que têm se destacado são líquidos iônicos (do -inglês- *ionic liquid* -IL). Estes apresentam excelentes características como baixo custo, baixa pressão de vapor, não volatilidade, alta condutividade iônica e ampla janela eletroquímica (LU et

al., 2012) tendo proporcionado aos CPEs uma boa estabilidade e reprodutibilidade em relação a resposta eletroquímica de biomoléculas (WEI; IVASKA, 2008) visto na aplicação de biossensores baseados em DNA (WANG et al., 2010; SUN et al., 2009; MOGHADDAN; TAJIK, BEITOLLAHI, 2019).

Entretanto, mesmo com as excelentes propriedades dos ILs como modificadores de eletrodo, alguns destes compostos apresentam alta toxicidade. Considerando que muitos deles têm apresentado resistência a biodegradação, aumentando sua permanência no meio ambiente (MBOUS et al., 2017), faz-se necessária a busca por novas alternativas de solventes em relação aos ILs com a crescente preocupação ambiental e busca de solventes verdes que reduzem impactos ao meio ambiente (KUDLAK et al., 2015).

Nesse sentido, uma alternativa aos ILs que têm sido relatada, são os solventes eutéticos profundos (do inglês- *Deep Eutectic Solvents- DES*). Sendo introduzido por Abbott et al. (2001) esta nova classe de solvente apresenta características e propriedades químicas semelhantes aos ILs, entretanto pode ser considerado como biodegradável, com baixa toxicidade e de baixo custo quando comparado aos ILs. Os DES segundo Smith, Abbott e Ryder (2014) podem ser classificados em quatro tipos (I,II,III e IV), basicamente depende da natureza do agente complexante utilizado.

Os DES do tipo III, mais utilizados em aplicações eletroquímicas e eletroanalíticas, (HANSEN et al., 2021) são representados por um composto com átomo com alta eletronegatividade e par de elétrons desemparelhado como aceptor de ligação de hidrogênio (HBA), e um composto com hidrogênio ligado a um átomo mais eletronegativo (F, O e N) chamado de doador de ligação de hidrogênio (HBD) (DAI et al.,2015; FERNANDEZ et al., 2018). Em uma determinada razão molar, as ligações de hidrogênio estabelecidas formam uma nova fase líquida conhecida como mistura eutética (ZHANG et al., 2012), caracterizada pelo decaimento abrupto do ponto de fusão em relação aos componentes individuais (RAMÓN; GUILLENA, 2020).

Os DES normalmente apresentam propriedades de baixa pressão de vapor, baixa volatilidade, não inflamabilidade, facilidade na preparação e estabilidade química e térmica (ABO-HAMAD et al. ,2015). Quando os componentes dos DES são precursores biocompatíveis, o DES recebe a denominação de solvente eutético profundo natural (NADES) (LIU et al., 2018). Embora a maior utilização destes solventes seja no campo de extração e obtenção de produtos naturais (MAIMULYANTI

et al., 2023). Segundo Brett (2018), destaca-se a possibilidade da aplicação dos DES no campo de desenvolvimento de sensores eletroquímicos com aplicações em eletropolimerização de polímeros condutores (PRATHISH; CARVALHO; BRETT, 2014), eletrodeposição de metais para modificação de eletrodos (ABBOTT et al., 2015) e o uso de NADES como aglutinantes de pasta de carbono (CARIATI; BUORO, 2019). Além disso, existe a possibilidade da aplicação de DES para o desenvolvimento de sensores baseados em biomoléculas como o DNA, devido este apresentar biocompatibilidade com alguns DES (SVIGELJ et al., 2021).

Nesse sentido, a estabilidade do dsDNA em solventes eutéticos profundos tem sido objeto de estudo de diferentes áreas como bioquímica, processos de extração e desenvolvimento de sensores (CHEN et al., 2019). Com isso recentes estudos demonstraram que o DNA é estável em DES de ambientes anidros com a possibilidade de formação de estruturas intramoleculares, intermoleculares e G-quadruplex (MAMAJANOV et al., 2010; SVIGELJ et al. 2021). Além disso, estudos mostraram que DES baseados em cloreto de colina e etilenoglicol podem garantir a estabilidade do DNA, neste caso a interação do DES e do DNA é por meio de interações de atração eletrostática entre o íon colina e a cadeia fosfato acompanhada por interações hidrofóbicas e polares entre DES e o sulco maior e menor do DNA (NAKANO *et al.*, 2013; ZHAO *et al.*, 2014; MONDAL *et al.*, 2013).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos baseados em ds-DNA a partir de eletrodos de pasta de carbono modificados com (NA)DES/ds-DNA, para a investigação de interações não específicas estabelecidas entre o DNA e os corantes alimentícios tartrazina, azul brilhante e a mistura dos corantes utilizando-se técnicas voltamétricas e impedimétricas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o comportamento eletroquímico do ds-DNA em CPE sem modificação e modificado com (NA)DES, avaliando a estabilidade, reatividade da biomolécula no solvente, por meio de técnicas voltamétricas de pulso e espectroscopia de impedância eletroquímica.
- Avaliar a influência da composição dos (NA)DES considerados hidrofílicos tendo como HBA = cloreto de colina e HBD = etilenoglicol, glicerol e um (NA)DES hidrofóbico constituído de ácido decanóico (HBA) e mentol (HBD) na modificação (NA)DES/CPE sobre o comportamento eletroquímico do ds-DNA adsorvido nestas superfícies.
- Avaliar e escolher a melhor proporção de modificador (NA)DES em relação a substituição de uma fração do óleo mineral nos eletrodos de pasta de carbono
- Investigar as interações dos corantes tartrazina e azul brilhante, e de sua combinação, com ds-DNA, utilizando-se de eletrodos compósitos do tipo (NA)DES/CPE por meio de técnicas voltamétricas e de espectroscopia de impedância eletroquímica.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados foram de grau analítico (P.A) e pesados em uma balança analítica da marca Sartorius modelo BP121s. As soluções foram preparadas com a água deionizada proveniente de um sistema Barnstead™ Easypure® (Thermoscientific, modelo D13321) (resistividade elétrica  $\geq 18,0 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ ).

Tabela 1 - Reagentes utilizados e procedência dos mesmos

Reagente	Procedência
Acetato de sódio anidro	Êxodo Científico®
Ácido Clorídrico	Êxodo Científico®
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85% (m/m)	Baker®
Na <sub>3</sub> HPO <sub>4</sub> anidro	Baker®
Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .12 H <sub>2</sub> O	Baker®
NaOH	Spectrum®
KCl	Spectrum®
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Spectrum®
K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> . 3 H <sub>2</sub> O	Mallickrodt®
Etilenoglicol	Sigma -Aldrich®
Glicerina	Sigma- Aldrich®
Cloreto de Colina	Sigma- Aldrich®
Ácido Decanóico (DecA)	Sigma- Aldrich®
Mentol	Sigma- Aldrich®
Óleo mineral Nujol	Sigma- Aldrich®
Grafite em Pó	Sigma- Aldrich®
dsDNA	Sigma- Aldrich®
Tarrazina	Tricon colors®
Azul Brilhante	Tricon colors®

Fonte: Autora, 2023.

Os eletrólitos suportes utilizados para os experimentos eletroquímicos foram o tampão ácido acético/acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5 e tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  preparado com  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% (m/m),  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_3\text{HPO}_4$  anidro e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  em um amplo intervalo de pH. Para o ajuste do pH, quando necessário, foi utilizado um ácido forte (HCl) ou base forte (NaOH). O pH dessas soluções foi medido com o pHmetro 827 pH lab (Metrohm).

A solução de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte foi utilizada como sonda eletroquímica para as medidas da EIS.

Os DES utilizados como aglutinantes foram preparados utilizando etilenoglicol, glicerina, cloreto de colina, ácido decanoico (DecA) e mentol.

As peneiras moleculares de silicato de alumínio com poro de tamanho de 3 Å (Sigma-Aldrich) foram utilizadas para evitar absorção de água pelos DES hidrofílicos. As pastas de carbono foram preparadas com o grafite em pó e o óleo mineral.

Soluções estoques de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  (dsDNA) obtido do timo de boi (calf thymus-CT) tipo I (41,9% molar de GC e 58,1% molar de AT) foram preparadas em água deionizada, sem o uso de ultrassom ou agitação. Após o preparo da solução reservou-se 24 h para solubilização completa do dsDNA e armazenou em geladeira.

Soluções estoques de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  tartrazina (TZ) e azul brilhante (AB) foram preparadas em água deionizada.

## **3.2 Instrumentação**

### **3.2.1 Medidas eletroquímicas**

Um sistema eletroquímico composto por três eletrodos: eletrodo de trabalho GCE (diâmetro de 3 mm) e/ou CPE (diâmetro de 4 mm); um contra eletrodo de fio de platina (0,5 mm de diâmetro) e um eletrodo de referência de Ag/AgCl/ KCl  $3 \text{ mol L}^{-1}$  foi empregado para a realização dos experimentos eletroquímicos e a cela utilizada apresenta o volume de 20 mL. Essas medidas foram efetuadas em um potenciostato/galvanostato  $\mu\text{Autolab}$  tipo III (EcoChemie) acoplado ao microcomputador e com a interface controlada pelo *software* NOVA 2.1.3 (Metrohm Autolab B.V.)

A caracterização dos CPEs, a determinação do comportamento eletroquímico do dsDNA nas superfícies de CPE e GCE e a interação dos eletrodos modificados com dsDNA com os corantes foram realizadas utilizando-se técnicas voltamétricas e impedimétricas. Para todos os experimentos de DPV foram definidos como parâmetros: amplitude de pulso 50 mV, degrau de potencial 2 mV, largura de pulso 70 ms e velocidade de varredura 5 mV s<sup>-1</sup> (OLIVEIRA-BRETT et al., 2004). Já para as medidas de espectroscopia de impedância eletroquímica os experimentos foram realizados em um potenciostato Autolab-PGSTAT 204 (Metrohm) acoplado com analisador de resposta da frequência (FRA 32M), controlado pelo software NOVA 2.1.3. Os parâmetros utilizados na obtenção dos espectros de impedâncias foram:  $E_{\text{fixado}} = +0,22 \text{ V}$ , no intervalo de frequência de 100000 a 0,01 Hz, com 10 pontos por década e amplitude de potencial 10 mV vs  $E_{\text{RMS}}$ . Parâmetros de obtenção diferentes dos listados nesta seção serão especificados nas legendas de suas respectivas figuras.

### 3.2.2 Caracterização das soluções (DNA e corantes) e dos compósitos

Para a caracterização do compósito por microscopia eletrônica de varredura foi empregado o microscópio do modelo LEO (440kV) com resolução de 63kV, operando com feixe de elétrons. Este foi utilizado para obter as imagens da superfície dos eletrodos CPE e CPE-DES, e para tanto os compósitos precisaram ser metalizados com ouro. A caracterização da tipografia dos eletrodos por Microscopia de Força Atômica foi realizada com o Microscópio Easyscan 2 (Nanosurf, Suíça) no modo de operação MAC. Já para as medidas de ângulo de contato de cada eletrodo (CPE e CPE<sub>DES</sub>), uma gota d'água deionizada foi posta na superfície eletródica para a obtenção do ângulo de contato entre a gota e a superfície dos eletrodos. Os ângulos de contato foram obtidos utilizando o tensiômetro ótico C201 (Attension) controlado pelo *software* One Attension e equipado com uma câmera digital Navitar.

Os espectros de absorção das soluções de dsDNA na região do ultravioleta-visível foram obtidos em um espectrofotômetro UV-Visível da marca Jasco, modelo V-630. As medidas foram realizadas no intervalo de 230 nm para 400 nm, em uma cubeta de quartzo, também para o estudo das interações dsDNA-corante, já para o

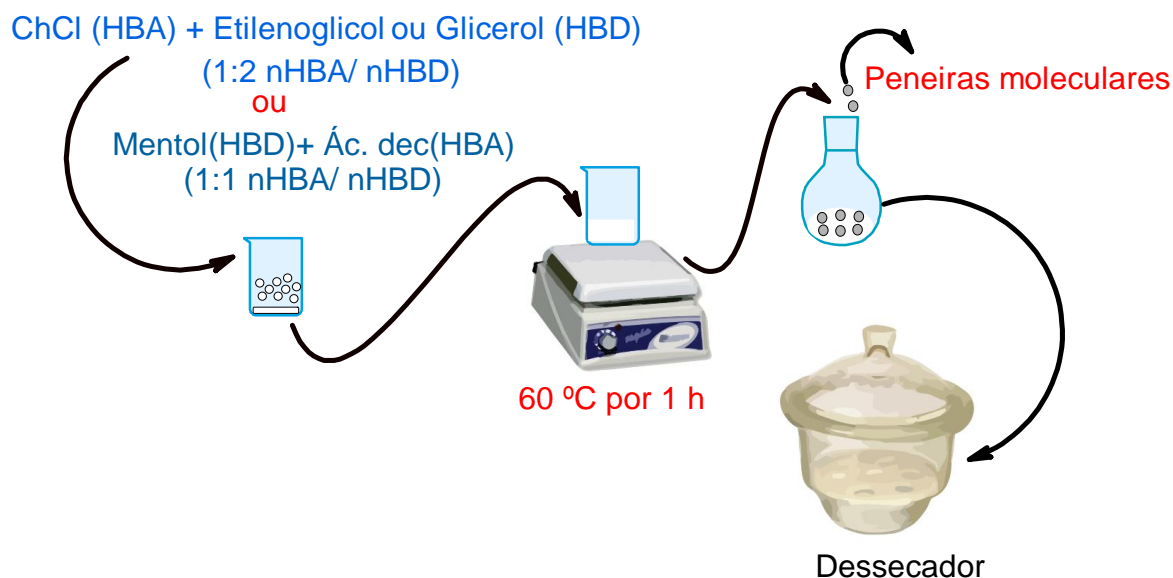
estudo individual dos corantes as medidas foram realizadas no intervalo de 200 nm para 800 nm.

### 3.3 Procedimentos experimentais

#### 3.3.1 Preparo dos solventes eutéticos profundos

Os NADES foram preparados seguindo o método Cariati e Buoro (2019) que consistiu na mistura de cloreto de colina (HBA) com etilenoglicol (etalina) e glicerol (glicelina) como HBDs na razão molar 1:2 (nHBA/nHBD), como representado na figura 3. O HDES foi preparado pela combinação de ácido decanóico (HBA) e mentol (HBD) (mentina) na razão molar 1:1. A mistura dos componentes é mantida sob aquecimento com a temperatura constante de 60 °C e agitação até a obtenção de um líquido homogêneo. O armazenamento foi realizado em um frasco de vidro contendo peneiras moleculares e mantido em um dessecador para evitar a incorporação de umidade pelo solvente.

**Figura 3.** Esquema da síntese dos DES



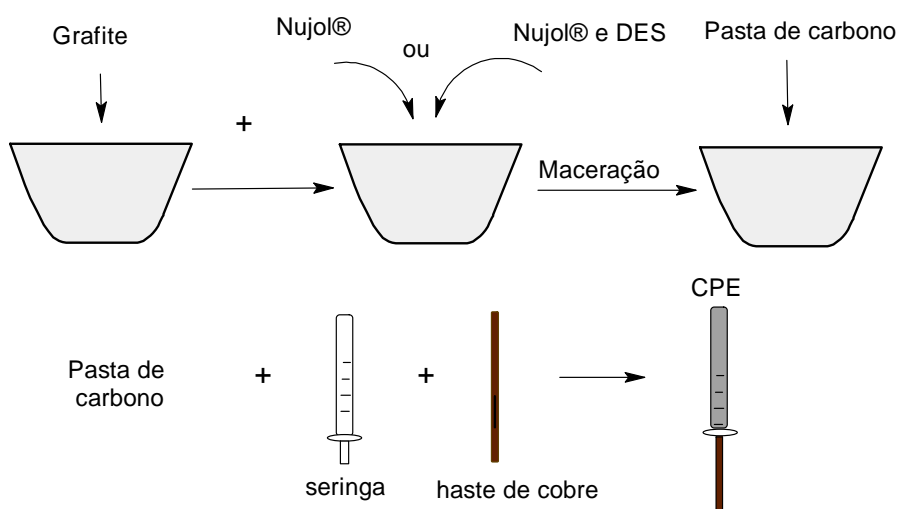
Fonte: Autora, 2023.



### 3.3.2 Preparo dos compósitos à base de pasta de carbono sem/com modificação com NADES

Os compósitos foram preparados de acordo com o procedimento descrito por Buoro et al. (2013) pela mistura de grafite em pó e aglutinante na proporção 2:1 ( $m_{\text{grafite}} : m_{\text{aglutinante}}$ ). Os aglutinantes utilizados foram óleo mineral e DES. A incorporação do DES na mistura foi realizada substituindo-se parte do óleo mineral pelo DES, mantendo a proporção de 2:1 ( $m_{\text{grafite}} : m_{\text{aglutinante}}$ ). O preparo da pasta e dos eletrodos seguiu o procedimento descrito por D' Almeida (2019) preenchendo as seringas 0,5 mL com as pastas e utilizando um suporte de cobre como contato elétrico figura 4. A pasta de carbono utilizada para o preparo do CPE e dos CPEs modificados foi deixada de repouso durante 10 dias. De acordo com Svancara e Schachl (1999) não é recomendado empregar imediatamente CPEs recém-preparados, portanto, as pastas de carbono devem ser deixadas em repouso por um determinado período para permitir a homogeneização completa. Este processo é chamado de auto homogeneização da pasta, que para diferentes estudos foi confirmado experimentalmente que pastas recém preparadas não apresentam um comportamento estável. Na literatura é sugerido que a pasta de carbono seja mantida em repouso no intervalo de no mínimo 48 horas após o preparo (SVANCARA et al., 2009).

**Figura 4.** Esquema do preparo das pastas de carbono com e sem modificação



Fonte: Autora, 2023.

### **3.3.3 Pré-tratamento mecânico e eletroquímico da superfície dos CPEs e GCE**

Antes das medidas, a superfície do CPE foi renovada e ativada eletroquimicamente. Inicialmente, foi realizado o polimento da superfície do eletrodo de pasta de carbono por meio da renovação da superfície do mesmo em uma folha A4 branca 75g/m<sup>2</sup> (D'ALMEIDA, 2019). Em seguida, a superfície foi ativada eletroquimicamente segundo Buoro et al. (2017), o eletrodo foi imerso em uma solução de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol L<sup>-1</sup>, e voltamogramas cíclicos foram obtidos no intervalo de potenciais,  $E_i = + 0,5 \text{ V}$  e  $E_f = + 1,5 \text{ V}$  até a obtenção de voltamogramas estáveis (20 ciclos com  $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$ ). Após este pré-tratamento, o CPE foi lavado abundantemente com água deionizada. O comportamento eletroquímico dos eletrodos tratados foi comparado com seus pares não tratados eletroquimicamente.

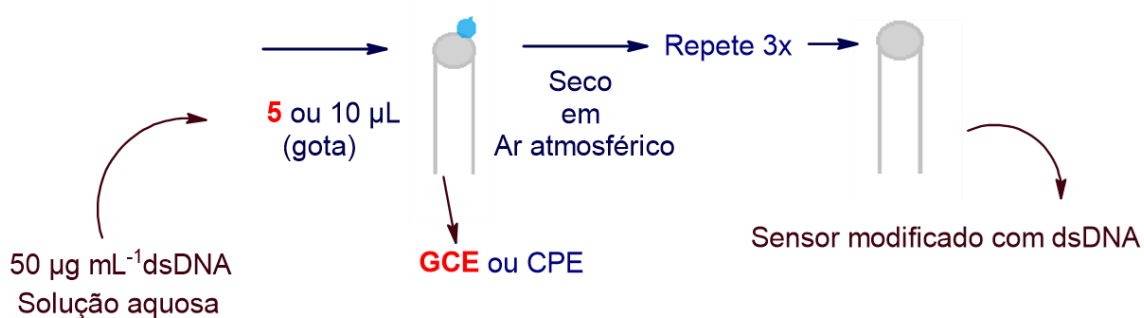
Para experimentos eletroquímicos realizados com o GCE, a superfície foi limpa de forma mecânica e eletroquímica segundo Machini (2019) e Buoro et al. (2014) com ligeiras adaptações. Inicialmente, lavou-se o GCE com álcool isopropílico (Êxodo) e com água deionizada. Posteriormente, a superfície do eletrodo foi polida em uma lixa disco Trizact P3000 (3M), e o eletrodo foi lavado durante 2 minutos com água deionizada. Em seguida, ao polimento mecânico, voltamogramas cíclicos foram registrados em solução de tampão acetato pH 4,5 no intervalo de potencial,  $E_i = 0,0 \text{ V}$  e  $E_f = + 1,2 \text{ V}$  (10 ciclos com  $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$ ) até a sobreposição estável dos sinais.

### **3.3.4 Preparação dos eletrodos GCE e CPE modificados com dsDNA em solução aquosa**

Os eletrodos modificados de dsDNA utilizando o GCE foram preparados por meio da imobilização de dsDNA como descrito por Diculescu e Oliveira-Brett (2012), depositando três gotas de 5  $\mu\text{L}$  de uma solução de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de ds-DNA em meio aquoso sobre o eletrodo, formando multicamadas. Para cada gotejamento sobre a superfície do eletrodo o sensor foi seco em ar atmosférico. Este procedimento tem como pressuposto uma cobertura completa da superfície do eletrodo a fim de evitar cobertura incompleta da superfície do eletrodo, evitando assim que haja moléculas co-adsorvidas do corante na superfície dos sensores. Os eletrodos de CPEs e CPE<sub>DES</sub>

foram preparados de modo similar, com adaptação em relação ao volume das gotas depositadas na superfície, sendo que neste procedimento as três gotas foram de 10  $\mu\text{L}$ , para garantir a cobertura completa da superfície do eletrodo já que o CPE apresenta um diâmetro superior ao GCE.

**Figura 5.** Esquema do preparo dos sensores modificados com dsDNA



Fonte: Autora, 2023.

### 3.3.5 Estudos de interação *in vitro* entre azul brilhante/tartrazina e mistura dos corantes-dsDNA

Os sensores eletroquímicos modificados com ds-DNA foram imersos de acordo com a figura 6 nas soluções dos corantes de concentrações de 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de tartrazina (TZ) e de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de azul brilhante (AB) com períodos de incubação diferentes. Já para as misturas destes foi utilizada uma concentração equimolar dos corantes de 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Em seguida, os eletrodos foram retirados das soluções dos analitos, lavados com água deionizada com objetivo de retirar moléculas dos corantes que não interagem com o dsDNA.

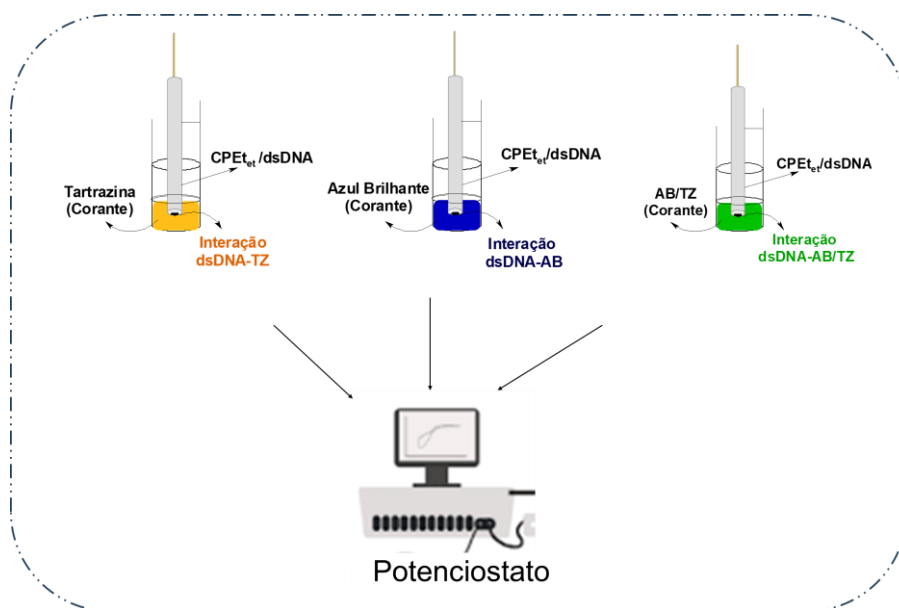
Para as análises utilizando a VDP, posteriormente a incubação e lavagem o eletrodo pré-tratado e modificado com ds-DNA foi imerso em uma solução 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  tampão ácido acético/acetato pH 4,5 para a obtenção dos voltamogramas de pulso diferencial. As medidas de EIS foram obtidas a partir da imersão do eletrodo não tratado modificado com dsDNA, após a incubação e lavagem em uma solução de 1.0 mmol  $\text{L}^{-1}$   $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte.

É importante destacar que a opção de se avaliar a interação ds-DNA-corante com os eletrodos de pasta de carbono sem o pré-tratamento por espectroscopia de

impedância eletroquímica diz respeito ao aumento de resistência à transferência de carga da superfície frente à sonda eletroquímica, permitindo a visualização clara dos processos capacitivos e resistivos na interface eletrodo/solução devido ao aumento do semicírculo representando no diagrama de Nyquist.

Após cada experimento, os eletrodos foram polidos mecanicamente, tratados eletroquimicamente (quando necessário) e modificados com dsDNA para novas medidas. Eletrodos controles modificados com dsDNA e sem modificação foram imersos durante o mesmo tempo dos eletrodos citados, com objetivo de garantir que alterações nos perfis voltamétricos estivessem correlacionadas apenas com interações dsDNA-corante.

**Figura 6.** Esquema do estudo de interação com dsDNA e os analitos de interesse.



Fonte: Autora, 2023.

### 3.4 Obtenção e análise de dados

O *software* utilizado para a obtenção de dados dos experimentos eletroquímicos realizados foi o NOVA versão 2.1.3 (Metrohm Autolab B.V.) e analisados com o software Origin PRO versão 8.0 (OriginLab). Para melhorar visualização do comportamento eletroquímico do dsDNA em diferentes eletrodos de carbono e das interações entre o dsDNA e o corante, alguns voltamogramas de pulso

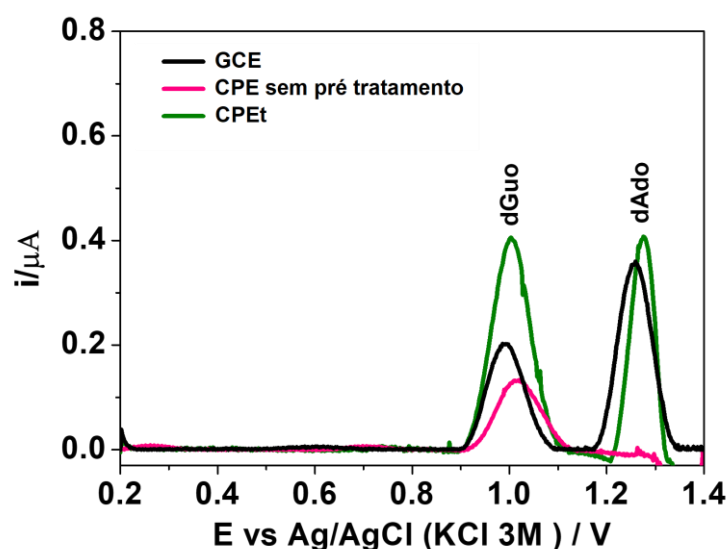
diferencial foram submetidos a um tratamento com correção de linha base por meio de um algoritmo matemático *média móvel* segundo Buoro et al. (2014). Este tratamento de dados segundo Machini (2019) possibilita uma melhor visualização dos picos de oxidação mesmo que a intensidade de corrente possa apresentar uma perda (>10%) em relação a curva não tratada.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 Comportamento eletroquímico dsDNA em CPE e influência do pré-tratamento da superfície e corpo do eletrodo**

Para o desenvolvimento dos sensores de CPE/ds-DNA modificados com os NADES, foi estudado o comportamento eletroquímico de ds-DNA em solução aquosa em CPE sem modificação. Segundo os voltamogramas de pulso diferencial representados na figura 7, o CPE sem pré-tratamento, não apresentou os picos de oxidação normalmente encontrados para outros eletrodos sólidos de carbono como o GCE na figura 7, uma das justificativas deste comportamento pode estar associado a característica hidrofóbica da superfície do eletrodo de pasta de carbono. Isto, porque sua composição é de 70% de grafite e 30% de aglutinante (óleo mineral), que adiciona a característica hidrofóbica à superfície do eletrodo. Segundo Svancara et al. (2012) as partículas de grafite estão praticamente cobertas com um filme fino do aglutinante, o que torna superfície hidrofóbica, e dificulta a adsorção do ds-DNA na superfície eletródica, diminuindo a disponibilidade das bases nitrogenadas para serem oxidadas.

**Figura 7.** Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha base obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com GCE (linha preta), CPE não tratado (linha rosa) e CPET (linha verde) modificados com ds-DNA no intervalo de potencial de  $E = 0$  a  $+1,4$  V (vs Ag/AgCl (KCl  $3,0$  mol  $L^{-1}$ )).



Segundo Oliveira e Brett (2010) a adsorção do dsDNA na superfície do eletrodo depende da natureza da superfície (superfície carregada, não polar-hidrofóbica, polar-hidrofílica), isto influencia os tipos de interações estabelecidas entre o dsDNA e a superfície do eletrodo e conseqüentemente no comportamento eletroquímico do dsDNA. Tendo em vista que, os filmes de dsDNA podem ser mantidos imobilizados na superfície do eletrodo por intermédio de diferentes tipos de interações como eletrostáticas e/ou hidrofóbicas com as bases de dsDNA e a cadeia de açúcar-fosfato carregada negativamente, ligações de hidrogênio e até mesmo empacotamento das bases (LABUDA et al. 2010).

O ds-DNA é uma biomolécula hidrofílica que apresenta uma carga global negativa devido aos grupos fosfatos carregados negativamente. Segundo Paquim e Brett (2008), quando se trata de uma superfície hidrofóbica, o ds-DNA estabelece interações hidrofóbicas entre a superfície hidrofóbica do eletrodo e os anéis hidrofóbicos das bases existentes nas extremidades livres do ds-DNA, mas a hidrofilicidade do ds-DNA deve reduzir a adsorção espontânea na superfície hidrofóbica do CPE, provavelmente influenciando a forma com que as bases são expostas para serem oxidadas na superfície do eletrodo.

De modo geral, o GCE apresenta uma superfície mais hidrofílica do que o eletrodo de pasta de carbono, desta forma a interação do dsDNA com a superfície do GCE pode ser por meio, principalmente de interações hidrofílicas que permitem uma melhor adsorção do dsDNA na superfície do eletrodo (OLIVEIRA-BRETT, 2005). Observamos que a forma que o ds-DNA se organiza no GCE permite que os resíduos de bases dAdo e dGuo fiquem expostos para serem oxidados, com maior preferência para os resíduos de adenina, por apresentar maior hidrofílicidade comparado a guanina. Neste caso, segundo Wang (1996) propõe que uma pré-ativação anódica na superfície do CPE é necessária para adicionar essa característica hidrofílica na superfície do eletrodo.

Na figura 7, também pode-se visualizar o aparecimento de dois picos de oxidação de dGuo e dAdo, em que  $E_{dGuo} = + 1,05 \text{ V}$  e  $E_{dAdo} = + 1,25 \text{ V}$  em pH 4,5 após a ativação da superfície do eletrodo. Durante este pré-tratamento provavelmente vários grupos funcionais contendo oxigênio são formados e instantaneamente protonados. Isso ocorre, porque esta ativação gera radicais, neste caso, radicais hidroxilas que podem ser capturados pelo íon hidrogenocarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) e, no final da funcionalização, a superfície pode apresentar terminações com íons carboxílicos (BUORO et al., 2017). Nesse sentido, essa funcionalização torna a superfície do CPE mais hidrofílica, repelindo as moléculas hidrofóbicas do aglutinante e permitindo a interação entre as bases mais hidrofílicas e a superfície do eletrodo por meio de diferentes tipos de interações hidrofílicas como por exemplo, forças eletrostáticas e ligações de hidrogênio. A ordem decrescente de hidrofobicidade para as bases nitrogenadas é  $G > A > T > C$  (OLIVEIRA, BRETT, 2010).

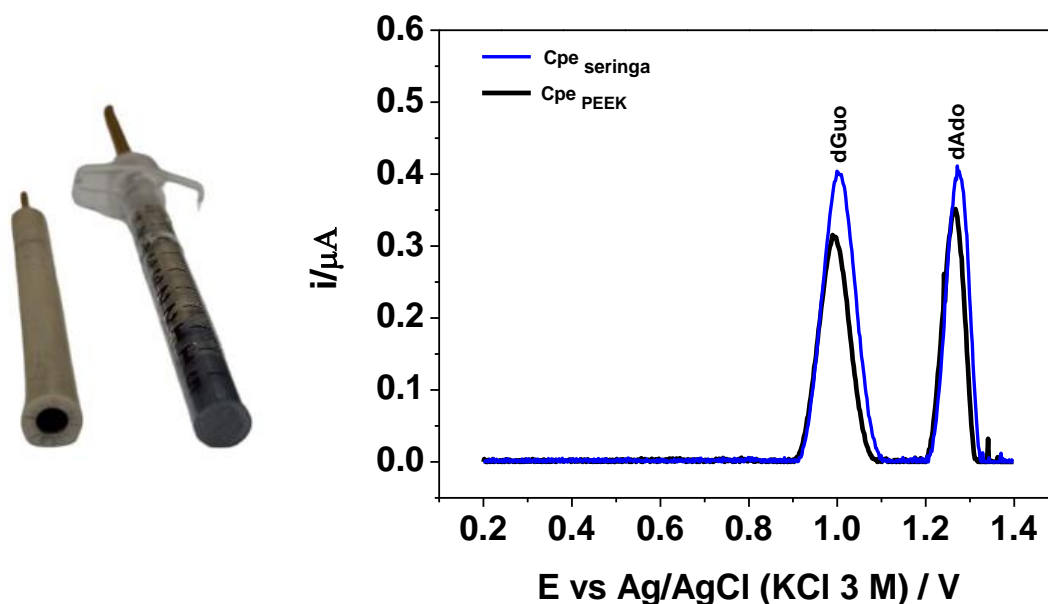
Embora a quantidade de adenosina naturalmente na estrutura do DNA seja maior, o valor próximo de 1 observado na razão das correntes dos picos de oxidação da dAdo e dGuo para o CPE em relação ao comportamento do GCE evidencia uma diferente organização do dsDNA na superfície do eletrodo do CPE.

A compactação da pasta de carbono é um fator importante para obter resultados mais reprodutíveis. A fim de avaliar a compactação da pasta de carbono em diferentes corpos de eletrodo foram escolhidos para o estudo: o PEEK que é o material comum para a produção de eletrodos de carbono vítreo e a seringa de polietileno normalmente utilizada pelo nosso grupo de pesquisa para a produção dos CPEs como ilustrado na figura 8.



Na figura 8, foram observados uma diferença entre as intensidades de correntes dos resíduos de bases dGuo e dAdo para os materiais utilizados. Observa-se que o material da seringa de polietileno de baixa densidade apresentou maiores intensidades de corrente para os picos de oxidação característicos do dsDNA do que o PEEK, o que era esperado dado maior área geométrica e maior reprodutibilidade, tendo em vista que os desvios relativos foram menores que 12% indicando melhor compactação da pasta de carbono. Vale destacar a diferença das proporções dos picos de dGuo e Ado, em PEEK quando comparada a proporção dos picos dos resíduos das bases nitrogenadas se assemelhou ao do GCE.

**Figura 8.** Corpos de eletrodo utilizados para a produção dos eletrodos (esquerda). Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha base obtidos para CPEt em PEEK e seringa de polietileno em um intervalo de potencial de 0 a +1,4 V (vs Ag/AgCl (KCl 3,0 M), em solução tampão acetato 0,1 M, pH 4.5 (direita).



#### 4.2 Comportamento eletroquímico ds-DNA em CPE modificado com NADES (etalina, glicelina e mentina)

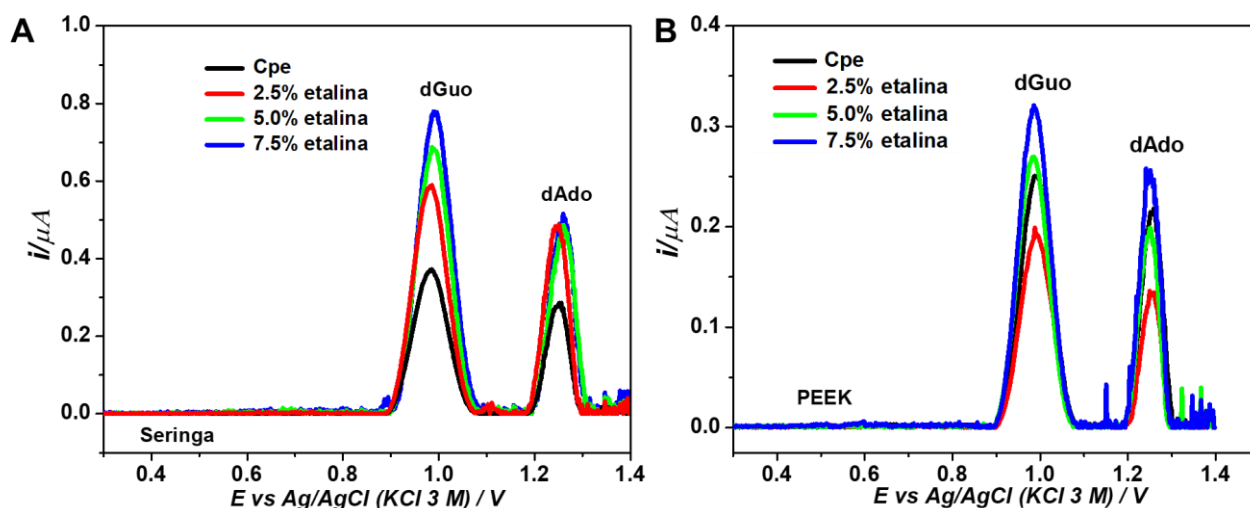
O comportamento eletroquímico do dsDNA em CPE modificados com etalina em diferentes porcentagens 2,5; 5,0; 7,5; (m/m) do aglutinante foi estudado por meio

da voltametria de pulso diferencial. Para isso, os mesmos estudos do material utilizado como corpo do eletrodo foram avaliados.

A figura 9 mostra que para o PEEK, eletrodos com 2,5% de modificador apresentaram menor intensidade de corrente comparado até mesmo com o CPE não modificado. Esse comportamento pode ser por causa que nesta porcentagem é adicionada uma pequena quantidade de massa do modificador na pasta de carbono, tendo em vista que com o corpo do material PEEK não se consegue uma compactação eficiente comparado a seringa, observa-se esse comportamento diferente do esperado. No caso, da seringa observamos que existe um aumento dos valores de corrente dos picos de oxidação referentes ao dsDNA à medida que se adiciona uma certa porcentagem do modificador.

Além disso, para os materiais estudados a porcentagem que apresentou melhor performance foi de 7,5% de etalina. Foram realizados estudos para avaliação de maiores porcentagens de modificador em relação ao aglutinante, contudo para porcentagem maior que 7,5% observa-se um decréscimo dos valores de corrente de pico no voltamograma de pulso diferencial encontrado no apêndice deste trabalho, convergindo com as observações em artigos publicados na literatura em que as melhores respostas de modificação são utilizando no máximo de 10%(m/m) de NADES como modificador. Segundo Cariati e Buoro (2019) maiores porcentagens apresentaram uma diminuição da taxa de transferência de carga sugerindo que a coesão da pasta é reduzida pelo seu desprendimento do corpo do eletrodo ,o que dificulta a reação de transferência de carga na superfície e corpo do eletrodo (Augusto et. al., 2022).

**Figura 9.** Voltamogramas de pulso diferencial com correção da linha base com CPE<sub>(et)</sub> com diferentes porcentagens em a) seringa de polietileno e b) PEEK no intervalo de potencial de E = 0,0 a +1,4 V (vs Ag/AgCl (KCl 3,0 M) / V), em solução tampão acetato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 4,5.

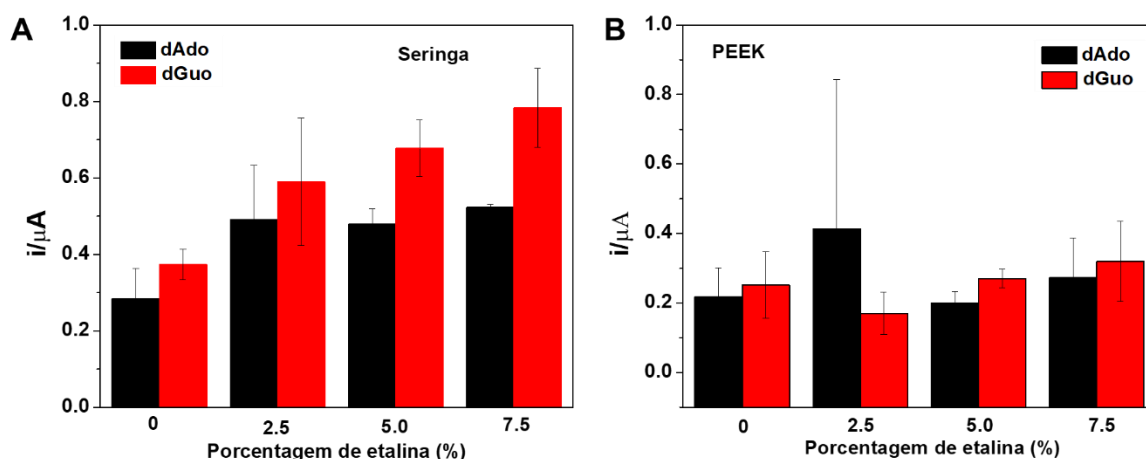


Os voltamogramas apresentados na figura 9 demonstraram também que para a porcentagem de 7,5% de etalina há aumento da corrente da dGuo  $\geq 40\%$  em relação ao CPE não modificado e de cerca de  $\geq 35\%$  para a dAdo, indicando que a presença da etalina na pasta de carbono provoca um aumento da resposta eletroquímica diminuindo a resistência à transferência de carga na pasta de carbono (Cariati, Buoro, 2019). Chama atenção também que as correntes de pico observadas para a dGuo em seringa chegam a ser 2,5 vezes maior que as observadas para o corpo PEEK, considerando a porcentagem de 7,5% de modificação.

Os resultados apresentados na figura 10 também demonstram que no material PEEK, os picos de oxidação apresentaram maiores desvios padrões absolutos do que em relação a seringa, evidenciando melhor compactação e homogeneidade da pasta para a seringa. Além disso, os desvios padrões relativos para o PEEK para figura 10A foram significativos, principalmente para a porcentagem de 2,5%, maior que 30%, inviabilizando o uso deste sensor. Ademais, a porcentagem de 7,5% utilizando a seringa apresentou um desvio relativo para dAdo menor que 1% e para dGuo menor que 13%. Para sensores modificados com dsDNA, existe uma variação intrínseca da imobilização e este valor pode ser considerado um valor realista (ULIANA, GARBELLINI, YAMANAKA, 2013). Estes resultados indicam que a compactação e a

coesão das pastas de carbono são fatores determinantes para a homogeneidade da pasta de acordo com o que literatura descreve.

**Figura 10.** Correntes de pico de oxidação dGuo e dAdo em função das porcentagens de etalina com os valores de desvio padrão absoluto: corpo do eletrodo seringa (A) e corpo do eletrodo peek (B).



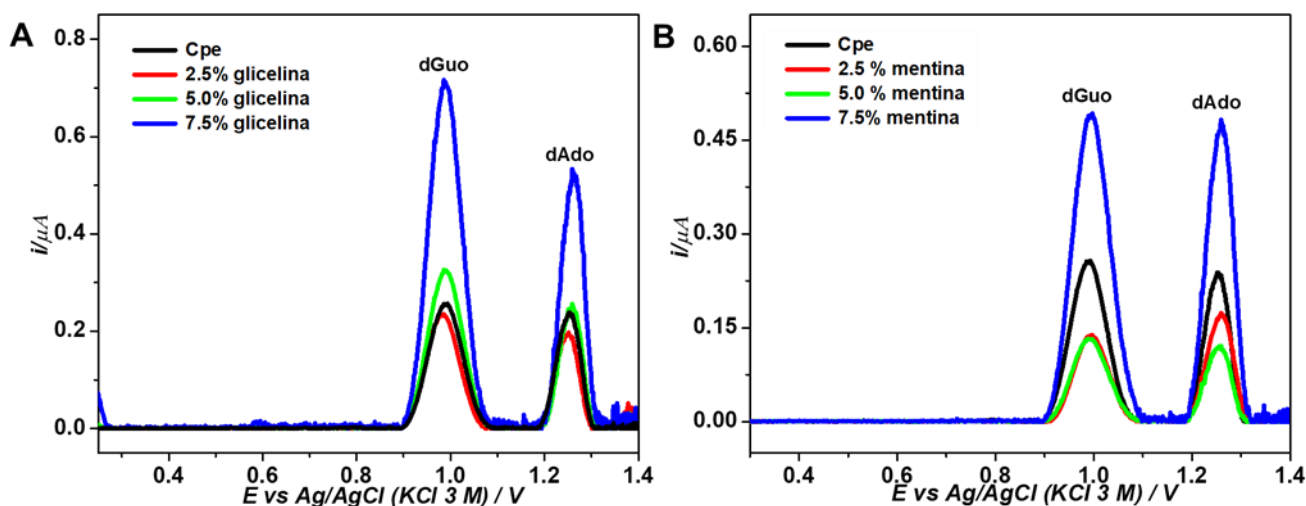
A partir da figura 9A, observa-se que as intensidades de corrente para a dAdo atingem um platô a partir de 2,5% de etalina, independentemente do valor da porcentagem do modificador no CPE. Além disso, a proporção entre os picos de oxidação dGuo e dAdo para  $\text{CPEt}_{(\text{et})}$  é alterada quando comparados ao GCE e ao CPE. Esses dois efeitos podem estar associados às características de composição da etalina que é composta pelo cloreto de colina e etilenoglicol. Segundo Nakano et al. (2014) e Mondal et al. (2013) sugerem que o íon colina é responsável pela estabilização do dsDNA através de interações eletrostáticas entre os grupos fosfatos carregados negativamente e por interações de ligações de hidrogênio com as bases nitrogenadas do dsDNA promovendo o efeito de inversão de estabilidade dos pares de base do dsDNA, em que o par A-T é estabilizado. Como consequência da estabilização, os resíduos de guanina estariam mais disponíveis para a oxidação do que os de adenina, refletindo nas maiores correntes de pico observadas para a dGuo.

A fim de se investigar que de fato seja uma possível interação do íon colina com o dsDNA, foi realizado um estudo comparativo entre outro DES com a presença do íon colina, no caso a glicelina (NADES hidrofílico) que também já foi evidenciado por Mondal et al. (2013) uma possível estabilidade de dsDNA em glicelina e um

NADES hidrofóbico, sem a presença do íon colina, a base de mentol como HBD e ácido decanoico como HBA, designada mentina. Para o estudo da influência da hidrofilicidade e hidrofobicidade na composição do CPE e conseqüentemente na resposta do comportamento eletroquímico do DNA, foram utilizados como modificadores glicelina (hidrofílica) e mentina (hidrofóbica) nas mesmas porcentagens do que a etalina (2,5; 5,0 e 7,5 %) m/m. O corpo do eletrodo utilizado foi a seringa e as medidas foram realizadas após dez dias de descanso das pastas modificadas.

Os voltamogramas obtidos com  $\text{CPEt}_{(\text{men})}$  na figura 11 mostram que, para porcentagens menores que 7,5% de modificador mentina, não houve aumento das intensidades de corrente dos picos de oxidação comparado ao  $\text{CPEt}$ . Para a porcentagem de 7,5% no  $\text{CPEt}_{(\text{men})}$  em comparação ao  $\text{CPEt}$ , observa-se um aumento das correntes dos picos de oxidação do dsDNA, indicando que o NADES hidrofóbico promoveu um aumento de condutividade, provavelmente associados aos grupos carboxílicos presentes na mentina.

**Figura 11.** Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha base obtidos com (a)  $\text{CPEt}_{(\text{gly})}$  e (b)  $\text{CPEt}_{(\text{men})}$  no intervalo de potencial de  $E = 0$  a  $+1,4$  V (vs  $\text{Ag}/\text{AgCl}$  ( $\text{KCl}$  3,0 M) / V, em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5, com aumento da porcentagem.



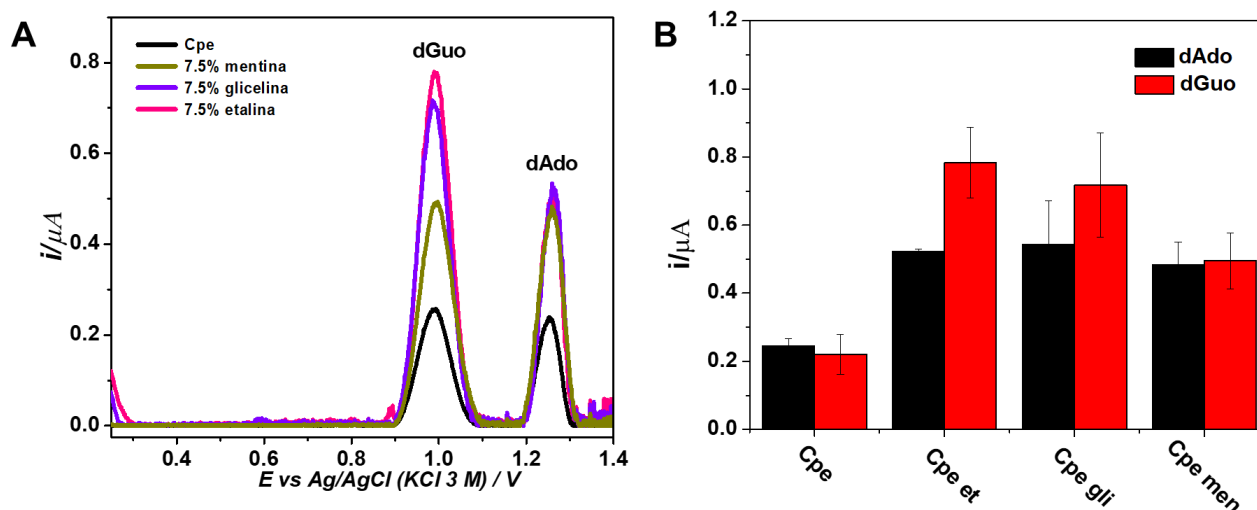
Embora existam diferenças entre os perfis voltamétricos do ds-DNA nas superfícies estudadas, a porcentagem de 7,5% substituição do aglutinante mineral por

NADES se mostrou a condição ótima enquanto composição de pasta de carbono para todas as modificações e foram comparadas na figura 12.

Na figura 12, os voltamogramas obtidos mostram que o comportamento eletroquímico do dsDNA em etalina e glicelina nas mesmas porcentagens é semelhante, evidenciando que o pico oxidação de dGuo apresenta maiores valores de intensidades de correntes comparados aos outros eletrodos, indicando uma certa semelhança da forma que o dsDNA se organiza na superfície do eletrodo. Já para o CPET<sub>(men)</sub> e o CPET que apresentam ausência do íon colina em suas composições o comportamento eletroquímico da dGuo apresenta valores de intensidade de corrente de pico semelhantes a dAdo. É importante compreender o comportamento eletroquímico do dsDNA e as proporções dos picos de oxidação de dGuo e dAdo devido as interações do tipo dsDNA-molécula alvo que serão investigadas, tendo em vista que a molécula estudada pode apresentar preferência de interação com um resíduo de base nitrogenada específico e promover possíveis danos oxidativos que são provenientes da oxidação das bases nitrogenadas.

Pode-se inferir também que os valores dos picos de oxidação referentes a dAdo para os três NADES são similares, indicando que possivelmente o íon colina pode ter um efeito nas interações estabelecidas entre o dsDNA e a superfície do eletrodo que influencia principalmente a exposição da dGuo para ser oxidada em relação a dAdo. Em consonância com os estudos realizado por Nakano et al. (2014) por meio de outras técnicas, há de fato uma possibilidade de ser uma inversão de estabilidade entre as bases nitrogenadas do dsDNA em NADES que apresentam o íon colina como precursor. Desta forma, pode-se no futuro realizar outros estudos na área de NADES sobre as interações de ácidos nucleicos e outras biomoléculas em ambientes contendo DES.

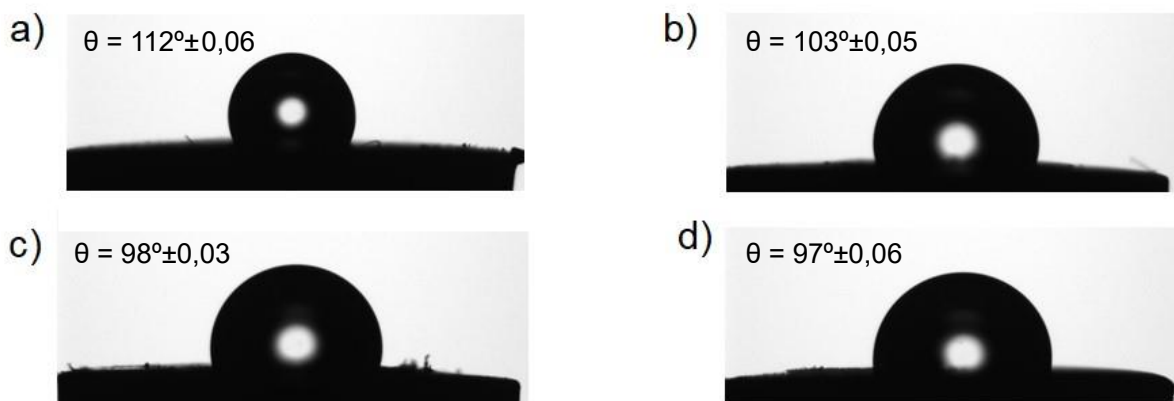
**Figura 12.** A) Voltamogramas de pulso diferencial com correção de linha base obtidos com CPEt com diferentes modificadores na porcentagem de 7,5% no intervalo de potencial de  $E = 0$  a  $+1,4$  V (vs Ag/AgCl (KCl 3,0 M) / V, em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5 B) Gráfico da corrente em função dos tipos de modificadores.



Segundo Svancara et al. (2012) a hidrofobicidade da pasta é influenciada pela presença do aglutinante, portanto medidas de ângulo de contato foram realizadas a fim de se confirmar a relação entre as magnitudes e proporção das correntes de pico de oxidação de ambos os nucleosídeos e a hidrofobicidade da superfície. Em ordem crescente de hidrofobicidade, observou-se  $\text{CPE} < \text{CPE}_{(\text{et})} < \text{CPE}_{(\text{gly})} < \text{CPE}_{(\text{men})}$ , figura 13.

A maior hidrofobicidade do CPE já era esperada, dada a natureza hidrofóbica do aglutinante, e confirma a necessidade de uma superfície hidrofílica para adsorção do ds-DNA, visto que o CPE sem pré-tratamento apresentou ângulo de contato de  $112^\circ$  e baixas correntes para oxidação de ambos os nucleosídeos. Com a adição da mentina, a hidrofobicidade da pasta aumenta, uma vez que o ângulo de contato da gota de água com a superfície diminui. A proximidade entre os ângulos de contato entre  $\text{CPE}_{(\text{men})}$  e  $\text{CPE}_{(\text{gly})}$  denota hidrofobicidade similar para ambas as superfícies. De modo geral, todas as superfícies apresentadas na figura 13 são classificadas como hidrofóbicas, por apresentarem ângulos de contato superiores a  $90^\circ$  o que indicaria a necessidade de um pré-tratamento.

**Figura 13.** Imagens obtidas na câmera digital Navitar para a) CPE; b) CPE<sub>(et)</sub>; c) CPE<sub>(gly)</sub> e d) CPE<sub>(men)</sub>.



Ainda, o efeito sugerido de estabilização do DNA, em especial do par A-T, pela presença do íon colina no caso do CPE<sub>(gly)</sub> e CPE<sub>(et)</sub> é uma possibilidade de explicação para o comportamento eletroquímico do dsDNA observado na figura 12. Segundo Nakano et al. (2014), o íon colina carregado positivamente interage eletrostaticamente com arcabouço açúcar-fosfato das fitas de DNA carregados negativamente reduzindo as forças repulsivas entre os grupos fosfatos. O íon colina também interage por meio de múltiplas ligações de hidrogênio com as bases do dsDNA através dos sulcos principais e secundários do dsDNA, estabilizando a conformação A-T. Tendo em vista que em condições fisiológicas os pares de base nitrogenadas G-C são mais estáveis devido o maior número de ligações de hidrogênio. Sendo comprovado experimentalmente (NAKANO et al. ,2014) que os íons colina podem reverter a estabilidade dos pares de base A-T e G-C, ou seja, o íon colina estabiliza a conformação da A-T: Como consequência da estabilização, os resíduos de guanina estariam mais disponíveis para a oxidação do que os de adenina, refletindo nas maiores correntes de pico observadas para a dGuo.

Este efeito de estabilização por parte do íon colina é preponderante sobre a hidrofobicidade da superfície visto que o CPE<sub>(et)</sub> apresenta comportamento similar em magnitudes de corrente e perfil voltamétrico ao CPE<sub>(gly)</sub>, mesmo apresentando ângulo de contato maior (maior hidrofobicidade), neste caso indica que os grupos funcionais dos componentes do DES desempenham um papel fundamental nas interações estabelecidas do dsDNA e a superfície do eletrodo e consequentemente no comportamento eletroquímico do dsDNA.



Como as medidas para o  $CPE_{(et)}$  apresentaram menor desvio padrão relativo cerca de 1% para dAdo comparado a cerca 20% para  $CPE_{(gly)}$ , provavelmente por promover uma melhor adsorção do ds-DNA, observada pelo aumento das correntes de pico de dGuo e dAdo, optou-se por utilizar a associação  $CPE_{(et)}/ds-DNA$  para os posteriores estudos de incubação com os corantes.

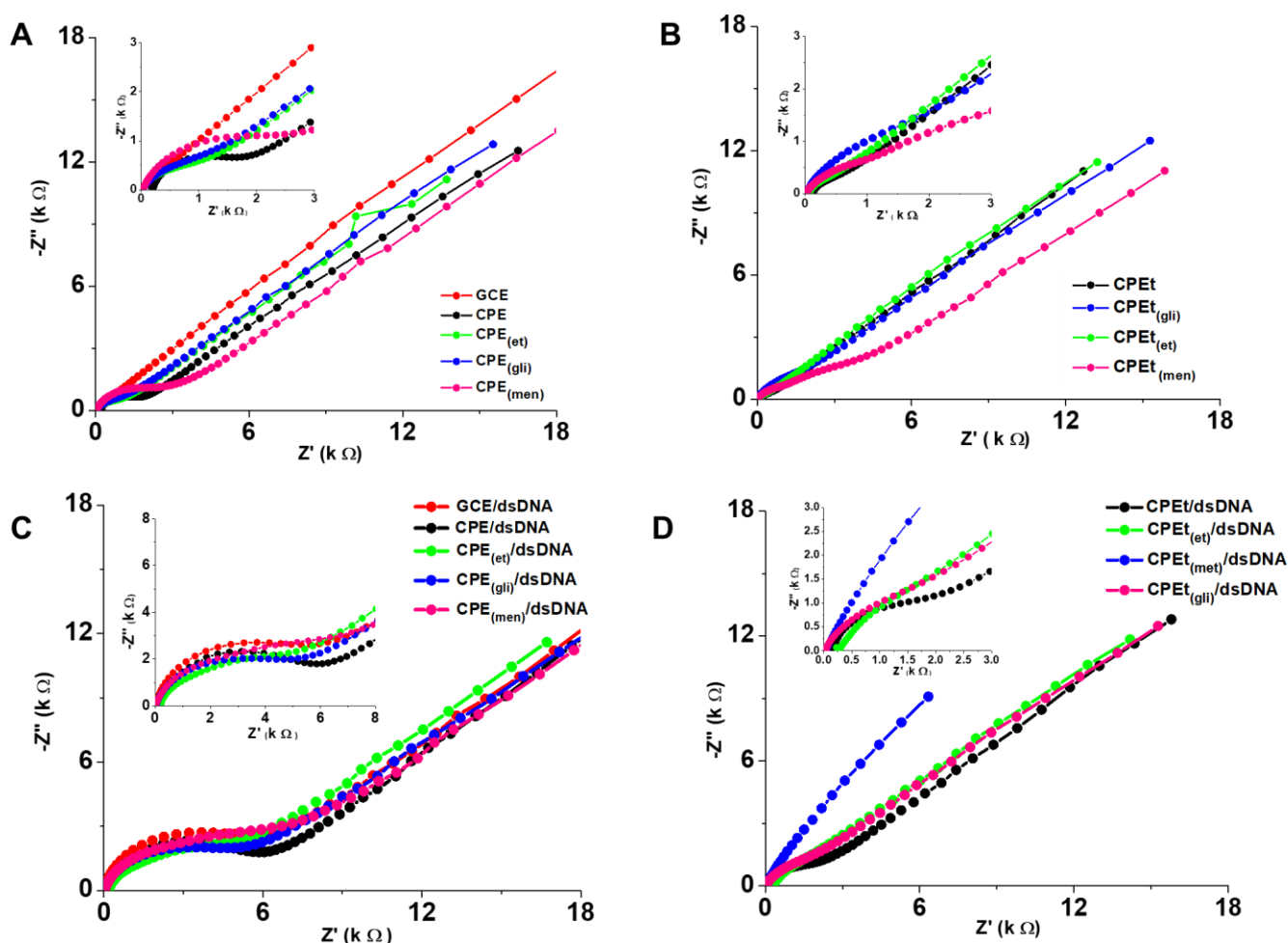
### **4.3 Caracterização superficial do CPEs por Espectroscopia de Impedância Eletroquímica**

Na figura 14 estão representados os espectros de impedância eletroquímica com diagrama de Nyquist obtidos para os eletrodos a fim de caracterizar e avaliar a resistência a transferência de carga e a capacitância da dupla camada elétrica dos eletrodos não modificados e modificados. O diagrama de Nyquist permite obter informações importantes acerca dos componentes de impedância real ( $Z'$ ) e impedância imaginária ( $Z''$ ) do sistema em estudo, normalmente um diagrama de Nyquist típico apresenta um semicírculo em altas frequências, referente à resistência à transferência de carga ( $R_{CT}$ ) da sonda na interface eletrodo solução e um comportamento linear em médias e baixas frequências, referente ao processo difusional da sonda eletroquímica. Como pode-se observar na figura 14A, para os eletrodos modificados com NADES, era esperado um decréscimo de resistência a transferência de carga, para o  $CPE_{(et)}$  e  $CPE_{(gli)}$ , observa-se este comportamento em comparação ao CPE. Este efeito pode ser explicado devido esses NADES apresentarem o íon colina carregado positivamente que interage com a sonda eletroquímica. Quando não há o cátion colina, caso do  $CPE_{(men)}$ , os grupos funcionais que ficam expostos na superfície repelem eletrostaticamente a sonda, aumentando a  $R_{CT}$ .

Já para a figura 14B, observa um diminuição da resistência de transferência de carga após o pré-tratamento, indicando que a superfície do eletrodo foi funcionalizada com grupos carregados que podem ser grupos funcionais orgânicos oxigenados, especialmente carboxilatos melhorando a condutividade e conseqüentemente diminuindo a resistência à transferência de carga de todos os eletrodos tratados. Ainda sim, para o  $CPE_{(men)}$ , um segundo semicírculo discreto é observado na figura 14 B o que poderia indicar uma maior  $R_{CT}$ , pode ser que a mentina forme um camada por

cima das folhas de grafite e à transferência de carga acontece entre a camada do DES e a superfície do eletrodo.

**Figura 14.** Diagrama de Nyquist de espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  contendo  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte com eletrodos sem dsDNA (A), eletrodos apenas com pré-tratamento (B), eletrodos com dsDNA sem pré-tratamento (C) e eletrodos pré-tratados com dsDNA (D)

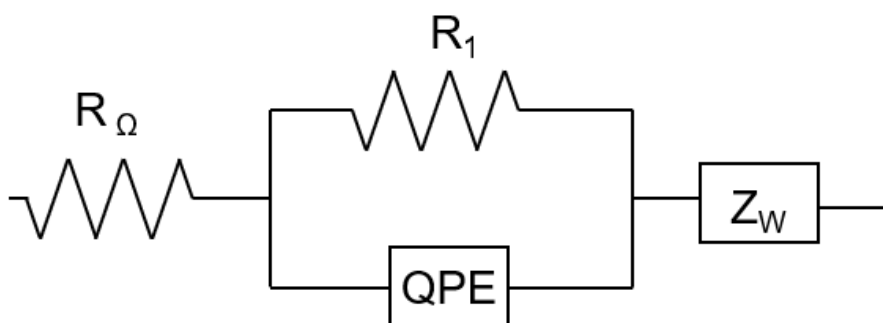


Após a adição de ds-DNA na superfície dos eletrodos, na figura 14C observa-se um aumento significativo em relação a resistência a transferência de carga, indicando a adsorção de ds-DNA na superfície do eletrodo. Para melhoria de condutividade da superfície do eletrodo modificado com ds-DNA para as medidas que utilizaram a técnica VDP, foi observado a necessidade de um pré-tratamento, na figura

14D, observa-se que o pré-tratamento proporcionou um aumento de condutividade e diminuição na resistência de transferência de carga, ao se comparar o CPEs sem pré tratamento e tratados ambos com ds-DNA.

Para a obtenção dos parâmetros, a partir do circuito de Randles na figura 15, proposto foi utilizado o software Nova com a ferramenta “electrochemical circle fit” e “Fit and Simulation”. Estas ferramentas propuseram um circuito equivalente, a partir dos pontos de ajuste de uma porção de semicírculo selecionados no diagrama de Nyquist, os parâmetros avaliados estão representados na tabela 2.

**Figura 15.** Circuito equivalente utilizado na ferramenta de análise “electrochemical circle fit”.



Na tabela 2, podemos observar um aumento dos valores da  $R_{CT}$  após a modificação com dsDNA dos eletrodos propostos, que pode ser atribuída a adsorção do dsDNA na superfície eletródica, estabelecendo uma repulsão eletrostática entre o par redox aniônico  $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$  e os esqueletos de fosfato carregados negativamente do DNA. Em que  $R_s$  (resistência não compensada),  $R_{CT}$  (resistência à transferência de carga), QPE (valor de elemento de fase constante) e o valor (chi-quadrado) do espectro ajustado. Os valores do elemento de fase constante (QPE) se correlacionam com a capacitância, quanto maiores valores de QPE, maior é o acúmulo de cargas na superfície do eletrodo. Após o pré- tratamento observa-se na tabela 2, que para todos os eletrodos comparados com seus pares não tratados, ocorreu o aumento do QPE, indicando a funcionalização da superfície com grupos carboxilatos.

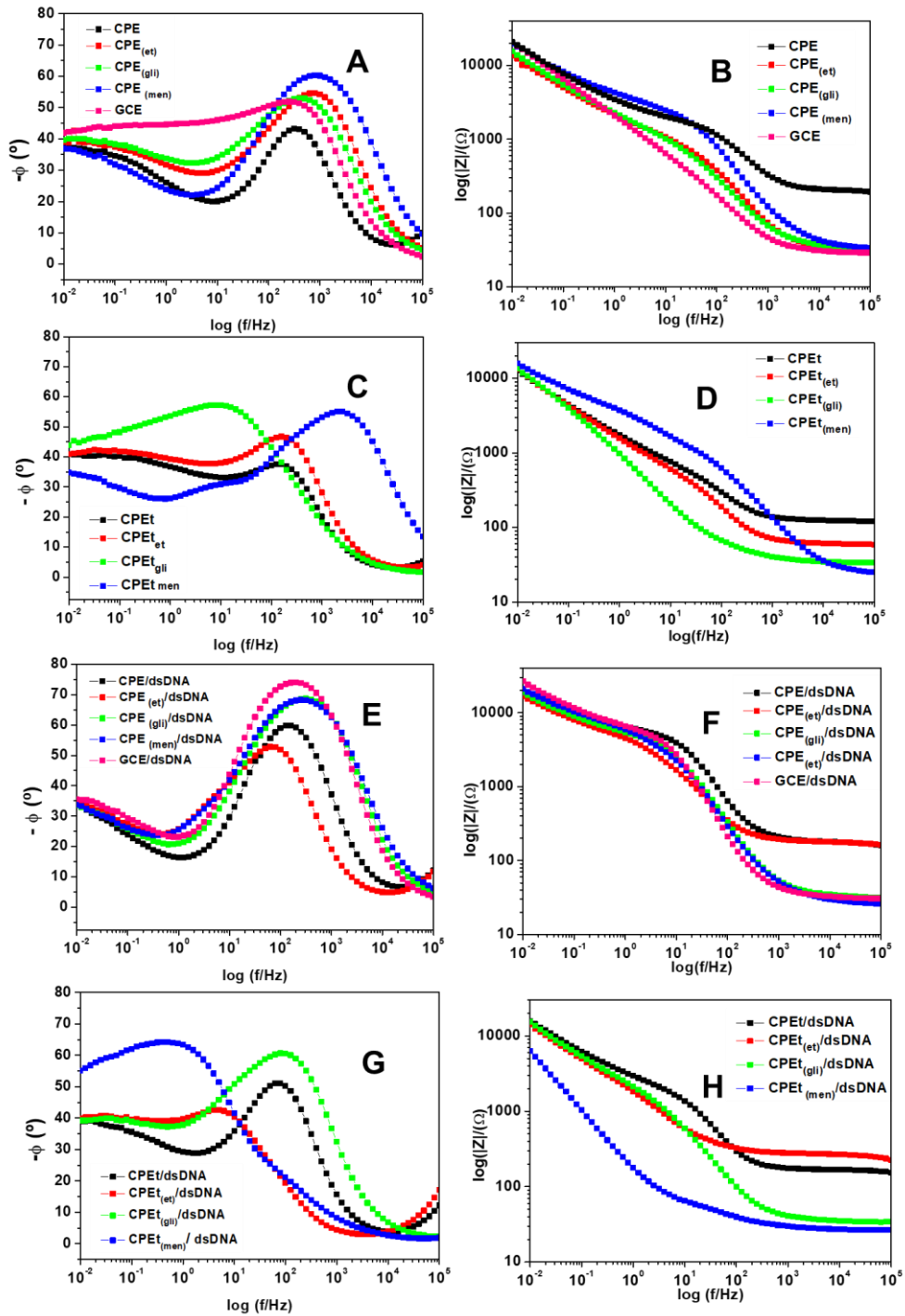
Tabela 2 - Parâmetros obtidos a partir do ajuste dos espectros de impedância eletroquímica ilustrados na figura 14.

Eletrodo	Rs (kΩ)	R <sub>ct</sub> . (kΩ)	QPE 1(2)		W 1(2)		χ <sup>2</sup>
			μMho* s (1/2)	α <sub>1</sub> (n)	μMho* s (1/2)		
CPE	0,196	1,6	3,2	0,83	196	0,12	
CPe <sub>t</sub>	0,120	0,6	14,0	0,81	228	0,07	
CPE <sub>-dsDNA</sub>	0,170	5,4	3,0	0,86	210	0,13	
CPe <sub>t-dsDNA</sub>	0,163	1,8	8,6	0,87	201	0,16	
CPE <sub>(et)</sub>	0,029	1,0	8,8	0,79	222	0,10	
CPe <sub>t(et)</sub>	0,059	0,5	14	0,85	223	0,04	
CPE <sub>(et)/ds-DNA</sub>	0,169	4,4	12,8	0,78	225	0,20	
CPe <sub>t(et)/ds-DNA</sub>	0,258	4,2	91,4	0,68	194	0,35	
CPE <sub>(gly)</sub>	0,031	1,1	13,5	0,76	194	0,05	
CPe <sub>t(gly)</sub>	0,033	0,5	149	0,70	157	0,01	
CPE <sub>(gly)/ds-DNA</sub>	0,030	4,6	5,2	0,85	205	0,08	
CPe <sub>t(gly)/ds-DNA</sub>	0,033	1,7	25,7	0,82	204	0,04	
CPE <sub>(men)</sub>	0,031	2,7	4,0	0,80	167	0,06	
CPe <sub>t(men)</sub>	0,018	2,7	13,5	0,67	201	0,70	
CPE <sub>(men)/ds-DNA</sub>	0,025	5,5	7,1	0,82	179	0,14	
CPe <sub>t(men)/ds-DNA</sub>	0,025	5,5	7,2	0,71	178	0,14	
GCE	0,028	0,4	12,5	0,837	133	0,05	
GCE/ds-DNA	0,030	5,4	38	0,913	138	0,01	

Fonte: Autora, 2023.

Na figura 16, estão representadas ambas as curvas Bode-fase e Bode-módulo para todos os eletrodos estudados.

**Figura 16.** Curvas (Bode-fase/Bode módulo) obtidas com eletrodo sem pré-tratamento (A/B), com pré-tratamento (C/D), sem pré-tratamento com dsDNA (E/F) e com pré-tratamento e com dsDNA (G/H) a partir dos espectros de impedância eletroquímica com  $E_{\text{fixado}} = + 0,22\text{V}$  em solução de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  contendo  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl.



Em altas frequências, a curva Bode fase mostra que a resposta do sistema é dominada pela resistência, adquirindo comportamento puramente resistivo, associada à resistência não compensada da solução, com ângulo de fase próximo de 0°. À medida que a frequência diminui, observa-se uma mudança do ângulo de fase, em que a impedância da componente capacitivo aumenta, e, conseqüentemente, o ângulo de fase tende a 90°. O aumento do ângulo de fase mostra o limite de carga acumulada na superfície, e assim, o aumento da impedância do sistema em virtude de um aumento de reatância da superfície, similar ao comportamento de um capacitor em circuitos elétricos. Após esse limite, a impedância cresce até que o filme consiga transferir carga de maneira eficiente, ocorrendo o decaimento do ângulo de fase. Já na faixa de baixas frequências, o ângulo tende a 45°, correspondente ao processo de difusão no sistema eletroquímico, uma vez que nesse momento o fenômeno de transporte de massa é o fator limitante da transferência eletrônica, aumentando ambas as impedâncias  $Z'$  e  $Z''$ .

Para melhor avaliar a capacitância e a distribuição de cargas na superfície, espectros de impedância eletroquímica foram obtidos em  $E_{\text{fixado}}$  ( $E_{\text{bias}}$ ) menos positivos que o  $E_{1/2}$  da sonda eletroquímica, figura 17. Nestas condições, o circuito equivalente se assemelha a um circuito R-CPE. Segundo Laschuk, Easton e Zenkina (2021) quando os valores de ângulo de fase decrescem significa que a dupla camada elétrica estabelecida com a modificação é menos eficiente em reter efetivamente a carga elétrica e o deslocamento do máximo do ângulo de fase para menores frequências pode indicar um comportamento próximo a de um capacitor, com maior capacidade de acumulação de carga. É possível calcular o constante de tempo de célula ( $\tau_0$ ) para o carregamento da dupla camada elétrica a partir do gráfico de Bode-fase, quando a curva atinge o valor de 45°, pela equação 1.

$$\tau_0 = \frac{1}{2\pi f_0}$$

Em que:

$\tau_0$  = constante de tempo da célula

$f_0$  = frequência cujo ângulo de fase é 45°

Para o fenômeno de carregamento da dupla camada elétrica, o valor de  $\tau_0$  implica no tempo dispendido para carregamento de 63% da dupla camada, similar ao que se observa em capacitores (LAZANAS e PRODROMIDIS, 2023). Considerando

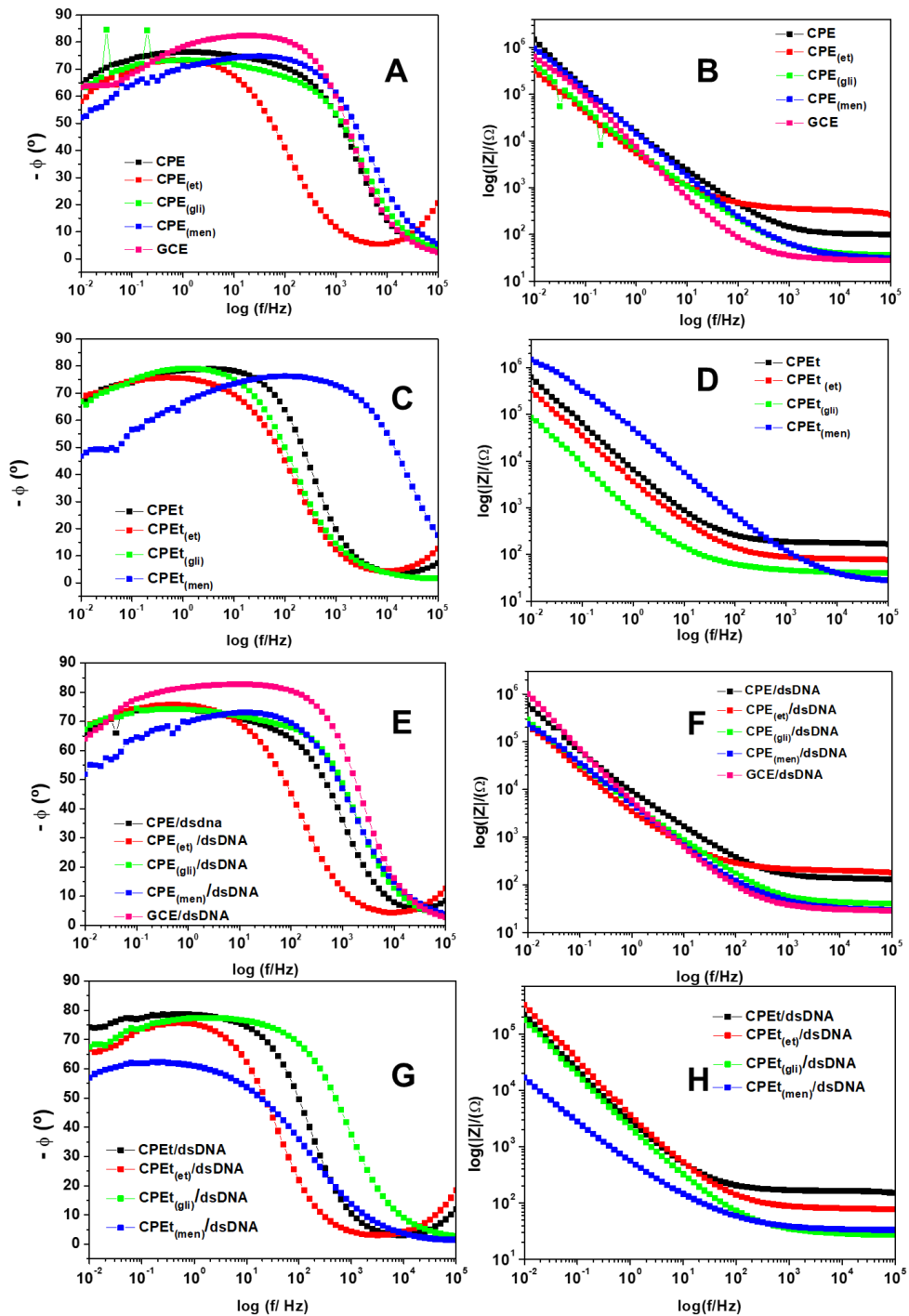
as constantes de célula para cada eletrodo, independentemente da modificação, se observa um tempo de célula muito maior para  $CPE_{(et)}$  ( $\tau_0 = 2.0$  ms) quando comparada às outras modificações e para o CPE não tratado ( $\tau_0 = 0,1$  ms) evidenciando uma capacidade de acumular carga muito maior do  $CPE_{(et)}$ . Tal fator pode ser atribuído à exposição dos cátions colina na interface eletrodo/solução aumentando a capacidade de acúmulo de carga e estabelecimento da dupla camada elétrica, figuras 17 A e B. Assim, pode-se presumir que estes grupos estarão expostos do momento em que o eletrodo for modificado com ds-DNA, o que possibilita a interação com grupos fosfato e conseqüentemente uma maior exposição das bases nitrogenadas para serem oxidadas.

Após o pré-tratamento, observa-se que o máximo do ângulo de fase se desloca para menores frequências, o que se traduz fisicamente em uma superfície mais carregada depois da funcionalização com grupos carregados negativamente, afetando o carregamento da dupla camada elétrica. Ainda sim, o  $CPE_{(et)}$  apresenta a menor constante de célula,  $\tau_0 = 0.5$  ms, mostrando que o pré-tratamento altera a distribuição de cargas na superfície do  $CPE_{(et)}$ , ( $\tau_0 = 2.0$  ms), figuras 17 C e D.

Na figura 17 E e F, observa-se um aumento do ângulo de fase para todos os eletrodos em comparação a figura 17 A, sugerindo que os resíduos de base de ds-DNA estão interagindo com a superfície do eletrodo deixando exposto o arcabouço de fosfato para a solução, ainda que não se seja observada muita alteração para o  $CPE_{(et)}$ , evidenciando que a carga do íon colina exposto na interface eletrodo/solução é a principal contribuinte para a capacitância interfacial, corroborando com as hipóteses levantadas quando o  $CPE_{(et)}$  foi avaliado por VDP.

Para os eletrodos tratados e modificados com dsDNA, figuras 17 G e H, se observa uma diminuição do ângulo de fase e um deslocamento significativo do máximo do ângulo de fase, principalmente para o  $CPE_{(men)}/ds-DNA$  em comparação ao não tratado, indicando que este eletrodo está se comportando como um capacitor. Ainda sim, em virtude da estabilidade e comportamento similar do  $CPE_{(et)}$  e  $CPE_{(et)}$  nas mais diferentes condições, e pela exposição do grupo colina responsável pela estabilização do dsDNA, o  $CPE_{(et)}$  será o eletrodo de escolha para os estudos de interação por espectroscopia de impedância eletroquímica com os corantes tartrazina e azul brilhante, e o  $CPE_{(et)}$  para as análises voltamétricas.

**Figura 17.** Curvas (Bode-fase/Bode módulo) obtidas com eletrodo sem pré-tratamento (A/B), com pré-tratamento (C/D), sem pré-tratamento com dsDNA (E/F) e com pré-tratamento e com dsDNA (G/H) a partir dos espectros de impedância eletroquímica em  $E_{\text{fixado}} = + 0,0\text{V}$  em solução de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  contendo  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl.



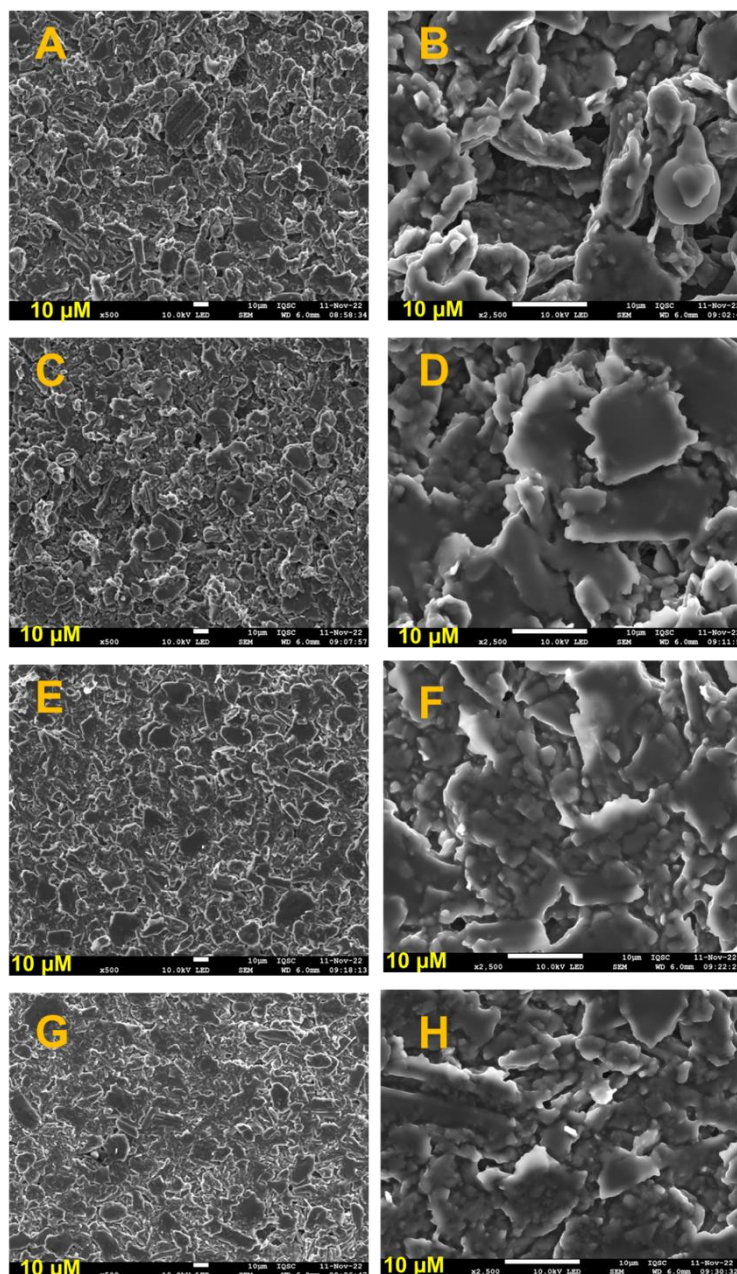


#### 4.4 Caracterização superficial do CPE<sub>(et)</sub> por microscopias de imagem

Na Figura 18A e B, estão representadas as micrografias do CPE não tratado, em que é possível observar aglomerados com tamanhos irregulares de folhas de grafite, sendo que as folhas estão com formato de folhas enroladas e com espaços vazios dentro da pasta. Além disso, observa-se que grande parte das folhas estão conectadas por conta do aglutinante óleo mineral. De acordo com Svancara et al. (2009), as folhas de grafite individuais na pasta carbono não modificada são revestidas pelo aglutinante, muitas delas sendo unidas em pequenos pacotes ou “stacks”.

Entretanto para o CPE<sub>(et)</sub>, figuras 18C e D, à imagem ampliada revela folhas com tamanhos mais regulares e mais lisas com a formação de um filme fino nas mesmas, resultando em uma cobertura quase total de todas as partículas de grafite, apresentando maior coesão e organização. Este efeito pode ser devido a agregação do NADES na pasta promover uma melhor aglutinação das partículas de grafite. Para as figuras 18E e F para CPE<sub>(men)</sub> e as figuras 18G e H para CPE<sub>(gli)</sub>, também fica evidente a formação de um filme fino provavelmente dos seus respectivos NADES sobre as folhas de grafite, contudo quando é comparado as imagens com ampliação de 2500x para todos CPEs modificados nota-se que os formatos das folhas de grafite são diferentes também a organização destas na superfície do eletrodo indicando que o modificador influencia no tamanho, formato e disposição das folhas grafite ficando evidente a modificação.

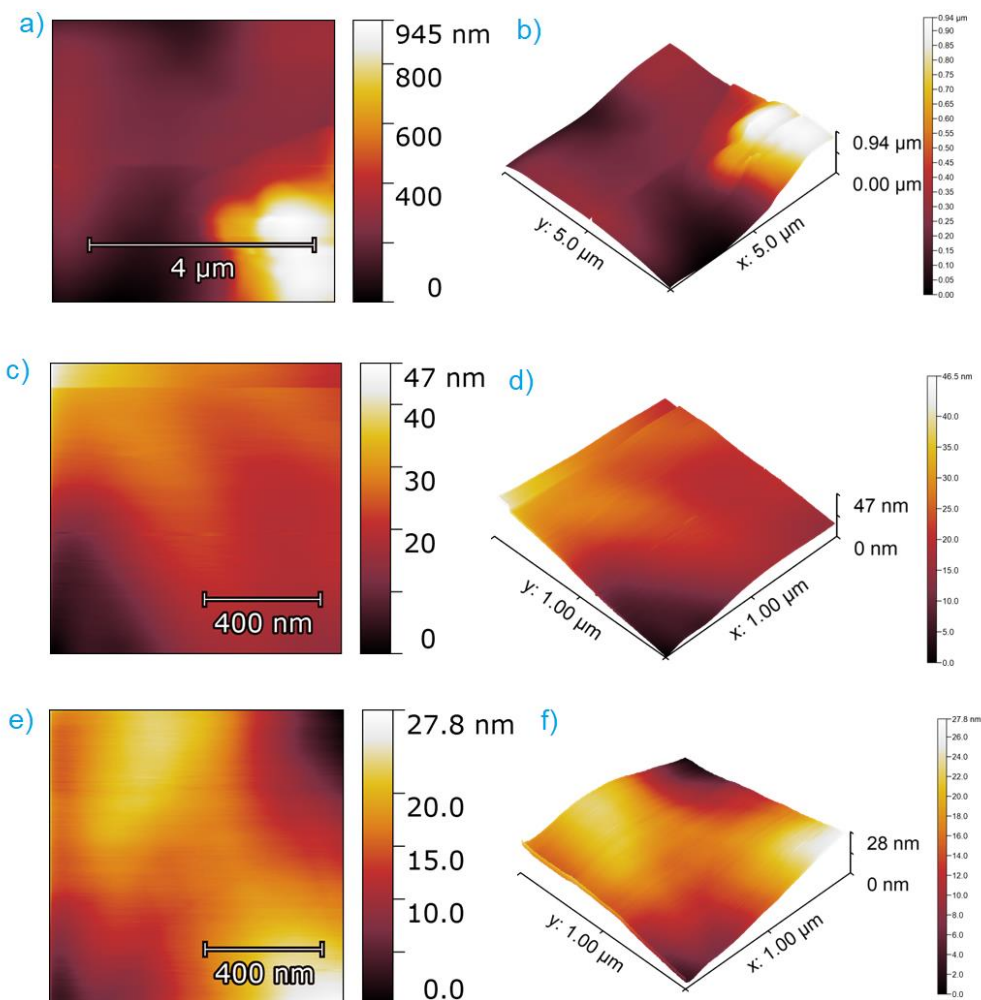
**Figura 18.** Imagens obtidas por MEV para A, C, E e G com CPE, CPE<sub>(et)</sub>, CPE<sub>(men)</sub> e CPE<sub>(gli)</sub>, respectivamente com ampliação 500x; B, D, F e H com CPE, CPE<sub>(et)</sub>, CPE<sub>(men)</sub> e CPE<sub>(gli)</sub>, respectivamente com ampliação 2500x.

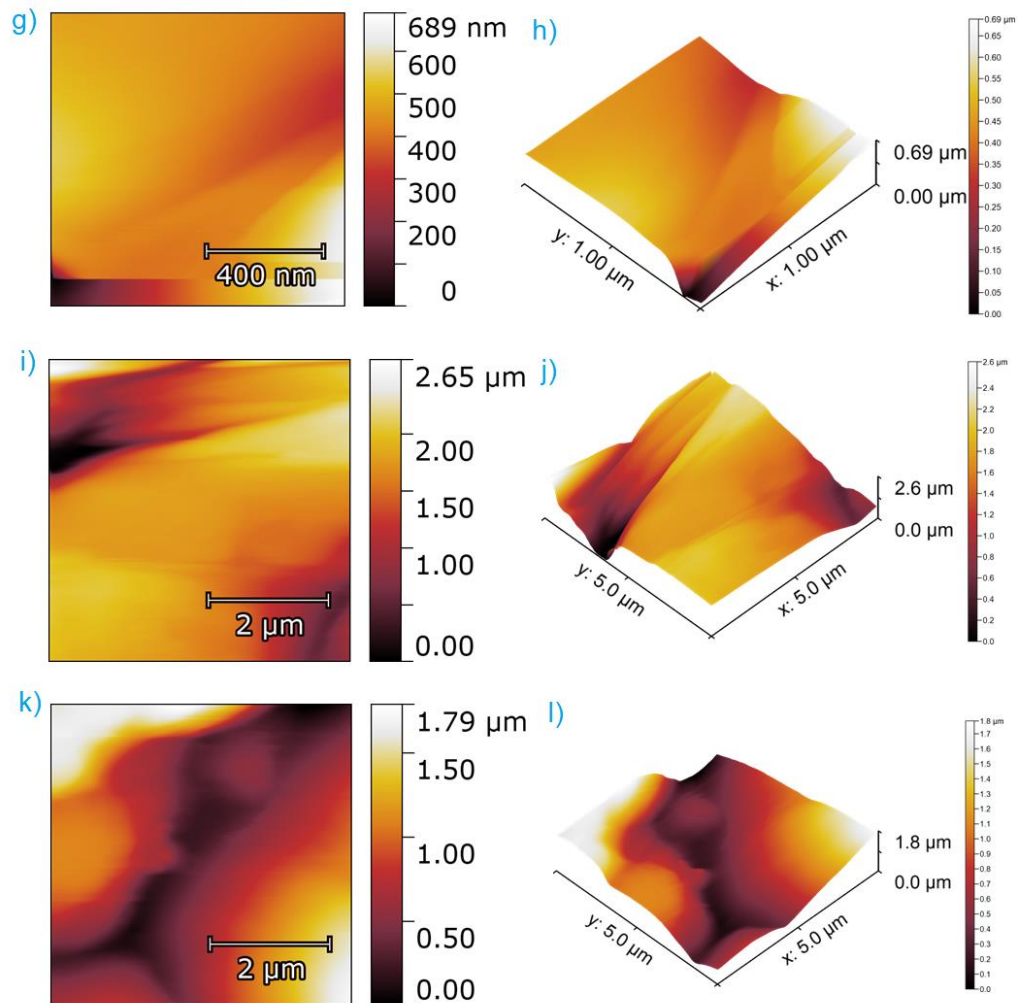


Para avaliar a topografia do CPE, CPE<sub>(et)</sub> e CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA, imagens de microscopia de força atômica (do inglês - *Atomic Force Microscopy* – AFM) foram obtidas para o CPE e o CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA com diferentes resoluções de acordo com a figura 19. As imagens obtidas para o CPE mostram rugosidades da ordem de 1,0 μm entre máximos e mínimos em sua menor ampliação, o que evidencia uma superfície

extremamente rugosa e irregular visto que a região de mínimo observada na imagem 19A pode estar relacionada a passagem do cantiléver por um vazio, hipótese que é sustentada pelas imagens de MEV para o CPE. Ao se trabalhar com resoluções maiores, observa-se baixa rugosidade, na faixa dos 50 nm, o que poderia mostrar uma região de aglomerado de grafite ou “stack”, que possui aparência plana e uniforme nas imagens de MEV com maior resolução.

**Figura 19.** Imagens de Microscopia de Força Atômica (varredura frontal) com sua representação 3D (A-F) CPE, (G-L) CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA.





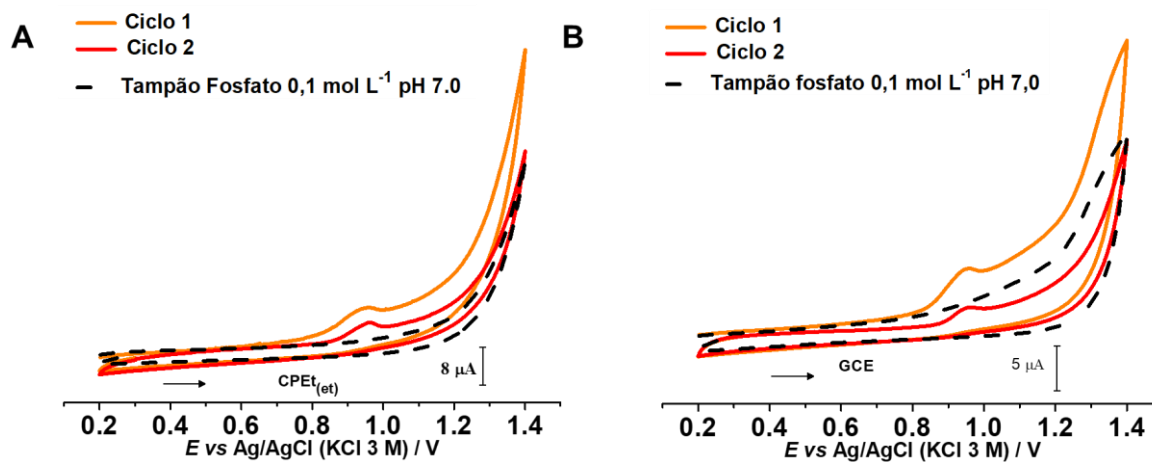
Quando se comparam as imagens entre  $CPE_{(et)}/ds\text{-DNA}$  (Figuras G-L) e o CPE, a escala de rugosidade entre máximos e mínimos do  $CPE_{(et)}/ds\text{DNA}$  é 2,5 vezes maior que a do CPE, evidenciando maior rugosidade. Entretanto, não são observados os mesmos vazios representados pelas áreas escuras nas imagens  $CPE_{(et)}/ds\text{DNA}$  quando comparadas ao CPE, o que sugere uma melhoria significativa na coesão e compactação da pasta. Quando em maiores resoluções, a rugosidade observada para o  $CPE_{(et)}/ds\text{-DNA}$  é de cerca de 690nm, 14,7x maior que a escala de rugosidade observada para o CPE (47nm), evidenciando uma possibilidade da adsorção do ds-DNA na superfície.

#### 4.5 Estudo de interação *in vitro* CPE<sub>(et)</sub>/dsDNA-TZ

O comportamento eletroquímico da TZ utilizando o CPE<sub>(et)</sub> foi inicialmente estudado por voltametria cíclica em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0, com,  $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$ , figura 20. Para todos os experimentos de caracterização do comportamento eletroquímico de TZ foi também utilizado o GCE, tendo em vista que este eletrodo será utilizado futuramente para comparar as interações do ds-DNA com o corante, já que o GCE é o eletrodo mais utilizado para esse tipo de estudo. É importante compreender o comportamento eletroquímico de ambos os corantes nos eletrodos base, para que qualquer sinal relativo à oxidação direta do corante possa ser identificado.

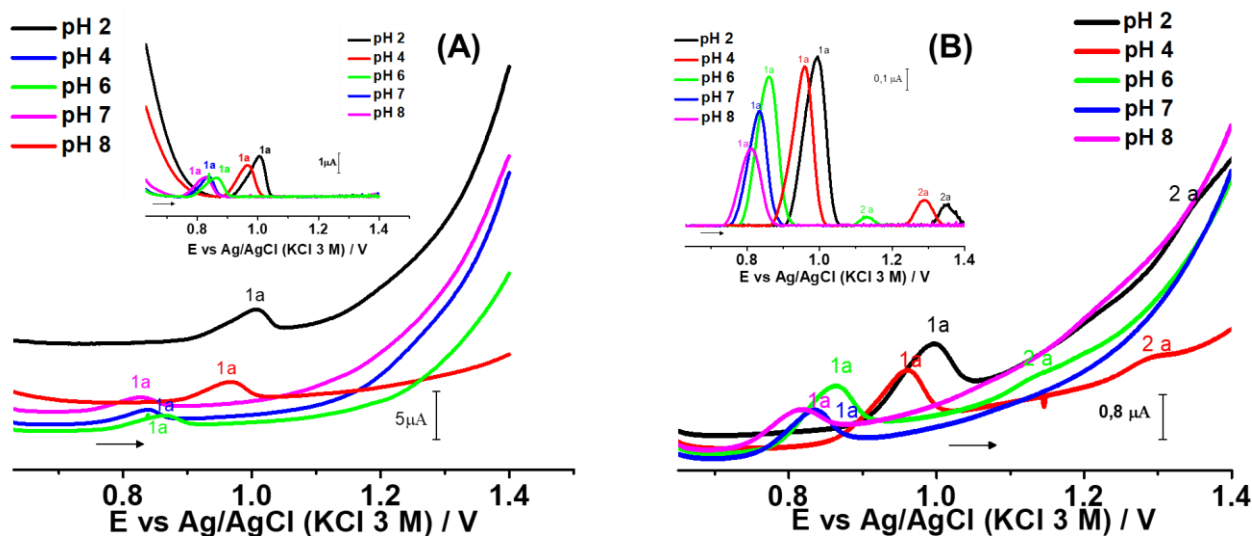
Os voltamogramas cíclicos obtidos com CPE em 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de TZ mostram um pico irreversível de oxidação em  $E_{p,a1} = + 0,95 \text{ V}$ , figura 20A, com possível adsorção de produtos de oxidação da tartrazina na superfície do eletrodo em detrimento de um decréscimo de corrente para o pico  $E_1$  após sucessivas varreduras. Este comportamento é observado em ambos os eletrodos.

**Figura 20.** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0, contendo TZ 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com CPE<sub>(et)</sub> (A) e GCE (B). Condições experimentais: velocidade de varredura 50 mV s<sup>-1</sup>, intervalo de potencial  $E = + 0,2 \text{ V}$  a +1,4V.



A influência do pH no processo de oxidação da tartrazina no GCE e CPE<sub>(et)</sub> foi avaliada em uma escala significativa de pH por meio da voltametria de pulso diferencial. Os voltamogramas de pulso diferencial da figura 21 foram obtidos em soluções contendo 10 μmol L<sup>-1</sup> de TZ. Para os resultados obtidos foi observado que o maior valor de corrente foi para o pH 2,0 e a partir deste pH há um decréscimo nos valores de corrente de pico em ambos os eletrodos, além disso há um deslocamento do valor do potencial de pico para valores mais negativos de potencial.

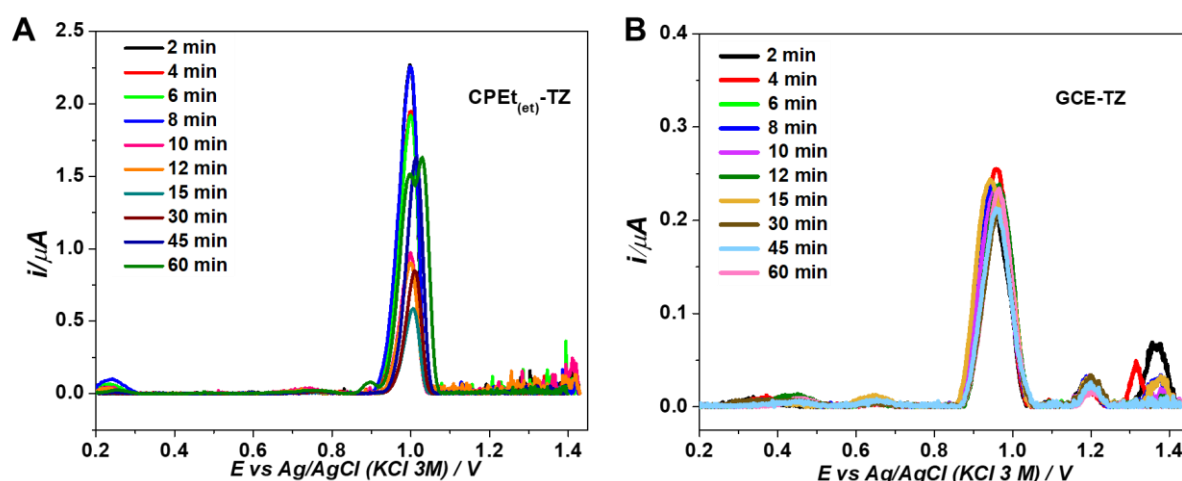
**Figura 21.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com CPE<sub>(et)</sub> em solução de 10 μmol L<sup>-1</sup> de tartrazina em diversos valores de pH e (inset) voltamograma de pulso diferencial com linha base corrigida (A). Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com GCE em solução de 10 μmol L<sup>-1</sup> de TZ em diversos valores de pH e (inset) voltamograma de pulso diferencial com linha base corrigida (B).



Desta forma, investigou-se a possibilidade de a TZ adsorver na superfície dos sensores antes do estudo da interação com o ds-DNA. Para a incubação da TZ com os eletrodos não modificados com ds-DNA, na figura 22, observa-se o pico do processo de oxidação da TZ, em GCE em  $E_{p,a} = + 0,95$  V e em CPE<sub>(et)</sub> em  $E_{p,a} = +1,0$  V, estando próximo do potencial de pico de oxidação da dGuo. Desta forma para controle das interações entre o ds-DNA e a TZ, o pico de oxidação da dAdo foi a referência para garantir que as oscilações de corrente observadas para o pico da

dGuo ocorrem em função da interação com o ds-DNA e não somente devido a uma sobreposição de picos de oxidação da TZ e da dGuo.

**Figura 22.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com  $\text{CPEt}_{(\text{et})}$  sem dsDNA (A) e GCE sem ds-DNA (B) após incubação em solução contendo  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de tartrazina no intervalo de 2 a 60 minutos.



As intensidades de corrente referentes aos picos de oxidação dos resíduos de base do ds-DNA foram representadas pela relação  $I/I_0$ , em que  $I$  é a corrente referente à oxidação dos resíduos de base do dsDNA e  $I_0$  é a corrente referente a oxidação da dAdo referente ao controle, funcionando como o padrão interno, antes das interações.

Uma vez estabelecidos os processos eletroquímicos relativos à tartrazina, o  $\text{CPEt}_{(\text{et})}/\text{ds-DNA}$  foi utilizado para investigar a interação ds-DNA-TZ em diferentes tempos de incubação. Os potenciais e correntes de pico referentes à oxidação de ambos os nucleosídeos foram monitorados após incubação do  $\text{CPEt}_{(\text{et})}/\text{ds-DNA}$  no intervalo de 2 a 60 minutos em solução contendo  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TZ em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 e comparados com seus respectivos controles, a fim de evidenciar possíveis alterações no perfil voltamétrico do ds-DNA decorrentes da interação ds-DNA-TZ. Para cada tempo de incubação, um novo eletrodo foi modificado e incubado em solução de TZ  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ , seguido de lavagem com água deionizada para garantir que as moléculas do analito que não interagiram com o ds-DNA fossem eliminadas, com posterior medida eletroquímica em solução tampão ácido acético/acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5.

Para o eletrodo controle (-) representado na figura 23, foram observados os picos referentes a oxidação de dGuo,  $E_{pa} = + 0,98 \text{ V}$ , e dAdo, em  $E_{pa} = + 1,25 \text{ V}$ .

Para o intervalo de 2 a 15 minutos de incubação em  $100\mu\text{M}$  de TZ em ambos os eletrodos, verificou-se um decréscimo não-linear das intensidades das correntes  $I/I_0$  dos picos de oxidação dos resíduos. Segundo Machini (2019), isto indica a possibilidade de uma forte condensação ou até mesmo agregação do ds-DNA provocada pela interação entre a TZ e os grupos fosfatos do DNA carregado negativamente. A figura 22 mostra que a TZ adsorve em ambos os eletrodos, sugerindo que as intensidades de corrente de dGuo após a interação, em relação aos sensores controles modificados com ds-DNA aumentassem.

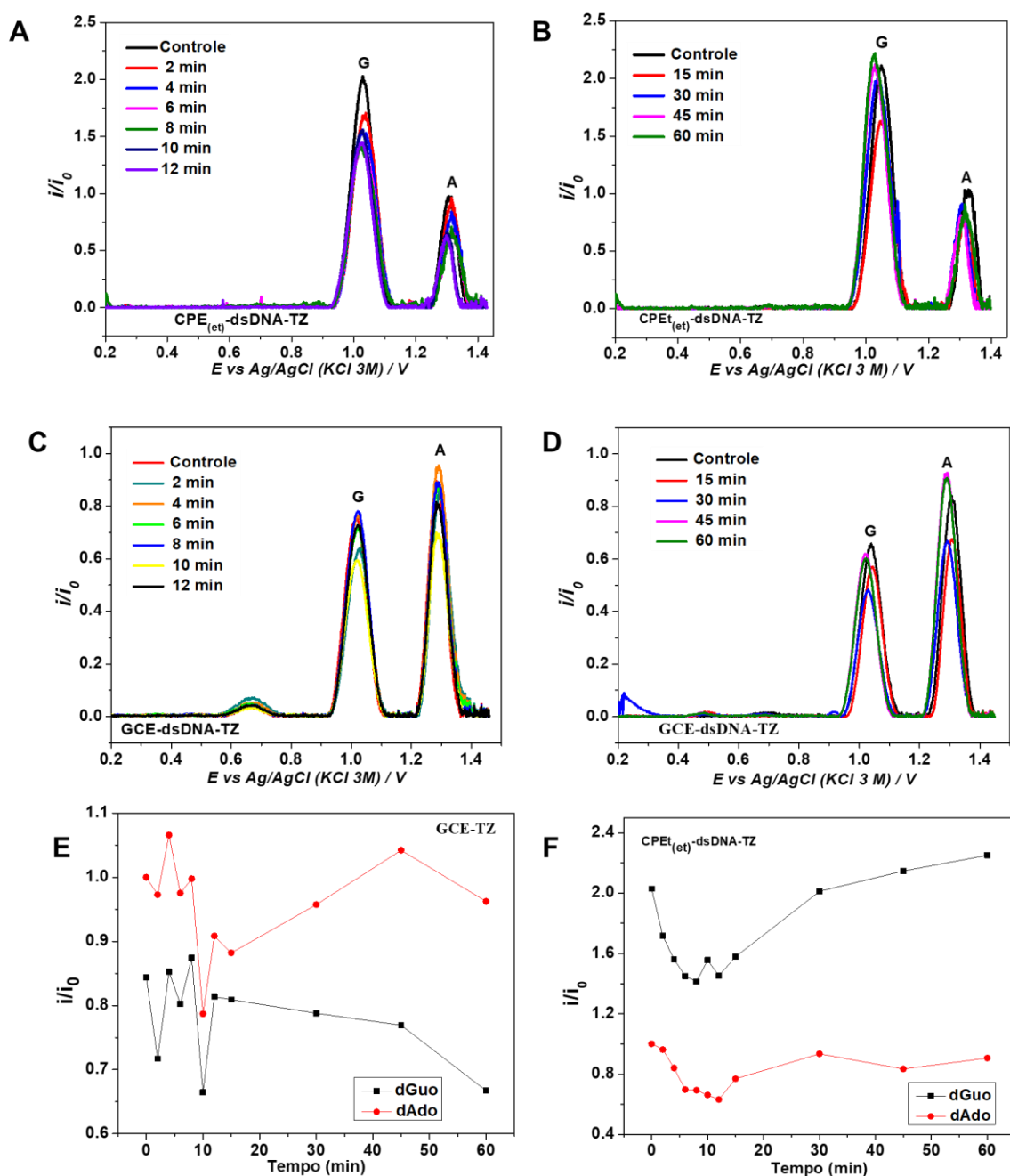
No entanto, o decréscimo das correntes de pico de oxidação de ambos os nucleosídeos na mesma proporção para  $\text{CPE}_{(et)}/\text{ds-DNA}$  evidencia a interação do ds-DNA com a tartrazina, além de um efetivo recobrimento das superfícies eletródicas com o ds-DNA, uma vez que não é observada a oxidação direta da tartrazina ou o aumento das correntes de pico do corante com o tempo. Para o sensor  $\text{GCE}/\text{ds-DNA}$ , também foi observado um decréscimo nos picos de oxidação do dAdo após a interação, no qual apresentou um comportamento mais irregular das intensidades de correntes dos picos de oxidação de ambos os resíduos quando comparados ao  $\text{CPE}_{(et)}/\text{ds-DNA}$ . Tal observação pode ser explicada levando em consideração que o ds-DNA está se rearranjado na superfície do eletrodo, mudando sua conformação sob uma superfície não funcionalizada. A presença dos cátions colina na superfície do  $\text{CPE}_{(et)}/\text{ds-DNA}$  promove uma reorganização mais uniforme da estrutura do ds-DNA. Para o tempo de 45 minutos os valores de corrente tendem a um valor constante indicando provavelmente uma estabilização da estrutura do ds-DNA em ambos os eletrodos.

A diminuição das intensidades de corrente de pico da oxidação dos nucleosídeos na figura 23 A e C, para ambos os eletrodos no intervalo de tempo de 2 a 15 minutos sugere o enovelamento da estrutura do dsDNA, aumentando o grau de agregação e diminuindo a exposição dos resíduos de bases para serem oxidados. Para os tempos de 30, 45 e 60 minutos, na figura 23 B, observa-se um aumento progressivo das intensidades das correntes dos picos de oxidação do resíduo da guanina para o do  $\text{CPE}_{(et)}/\text{ds-DNA}$  e um deslocamento nos potenciais de pico para o sentido mais negativo a partir de 45 minutos de incubação. Já para o  $\text{GCE}/\text{ds-DNA}$ ,



há uma sobreposição mais significativa do pico oxidação da tartrazina ao pico de oxidação da dGuo e ao dAdo para os tempos de 45 e 60 minutos, indicando o aumento da adsorção da TZ na superfície eletródica para oxidação direta. O incremento a partir de 45 minutos observados para os picos de oxidação dos nucleosídeos controlado a partir do pico de oxidação da dAdo pode ser atribuído à expansão da dupla fita de DNA ao interagir com o corante adsorvido na superfície eletródica. Os estudos de interação foram realizados em triplicatas, sendo que o RSD% máximo foi de 12%, apenas para o tempo de 10 minutos, para o restante o RSD% foi menor que 5%.

**Figura 23.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA (A,B) e GCE/ds-DNA (C,D) após incubação em solução contendo em 100 μmol L<sup>-1</sup> de TZ em vários tempos de incubação (2 a 60 minutos). Gráficos da corrente de pico normalizado em função do tempo de interação com o corante em CPE<sub>(et)</sub> (E) e GCE (F).



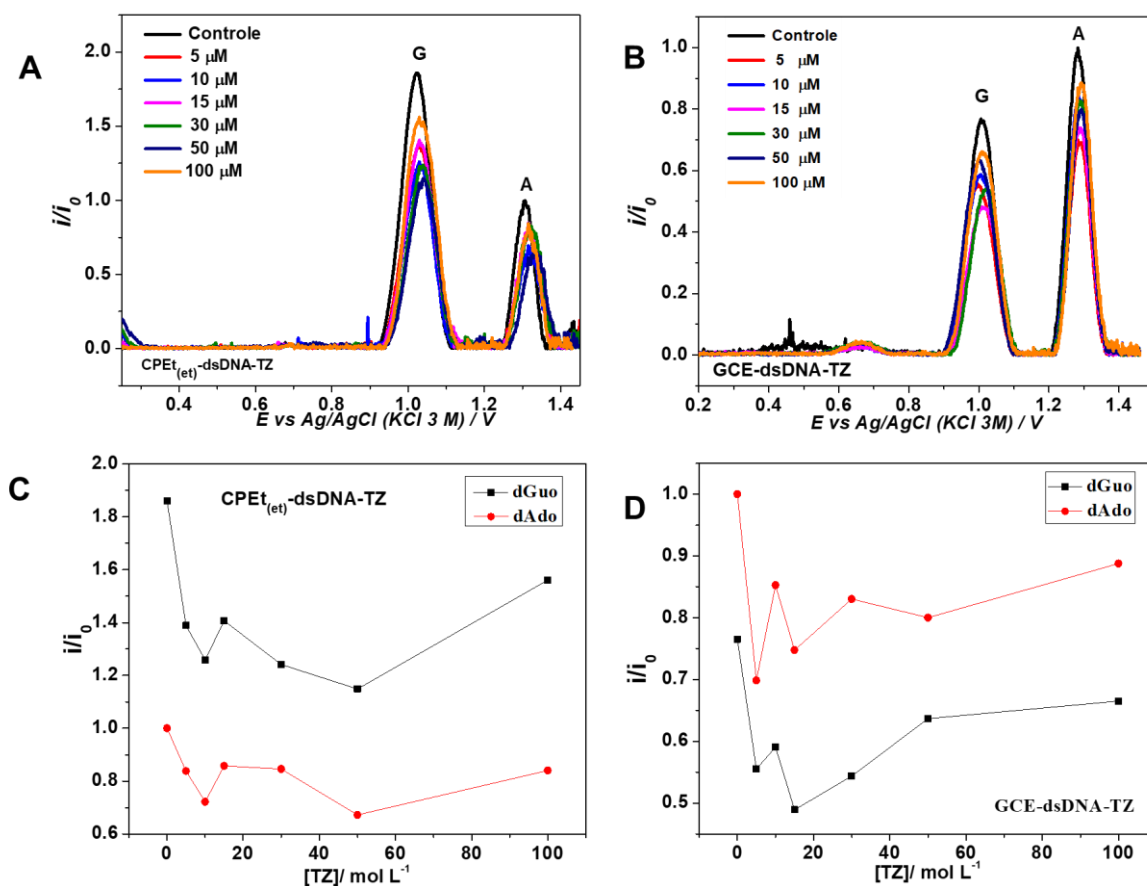
Foi avaliado a interação dsDNA-TZ no intervalo de concentração de 5 a 100 μmol L<sup>-1</sup> de tartrazina. De acordo com os voltamogramas obtidos na figura 24, observa-se que há um decréscimo dos valores das correntes  $I/I_0$  para os picos de

oxidação de dGuo e dAdo e um deslocamento dos potenciais de pico para o sentido positivo em ambos os eletrodos.

Ademais, não se observa um comportamento linear em relação aos valores de corrente dos resíduos de base e a variação de concentração da tartrazina. No intervalo de concentração 5 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de tartrazina para  $\text{CPE}_{\text{(et)}}/\text{ds-DNA}$  observa-se um decréscimo dos valores das correntes em cerca da dGuo  $\geq 39\%$  em relação ao CPE controle e de cerca de  $\geq 33\%$  para a dAdo, após este intervalo observa-se que há um aumento da corrente tendendo a uma estabilidade. No caso,  $\text{GCE}/\text{dsDNA}$ , a faixa de concentração de 5 a 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de tartrazina apresentou decréscimo dos valores das correntes do resíduo de dGuo em cerca  $\geq 37\%$  em relação GCE controle e de cerca de  $\geq 29\%$  para a dAdo, após este intervalo observa-se que há um aumento da corrente tendendo a uma estabilidade.

Além disso, mesmo que haja uma interação entre a TZ e os resíduos de bases de ds-DNA, não se verificou a formação dos picos referentes a danos de clivagem, representados pela liberação de guanina e/ou adenina livre, ou danos oxidativos ao ds-DNA, em decorrência da ausência dos biomarcadores de danos oxidativos de ds-DNA, 8-oxoGua e 2,8 oxoAde.

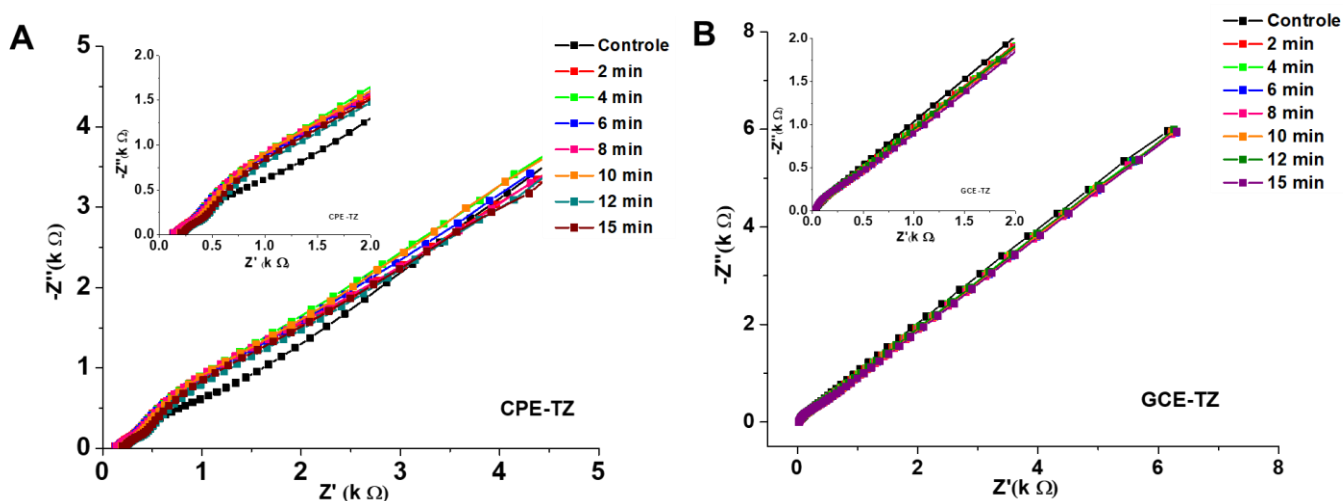
**Figura 24.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA (A) e GCE/ds-DNA (B) após incubação de 4 minutos em solução contendo concentrações no intervalo de 5 a 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de TZ. Gráficos da corrente normalizada dos picos de oxidação de dGuo e dado em função da concentração da TZ com CPE<sub>(et)</sub> (C) e GCE (D).



Outra alternativa interessante para a análise de interação entre biomoléculas e analitos que podem apresentar possível capacidade mutagênica é o emprego de sensores impedimétricos de ds-DNA. Normalmente, após a modificação com o ds-DNA há um aumento da resistência a transferência de carga entre a sonda redox e o eletrodo permitindo o uso da EIS (ERDEM; EKSIN; MARAL, 2023). Com o objetivo de complementar os estudos de interação do ds-DNA com a tartrazina por VDP, propôs-se a avaliação da interação entre ds-DNA e TZ a partir do uso de espectroscopia de impedância eletroquímica. Inicialmente a fim de verificar, se adsorção da tartrazina também interferiria nas medidas, foi realizado um estudo com o CPE<sub>(et)</sub> sem modificação incubado na solução do corante. Na figura 25, observa-se que não houve uma alteração significativa do perfil do diagrama de Nyquist em

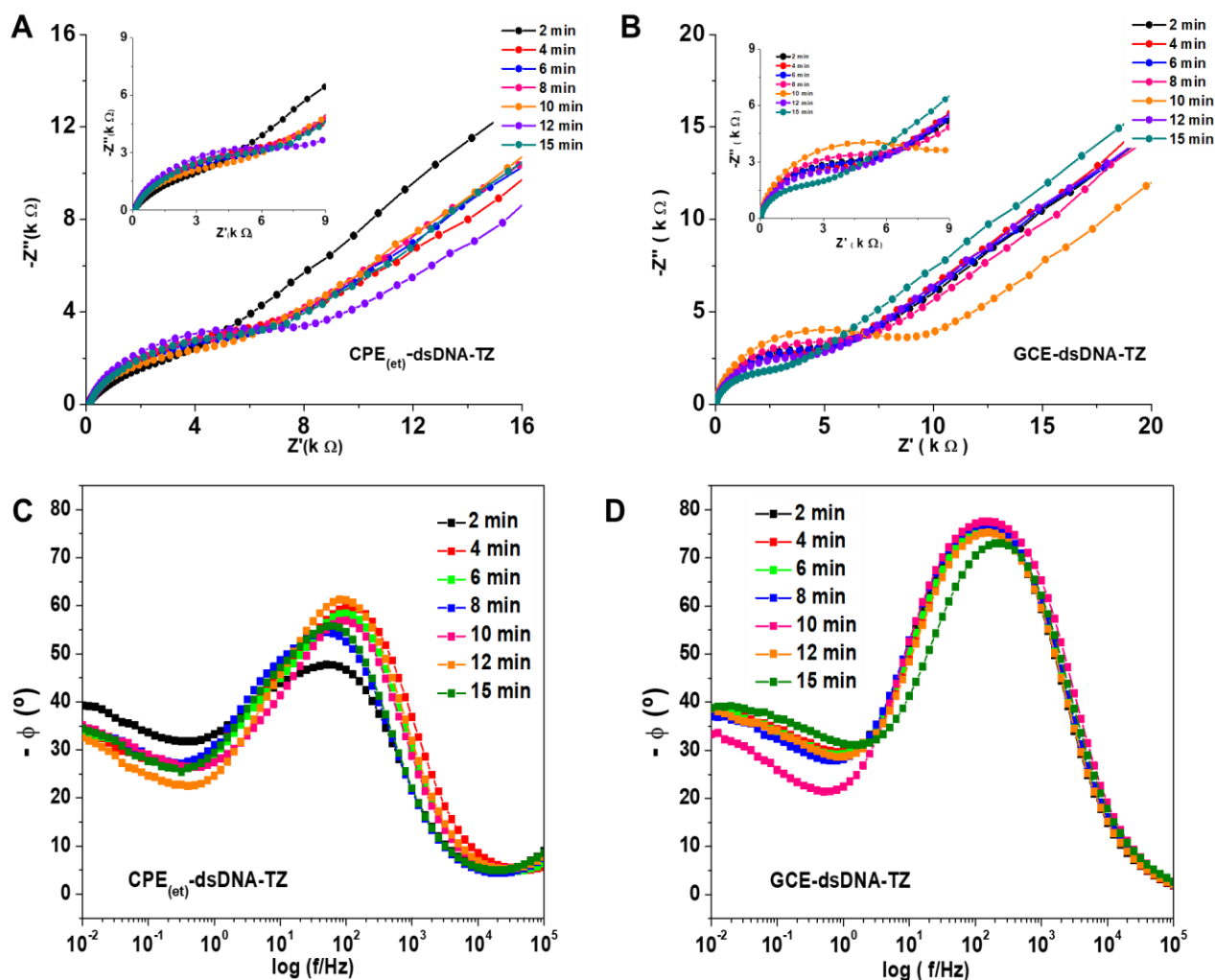
comparação ao controle. Desta forma seguiu-se as análises das interações entre o sensor CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA e a TZ.

**Figura 25.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte com CPE<sub>(et)</sub> (A), GCE (B) após incubação em solução contendo em  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de TZ durante 2 a 15 minutos.  $E_{\text{fixado}} = +0,22 \text{ V}$



Para as medidas impedimétricas, usou-se o mesmo procedimento aos estudos realizados com a VDP, em que a única diferença foi que as leituras foram realizadas em uma solução de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$   $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl, trata-se de uma sonda redox com os parâmetros muito bem estabelecidos na literatura. O intervalo de tempo escolhido para realizar os estudos foi de 2 a 15 minutos, tendo em vista que foi neste intervalo em que as interações entre dsDNA tartrazina foram mais significativas, em que os resultados estão representados na figura 26.

**Figura 26.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte com  $CPE_{(et)}/ds\text{-DNA}$  (A e C),  $GCE/ds\text{-DNA}$  (B e D) após incubação em solução contendo em  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  de tartrazina durante 2 a 15 minutos.



Nas figuras, 26 A e B, observa-se uma variação da resistência à transferência de carga, caracterizada pelo alargamento do semicírculo no diagrama de Nyquist, em relação ao tempo de interação, indicando que de fato existe a formação de um complexo ds-DNA-TZ que é capaz de mudar a conformação do ds-DNA. A possível inserção de moléculas de TZ na estrutura do ds-DNA adsorvido aumenta a barreira de transferência de carga da sonda eletroquímica, aumentando a  $R_{CT}$ . O fato de a TZ possuir grupos sulfonatos desprotonados e carregados negativamente no pH avaliado e somado com a exposição dos grupos fosfatos ocasionaria um aumento de densidade de carga negativa na interface eletrodo-solução, promovendo uma

repulsão eletrostática e aumentando a  $R_{CT}$ . Na tabela 3 os valores de  $R_{CT}$  corrigidos em função do controle estão representados, apresentando uma resposta não-linear em relação ao intervalo de tempo, semelhante ao observado por técnicas voltamétricas indicando mudança conformacional da estrutura dsDNA após a interação com a tartrazina. A relativização proposta dos valores de  $R_{CT}$ , possibilita a visualização mais precisa de suas variações, podendo ser comparada diretamente à relativização apresentada para as correntes de pico dos resíduos das bases do dsDNA obtidos da VDP. Nas figuras 26, C e D os máximos dos ângulos de fase, principalmente no  $CPE_{(et)}/ds-DNA$  aumentam com tempo, reflexo do aumento das  $R_{CT}$ .

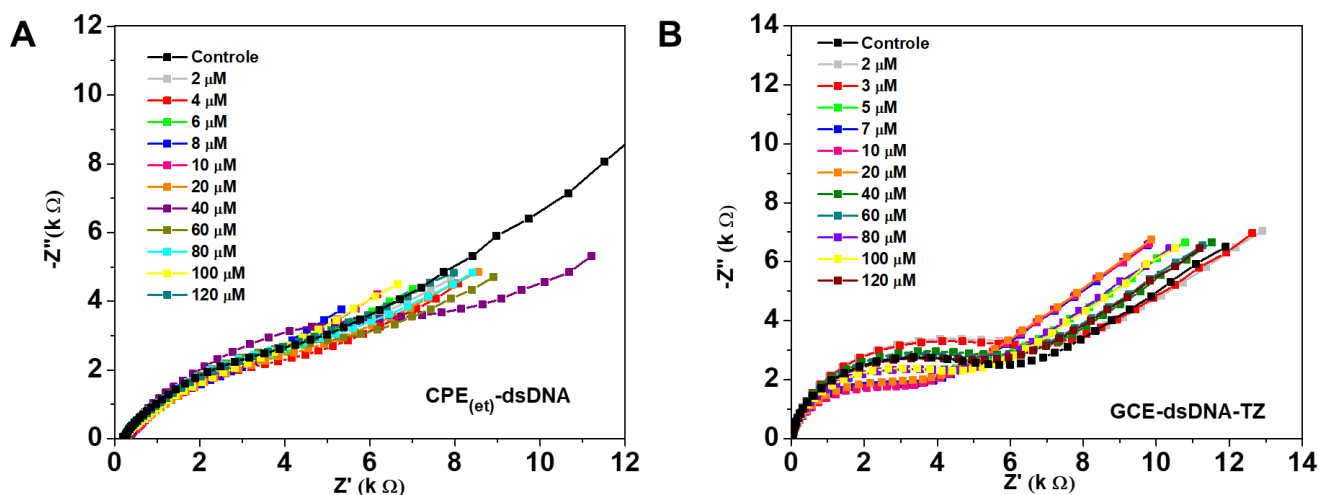
Tabela 3 - Valores de  $R_{CT}$  normalizados em relação ao controle

CPE <sub>(et)</sub> /ds-DNA		GCE/ds-DNA	
Tempo (min)	(R <sub>1</sub> -R <sub>0</sub> /R <sub>0</sub> )	Tempo (min)	(R <sub>1</sub> -R <sub>0</sub> /R <sub>0</sub> )
2	0,188	2	0,826
4	0,877	4	0,215
6	0,290	6	-0,107
8	0,013	8	0,055
10	0,246	10	0,041
12	0,606	12	-0,139
15	0,333	15	0,379

Fonte: Autora, 2023.

Após o estudo das interações no intervalo de 2 a 15 minutos, foi escolhido o tempo 4 minutos em que se observa maior  $R_{CT}$  referente ao  $CPE_{(et)}/ds-DNA$  para prosseguir os estudos das interações. A concentração de TZ foi variada no intervalo de 2 a 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$  os diagramas de Nyquist correspondentes estão representados na figura 27 e o gráfico com os valores da  $R_{CT}$  em função da concentração estão presentes na figura 28.

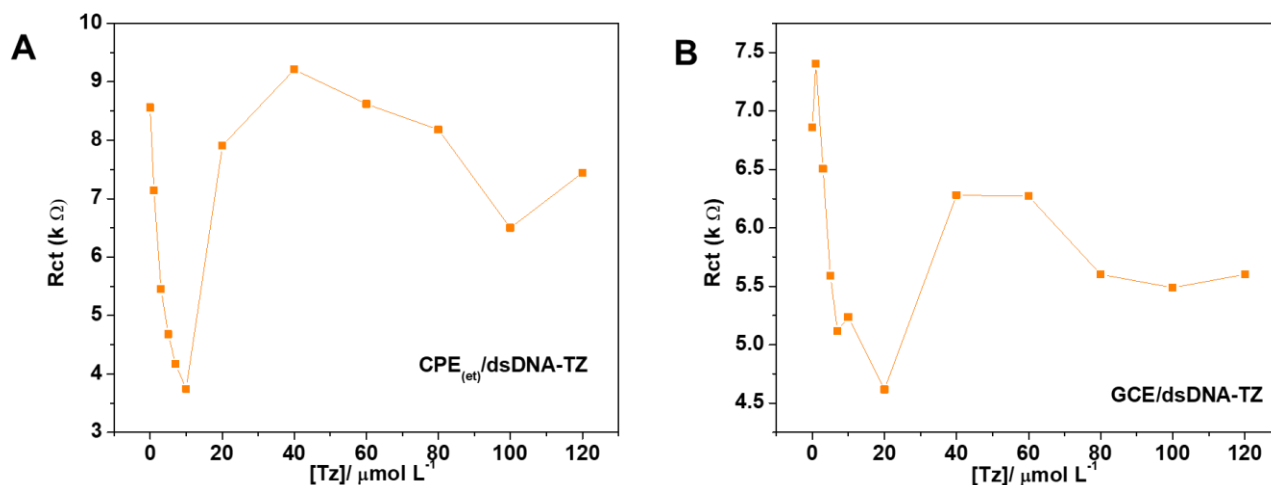
**Figura 27.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte com  $CPE_{(et)}/ds\text{-DNA}$  (A), GCE/ $ds\text{-DNA}$  (B) após incubação de 12 minutos em solução contendo concentrações no intervalo de 2 a  $120 \mu\text{mol L}^{-1}$  de tartrazina.



Na figura 27 e 28 observa-se uma variação da  $R_{CT}$  em função da concentração da tartrazina que no intervalo de concentração de 2 a  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  há um decréscimo significativo da  $R_{CT}$ . Este comportamento é semelhante ao observado na VDP no qual observa-se a diminuição das correntes de pico de oxidação de ambos os nucleosídeos representado na figura 24 em função da concentração de tartrazina na faixa de 0 a  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Isto indica uma interação direta dos corantes com as bases purínicas adenina e guanina, diminuindo a sua disponibilidade para ser oxidada, ao mesmo tempo que alonga a estrutura do DNA diminuindo a resistência à transferência de carga da sonda eletroquímica. Para o intervalo de concentração de 40 a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $R_{CT}$  aumenta e tende a uma estabilidade, provavelmente ocorre a saturação da interação do  $ds\text{DNA}$ - tartrazina, este intervalo é muito próximo daquele observado na VDP. Para a faixa de concentração de 50 a  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$  na VDP as intensidades de corrente dos picos de oxidação dGuo e dAdo também atingem um platô indicando essa saturação do complexo  $ds\text{DNA}$ -TZ. Isso indica que para concentrações mais altas, a reorganização da cadeia do DNA em uma estrutura mais condensada aumenta a  $R_{CT}$  em função do aumento do número de moléculas intercaladas. O tipo de interação e o estabelecimento de uma compreensão mais abrangente das interações entre molécula alvo e o  $ds\text{-DNA}$  só foi possível a partir da combinação de análise interfacial entre voltametria e impedância eletroquímica.

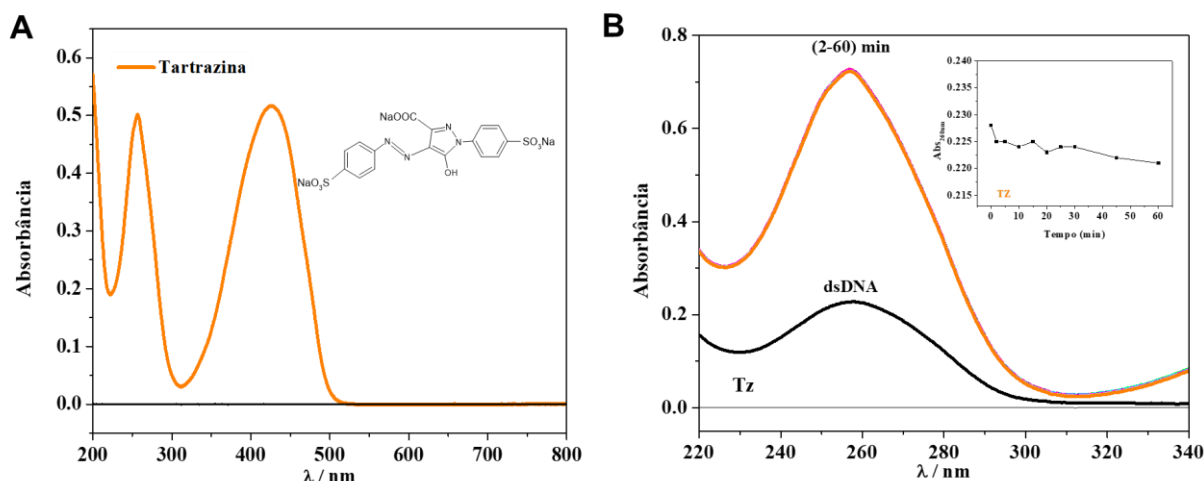


**Figura 28.** Gráfico de  $R_{CT}$  em função da concentração de TZ expressa em micromolar com  $CPE_{(et)}/ds\text{-DNA}$  (A) e  $GCE/ds\text{-DNA}$  (B).



Com o objetivo de complementar os estudos realizados na investigação da interação do ds-DNA com a tartrazina, um estudo adicional foi proposto utilizando a espectrofotometria UV-Vis. Inicialmente, foi avaliado o espectro de absorção UV-Vis da TZ para determinar o comprimento de onda máximo de absorção. Na figura 29A, o corante TZ apresentou duas bandas de absorção de alta intensidade, a primeira em aproximadamente  $\lambda = 259$  nm que pode estar relacionada com transições eletrônicas dos sistemas conjugados dos anéis aromáticos e a segunda banda de absorção em  $\lambda = 430$  nm que corresponde as transições eletrônicas características do grupo azo. Para avaliar as interações com o ds-DNA e o analito, avalia-se possíveis efeitos no deslocamento e valor de absorbância no comprimento de onda de máximo de absorção (batocrômico, hipsocrômico, hipercrômico e hipocrômico), levando em consideração que a solução de dsDNA apresenta uma banda de absorção em  $\lambda = 260$  nm.

**Figura 29.** Espectros UV-Vis obtidos em: solução de Tartrazina de  $25 \mu\text{mol L}^{-1}$  (A) e da solução de dsDNA  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0 antes e após interação com a Tartrazina no intervalo de 2 a 60 minutos (B) e variação da absorbância do dsDNA em 260 nm versus o tempo de interação do corante (B-inset).



Na figura 29B os espectros foram obtidos utilizando uma solução de dsDNA controle (sem a mistura com o corante) e a mistura da solução de dsDNA e tartrazina no intervalo de tempo de 2 a 60 minutos. Contudo, a tartrazina apresenta uma banda absorção na mesma região que o dsDNA, sendo assim foi realizado um procedimento matemático segundo Uliana, Garbellinie, Yamanaka (2012) que consiste na subtração do espectro do corante daquele obtido para corante + ds-DNA. Observa-se no gráfico inset na figura 29B que a variação da absorbância do DNA em 260 nm foi menor que 5% pouco significativa, em que não se pode afirmar uma interação com o dsDNA neste intervalo de tempo utilizando este método. Provavelmente em menores concentrações de tartrazina e utilizando outros modelos matemáticos para a distinção das bandas de absorção de cada componente pode ser possível a avaliação de interação de dsDNA por meio deste método, já pelos métodos eletroquímicos foi possível visualizar as interações dsDNA-TZ.

De acordo com Barbosa (2002) por meio da técnica de espectroscopia de absorção no UV-Visível, foi identificado que a TZ pode formar compostos de intercalação com ds-DNA, confirmando que este corante interage com o dsDNA. Além disso, este trabalho propôs que a molécula da tartrazina pode entrar ou se inserir nos

enovelamentos do DNA e intercalar entre as suas bases nitrogenadas devido sua estrutura ser planar e apresentar anéis aromáticos .

Além disso, um estudo recente realizado por Escobar et al. (2023), usando modelagem computacional em multiescala acoplada com outras técnicas também observou a formação de complexos ds-DNA-TZ, mas neste caso o mecanismo proposto foi uma interação por meio de uma ligação da tartrazina com o sulco menor do dsDNA. Segundo Rehman et al. (2015) as interações não covalentes de pequenas moléculas com dsDNA, aquelas que são reversíveis, são classificadas em interações eletrostáticas, por intercalação e/ou via sulcos do dsDNA, normalmente pode ocorrer mais de um tipo de interação da molécula estudada com o dsDNA. Os resultados obtidos para ambos os eletrodos corroboram a proposição de uma formação de um complexo ds-DNA-TZ, por possível intercalação, normalmente a inserção de um intercalador entre os pares de bases nitrogenadas adjacentes resulta em mudanças na estrutura do dsDNA causando alongamento, rigidez e/ou desnovelamento da dupla hélice do DNA (RESCIFINA et al. ,2014).

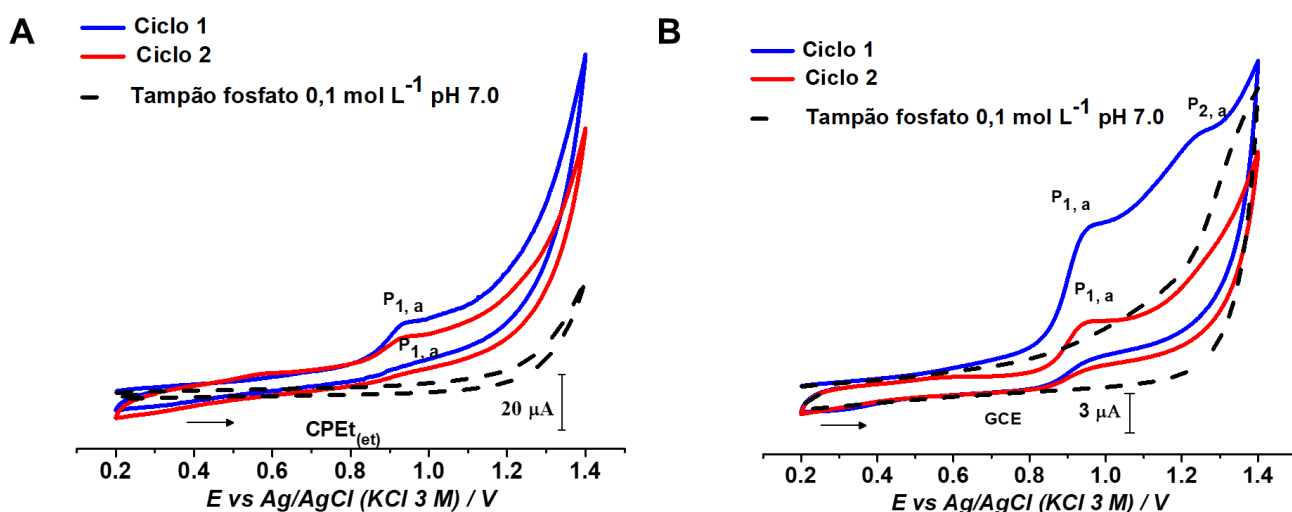
Para o estudo realizado neste trabalho de interação ds-DNA/TZ via sensores eletroquímicos utilizando a VDP e a EIS foi possível observar a interação e formação de um complexo ds-DNA-TZ em consonância com os estudos dos autores: Barbosa (2002) e Escobar et al. (2023), indicando a possibilidade de um mecanismo de interação ds-DNA/TZ por intercalação. Ademais, destaca-se que o CPET<sub>(et)</sub> apresentou capacidade de impedir a adsorção da tartrazina, evitando a interferência da oxidação direta da tartrazina sobre a superfície eletródica, indicando uma cobertura mais homogênea da superfície eletródica pelo material genético.

#### **4.6 Estudo de interação *in vitro* azul brilhante-CPET<sub>(et)</sub>/dsDNA**

Voltamogramas cíclicos foram obtidos com CPET<sub>(et)</sub> e GCE em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 para avaliar o comportamento eletroquímico do corante azul brilhante, figuras 30A e B. Com os resultados obtidos na figura 30A, observou-se um único pico anódico irreversível com o CPET<sub>(et)</sub> em  $E_{p,a1} = + 0,95$  V, associado à oxidação direta do corante. Não obstante, a oxidação do AB em GCE se apresenta em duas etapas, com o aparecimento de dois picos anódicos irreversíveis em  $E_{p,a1} = +1,01$  V e  $E_{p,a2} = +1,22$  V. Além disso, observou-se um decréscimo do pico  $E_{p,a1}$

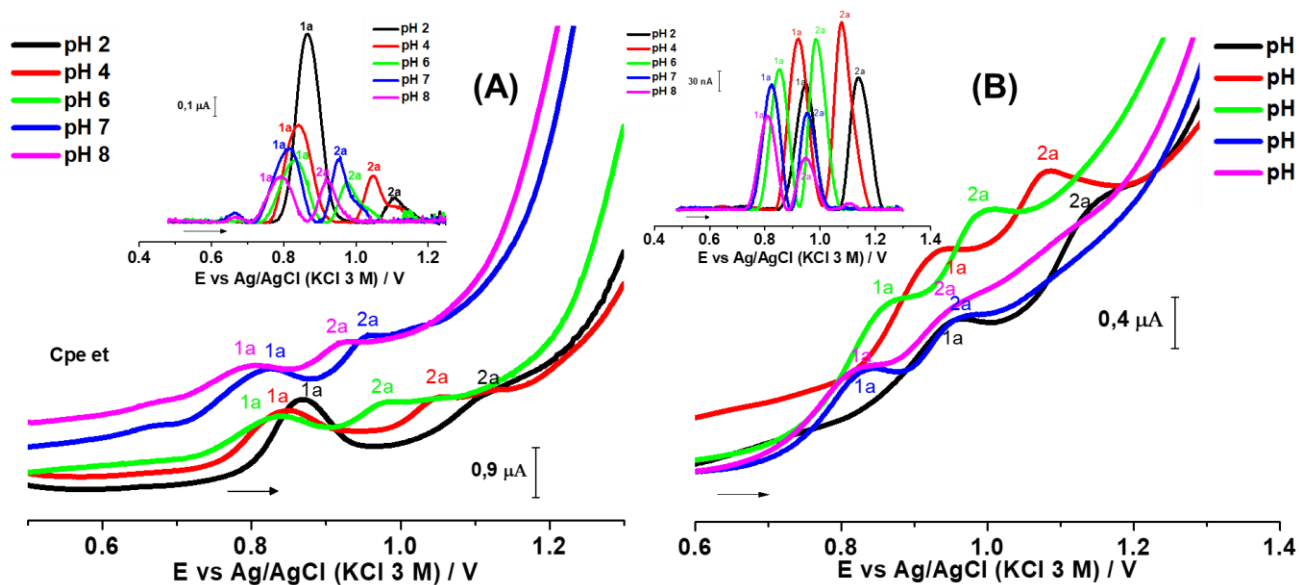
relacionado a uma possível adsorção de subprodutos na superfície do eletrodo após sucessivas varreduras.

**Figura 30.** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 contendo 100 μmol L<sup>-1</sup> de azul com CPE<sub>(et)</sub> (A) e GCE (B). Parâmetros experimentais: velocidade de varredura 50 mV s<sup>-1</sup>, E<sub>i</sub> = E<sub>f</sub> = +0,2V e E<sub>λ</sub> = +1,4 V.



A influência do pH na oxidação do AB no GCE e CPE<sub>(et)</sub> no intervalo de pH de 2 a 8 por voltametria de pulso diferencial foi avaliada. Para o GCE foi observado dois picos anódicos semelhante com a literatura, Sierra et al. (2019). Os voltamogramas de pulso diferencial da figura 31 foram obtidos em soluções contendo 10 μmol L<sup>-1</sup> de azul brilhante. Observa-se que o AB também apresenta processos de oxidação em potenciais semelhantes aos observados para a oxidação dos nucleosídeos dGuo e dAdo em tampão ácido acético/acetato, pH 4,5.

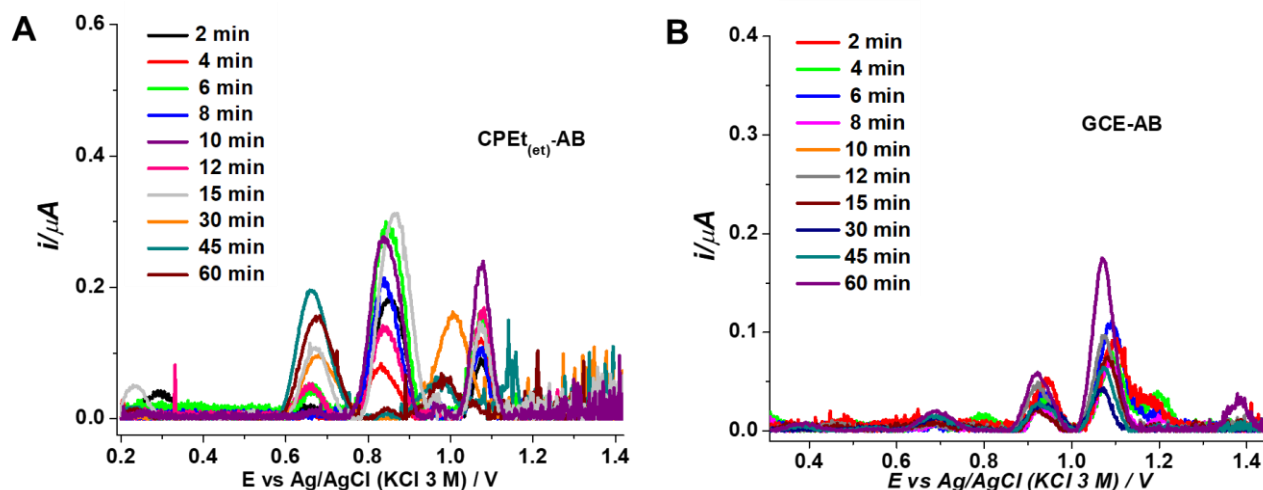
**Figura 31.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com GCE para 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AB para diferentes valores de pH (A) e voltamograma de pulso diferencial com a linha base corrigida(inset); Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com  $\text{CPE}_{(\text{et})}$  para 10,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AB para diferentes valores de pH (B) e voltamograma de pulso diferencial com a linha base corrigida (inset).



A fim de se compreender melhor à interação do corante com a superfície de  $\text{CPE}_{(\text{et})}$ , e GCE, os voltamogramas de pulso diferencial obtidos com  $\text{CPE}_{(\text{et})}$  e GCE, após incubação com o corante, foram comparados ao longo do tempo, figura 32, o que permitiu a observação de aparecimento de quatro picos de oxidação, próximos a oxidação da dGuo. Por isso, observa-se a importância do recobrimento completo de dsDNA na superfície do eletrodo para verificar a possibilidade de distinguir os processos observados.

O  $\text{CPE}_{(\text{et})}/\text{ds-DNA}$  foi utilizado para investigar a interação ds-DNA-AB em diferentes tempos de incubação. Para o monitoramento da interação do azul brilhante e o ds-DNA o sensor foi incubado em 2 a 60 minutos em solução de AB 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em pH 7,0. As mudanças das intensidades de correntes referentes aos picos de oxidação dos resíduos de base da guanina e adenina de dsDNA foram comparadas com eletrodo controle de ds-DNA nas mesmas condições, na ausência do analito, para analisar possíveis alterações nas propriedades eletroquímicas do dsDNA por meio da interação ds-DNA-AB.

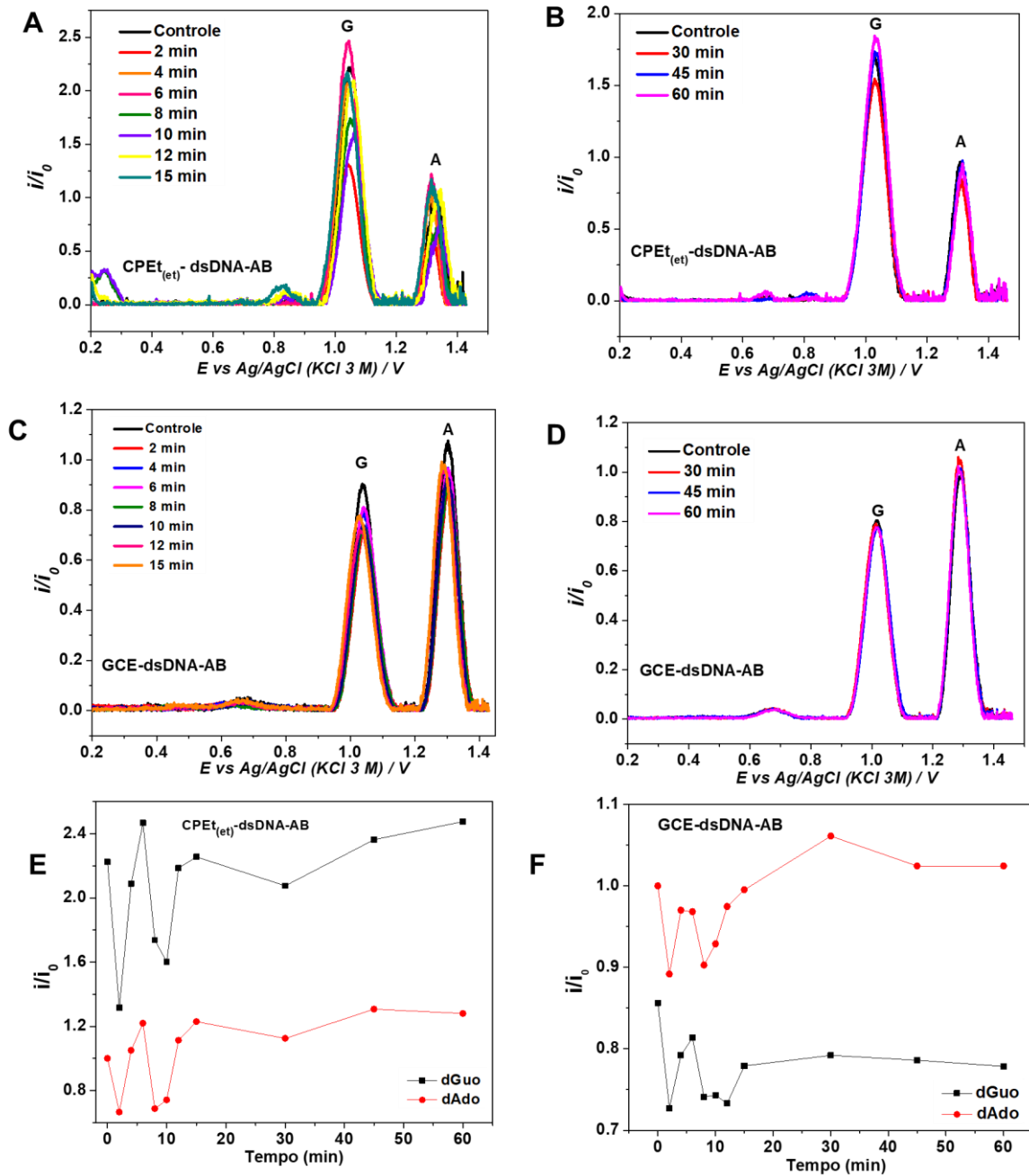
**Figura 32.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com CPET<sub>(et)</sub> (A) e GCE (B) após incubação em solução contendo 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de Azul Brilhante no intervalo de 2 a 60 minutos.



Para cada tempo de incubação, um novo eletrodo foi modificado e incubado na solução de AB  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com subsequente lavagem com água deionizada para garantir que as moléculas do analito que não interagiram com o ds-DNA fossem eliminadas, o eletrodo foi lavado com água deionizada e depois foi realizada a medida eletroquímica em solução tampão ácido acético/acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,5. As intensidades de corrente referentes aos picos de oxidação dos resíduos de base do dsDNA foram representadas pela relação  $I/I_0$ , em que  $I$  é a corrente referente à oxidação dos resíduos de base do dsDNA e  $I_0$  é a corrente referente a oxidação da dAdo referente ao controle, funcionando como o padrão interno, antes das interações.

Ambos, GCE/ds-DNA e CPET<sub>(et)</sub>/ds-DNA, apresentaram uma redução significativa das intensidades dos picos de oxidação de dAdo e dGuo já com 2 minutos de incubação, mostrando um processo de interação muito rápido entre AB e o ds-DNA, figura 33. Apesar dessa interação inicial similar entre os eletrodos, o GCE/dsDNA apresenta pouca mudança nos valores de correntes de pico observados para dGuo e dAdo nos tempos de 4,6,8 e 10 min. Após 12 min de interação, há a estabilização da intensidade de corrente referente ao pico de oxidação dAdo.

**Figura 33.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com  $CPE_{(et)}/ds\text{-DNA}$  (A,B) e  $GCE/ds\text{-DNA}$  (C,D) após incubação em solução contendo em  $100\ \mu\text{mol L}^{-1}$  de AB durante 2 a 60 minutos. Gráficos da corrente de pico normalizado em função do tempo de interação com o corante em  $CPE_{(et)}$  (E) e GCE (F).



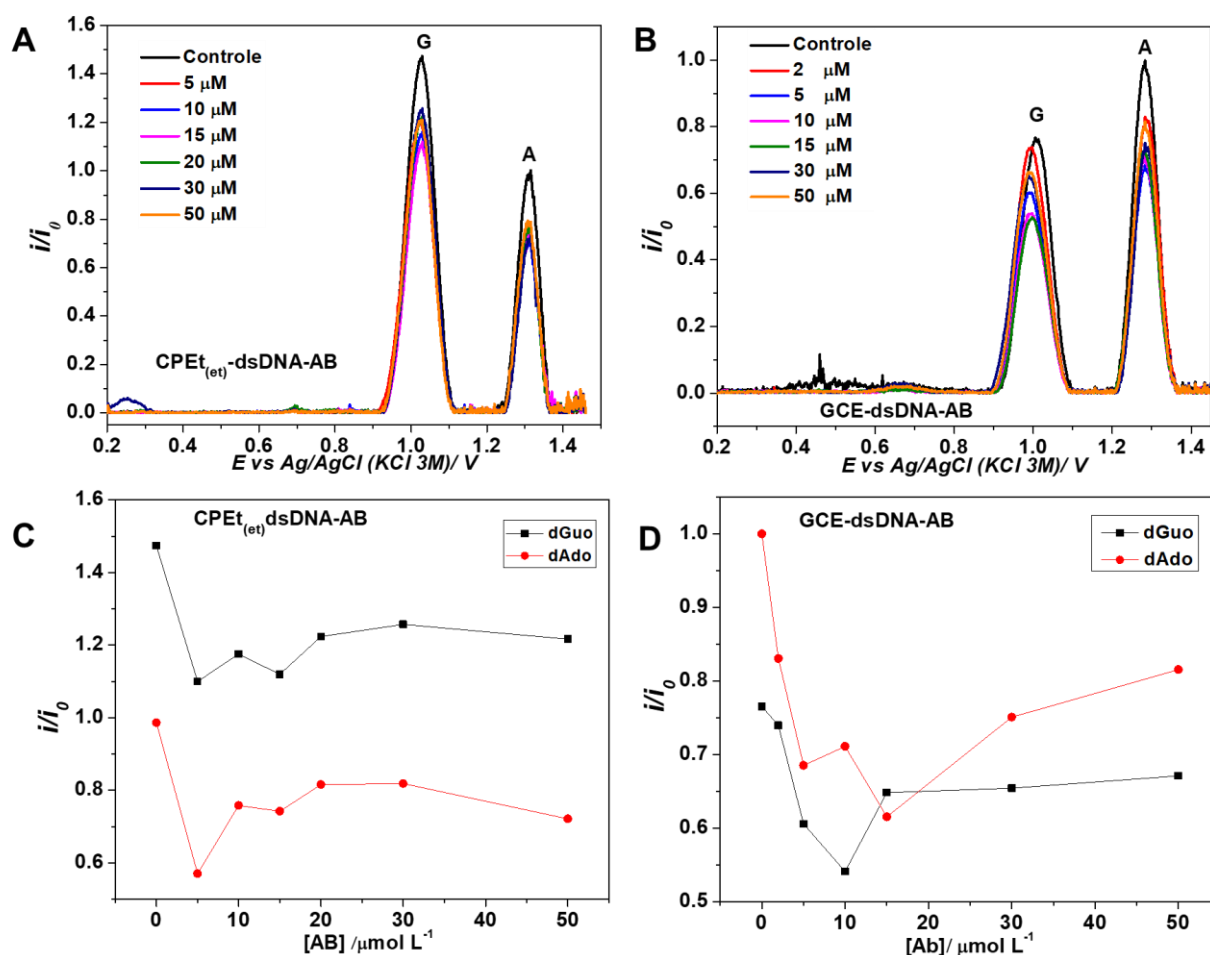
Em 6, 12 e 15 min, observa-se o aparecimento de um terceiro pico em  $E_{p,a} = + 0,8 \text{ V}$ , correspondente ao corante após incubação, uma vez que esse mesmo pico também aparece no CPET<sub>(et)</sub> incubado no corante. Sugere-se então que este pico pode estar associado à adsorção ou degradação do corante sobre a superfície do CPE<sub>(et)</sub>, uma vez que não há correspondência do mesmo para o GCE. Este subproduto formado pode ser que influencie no comportamento eletroquímico do ds-DNA, que quando há seu aparecimento na superfície do eletrodo, o ds-DNA apresenta uma conformação menos enovelada apresentando um aumento nos valores de corrente para os picos de oxidação dos resíduos de base.

Para os tempos de 30,45 e 60 minutos não foi observado alteração significativa das intensidades de corrente dos resíduos de base em relação ao eletrodo controle (sem interação com o corante) para os dois sensores. Os estudos de interação foram realizados em triplicatas, sendo que o RSD% máximo foi de 13%, apenas para o tempo de 12 minutos, para o restante o RSD% foi menor que 6%.

O tempo de 2 minutos foi escolhido para avaliar a variação da concentração dos corantes no intervalo em relação a resposta voltamétrica dos sensores modificados com ds-DNA de 2 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do AB. De acordo com os voltamogramas obtidos na figura 34, observa-se que há um decréscimo dos valores das correntes para os picos de oxidação de dGuo e dAdo em ambos os eletrodos. Ademais, não se observa um comportamento linear em relação aos valores de corrente dos resíduos de base e a variação de concentração do azul brilhante. No intervalo de concentração 5 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AB para CPET<sub>(et)</sub>/ds-DNA observa-se um decréscimo dos valores das correntes em cerca da dGuo  $\geq 15\%$  em relação ao CPET<sub>(et)</sub>/ds-DNA controle e de cerca de  $\geq 25\%$  para a dAdo, os valores de correntes neste intervalo são muito próximos entre si indicando que neste intervalo tende a uma estabilidade da estrutura do ds-DNA, provavelmente a saturação da interação. No caso, GCE/dsDNA, a faixa de concentração de 2,0 a 15  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AB apresentou decréscimo dos valores das correntes em cerca da dGuo  $\geq 30\%$  em relação ao CPE controle e de cerca de  $\geq 30\%$  para a dAdo, após este intervalo observa-se que há um aumento da corrente tendendo a uma estabilidade.



**Figura 34.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com a)  $CPE_{(et)}$  e b) GCE após incubação de 2 minutos em solução contendo concentrações no intervalo de 5 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AB. Gráficos da corrente normalizada dos picos de oxidação de dGuo e dado em função da concentração de AB com c)  $CPE_{(et)}$  e d) GCE.

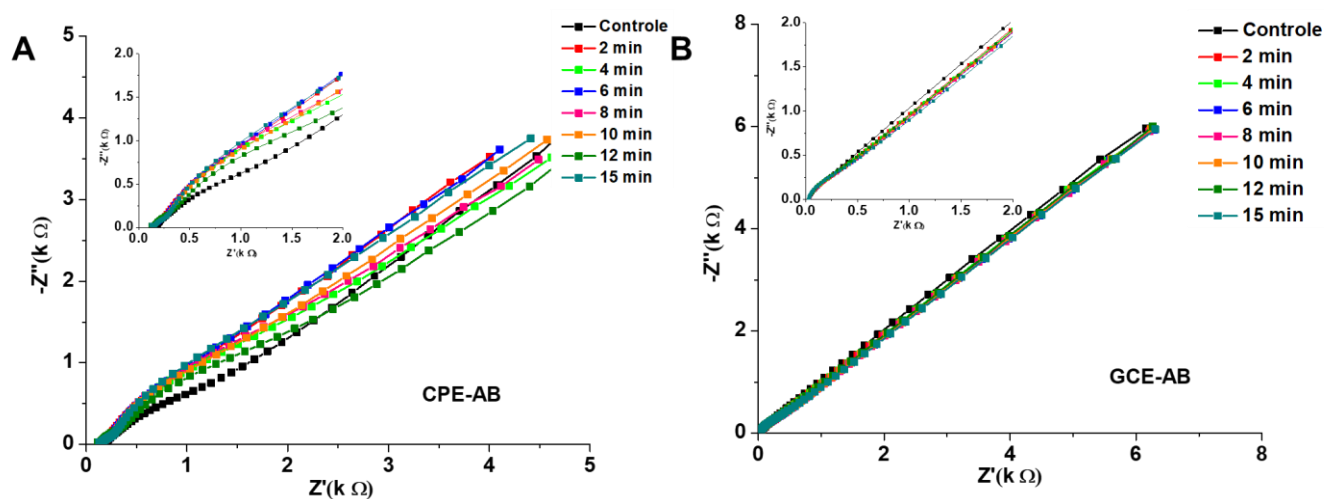


No que tange a interação dsDNA-AB, não se verificou a formação de picos referentes a danos de clivagem ou oxidativos, representados pela liberação de Gua e/ou Ade livre, e 8-oxoguanina 2-8 oxoadenina, respectivamente. Entretanto, é possível sugerir o enovelamento da estrutura, em virtude da diminuição dos picos de ambos os nucleosídeos.

Com o objetivo de complementar os estudos de interação do dsDNA com o AB por VDP, foi realizado a avaliação da interação dsDNA-AB utilizando-se de EIS. Inicialmente a fim de verificar, se uma possível adsorção de azul brilhante na superfície do eletrodo também interferiria nas medidas, foi realizado um estudo com ambos  $CPE_{(et)}$  e GCE não modificados incubados em soluções de corante, com posterior

avaliação em solução de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (sonda eletroquímica) em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte. Na figura 35, observa-se que não houve uma alteração significativa do perfil do diagrama de Nyquist em comparação ao controle. Desta forma seguiu-se as análises das interações entre o sensor  $\text{CPE}_{(\text{et})}/\text{dsDNA}$  e AB.

**Figura 35.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte com  $\text{CPE}_{(\text{et})}$  (A), GCE (B) após incubação em solução contendo em  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AB durante 2 a 15 minutos.  $E_{\text{fixado}} = +0,22 \text{ V}$



Para análises impedimétricas usou-se o mesmo procedimento aos estudos realizados com a VDP, em que a única diferença foi que as leituras foram realizadas em uma solução de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl. O intervalo de tempo escolhido para realizar os estudos foi de 2 a 15 minutos tendo em vista que foi neste intervalo em que as interações entre dsDNA-AB foram mais significativas, em que os resultados estão representados na figura 36A-B. Os diagramas de Nyquist para ambos os eletrodos evidenciam a formação de um complexo dsDNA-AB, devido ao alargamento do semicírculo com o aumento de tempo indicando que após a intercalação das moléculas de AB no dsDNA, há uma possível obstrução da superfície do eletrodo dificultando à transferência de carga e conseqüentemente variando os valores de  $R_{\text{CT}}$  que estão representados na tabela 4. Ainda que os valores de  $R_{\text{CT}}$  não tenham apresentado tendências em função do tempo, este comportamento foi similar em relação as variações de intensidade de corrente dos picos de oxidação da dAdo e

dGuo observados na VDP. A relativização proposta dos valores de  $R_{ct}$ , possibilita a visualização mais precisa de suas variações, podendo ser comparada diretamente à relativização apresentada para as correntes de pico dos resíduos das bases do dsDNA obtidos da VDP.

Tabela 4 - Valores de  $R_{CT}$  normalizados em relação ao controle

CPE <sub>(et)</sub> /ds-DNA		GCE/ds-DNA	
Tempo (min)	(R <sub>1</sub> -R <sub>0</sub> /R <sub>0</sub> )	Tempo (min)	(R <sub>1</sub> -R <sub>0</sub> /R <sub>0</sub> )
2	0,189	2	0,730
4	0,367	4	0,215
6	0,177	6	0,107
8	-0,077	8	0,055
10	0,304	10	0,041
12	0,212	12	-0,161
15	0,208	15	-0,379

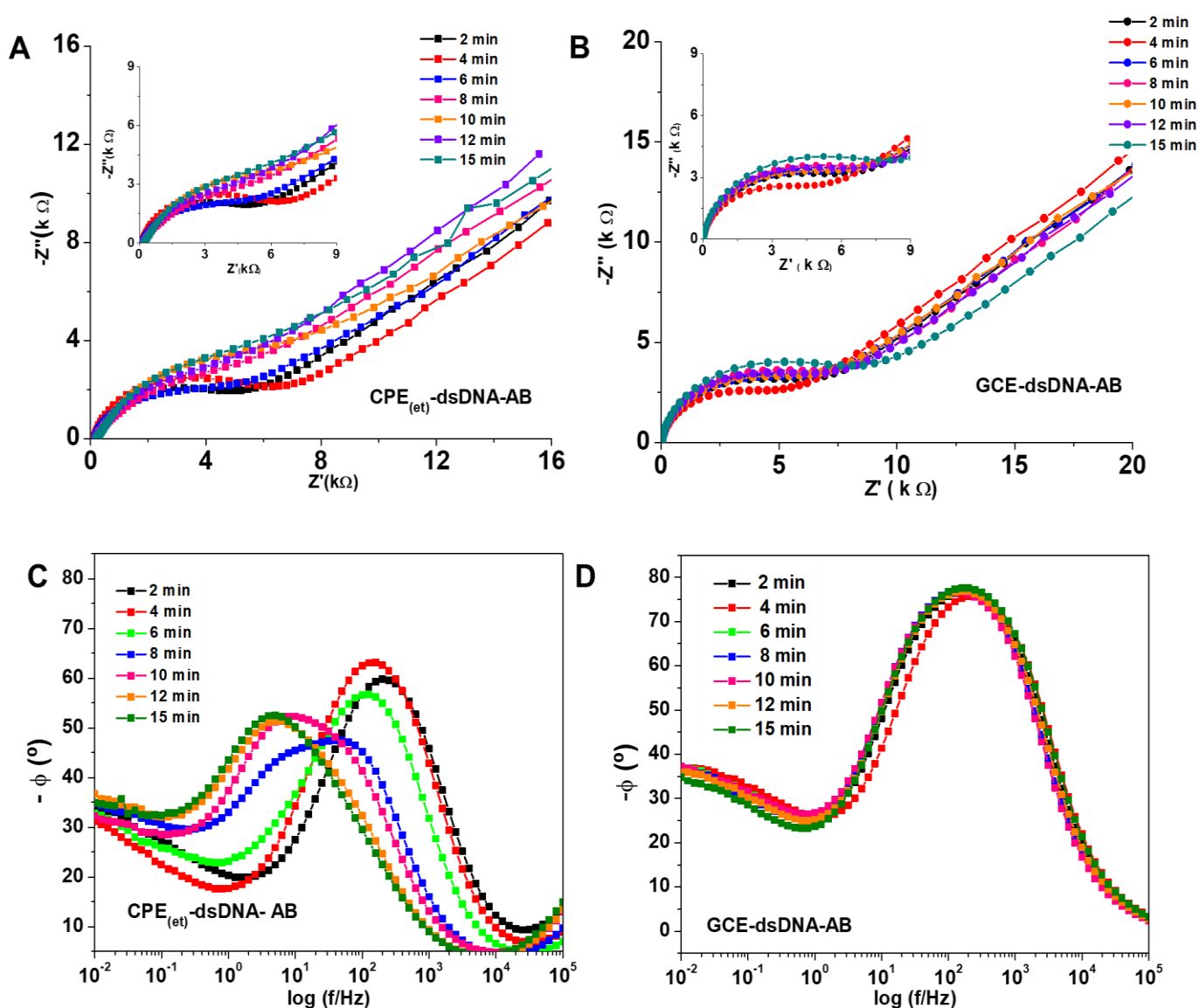
Fonte: Autora, 2023

Ainda, a figura 36C apresenta um deslocamento, para menores valores de frequência, da frequência específica ( $f_0$ ) de carregamento da interface-eletrodo com aumento do tempo de incubação para o CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA, indicando que as interações estabelecidas entre o AB e o ds-DNA aumentam o tempo de carregamento da dupla camada elétrica, em função de um aumento de capacitância. O deslocamento da frequência específica à 45° ( $f_0$ ) observada com o aumento do tempo pode ser consequência de uma interface eletrodo solução com maior capacitância, decorrente da intercalação de moléculas carregadas de corante na estrutura do ds-DNA .

No caso do AB, o mesmo apresenta cargas tanto positivas quanto negativas em sua estrutura química o que amplia a capacidade de carregamento da superfície e aumenta a constante de tempo de célula ( $\tau_0$ ), característica do carregamento da interface eletrodo-solução, conforme há o aumento do tempo de incubação, evidente para um estrutura menos enovelada do ds-DNA sobre o CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA. O mecanismo de interação dsDNA-AB por intercalação observado sugere que inicialmente ocorra o desnovelamento da estrutura do dsDNA para minimizar a energia de repulsão dos grupos carregados presentes na molécula do azul brilhante entre os

grupos fosfatos carregados negativamente no dsDNA, desta forma o arcabouço açúcar - fosfato seria exposto para a superfície do eletrodo aumentando a densidade de carga negativa, isto explicaria também o aumento de  $R_{CT}$

**Figura 36.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte com  $CPE_{(et)}/ds\text{-DNA}$  (A e C) e  $GCE/ds\text{-DNA}$  (B e D) após incubação em solução contendo em  $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  de AB durante 2 a 15 minutos.  $E_{fixado} = +0,22 \text{ V}$



Na tabela 5, para o GCE/ds-DNA observa-se que os valores de  $\tau_0$  praticamente não se alteram, indicando que o efeito das interações não afeta significativamente o carregamento da dupla camada elétrica. Já para o CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA a oscilação dos valores de  $\tau_0$  em função do tempo no intervalo de 2 a 6 minutos sugere que o dsDNA se reorganiza se enovelando e desenovelando na superfície do eletrodo para minimizar a energia de repulsão eletrostática entre os grupos carregados negativamente de AB e os grupos fosfatos carregados negativamente de dsDNA, isto explicaria a oscilação dos valores de  $R_{CT}$  e também a oscilação dos valores de intensidade de corrente dos picos de oxidação dos resíduos de bases do ds-DNA no mesmo intervalo de tempo. Esse comportamento é observado até 6 minutos, a partir de 8 minutos  $\tau_0$  aumenta linearmente de forma significativa em relação ao tempo, indicando que neste tempo o dsDNA pode ter desenovelado completamente e iniciado a intercalação das moléculas de AB carregadas negativamente, aumentando a capacitância do sistema e consequentemente o  $\tau_0$ .

Tabela 5 - Tempos de incubação, frequências e ( $\tau_0$ ) para interação ds-DNA-AB

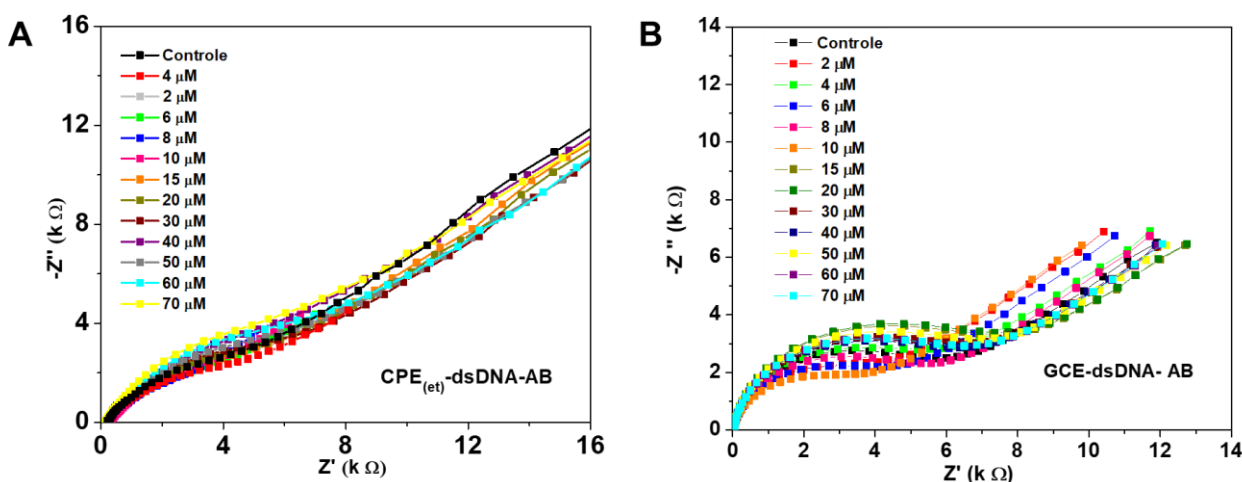
Tempo de incubação (min)	Frequência específica ( $f_i$ ) / Hz		Constante de célula ( $\tau_0$ ) <sup>-</sup>	
	CPE <sub>(et)</sub> /ds-DNA	GCE/ds-DNA	CPE <sub>(et)</sub> /ds-DNA (ms)	GCE/ds-DNA ( $\mu$ s)
2	39	7943	4,0	20
4	19	6309	8.3	25
6	25	7943	6.3	20
8	8,0	7943	19	20
10	2.5	7943	63	20
12	1.6	7943	100	20
15	1.2	7943	132	20

Fonte: Autora, 2023.

Após o estudo das interações no intervalo de 2 a 15 minutos, foi escolhido o tempo com maior  $R_{CT}$ , para prosseguir os estudos das interações, o tempo escolhido foi de 4 minutos. A concentração de azul brilhante foi variada no intervalo de 2 a 70  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> os diagramas de Nyquist correspondentes estão representados na figura 37

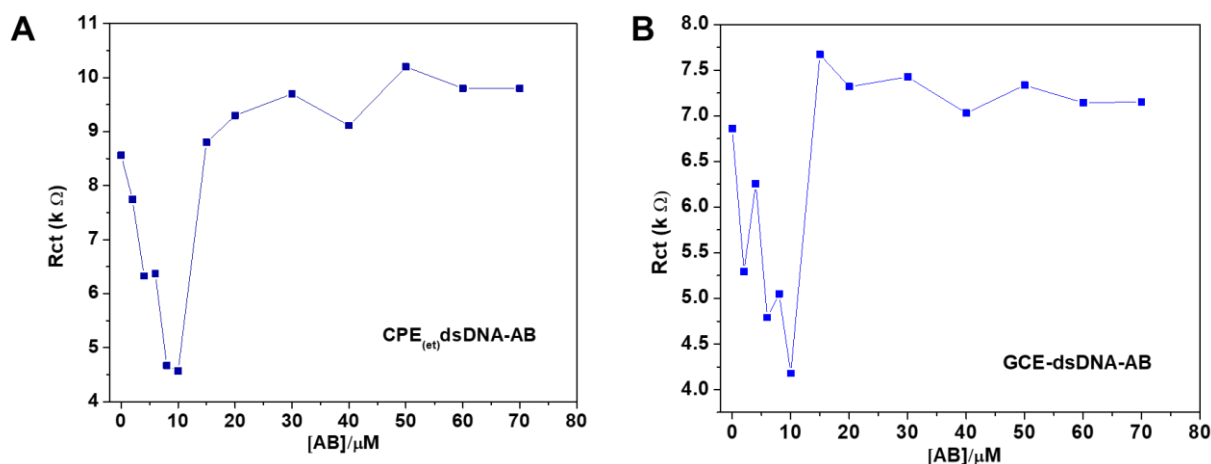
e o gráfico com os valores da  $R_{CT}$  em função da concentração estão presentes na figura 38. Nas figuras 37, observa-se uma variação da  $R_{CT}$  em função da concentração que no intervalo de concentração de 2 a 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em que há um decréscimo significativo da  $R_{CT}$ .

**Figura 37.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  em 0,5 mol  $\text{L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte com  $\text{CPE}_{(et)}/\text{ds-DNA}$  (A) e  $\text{GCE}/\text{dsDNA}$  (B) após incubação de 10 minutos em solução contendo concentrações no intervalo de 2 a 70  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AB.



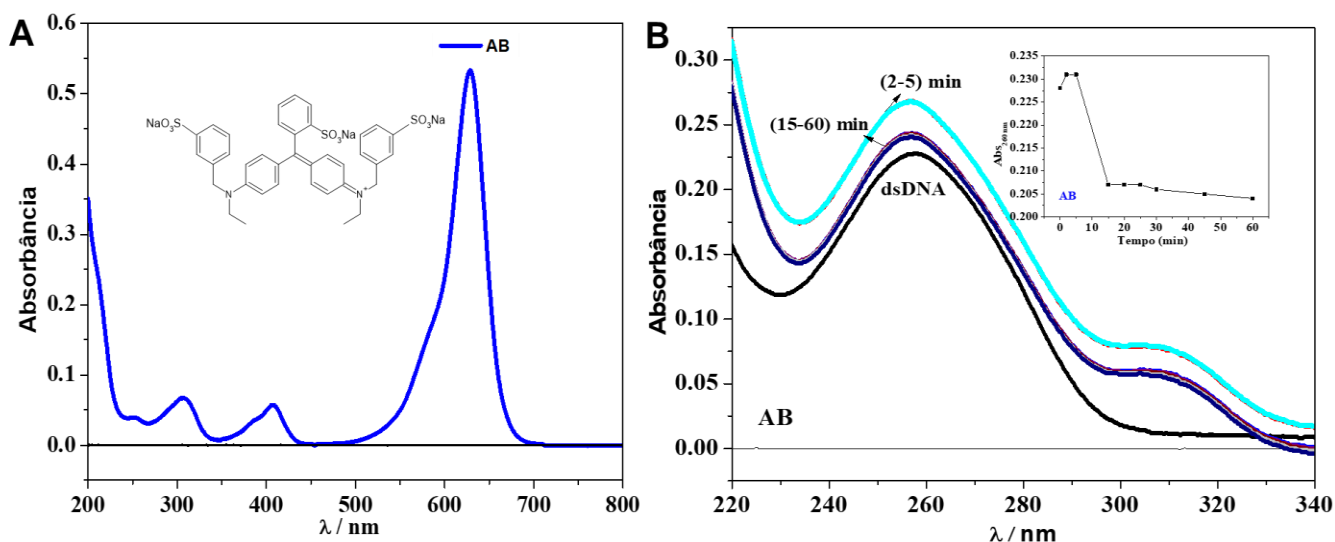
Na figura 38, observa-se que para o intervalo de concentração de 20 a 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AB, a  $R_{CT}$  aumenta e tende à estabilidade, ponto em que pode ocorrer a saturação do número de sítios de interação entre ds-DNA e AB, convergindo com o intervalo observado via VDP, que para a faixa de concentração de 15 a 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  as intensidades de corrente dos picos de oxidação dGuo e dAdo atingem um platô.

**Figura 38.** Gráfico de  $R_{CT}$  em função da concentração de AB com  $CPE_{(et)}/ds\text{-DNA}$  (A) e  $GCE/ds\text{-DNA}$  (B).



Com o objetivo de complementar os estudos realizados na investigação da interação do ds-DNA com o AB, um estudo adicional foi proposto utilizando a espectrofotometria UV-Vis. Inicialmente, foi avaliado o espectro de absorção UV-Vis do AB no intervalo de comprimento de onda 200 a 800 nm para determinar o comprimento de onda máximo de absorção. Na figura 39A, o corante AB apresentou quatro bandas de absorção, sendo a quarta banda de alta intensidade, a primeira em aproximadamente  $\lambda = 259$  nm, a segunda banda de absorção em  $\lambda = 300$  e a terceira banda,  $\lambda = 420$  nm e quarta banda de absorção em  $\lambda = 630$  nm. Tendo em vista que a solução de dsDNA apresenta uma banda de absorção em  $\lambda = 260$  nm. Na figura 39B os espectros foram obtidos utilizando uma solução ds-DNA controle (sem a mistura com o corante) e a mistura da solução de ds-DNA e AB no intervalo de tempo de 2 a 60 minutos. Contudo, o AB também apresenta uma banda absorção na mesma região que o ds-DNA, sendo assim foi realizado um procedimento matemático segundo Uliana, Garbellini e Yamanaka (2012). Observa-se no gráfico inset na figura 39B que a variação da absorbância do DNA em 260 nm no intervalo de 2 a 5 minutos teve um aumento de absorbância maior que 8% indicando um efeito hipercrômico e no intervalo de 15 a 60 minutos a absorbância apresentou um decaimento maior que 15% indicando um efeito hipocrômico. A ocorrência desses efeitos na intensidade de absorção de radiação pelo dsDNA mostra interações do corante com a estrutura do ds-DNA via intercalação, em que os anéis aromáticos do corante interagem com as bases nitrogenadas do dsDNA.

**Figura 39.** Espectros UV-Vis obtidos em 5,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de solução de AB (A) e em solução de ds-DNA 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  antes e após interação com AB no intervalo de 2 a 60 minutos (B) e variação da absorbância do ds-DNA em 260 nm versus o tempo de interação do corante (inset).



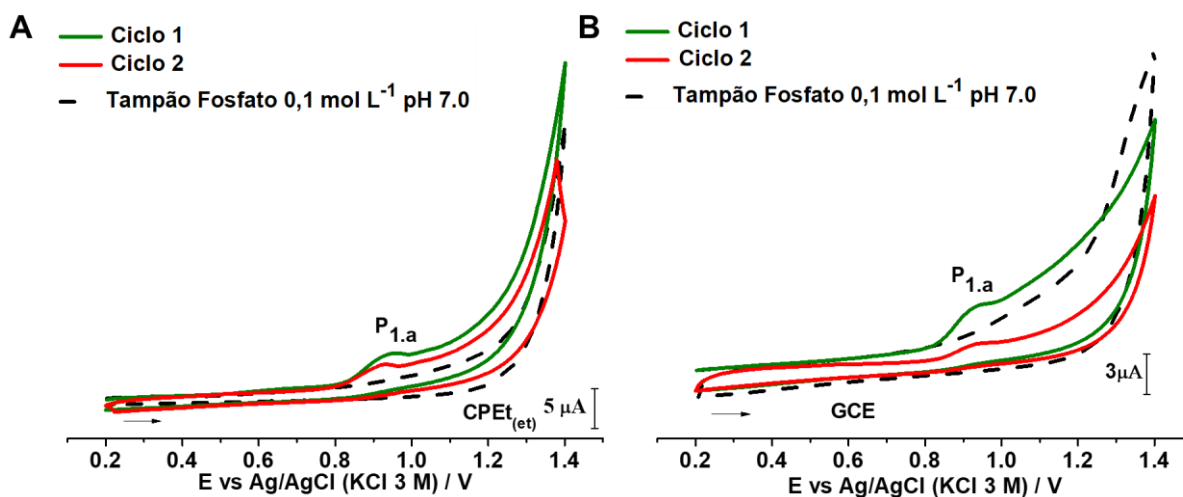
De acordo com Queiroz (2007) por meio da técnica de absorção UV-Vis e de infravermelho foi identificado que o AB pode formar complexos com ds-DNA, sugerindo processo de intercalação do corante e as bases de ds-DNA, ocupando principalmente o sítio da guanina. Para o estudo realizado neste trabalho de interação ds-DNA/AB via sensores eletroquímicos utilizando a VDP e a EIS foi possível observar a interação e formação de um complexo ds-DNA-AB em consonância com o estudo da autora: Queiroz (2007) indicando a possibilidade de um mecanismo de interação ds-DNA/AB por intercalação. Portanto, os resultados observados a partir dos sensores de DNA corroboram a proposição de intercalação da molécula de azul brilhante com o ds-DNA. Tendo em vista que a inserção de um intercalador entre os pares de bases nitrogenadas adjacente resulta em mudanças na estrutura do dsDNA causando alongamento, rigidez e/ou desnovelamento da dupla hélice do DNA (RESCIFINA et al., 2014) observadas no estudo realizado.



#### 4.7 Estudo de interação *in vitro* da mistura equimolar tartrazina/azul brilhante com CPE<sub>(et)</sub>/dsDNA

Voltamogramas cíclicos foram obtidos com CPE<sub>(et)</sub> e GCE em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 para avaliar o comportamento eletroquímico da mistura equimolar dos corantes AB e TZ, figuras 40 A e B. Com os resultados obtidos na figura 40, observou-se um único pico anódico irreversível com o CPE<sub>(et)</sub> em  $E = + 0,94$  V, associado à oxidação direta da mistura dos corantes. Com o GCE também há apenas o aparecimento de um pico anódico irreversível em  $E_{p,a1} = +0,99$  V . Além disso, observou-se um decréscimo do pico  $E_{p,a1}$  relacionado a uma possível adsorção de subprodutos na superfície do eletrodo após sucessivas varreduras.

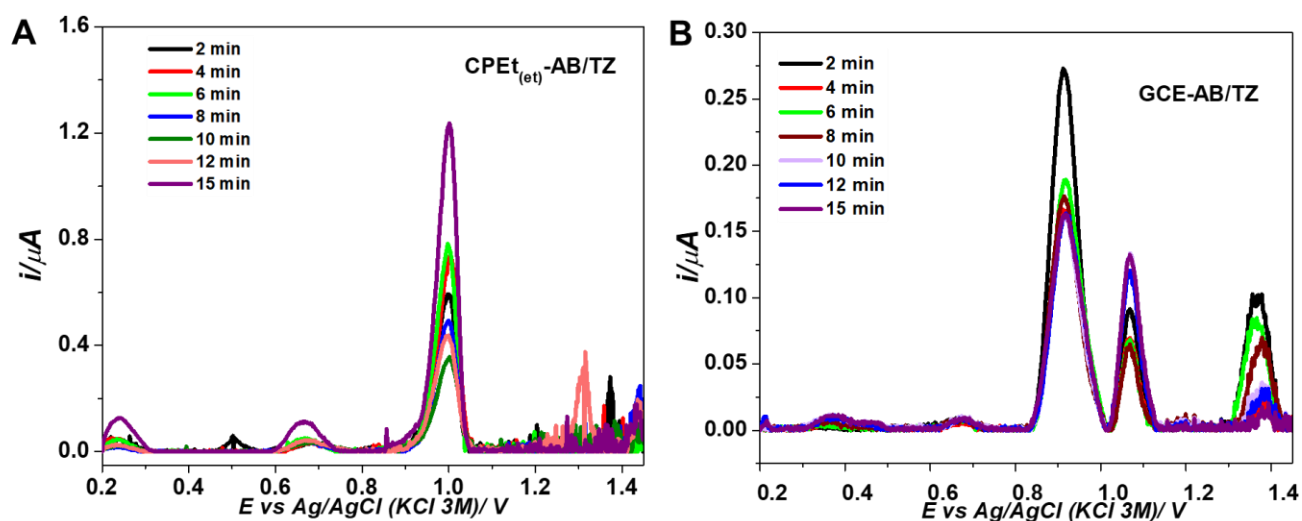
**Figura 40.** Voltamogramas cíclicos obtidos em solução de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 contendo 50,0 μmol L<sup>-1</sup> de AB e TZ com CPE<sub>(et)</sub> (A) e GCE (B). Parâmetros experimentais: velocidade de varredura 50 mV s<sup>-1</sup>,  $E_i = E_f = +0,2$ V e  $E_\lambda = +1,4$  V.



Com o propósito de avaliar se a mistura dos corantes também apresentariam adsorção da superfície do eletrodo não modificado com dsDNA voltamogramas de pulso diferencial de CPE<sub>(et)</sub> e GCE foram comparados ao longo do tempo de 0 a 15 minutos, figura 41, o que permitiu a observação de aparecimento de picos de oxidação ao longo do tempo. Para o CPE<sub>(et)</sub> os picos de oxidação foram  $E_{p,a1} = + 0,23$  V,  $E_{p,a2} = + 0,65$  V e  $E_{p,a3} = + 0,98$  V . Em GCE, os picos de oxidação

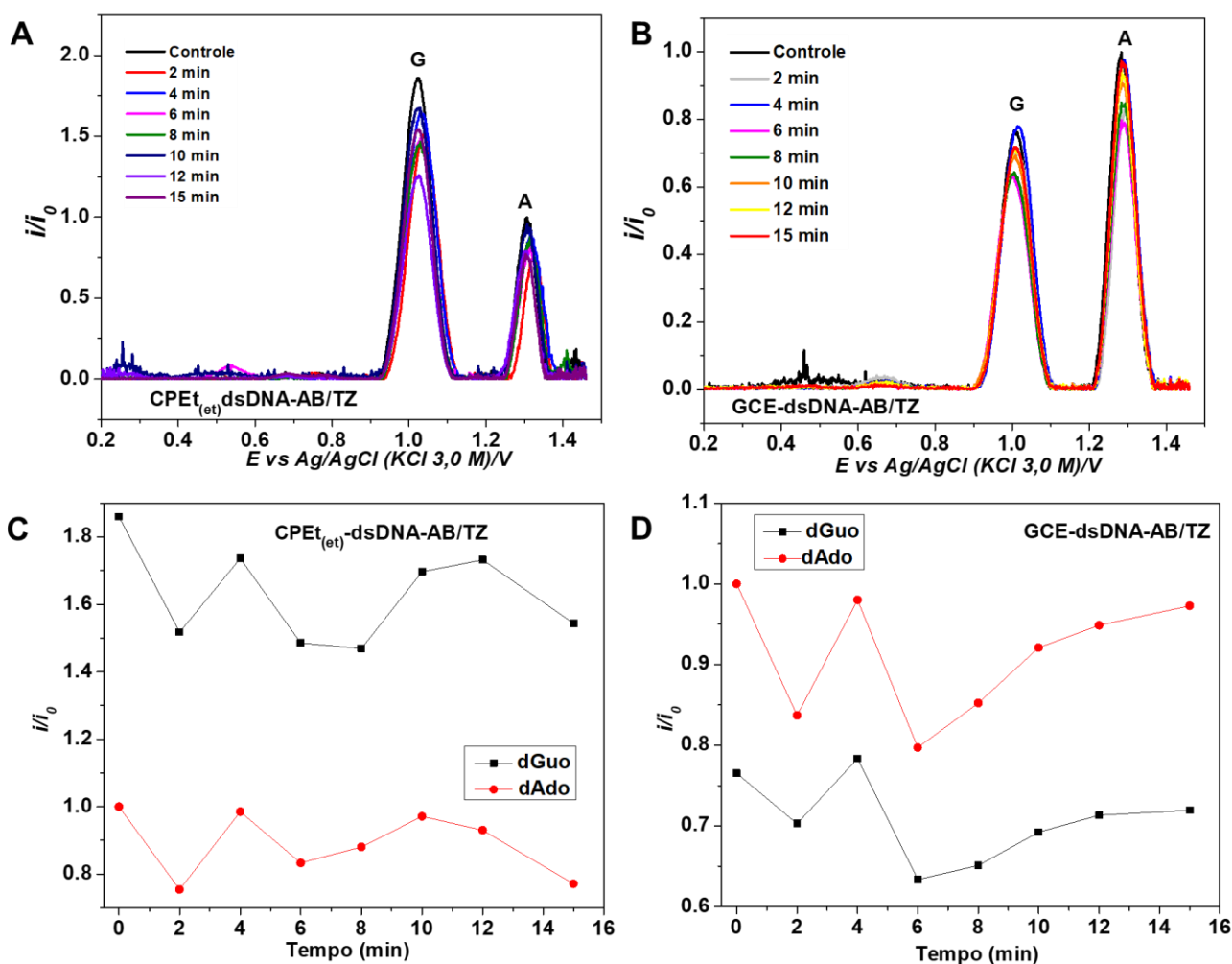
foram  $E_{p,a1} = + 0,3$ ,  $E_{p,a2} = + 0,7$  V e  $E_{p,a3} = + 0,9$  V ,  $E_{p,a4} = + 1,1$  V e  $E_{p,a5} = +1,35$  V. Como foi observado nos resultados, os picos de oxidação estão próximos do potencial de pico de oxidação da dGuo para os dois sensores e para o GCE também o pico de oxidação da dAdo.

**Figura 41.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com CPE<sub>(et)</sub> (A) e GCE (B) após incubação em solução contendo 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de AB e TZ no intervalo de 2 a 15 minutos.



O CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA e o GCE/ds-DNA foram utilizados para investigar a interação da mistura equimolar dos corantes e o ds-DNA em diferentes tempos de incubação. Os potenciais e correntes de pico referentes à oxidação de ambos os nucleosídeos foram monitorados após incubação dos sensores no intervalo de 2 a 15 minutos em solução contendo 50,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de TZ e AB em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 e comparados com seus respectivos controles, a fim de evidenciar possíveis alterações no perfil voltamétrico dsDNA decorrentes da interação representados na figura 42. Nos gráficos das figuras 42 (C,D) pode observar-se que no intervalo de 0 a 15 minutos um comportamento não-linear em relação aos valores de correntes dos picos de oxidação da dGuo e dAdo, principalmente no intervalo de 2 a 8 minutos para os dois sensores, torna-se complexo definir qual corante está contribuindo de forma majoritária para a interação observada, o que já era esperado.

**Figura 42.** Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução tampão acetato pH 4,5 com (a) CPET<sub>(et)</sub>/ds-DNA e (b) GCE/ds-DNA após incubação em solução contendo em 50 μmol L<sup>-1</sup> de TZ e AB durante 2 a 15 minutos. Gráficos da corrente de pico normalizado em função do tempo de interação com o corante em CPET<sub>(et)</sub> (C) e GCE (D).

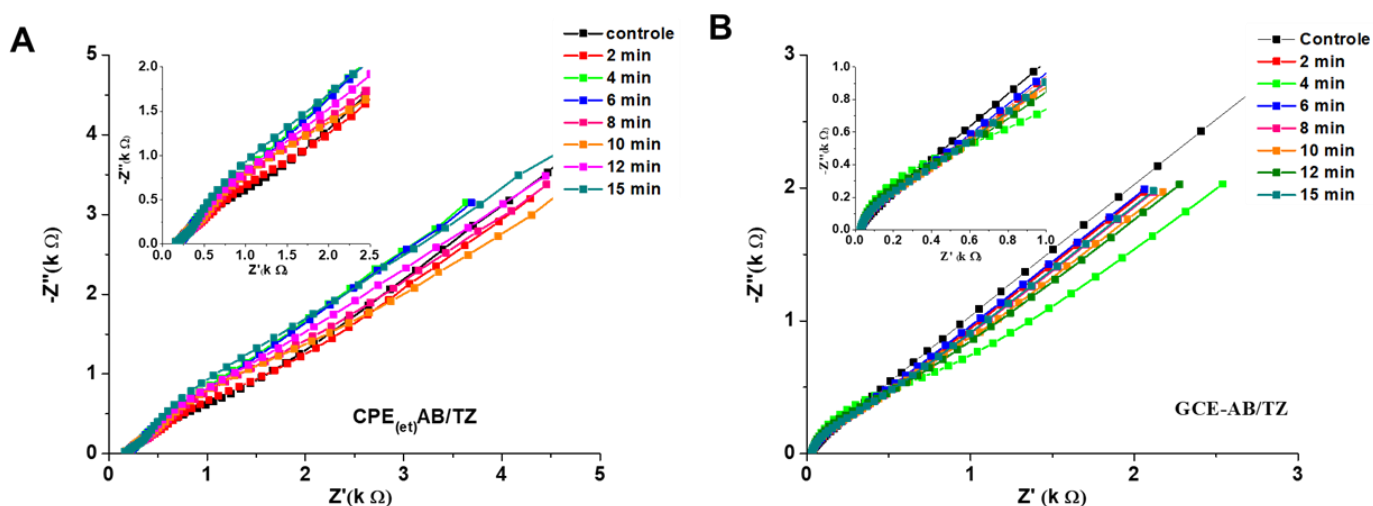


Para o CPET<sub>(et)</sub>/ds-DNA para o tempo de 2 minutos há um decréscimo dos valores de corrente dos picos de oxidação dos resíduos de base do ds-DNA em relação ao controle indicando que a conformação do ds-DNA está mais rígida, contudo, essa conformação vai mudando ao longo de tempo em que observa-se o desnovelamento da estrutura dupla hélice do ds-DNA que permite um acesso mais próximo dos resíduos da base na superfície do eletrodo, facilitando sua oxidação até o tempo de 12 minutos. Já para o GCE/ds-DNA é no período de 6 minutos que se observa o maior decaimento do valor de corrente referente a oxidação das bases dos resíduos, e é a partir de 8 minutos que a estrutura do ds-DNA é desnovelada e tende

a estabilização. Os estudos de interação foram realizados em triplicatas, sendo que o RSD% máximo foi de 15%.

Com o objetivo de complementar os estudos de interação do ds-DNA com o AB e a TZ, o mesmo protocolo de estudos *in vitro* ds-DNA-AB/TZ foi aplicado, utilizando-se de EIS para avaliação da interação ds-DNA-AB/TZ. Inicialmente a fim de verificar, se uma possível adsorção simultânea de AB e TZ na superfície do eletrodo também interferiria nas medidas, foi realizado um estudo com ambos CPE<sub>(et)</sub> e GCE não modificados incubados em soluções de corante, com posterior avaliação em solução de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O (sonda eletroquímica) em 0,5 mol L<sup>-1</sup> de KCl como eletrólito suporte. Como não houveram alterações singificativas do perfil impedimétrico na figura 43, seguiu-se com as análises das interações entre ds-DNA e a mistura dos corantes.

**Figura 43.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.3H<sub>2</sub>O em 0,5 mol L<sup>-1</sup> de KCl como eletrólito suporte com CPE<sub>(et)</sub> (A), GCE (B) após incubação em solução contendo em 50 μmol L<sup>-1</sup> de TZ e AB durante 2 a 15 minutos.



O intervalo de tempo escolhido para realizar os estudos foi de 2 a 15 minutos tendo em vista que foi neste intervalo em que as interações entre dsDNA-AB-TZ foram mais significativas, evidenciadas pelas análises de VDP, figura 42. Os diagramas de Nyquist para ambos os eletrodos mostraram que houve a formação de um complexo dsDNA-AB-TZ, evidenciadas a partir das variações dos valores de  $R_{CT}$  que estão apresentadas na tabela 6, ainda que não se observe uma tendência variação com o

tempo de incubação. A relativização proposta dos valores de  $R_{ct}$ , possibilita a visualização mais precisa de suas variações, podendo ser comparada diretamente à relativização apresentada para as correntes de pico dos resíduos das bases do dsDNA obtidos da VDP.

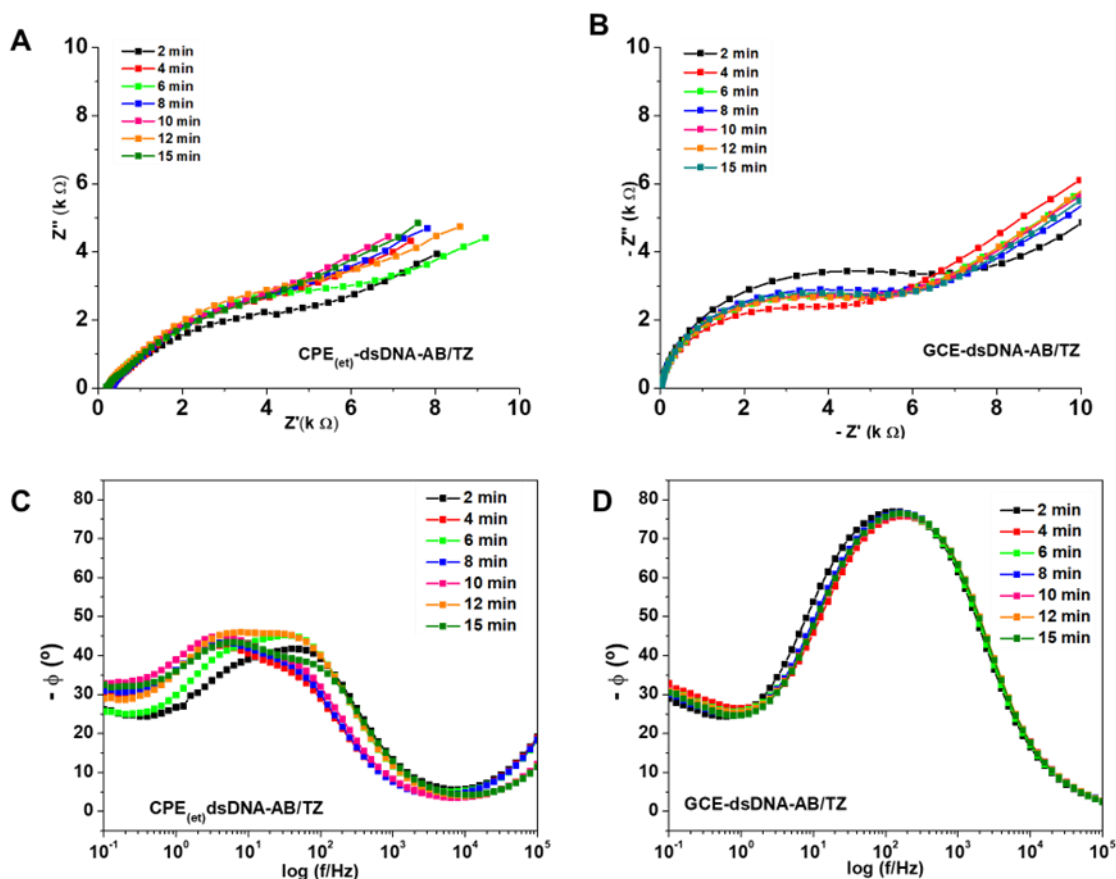
Tabela 6 - Valores de  $R_{CT}$  normalizados em relação ao controle

CPE <sub>(et)</sub> /ds-DNA		GCE/ds-DNA	
Tempo (min)	( $R_1-R_0/R_0$ )	Tempo (min)	( $R_1-R_0/R_0$ )
2	0,452	2	0,384
4	0,428	4	-0,291
6	0,338	6	-0,273
8	-0,025	8	-0,277
10	-0,045	10	-0,354
12	0,257	12	-0,885
15	0,013	15	-0,558

Fonte: Autora, 2023.

Ainda, o diagrama de Bode-fase para o CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA, figura 44C, apresenta um deslocamento, para menores valores de frequência, da frequência específica ( $f_0$ ) de carregamento da interface-eletrodo solução, com aumento do tempo indicando que as interações estabelecidas entre a mistura AB-TZ e o ds-DNA estão mudando a conformação do dsDNA.

**Figura 44.** Espectros de impedância eletroquímica obtidos em solução de  $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$  em  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl como eletrólito suporte com  $CPE_{(et)}/ds\text{-DNA}$  (A e C), GCE/ $ds\text{-DNA}$  (B e D) após incubação em solução contendo em  $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  de AB e TZ durante 2 a 15 minutos.



Apesar do deslocamento, este é menos significativo quando comparado às incubações realizadas com apenas o AB, mostrando que há a intercalação de ambos os corantes no ds-DNA, e não de apenas um deles. Já para o GCE/ $ds\text{-DNA}$ , observa-se o efeito das interações principalmente no diagrama de Nyquist, que evidencia uma diminuição dos valores de  $R_{CT}$  sem afetar significativamente o carregamento da dupla camada elétrica, uma vez que os valores de  $\tau_0$  praticamente não se alteram no diagrama de Bode-fase, figura 44D, e na tabela 7. Já para o  $CPE_{(et)}/ds\text{-DNA}$ , observa-se um aumento linear de  $\tau_0$  em função do tempo, indicando que com aumento de tempo da interação dos corantes com o dsDNA, este pode ter se desnovelado completamente e iniciado a intercalação das moléculas de AB e TZ carregadas negativamente, aumentando a capacitância do sistema e conseqüentemente o  $\tau_0$ .

Tabela 7 - Tempos de incubação, frequências e ( $\tau_0$ ) para interação ds-DNA-AB/TZ

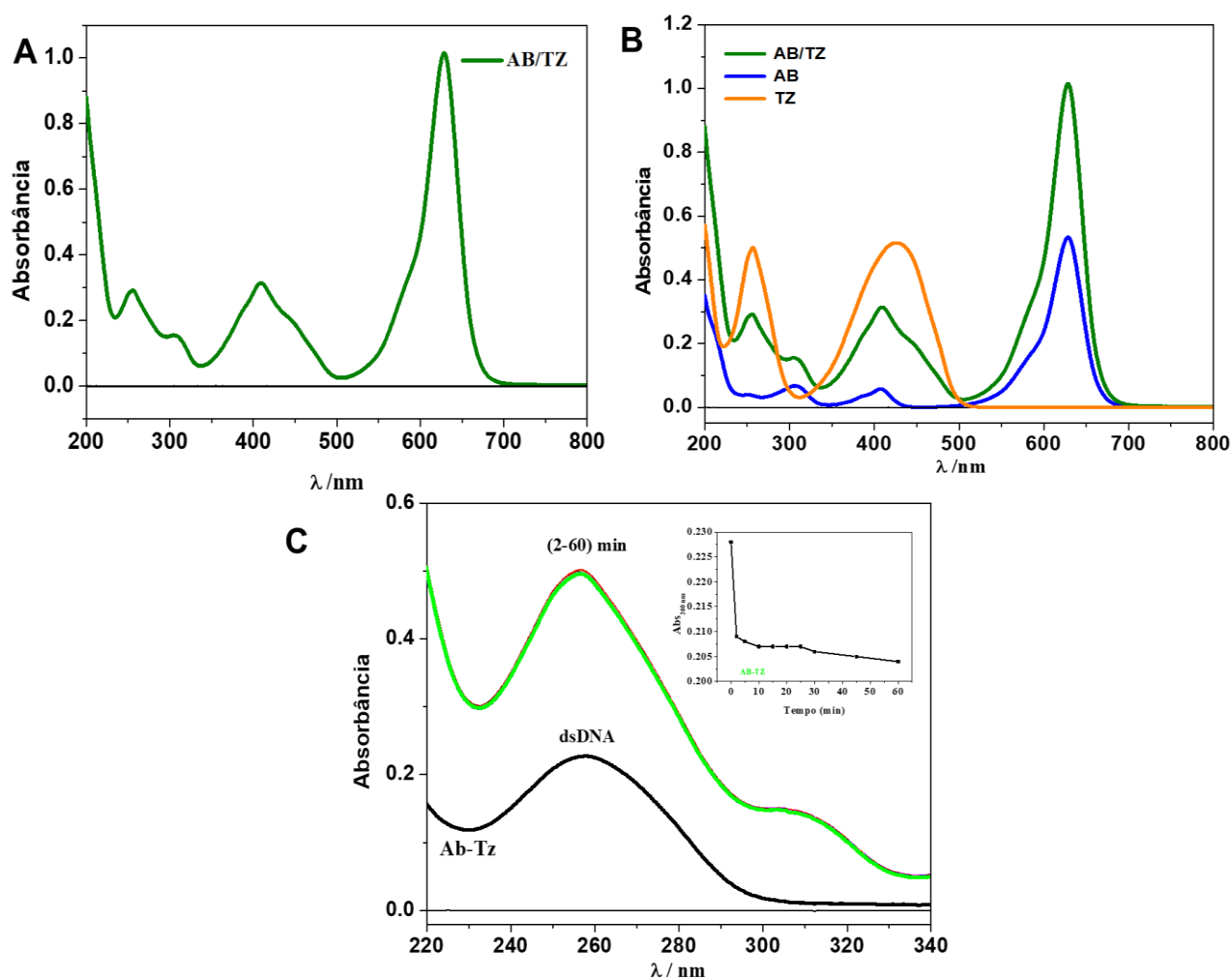
Tempo de incubação (min)	Frequência específica ( $f_0$ ) / Hz		Constante de célula ( $\tau_0$ ) ms	
	CPE <sub>(et)</sub> /ds-DNA	GCE/ds-DNA	CPE <sub>(et)</sub> /ds-DNA	GCE/ds-DNA
2	25.0	6.3	6.3	25
4	10.0	10.0	16	16
6	6.3	10.0	25	16
8	5.0	10.0	30	16
10	4.0	10.0	40	16
12	2.5	10.0	60	16
15	2.0	10.0	80	16

Fonte: Autora, 2023.

Um estudo adicional foi proposto utilizando a espectrofotometria UV-Vis. Inicialmente, foi avaliado o espectro de absorção UV-Vis da mistura equimolar do AB e TZ no intervalo de comprimento de onda 200 a 800 nm para determinar o comprimento de onda máximo de absorção. Na figura 45A, a mistura dos corantes apresentou um espectro de absorção semelhante ao do AB onde ocorreu o aparecimento de quatro bandas de absorção, sendo a quarta banda de alta intensidade, a primeira em aproximadamente  $\lambda = 259$  nm, a segunda banda de absorção em  $\lambda = 300$  e a terceira banda  $\lambda = 400$  nm e quarta banda de absorção em  $\lambda = 630$  nm. Na figura 45B, comparou-se os espectros de absorção individuais da tartrazina e azul brilhante com o da mistura dos corantes, em que se observa a contribuição de cada componente. Na figura 45C os espectros foram obtidos utilizando uma solução ds-DNA controle (sem a mistura com o corante) e a mistura da solução de ds-DNA e a mistura dos corantes no intervalo de tempo de 2 a 60 minutos. Contudo, a mistura também apresenta uma banda absorção na mesma região que o ds-DNA, sendo assim foi realizado um procedimento matemático realizado para os outros corantes acima. Observa-se no gráfico inset na figura 45C que a variação da absorbância do DNA em 260 nm no intervalo de 2 a 60 minutos teve um decréscimo de absorbância maior que 12% indicando um efeito hipocrômico. O hipocromismo pode indicar alteração na estrutura do ds-DNA, principalmente por intercalação, a

partir da interação dos anéis aromáticos dos corantes com as bases nitrogenadas do ds-DNA.

**Figura 45.** Espectros UV- Vis obtidos em solução de AB e TZ de  $10,0 \mu\text{mol L}^{-1}$  (A e B) e da solução de ds-DNA  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  antes e após interação com a tartrazina no intervalo de 2 a 60 minutos (C) e (inset) variação da absorbância do dsDNA em 260 nm versus o tempo de interação do corante.



A conclusão obtida a partir dos estudos sugere que para o GCE, a interação de todos os corantes ocorre de maneira interfacial, com os aglomerados que são formados em eletrodos de carbono ((OLIVEIRA, BRETT, 2010).), sem ocorrência de intercalação em função do envelhecimento da estrutura. Quando se adiciona o cátion colina no substrato eletródico do  $\text{CPE}_{(\text{et})}$ , a presença do mesmo pode alongar a cadeia do ds-DNA possibilitando a intercalação dos corantes com o material genético. O



alongamento do material genético sobre a superfície do CPE<sub>(et)</sub> se aproxima mais da estrutura quaternária do ds-DNA em solução, evidenciado pelos estudos realizados com espectroscopia no UV-Visível, possibilitando uma representação mais fiel e precisa das interações molécula alvo-ds-DNA.

## 5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, avaliou-se o potencial de aplicação de plataformas a base de pasta de carbono modificadas com solventes eutéticos profundos como substrato de adsorção de ds-DNA para aplicação em estudos de interação *in vitro* ds-DNA-molécula alvo. As moléculas escolhidas foram os corantes tartrazina (TZ) e azul brilhante (AB), e sua combinação, comumente utilizados como aditivos alimentares em alimentos ultraprocessados.

A adsorção de ds-DNA na superfície hidrofóbica da pasta de carbono sem modificação (CPE) é prejudicada em virtude da inexistência de interações intermoleculares que permitam a reorganização da estrutura helicoidal do dsDNA sobre a superfície da pasta, necessitando de pré-tratamento eletroquímico que se mostrou crucial para a obtenção de respostas reprodutíveis. Foi possível estabelecer que a conformação do dsDNA adsorvido sobre a superfície do eletrodo depende das características hidrofílicas do eletrodo, regidas pelas interações eletrostáticas e de ligação de hidrogênio, expondo as bases para serem oxidadas na superfície do eletrodo conforme maior quantidade de ligações estabelecidas, ou seja, maior caráter hidrofílico.

A partir dos eletrodos modificados com NADES a base de cloreto de colina (CPE<sub>(et)</sub> e CPE<sub>(gly)</sub>), foi possível constatar, por metodologia eletroquímica, a estabilização do dsDNA, via cloreto de colina, em que o íon colina estabelece interações por meio de ligações de hidrogênio com os sulcos do dsDNA e estabiliza o par de base nitrogenada A-T, conseqüentemente aumentando a exposição da deoxiguanosina para oxidação direta sobre o eletrodo. O estudos de EIS foram fundamentais para determinar a característica e escolha da superfície, uma vez o aumento da capacitância interfacial promovida pela presença do íon colina na interface eletrodo-solução, possibilitou a escolha do CPE<sub>(et)</sub> como substrato base para os posteriores estudos de interação ds-DNA-corante.

Os estudos de interação com os corantes mostraram que, independentemente do corante avaliado, o recobrimento da superfície do CPE<sub>(et)</sub>/ds-DNA foi extremamente efetivo, uma vez que não foram observados picos referentes à oxidação direta dos corantes na superfície eletródica.

Observa-se a intercalação da tanto da TZ quanto do AB com o ds-DNA evidenciado: (I) pela diminuição das correntes de pico referentes à oxidação de ambas as bases nitrogenadas e (II) pelo aumento da constantes de tempo de reação observadas em EIS para o  $CPE_{(et)}/ds-DNA$ . A ausência desse fenômeno no GCE/ds-DNA mostra que o ds-DNA permanece enovelado, formando agregados que dificultam a intercalação do composto no material genético. Neste contexto, é sugerido que a interação ocorra de maneira mais superficial, promovendo uma maior condensação da estrutura do ds-DNA, sem que haja intercalação. O eletrodo proposto ( $CPE_{(et)}/ds-DNA$ ), tanto para a TZ quanto para o AB, e para sua mistura, permitiu a observação de uma interação de ambos os corantes com os resíduos de bases do ds-DNA, promovendo a intercalação do corante no material genético, e constatando a ausência de danos oxidativos ou de clivagem no ds-DNA.

Apesar de não ter sido possível construir um dispositivo analítico para quantificação das concentrações de ambos os corantes, o eletrodo  $CPE_{(et)}/dsDNA$  se mostrou mais eficiente que o GCE/ds-DNA para estudos de interação *in-vitro* entre ds-DNA e molécula alvo, trazendo uma aproximação mais fiel da conformação do ds-DNA adsorvido a que ocorre em solução, e evidenciando novas potencialidades de aplicação de solventes eutéticos profundos no desenvolvimento de sensores eletroquímicos e como plataformas para estudos de interação com moléculas alvo.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, A. P.; BALLANTYNE, A.; HARRIS, R. C.; JUMA, J. A.; RYDER, K. S.; FORREST, G. A Comparative study of nickel electrodeposition using deep eutectic solvents and aqueous solutions. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 176, p. 718-726, 2015.
- ABBOTT, A. P.; CAPPER, G.; DAVIES, D.L.; MUNRO, H. L.; RASHEED, R. K.; TAMBYRAJAH, V. Preparation of novel, moisture- stable, Lewis acidic ionic liquids containing quaternary ammonium salts with functional side chains. **Chemical Communications**, Cambridge, n. 19, p. 2010-2011, 2001.
- ABO-HAMAD, A.; HAYYAN, M.; ALSAADI, M. A.; HASHIM, M. A. Potential applications of deep eutectic solvents in nanotechnology. **Chemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 273, p. 551-567, 2015.
- ABADU, E. M.; SIMON, R. Provisional chapter title: food additives and reactions: part 1. *In*: REFERENCE module in food science. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 1-2.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. ANVISA. **Resoluções nº 340 de 13 de dezembro de 2002**. Brasília: ANVISA, 2002. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br> >. Acesso em: 22 mar. 2023.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resoluções nº 382 a 388 de 5 de agosto de 1999**. Brasília: ANVISA, 1999. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br>. Acesso em: 22 mar. 2023.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resoluções nº 778 de 1 de março de 2023**. Brasília: ANVISA, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br>. Acesso em: 22 mar. 2023.
- AI-MASHHEDY, L. A. M.; FIJER, A. N. Acute toxicity of food additives tartrazine and carmoisine on white male mice. **International Journal of PharmTech Research**, Mumbai, v. 9, n. 4, p. 364-367, 2016.
- ALI, H. Biodegradation of synthetic dyes - a review. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 213, n. 1-4, p. 251-273, 2010.
- ANASTÁCIO, L. B.; OLIVEIRA, D. A.; DELMASCHIO, C. R.; ANTUNES, L. M. G.; CHEQUER, F. M. D. Corantes alimentícios amarantho, eritrosina B e tartrazina, e seus possíveis efeitos maléficis à saúde humana. **Journal of Applied Pharmaceutical Sciences**, Ipatinga, v. 3, n. 2, p.16-30, 2016.
- ARVARI, J. H.; DEHKORDI, S. S. S.; FARHADIAN, S. Evaluation of interactions between food colorant, tartrazine, and Apo-transferrin using spectroscopy analysis and docking simulation. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v. 339, 2021.

AUGUSTO, K. K.; PITON, G. R.; GOMES, P. C.; LONGATTO, G. P.; MORAES, F. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Enhancing the electrochemical sensitivity of hydroquinone using a hydrophobic deep eutectic solvent-based carbon paste electrode. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 14, n. 20, p. 2003-2013, 2022.

BABU, A. N.; REDDY, S. D.; SHARMA, P.; KUMAR, G. S.; RAVINDHRANATH, K.; MOHAN, G. V. K. Removal of hazardous indigo carmine dye from waste water using treated red mud. **Materials Today: proceedings**, Amsterdam v. 17, p. 198-208, 2019.

BARBOSA, R. A. Intercalação dos corantes alimentícios vermelho-40 e tartrazina em ácido desoxirribonucléico. 2002. 64 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

BRETT, C. M. A. Deep eutectic solvents and applications in electrochemical sensing. **Current Opinion in Electrochemistry**, Amsterdam, v. 10, p. 143-148, 2018.

BRETT, C.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. DNA and enzyme-based electrochemical biosensors: electrochemistry and afm surface characterization. *In*: CRESPILO, N. F. **Nanobioelectrochemistry from implantable biosensors to green power generation**. New York: Springer, 2014. v.18. p. 105-125.

BRÜSCHWEILER, J. B.; MERLOT, C. Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are not regulated yet. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, San Diego, v.88, p. 214- 226, 2017.

BUORO, R. M.; BACIL, R. P.; SANZ, C. G.; CAMPOS, O. S.; SERRANO, S. H. P. Biomimetic behavior and nanomolar detection of hydrogen peroxide on na electrochemically pre-treated hematin modified glassy carbon electrode. **Sensors and Actuators B: chemical**, Lausanne, v. 250, p. 169-187, 2017.

BUORO, R. M.; BACIL, R. P.; SILVA, R. P.; SILVA, L. C.; LIMA, A. W. O.; COSENTINO, I. C.; SERRANO, S. H. P. Lignin-AuNp modified carbon paste electrodes-preparation, characterization, and applications. **Electrochimica Acta**, Oxford, v. 96, p.191-198, 2013.

BUORO, R. M.; LOPES, I. C.; DICULESCU, V. C.; SERRANO, S. H. P.; LEMOS, L.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. In situ evaluation of gemcitabine-DNA interaction using a DNA-electrochemical biosensor. **Bioelectrochemistry**, Lausanne, v. 99, p. 40-45, 2014.

CARIATI, L. S. S.; BUORO, R. M. Evaluation of ionic natural deep eutectic solvents (NADES) modified binders towards the chemical properties of carbon paste electrodes. **Electrochemistry Communications**, New York, v. 109, 2019.

CLARE, G. The In Vitro Mammalian chromosome aberration test. **Methods in Molecular Biology**, New York, v. 817, p. 69-91, 2012.

CORRADINI, M. G. Synthetic food colors. *In*: MELTON, L.; SHAHIDI, F.; VARELIS, P. **Encyclopedia of food chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2019. p. 291-296.

CHEN, J.; WANG, Y.; WEI, X.; NI, R.; MENG, J.; XU, F.; LIU, Z. A composite prepared from MnO<sub>2</sub> nanosheets and a deep eutectic solvent as an oxidase mimic for the colorimetric determination of DNA. **Microchimica Acta**, Viena, v. 187, n.1, p. 1-7, 2019.

D'ALMEIDA, S. R. **Desenvolvimento de eletrodos compósitos modificados com GO/PVI/PdNPs, para determinação de p-nitrofenol em efluente têxteis sintéticos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

DAI, Y.; WITKAMP, G. J.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their application. **Food Chemistry**, Oxford, v. 187, p. 14-19, 2015.

DEHKORDI, H. S.; FARHADIAN, S.; GHASEMI, M. The interaction between the azo dye tartrazine and  $\alpha$ -Chymotrypsin enzyme: molecular dynamics simulation and multi-spectroscopic investigations. **Journal of Molecular Liquids**, Amsterdam, v.344, 2021.

DICULESCU, V. C.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. DNA- electrochemical biosensors and oxidative damage to DNA: application to cancer. *In*: PREEDY, V. R.; PATEL, V. **Biosensors and Cancer**. Boca Raton: CRC Press, 2012. p. 182-210.

DICULESCU, V. C.; PAQUIM, A. M. C.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Applications of a DNA electrochemical biosensor. **Trac Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 79, p. 23-26, 2016.

ENSAFI, A. A.; REZAEI, B.; AMINI, M.; HEYDARI, E. B. A novel sensitive DNA-biosensor for detection of a carcinogen, Sudan II, using electrochemically treated pencil graphite electrode by voltametric methods. **Talanta**, Amsterdam, v. 88, p. 244-251, 2012.

ERDEM, A.; EKSIN, E.; MARAL, M. Nucleic acid based impedimetric biosensors. *In*: BARHOUM, A.; ALTINTAS, Z. **Fundamentals of sensor technology**: principles and novel designs. Amsterdam: Elsevier, 2023. p. 285-307.

ESCOBAR, A. S.; GALVEZ, F. F. J.; ORELLANA, C.; BOLLO, S.; ROSALES, S. P.; RAJAS, M. S. Unveiling the tartrazine binding mode with ds- DNA by UV- visible spectroscopy, electrochemical, and QM/MM methods. **Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, Oxford, v. 292, 2023.

ESQUERDO, V. M.; CADAVAL, T. R. S.; DOTTO, G. L.; PINTO, L. A. A.; Chitosan scaffold as an alternative adsorbent for the removal of hazardous food dyes from aqueous solutions. **Journal Of Colloid and Interface Science**, San Diego, v. 424, p. 7-15, 2014.

FERNÁNDEZ, M. A.; BOITEUX, J.; ESPINO, M.; GOMEZ, F. J. V.; SILVA, M. F. Natural deep eutectic solvents- mediated extractions: the way forward for sustainable analytical developments. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 1038, p. 1-10, 2018.

FREITAS, A. S. Tartrazina: uma reação das propriedades e análises de quantificação. **Acta Tecnológica**, São Luís, v. 7, n. 2, p. 65-72, 2012.

FOOD INGREDIENTS BRASIL. **Insumos**. Bauru, 2016. v. 39, p. 24-46.

HANSEN, B. B.; SPITTLE, S.; CHEN, B.; POE, D.; ZHANG, Y.; KLEIN, J. M.; HORTON, A.; ADHIKARI, L.; ZELOVICH, T.; DOHERTY, B. W. Deep eutectic solvents: a review of fundamentals and application. **Chemical Reviews**, Washington, v. 121, n.3, p. 1232-1285, 2020.

JASNOWSKA, J.; LIGAJ, M.; STUPNICKA, B.; FILIPIAK, M. DNA sensor for o-dianisidine. **Bioelectrochemistry**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 85-90, 2004.

KOÇ, K.; PANDIR, D. All aspect of toxic effect of brilliant blue and sunset yellow in *Allium cepa* roots. **Cytotechnology**, Dordrecht, v.70, p. 449-463, 2018.

KONIG, J. Food colour additives of synthetic origin. *In: COLOUR additives for foods and beverages*. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 35-60.

KUDLAK, B.; OWCZAREK, K.; NAMIESNIK, J. Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents- a review. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 22, n. 16, p. 11975-11992, 2015.

KUMAR, N.; RAGHAVENDRA, M.; TOKAS, J.; SINGAL, H. R. Flavor addition in dairy products. *In: NUTRIENTS in dairy and their implications on health and disease*. Amsterdam: Elsevier, 2017. p. 123-135.

KUO, B.; BEAL, A. M.; WILLS, W. J.; WHITE, A. P.; MARCHETTI, F.; NONG, A.; MACLAREN, B. S. T.; HOUCK, K.; YAUK, L. C. Comprehensive interpretation of in vivo micronucleus test results for 292 chemicals: from hazard identification to risk assessment application. **Archives of Toxicology**, Heidelberg, v. 96, p. 2067-2085, 2022.

KUROSUMI, A.; KANEKO, E.; NAKAMURA, Y. Degradation of reactive dyes by ozonation and oxalic acid-assimilating bacteria isolated from soil. **Biodegradation**, New York, v. 19, n. 4, p.489-494, 2007.

LABUDA, J.; OLIVEIRA-BRETT, A. M.; EVTUGYN, G.; FOJTA, M.; MASCINI, M.; OZSOZ, M.; PALCHETTI, L.; PALECEK, E.; WANG, J. Electrochemical nucleic acid-bases biosensors: concepts, terms, and methodology (IUPAC Technical Report). **Pure And Applied Chemistry**, Berlim, v. 82, n. 5, p. 1161-1187, 2010.

LASCHUK, N. O.; EASTON, E. B.; ZENKINA, O. L. Reducing the resistance for the use of electrochemical impedance spectroscopy analysis in materials chemistry. **RSC Advances**, Cambridge, v.11, n. 45, p. 27925-27936, 2021.

LAZANAS, A. C.; PRODRONIDIS, M. I. electrochemical impedance spectroscopy - a tutorial. **ACS Measurement Science Au**, Washington, DC, v. 3, n. 3, p.143-236, 2023.

LEULESCU, M.; ROTARU, A.; PALARIE, I.; MOANNA, A.; CIOATERA, N.; POPESCU, M.; MORINTALE, E.; BUBULICA, M. V.; FLORIAN, G.; HARABOR, A. Tartrazine: physical, thermal and biophysical properties of the most widely employed synthetic yellow food-colouring azo dye. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, Dordrecht, v. 134, n. 1, p. 209-231, 2018.

LIPSKIKH, O. L.; KOROTKOVA, E. I.; BAREK, J.; VYSKOCIL, V. S. M.; KHRISTUNOVA, E. P. Simultaneous voltametric determination of Brilliant Blue FCF and Tartrazine for food quality control. **Talanta**, Amsterdam, v. 218, 2020.

LIU, Y.; FRIESEN, J. B.; MCALPINE, J. B.; LANKIN, D. C.; CHEN, S. N.; PAULI, G. F. Natural deep eutectic solvents: properties, applications, and perspectives. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 81, n. 3, p. 679-690, 2018.

LU, X.; BURREL, G.; SEPAROVIC, F.; ZHAO, C. Electrochemistry of room temperature protic ionic liquid: a critical assessment for use as electrolytes in electrochemical applications. **The Journal of Physical Chemistry Part B**, Washington, v. 116, n. 30, p. 9160- 9170, 2012.

MACHINI, W. B. S. **Mecanismo de interação de fármacos de proteínas com DNA detectados in situ com um biossensor eletroquímico modificado com nanoestruturas de DNA**. 2019. 390 f. Tese (Doutorado) – Curso de Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2019.

MACHINI, W. B. S.; FERNANDES, I. P. G.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Antidiabetic drug metformin oxidation and in situ interaction with dsDNA using dsDNA-electrochemical Biosensor. **Electroanalysis**, Weinheim, v. 31, n. 10, p. 1977-1987, 2019.

MAIMULYANTI, A.; NURHIDAYATI, I.; MELLISANI, B.; PUTRI, F. A. R.; PUSPITA, F.; PRIHADI, A. R. Development of natural deep eutectic solvent (NADES) based on choline chloride as a green solvent to extract phenolic compound from coffee husk waste. **Arabian Journal of Chemistry**, Amsterdam, v.16, n. 4, 2023.

MBOUS, P. Y.; HAYYAN, M.; HAYYANA, A.; WONG, W. F.; HASHIM, M. A.; LOOI, C. Y. Applications of deep eutectic solvents in biotechnology and bioengineering - promises and challenges. **Biotechnology Advances**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 105-134, 2017.

MMAJANOV, I.; ENGELHART, A. E.; BEAN, H. D.; HUD, N. V. DNA and RNA in Anhydrous Media: duplex, triplex, and G- quadruplex secondary structures in a deep eutectic solvent. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 49, n. 36, p. 6310-6314, 2010.

MOGHADDAM, M. H.; TAJIK, S.; HADI, B. A new electrochemical DNA biosensor based on modified carbon paste electrode using graphene quantum dots and ionic liquid for determination topotecan. **Microchemical Journal**, Philadelphia, v.150, 2019.



MONDAL, D.; SHARMA, M.; MUKESH, C.; GUPTA, V.; PRASAD, K. Improved solubility of DNA in recyclable and reusable bio-bases deep eutectic solvents with long-term structural and chemical stability. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 49, n. 83, p. 9606-9608, 2013.

NAKANO, M.; TATEISHI-KARIMATA, H.; TANAKA, S.; SUGIMOTO, N. Choline Ion Interactions with DNA Atoms Explain Unique Stabilization of A-T Base Pairs in DNA Duplexes: a microscopic view. **The Journal of Physical Chemistry Part B**, Washington, DC, v. 118, n. 2, p. 379-389, 2013.

NASCIMENTO, G. E.; CAVALCANTI, V. O. M.; SANTANA, R. M. R.; SALES, D. C. S.; RODRÍGUEZ, J. M. D.; NAPOLEÃO, D. C.; DUARTE, M. M. B. Degradation of a sunset yellow and tartrazine dye mixture: optimization using statistical design and empirical mathematical modeling. **Water, Air, & Soil Pollution**, Dordrecht, v. 231, n. 5, p. 231-254, 2020.

NILSON, A. F. E.; FERRARI, G.; LOUZADA, C. M. L.; LEVY, B. R.; MONTEIRO, A. C.; REZENDE, F. M. L. Premature deaths attributable to the consumption of ultraprocessed foods in Brazil. **American Journal of Preventive Medicine**, New York, v. 64, p. 129-136, 2023.

NEZHA, K. G.; KHORABLOU, Z.; ZAMANI, M.; DORRAJI, S. P.; ALAMGHOLILOO, M. Voltammetric sensor for tartrazine determination in soft drinks using poly (p-aminobenzenesulfonic acid)/ zinc oxide nanoparticles in carbon paste electrode. **Journal of Food and Drug Analysis**, Berkeley, v. 25, p. 293-301, 2017.

OKAFOR, S. N.; OBONGA, W.; EZEOKONKWO, M. A.; NURUDEEN, J.; OROVWIGHO, U.; AHIABUIKE, J. Assessment of the health implications of synthetic and natural food colourants – a critical review. **Pharmaceutical and Biosciences Journal**, Nsukka, p. 1- 11, 2016.

OLIVEIRA, S. C. B.; DICULESCU, V. C.; PAQUIM, A. M.C.; OLIVEIRA-BRETT, A.M. Electrochemical biosensors for DNA- DRUG interactions. **Encyclopedia of Interfacial Chemistry**, Amsterdam, p. 124-139, 2018.

OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. DNA – electrochemical biosensors: AFM surface characterisation and application to detection of *In Situ* oxidative damage to DNA. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, Sharjah v. 13, p. 628- 640, 2010.

OLIVEIRA, S. C. B.; PAQUIM, A. M. C.; RIBEIRO, S. M.; MELO, A. T. P.; VIVAN, M.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. In situ electrochemical and AFM study of thalidomide-DNA interaction. **Bioelectrochemistry**, Lausanne, v. 76, n. 1-2, p. 201-207, 2009.

OLIVEIRA-BRETT, A. M. DNA-based biosensors. *In*: GORTON, L. **Biosensors and modern biospecific analytical techniques**. Amsterdam: Elsevier, 2005. p. 179-208, 2005. (Comprehensive Analytical Chemistry, 44).

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; DICULESCU, V. C.; PAQUIM, A. M. P.; SERRANO, S. H. P. DNA-electrochemical biosensores for investigating DNA damage. *In: ALEGRET, A.; MERKOÇI, A. **Electrochemical sensor analysis***. Amsterdam: Elsevier, 2007. p. 413-437. (Comprehensive Analytical Chemistry, 49).

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; PAQUIM, A. M. C.; DICULESCU, V. C.; PIEDADE, J. A. P. Electrochemistry of nanoscale DNA surface films on carbon. **Medical Engineering & Physics**, Oxford, v. 28, n. 10, p. 963-970, 2006.

OLIVEIRA-BRETT, A. M.; PIEDADE, J. A. P.; SILVA, L. A.; DICULESCU, V. C.; Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 332, n. 2, p. 321-329, 2004.

PAQUIM, C. A. M, OLIVEIRA-BRETT, A. M. Microscopia de força atômica de moléculas de DNA absorvidas na superfície de HOPG. **Química**, Coimbra, p. 57-68, 2004.

PALECEK, E.; BARTOLIK, M. Electrochemistry of nucleic acids. **Chemical Reviews**, Washington, v. 112, n. 6, p. 3427-3481, 2012.

PRATHISH, K. P.; CARVALHO, R. C.; BRETT, C. M. A. Highly sensitive poly (3,4-ethylenedioxythiophene) modified electrodes by electropolymerization in deep eutectic solvents. **Electrochemistry Communications**, New York, v. 44, p. 8-11, 2014.

PEREIRA, S. L. L.; MARCUSSI, S.; SÁTIRO, C. L.; PEREIRA, A. C.; ANDRADE, F. L.; DAVIDE, C. L.; SANTOS, D. C. Application of comet assay to assess the effects of white bean meal on DNA of human lymphocytes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 48, n.1, p. 103-108, 2012.

QUEIROZ, C. F. O. **Estudos sobre a intercalação dos corantes azul Brilhante-FCF e Azul de Coomassie G-250 em ácido Desoxirribonucleico (DNA)**. 2007. 118 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

RAMBLER, M. R.; RINEHART, E.; BOEHMLER, W.; GAIT, P.; MOORE, J.; SCHLENKER, M.; KASHYAP, R. A review of the association of blue food coloring with attention deficit hyperactivity disorder symptoms in children. **Cureus**, New York, v. 14, 2022.

RAMÓM, D.; GUILLENA, G. **Deep eutectic solvents**. New York: John Wiley & Sons, 2020.

RATHI, B. S.; KUMAR, P. S.; VO.; D. V. N. Critical review on hazardous pollutants in water environment: occurrence, monitoring, fate, removal technologies and risk assessment. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 797, 2021.

REHMAN, S. U.; SARWAR, T.; HUSAIN, M. A.; ISHQI, H. M.; TABISH, M. Studying non-covalent drug-DNA interactions. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York v. 576, p. 49-60, 2015.

RESCIFINA, A.; ZAGNI, C.; VARRICA, M. G.; PISTARÀ, V.; CORSARO, A. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Catania, v. 74, p. 95-115, 2014.

REZAEI, B.; BOROUJENI, M. K.; ENSAFI, A. A. Development of Sudan II sensor based on modified treated pencil graphite electrode with DNA, o-phenylenediamine, and gold nanoparticle bioimprinted polymer. **Sensors and Actuators B: chemical**, Lausanne, v. 222, p. 849-856, 2016.

RODRIGUES, P. S. **Estudo de ingestão de sete corantes artificiais pela população brasileira**. 2021. 63 f. Tese (Doutorado) – Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021.

SANTOS, R. J.; SOARES, S. L.; SOARES, M. B.; FARIAS, M. G.; OLIVEIRA, A.V.; SOUSA, B. N. A.; NEGREIROS, A. H.; SILVA, C. C. F.; PERON, A. P.; PACHECO L. A. C.; MARQUES, M. M.; GONÇALVES, R. C. J.; MONTENEGRO C. R.; ISLAM, T.M.; RAD, S. J.; MOHAMMAD, S. M.; CAVALCANTE, M. C. A. M.; SOUSA, C. J.M. Cytotoxic and mutagenic effects of the food additive tartrazine on eukaryotic cells. **BMC Pharmacology and Toxicology**, London, v. 23, 2022.

SANZ, C. G.; BUORO, R. M.; BACIL, R. P.; SILVA, I. S.; RENDELUCCHI, A. D.; COSTA, F. P.; SERRANO, S. H. P. Sensing Materials: electrochemical applications of dna sensors and biosensors. *In*: **ENCYCLOPEDIA of Sensors and Biosensors**. Amsterdam: Elsevier, 2023. p 1-21.

SATPATI, A. K.; SAHOO, S.; DEY, M. K.; REDDY, A. V. R.; MUKHERJEE, T. Electrochemical and spectroelectrochemical investigations of quercetin on unmodified and DNA-modified carbon paste electrode and its determination using voltammetry. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 3, n. 6, 2011.

SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R. Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 3, p. 417-424, 1999.

SILVA, M. M.; REBOREDO, F. H.; LIDON, F. C. Food colour additives: a synoptical overview on their chemical properties, applications in food products, and health side effects. **Foods**, Basel, v. 11, n. 3, p. 379, 2022.

SMITH, E. L.; ABBOTT, A.; RYDER, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and their applications. **Chemical Reviews**, Washington, v. 114, n.21, p. 11060-11082, 2014.

SPELLMEIER, J. G.; STULP, S. Avaliação da degradação e toxicidade dos corantes alimentícios eritrosina e carmin de cochonilha através de processo fitoquímico. **Acta Ambiental Catarinense**, Chapecó, v. 6, n.1, p. 65-83, 2009.

SUN, W.; LI, Y.; GAO, H.; JIAO, K. Direct electrochemistry of double stranded DNA on ionic liquid modified carbon paste electrode. **Microchemica Acta**, Viena, v. 165, p. 313-317, 2009.

SVANCARA, I.; KALCHER, K.; WALCARIUS, A.; VYTRAS, K. **Electroanalysis with carbon paste electrodes**. New York: CRC Press, 2012.

SVANCARA, I.; SCHACHL, K.; SERRANO, S. H. P. Testing of unmodified carbon paste electrodes. **Chemické Listy**, Praga, v. 93, p. 490-499, 1999.

SVANCARA, I.; WALCARIUS, A.; KALCHER, K.; VYTRAS, K. Carbon paste electrodes in the new millennium. **Open Chemistry**, Mazovia, v. 7, n. 4, p. 598-656, 2009.

SVANCARA, I.; VYTRAS, K.; BAREK, J.; ZIMA, J. Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Philadelphia, v.31, n. 4, p. 311-345, 2001.

SVIGELJ, R.; DOSSI, N.; GRAZIOLI, C.; TONIOLO, R. Deep Eutectic Solvents (DESS) and their application in biosensor development. **Sensors**, Basel, v. 21, n. 13, 2021.

TANAKA, T.; TAKAHASHI, O.; INOMATA, A.; OGATA, A.; NAKAE, D. Reproductive and neurobehavioral effects of Brilliant Blue FCF in Mice. **Birth Defects Research Part B: developmental and reproductive toxicology**, Hoboken, v. 95, n. 6, p. 395-409, 2012.

TIRON, M. M. LUCACIU, I. E.; NITA- LAZAR, M.; GHEORGHE, S. Considerations on the toxicity of Brilliant Blue FCF aqueous solutions before and after ozonation. **Revista de Chimie**, Bucharest, v. 71, n. 4, p. 356-365, 2020.

TKACZYK, A.; MITROWSKA, K.; P. A. Synthetic organic dyes as contaminants of the aquatic environment and their implications for ecosystems: a review. **Science of the Total Environment**, Orlando, v, 717, p. 137-222, 2020.

ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. Spectrophotometric evaluation of the behavior of disperse red 1 dye in aqueous media its interaction with calf thymus dsDNA. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 178, p.627-635, 2013.

ULIANA, C. V.; GARBELLINI, G. S.; YAMANAKA, H. Evaluation of the interactions of DNA with textile dyes Disperse Orange 1 and Disperse Red 1 and their electrolysis products using an electrochemical biosensor. **Sensors and Actuators B: chemical**, Amsterdam, v. 23, n.8, p.1469-1475, 2012.

UNITED STATES. Food & Drug Administration. **Summary of color additives for use in the United States in foods, drugs, cosmetics, and medical devices**. Silver Springs: FDA, 2022. Disponível em: <https://www.fda.gov/industry/color-additive-inventories/summary-color-additives-use-united-states-foods-drugs-cosmetics-and-medical-devices>. Acesso em: 18 abr. 2023.

VILLAÑO, D.; GARCÍA, C. V.; MENA, P. Colors: health effects. *In*: **ENCYCLOPEDIA of Food and Health**. Amsterdam: Elsevier, 2016.p. 265-272.

VYTRAS, K.; SVANCARA, I.; METELKA, R. Carbon paste electrodes in electroanalytical chemistry. **Journal of the Serbian Chemical Society**, Belgrade, v.74, n. 10, p. 1021-1033, 2009.

WANG, Y.; XIONG, H.; ZHANG, X. Detection of rutin at DNA modified carbon paste electrode based on a mixture of ionic liquid and paraffin oil as a binder. **Microchimica Acta**, Viena, v. 170, p. 27-32, 2010.

WANG, J.; RIVAS, G.; CAI, X.; SHIRAISHI, H.; FARIAS, P. A. M.; DONTA, N.; LUO, D. Accumulation and trace measurements of phenothiazine drugs at DNA-modified electrodes. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 332, n. 2-3, p. 139-144, 1996.

WEI, D.; IVASKA, A. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 607, n. 2, p. 126-135, 2008.

WOODRUFF, S. R.; LI, Y.; YAN, L.; BISHOP, M.; JONES, Y. M.; WATANABE, F.; BIRIS, S. A.; RICE, P.; ZHOU, T. Genotoxicity evaluation of titanium dioxide nanoparticles using the Ames test and Comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, Oxford, v. 32, p. 934-943, 2012.

WU, L.; XU, Y.; LV, X.; CHANG, X.; MA, X.; TIAN, X.; SHI, X.; LI, X.; KONG, X. Impacts of an azo food dye tartrazine uptake on intestinal barrier, oxidative stress, inflammatory response and intestinal microbiome in crucian carp. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Philadelphia, v. 223, 2021.

XU, G.; WANG, W.; LI, B.; LUO, Z.; LUO, X. A dopamine sensor based on a carbon paste electrode modified with DNA-doped poly (3, 4-ethylenedioxythiophene). **Microchimica Acta**, Viena, v. 182, n. 3-4, p. 679-685, 2014.

ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. **Corantes**: caracterização química, toxicológica, método de detecção e tratamentos. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2016. 347p.

ZHAO, H. DNA stability in ionic liquids and deep eutectic solvents. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oxford, v. 90, n.1, p. 19-25, 2014.

ZHANG, Q.; VIGIER, K. O.; ROYER, S.; JÉROME, F. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. **Chemical Society Reviews**, Cambridge, v.41, n. 21, p. 7108, 2012.

ZHU, J. J.; GU, K.; XU, J. Z.; CHEN, H. Y. DNA modified carbon paste electrode for the detection of 6- Mercaptopurine. **Analytical Letters**, New York, v. 34, n. 3, p. 329-337, 2001.

ZIMA, J.; IVANCARA, I.; BAREK, J.; VYTRAS, K. Recent advances in electroanalysis of organic compounds at carbon paste electrodes. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, New York, v. 39, n. 3, p. 204-227, 2009.

## APÊNDICE

**Figura 46.** Voltamogramas de pulso diferencial com correção da linha base com CPE (et) com diferentes porcentagens em a) seringa de polietileno e no intervalo de potencial de  $E = 0$  a  $+ 1,4$  V (vs Ag/AgCl (KCl 3,0 M) / V), em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 4,5.

