

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Allan Carlos dos Santos Aguiar

**Estudo eletroquímico do contaminante emergente
2,6-dicloro-1,4-benzoquinona em solução aquosa e
avaliação da sua interação com DNA**

SÃO LUÍS

2017

Allan Carlos dos Santos Aguiar

**Estudo eletroquímico do contaminante emergente 2,6-
dicloro-1,4-benzoquinona em solução aquosa e avaliação
da sua interação com DNA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração Química Analítica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Luiza Maria Ferreira Dantas

Co-orientadora: Dr^a. Ilanna Campelo Lopes

SÃO LUÍS

2017

Aguiar, Allan Carlos dos Santos.

Estudo eletroquímico do contaminante emergente 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona em solução aquosa e avaliação da sua interação com DNA / Allan Carlos dos Santos Aguiar. - 2017.

61 f.

Coorientador(a): Ilanna Campelo Lopes.

Orientador(a): Luiza Maria Ferreira Dantas.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, Universidade Federal do Maranhão, 2017.

1. 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona. 2. Degradação. 3. DNA. 4. Voltametria. I. Dantas, Luiza Maria Ferreira. II. Lopes, Ilanna Campelo. III. Título.

Allan Carlos dos Santos Aguiar

**Estudo eletroquímico do contaminante emergente 2,6-dicloro-
1,4-benzoquinona em solução aquosa e avaliação da sua
interação com DNA**

Aprovado em: 30/05/ 2017

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Luiza Maria Ferreira Dantas

Prof^a. Dr^a. Aldaléa Lopes Brandes Marques

Prof^a. Dr^a. Mayara Ingrid Sousa Lima

**Todo mundo tem sua vida e nada é melhor
do que brincar.**

Ana Luísa, 4 anos.

AGRADECIMENTOS

Mais uma vitória galgada com muito esforço. Mas nada foi conquistado sozinho, por esse motivo quero agradecer a Deus, por nunca faltar em nenhum momento ao longo desses dois anos.

Muito obrigado a minha esposa, amiga e companheira Karla, pelo incentivo, doação e suporte dado. Obrigado por abrir mão de seus projetos para que o meu pudesse ser realizado. Obrigado por aguentar o estresse, o cansaço, a falta de tempo, o mau humor. Obrigado por estar sempre ao meu lado na digitação da primeira à última palavra. Meu amor, eu te amo, sem você seria impossível a conclusão de mais esta etapa nas nossas vidas.

Muito obrigado a minha filha Ana Luísa, pelos momentos de descontração vivenciados, pelos incansáveis convites: “vamos brincar”? E lógico, pelas teimas diárias, isso também faz parte, mas no final do dia sempre vem a recompensa de estarmos juntos, felizes e sorrindo.

Obrigado a minha mãe Terezinha por sua doação plena desde a gestação até hoje. Por segurar minhas mãos nos meus primeiros passos, por me ensinar as primeiras palavras e por vivenciar as provações e aprovações nesta longa jornada. Ela viu cada mudança e sempre contribuiu para meu desenvolvimento. Obrigado também a minha outra mãe, Raimunda, que jamais me esquece nas suas orações às quais recebo em forma de crescimento.

Quero dedicar essa conquista ao meu pai Silvestre, que nos deixou no início dessa caminhada e é responsável por tudo que sou enquanto homem.

Obrigado ao professor Dr. Auro Tanaka pelo acolhimento quanto ao meu ingresso no curso de Mestrado e por sua solicitude em tudo que foi necessário para a efetividade deste trabalho. Agradeço à professora Dr^a. Luiza Dantas pelas idas e vindas dos vários textos nestes anos, pela dedicação a cada leitura, pela paciência em cada correção e por ser responsável pela concretização desta dissertação. Obrigado à Dr^a. Ilanna Campelo, que encurtou a distância física fazendo-se presente em todo o desenrolar do trabalho, desde a ideia inicial até a finalização, sendo fundamental em suas colocações e contribuições. Obrigado ao meu amigo professor Dr. Iranaldo Silva que foi importantíssimo na compreensão do trabalho e, lógico, na descontração constante do ambiente.

Não posso esquecer os meus amigos do Laboratório de Eletroquímica, pelo companheirismo e disposição em ajudar. Em especial, obrigado a Paulina, Elizaura, José Wilian, Flaudiner e Bárbara (LPQA), que diretamente colocaram muito suor, disposição e empenho para que esse trabalho virasse realidade.

RESUMO

A 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona (DCBQ), um subproduto do processo de desinfecção da água, é uma molécula altamente reativa e apresenta um ciclo redox com seus radicais semiquinonas que levam à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas espécies podem causar estresse oxidativo grave dentro de células por meio da formação de macromoléculas, como lipídios oxidados, proteínas e DNA. A compreensão de como isso ocorre é muito complexa e os danos celulares gerados se dão por meio de alquilação de proteínas e/ou DNA. Diante disso, um estudo do comportamento eletroquímico da DCBQ antes e após a sua degradação em solução aquosa sobre eletrodo de carbono vítreo (ECV) e a investigação da DCBQ com DNA, utilizando biossensores eletroquímicos de *dsDNA* (do inglês double stranded Desoxyribonucleic Acid), foram realizados. A DCBQ foi investigada inicialmente por voltametria cíclica (VC), apresentando um processo reversível no intervalo de pH de 3,7 a 12,6. Por voltametria de pulso diferencial (VPD) observou-se que o potencial de pico da DCBQ é dependente do pH da solução até pH 9,2. Após varreduras de potencial sucessivas, observou-se a formação de um produto de oxidação reversivelmente oxidado em um processo dependente do pH até pH 5,4. O comportamento eletroquímico da DCBQ e do seu produto de oxidação foram investigados por VOQ, confirmando, assim, a reversibilidade desses dois processos redox em toda a faixa de pH estudada. Após vários períodos de incubação, em diferentes eletrólitos, a degradação espontânea da DCBQ foi detectada eletroquimicamente pelo decaimento da sua corrente de pico e o aparecimento de um novo pico de oxidação, em potencial menos positivo. A oxidação da DCBQ degradada é um processo reversível e dependente do pH para valores de $3,7 \leq \text{pH} \leq 6,0$. A degradação da DCBQ em solução aquosa foi confirmada por meio de experimentos realizados por espectrofotometria UV-Vis. Utilizando soluções de *dsDNA* incubadas e biossensores eletroquímicos de *dsDNA*, observou-se que a DCBQ e o(s) *pdDCBQ* (produtos de degradação da DCBQ) interagiram com o *dsDNA*, através da liberação das bases Gua e Ade. A interação da DCBQ-*dsDNA* não mostrou nenhum dano oxidativo causado ao DNA pelo(s) produto(s) formados pela DCBQ, visto que a 8-oxoGua/2,8-DHA não foi detectada. Uma metodologia analítica, utilizando microeletrodo de ouro e VOQ foi desenvolvida para a determinação da DCBQ, obtendo-se um intervalo linear de 19,9 a 291,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com limites de detecção e de quantificação de 6,1 e 20,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-chave: 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona, Degradação, Voltametria, DNA.

ABSTRACT

The 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone (DCBQ), a subproduct of the water disinfection process, is a highly reactive molecule and has a redox cycle with its semiquinone radicals that lead to the formation of reactive oxygen species (ROS). These species can cause severe oxidative stress in cells leading to the formation of macromolecules, such as oxidized lipids, proteins and DNA. The induced cell damage occur through alkylation of proteins and/or DNA, moreover understanding how this occurs is very complex. Thus, the study of the electrochemical behaviour of DCBQ before and after degradation in aqueous solution on glassy carbon electrode, as well as the investigation of DCBQ and DNA using dsDNA-electrochemical biosensors were performed. The DCBQ showed a reversible process at pH range from 3.7 to 12.6 when was evaluated by cyclic voltammetry. For differential pulse voltammetry the peak potential of DCBQ was pH-dependent until pH 9.2. After successive scans occurred the formation of a reversible oxidation product in a pH-dependent process to pH 5.4. The electrochemical behaviour of DCBQ and its oxidation products was also investigated by square wave voltammetry. The reversibility of these two redox processes was confirmed in a wide range of pH. By varying incubation time and electrolyte solutions, DCBQ showed spontaneous degradation which was electrochemically detected by the decrease of the current peak and appearance of a new oxidation peak at less positive potential. The oxidation of the degraded DCBQ was a reversible and pH-dependent process in the pH values of $3.7 \leq \text{pH} \leq 6.0$. Moreover, the degradation of DCBQ in aqueous solution was confirmed by UV-Vis spectrophotometry experiments. Using incubated dsDNA solutions and dsDNA-electrochemical biosensors, it was observed that the DCBQ and *pd*DCBQ interacted with the dsDNA, through the release of the bases Gua and Ade. The interaction of DCBQ-dsDNA did not show any oxidative damage to DNA by the product(s) formed by DCBQ, since the 8-oxoGua/2,8-DHA was not detected. An analytical methodology for the determination of DCBQ, using gold microelectrode and square wave voltammetry, was developed in the range of 19.9 to 291.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The detection and quantification limits of 6.1 and 20.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively were detected.

Keywords: 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone; Degradation; Voltammetry; DNA.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Geral	18
2.2. Específicos.....	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1. Contaminantes emergentes (CE)	19
3.1.1. Halobenzoquinonas (HBQs)	19
3.2. Ácido desoxirribonucleico.....	21
3.2.1. Danos ao DNA causados por quinonas	22
3.2.2. Eletroquímica do DNA	24
3.3. Técnicas voltamétricas.....	25
3.3.1. Microeletrodos	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Reagentes e soluções	27
4.2. Instrumentação.....	28
4.2.1. Medidas voltamétricas	28
4.2.2. Medidas espectrofotométricas.....	29
4.2.3. Tratamento dos dados voltamétricos.....	30
4.3. Limpeza da superfície do ECV	30
4.4. Degradação química da DCBQ	30
4.5. Investigação voltamétrica da interação da DCBQ com DNA	30
4.5.1. Preparação das soluções de <i>dsDNA</i> incubadas.....	31
4.5.2. Preparação do biossensor eletroquímico de <i>dsDNA</i> e procedimento de incubação	31
4.6. Construção do microeletrodo de ouro.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1. Comportamento eletroquímico da DCBQ.....	33
5.1.2 Voltametria Cíclica	33
5.1.3. Voltametria de pulso diferencial	35
5.1.4. Voltametria de onda quadrada	38

5.2. Comportamento eletroquímico da DCBQ degradada.....	39
5.2.1. Voltametria Cíclica	39
5.2.2. Voltametria de pulso diferencial	40
5.2.3. Voltametria de onda quadrada	43
5.3. Análise espectrofotométrica da DCBQ	43
5.4. Interação da DCBQ com DNA	45
5.4.1. Avaliação voltamétrica da interação da DCBQ com <i>ds</i> DNA utilizando soluções de <i>ds</i> DNA incubadas.....	45
5.4.2. Avaliação voltamétrica da interação da DCBQ com <i>ds</i> DNA utilizando biossensores de <i>ds</i> DNA	46
6. Metodologia para a determinação da DCBQ	48
6.1. Detecção da DCBQ sobre microeletrodo de Au.....	48
6.2. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada	51
6.2.1. Variação da frequência de aplicação dos pulsos	51
6.2.2. Variação da amplitude de aplicação dos pulsos.....	52
6.2.3. Variação do incremento de potencial.....	53
6.2.4. Curva analítica	54
6.2.5. Limite de detecção (LD) e Limite quantificação (LQ)	55
7. CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona	17
Figura 2. Estrutura do DNA de dupla hélice.....	22
Figura 3. Mecanismo da oxidação da guanina [23].	23
Figura 4. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos sobre um eletrodo de carbono vítreo em solução tampão acetato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 4,5, com: 60 µg mL ⁻¹ de ssDNA (•••) 1 ^a e (—) 10 ^a varredura, e 60 µg mL ⁻¹ de dsDNA (•••) 1 ^a e (—) 40 ^a varredura de potencial [20].	24
Figura 5. (A) Potenciostato AUTOLAB PGSTAT. (B) Célula eletroquímica: (1) Eletrodo de trabalho; (2) Eletrodo auxiliar e (3) Eletrodo de referência.	29
Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos sobre ECV em solução tampão acetato pH 4,5 (A), tampão fosfato pH 7,0 (B) e tampão borato pH 9,2 (C), saturado com N ₂ : (—) na ausência e (—) na presença de DCBQ 1 mmol L ⁻¹ ; v = 50 mV s ⁻¹	34
Figura 7. A) Voltamogramas cíclicos obtidos sobre ECV a partir de uma solução 1 mmol L ⁻¹ de DCBQ em em tampão fosfato pH 7,0, registrados em diferentes valores de velocidade de varredura. B) Relação I_{pa} vs. $v^{1/2}$	35
Figura 8. A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1 ^a varredura obtidos após a adição de uma solução 10 µmol L ⁻¹ de DCBQ ao eletrólito suporte em função do pH. B) Gráfico do (●) E_p e (●) I_p do pico 1a vs. pH.....	36
Figura 9. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução de DCBQ 10 µmol L ⁻¹ em tampão acetato pH 3,7: (—) 1 ^a , (—) 2 ^a e (—) 3 ^a varreduras.....	37
Figura 10. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 2 ^a varredura obtidos após a adição de uma solução 10 µmol L ⁻¹ de DCBQ ao tampão em função do pH. A) gráfico 3D segunda varredura B) Gráfico do (●) E_p e (●) I_p do pico 2 _a vs pH.	38
Figura 11. Voltamogramas de onda quadrada obtidos após a adição de 10 µmol L ⁻¹ de DCBQ ao tampão acetato pH 4,5: (A) 1 ^a e (B) 2 ^a varreduras; I_t – corrente total, I_f – corrente direta, I_b – corrente reversa.....	38
Figura 12. Voltamogramas cíclicos obtidos após 8 dias de incubação de solução de DCBQ 10 µmol L ⁻¹ em tampão acetato pH 3,7: (—) 1 ^a , (—) 2 ^a e (—) 3 ^a varreduras; v = 50 mV s ⁻¹	40
Figura 13. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida obtidos em solução de DCBQ 10 µmol L ⁻¹ em diferentes tempos de incubação em: (A) tampão acetato pH 3,7, (B) tampão fosfato pH 7,0 e (C) tampão borato pH 9,2.....	41

Figura 14. Variação da corrente do pico 1a para 0 h, 24 h, 48 h e 8 dias de incubação em tampão em função do pH, com este variando de 3,7 a 12,6.	42
Figura 15. A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1ª varredura obtidos para uma solução de DCBQ 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão após 8 dias de incubação em função do pH. B) Gráfico da variação do (●) E_p e (●) I_p com o pH para o pico 3a.	42
Figura 16. Voltamogramas de onda quadrada obtidos após 8 dias de incubação de solução de DCBQ 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,4: (—) 1ª varredura; I_t – corrente total, I_f – corrente direta e I_b – corrente inversa.	43
Figura 17. Espectros de absorção UV-Vis em solução de DCBQ 33,2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes tempos de incubação em: (A) tampão acetato pH 4,5 (B) tampão fosfato pH 7,0 e (C) tampão borato pH 9,2.	44
Figura 18. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida em tampão acetato pH 4,5: dsDNA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de controle (—) e incubado com pdDCBQ 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (27 dias de degradação em tampão acetato pH 4,5) durante (—) 10 min, (—) 2 e (—) 8 dias.	46
Figura 19. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida em tampão acetato pH 4,5: biossensor de dsDNA 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de controle (—) e incubado com DCBQ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ durante (—) 10 min, (—) 24h, (—) 48h, (—) 72h e (—) 96h.	47
Figura 20. Voltamogramas de onda quadrada e componentes de corrente para DCBQ 1mmol L^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , em microeletrodo de ouro, com $f = 10 \text{ Hz}$; $a = 50 \text{ mV}$ e incremento de varredura = 5 mV.	49
Figura 21. Voltamogramas de onda quadrada do microeletrodo de Au 15,45 μm de raio obtidos em solução tampão fosfato na presença de DCBQ 1 mmol L^{-1} , com $f = 2 \text{ Hz}$; $a = 50 \text{ mV}$ e incremento de varredura = 6 mV.	50
Figura 22. A) Voltamogramas de onda quadrada obtido com microeletrodo de ouro em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 4,5, na presença de DCBQ 1 mmol L^{-1} , em diferentes frequências, amplitude 50 mV e incremento de varredura 3 mV. B) Gráfico de corrente de pico (I_p) em função da raiz quadrada da frequência de pulsos aplicados.	51
Figura 23. A) Voltamogramas de onda quadrada obtido com microeletrodo de ouro em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH = 4,5, com adição da DCBQ 1 mmol L^{-1} em diferentes amplitudes, frequência 2 Hz e incremento de varredura 3 mV. B) Gráfico da corrente de pico em função da amplitude de pulsos.	52

Figura 24. A) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução DCBQ 1 mmol L^{-1} obtido com microeletrodo de ouro em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$. Frequência 2 Hz e amplitude 50 mV. B) Dependência da corrente de pico da redução da DCBQ com o incremento de potencial de varredura.	53
Figura 25. A) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações da DCBQ sobre microeletrodo de ouro em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} 4,5$) com amplitude= 50 mV, incremento= 6 mV e $f = 2 \text{ Hz}$. B) Curva analítica.	54
Figura 26. A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão fosfato ($\text{pH} = 4,5$) contendo adições sucessivas de $0,253 \text{ mmol L}^{-1}$ da DCBQ, utilizando microeletrodo de Au de $15,45 \text{ }\mu\text{m}$ de raio, com $a = 50 \text{ mV}$, $f = 2 \text{ Hz}$ e incremento = 6 mV e B) Curva de recuperação em eletrólito suporte.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

2,8-DHA	2-8-dihidroxiadenina
8-oxoGua	8-oxoguanina
Ade	Adenina
CBQs	Clorobenzoquinonas
CE	Contaminantes Emergentes
dAdo	Desoxiadenosina
<i>dAdo</i>	Desoxiadenosina
DBBQ	2,6-dibromobenzoquinona
DCBQ	2,6-dicloro-1,4-benzoquinona
DCMQ	2,6-dicloro-3-metil-1,4-benzoquinona
<i>dGua</i>	Desoxiguanosina
dGuo	Desoxiguanosina
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês <i>Desoxyribonucleic Acid</i>)
<i>dsDNA</i>	Ácido desoxirribonucléico de cadeia dupla (do inglês <i>double stranded Desoxyribonucleic Acid</i>)
ECV	Eletrodo de Carbono Vítreo
E_p	Potencial de pico
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
F	Frequência de pulso
Gua	Guanina
HBQs	Halobenzoquinonas

HPLC-MS /MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (do inglês <i>High performance liquid chromatography - mass spectrometry</i>)
I_b	Corrente inversa (do inglês <i>backward current</i>)
I_f	Corrente direta (do inglês <i>forward current</i>)
I_L	Corrente limite
I_p	Corrente de pico
MON	Matéria Orgânica Natural
$pdDCBQ$	Produto(s) de degradação da DCBQ
SPE	Extração em Fase Móvel
SPE- HPLC-MS /MS	Extração em fase sólida-cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massa (do inglês <i>Solid Phase Extraction - High performance liquid chromatography- mass spectrometry</i>)
$ssDNA$	Ácido desoxirribonucléico de cadeia simples (do inglês <i>single stranded Desoxyribonucleic Acid</i>)
TCBQ	2,3,6-tricloro-1,4-benzoquinona
v	Velocidade de varredura
VC	Voltametria Cíclica
VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
VPD	Voltametria de Pulso Diferencial
$W_{1/2}$	Largura do pico à meia altura
ΔE_p	Amplitude de pulso
ΔE_s	Incremento de potencial
ΔE_t	Largura de pulso
T	Tempo

1. INTRODUÇÃO

A necessidade do uso contínuo da água, seja no consumo doméstico ou industrial, torna este bem cada vez mais escasso no que tange principalmente a sua qualidade. Os mananciais dos grandes centros urbanos são o destino final de vários produtos de origem industrial e doméstico que fazem parte do dia-a-dia da população como um todo.

A ação de várias intempéries, como temperatura, luminosidade, matéria orgânica natural (MON), dentre outras, contribuem para que reações químicas nesse meio transformem esses produtos e subprodutos em contaminantes diversos que precisam ser eliminados durante o processo de desinfecção destas águas para o reuso.

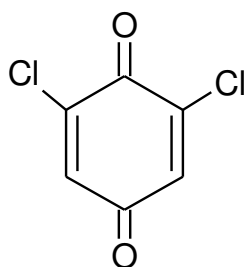
O desenvolvimento econômico de todas as nações está diretamente relacionado ao processo de transformação química dos materiais, e junto com esse progresso, a poluição que se dá devido ao descarte ambientalmente incorreto desses subprodutos químicos, que contribuem para a deterioração do solo, ar e água. Há, portanto, lacunas no que tange ao desenvolvimento de legislações mais exigentes e principalmente uma maior fiscalização com o objetivo de minimizar os danos gerados até o momento e, sobretudo, evitar maiores problemas futuros [1].

Os rejeitos oriundos de indústrias, residências, hospitais e áreas agrícolas, ao entrarem em contato com os constituintes naturais presentes nas águas, sofrem uma série de reações que podem produzir compostos extremamente tóxicos em concentrações substancialmente pequenas (ng L^{-1}), ou seja, estes podem vir a provocar problemas diversos, uma vez que os processos naturais como biodegradação microbiana são ineficazes em suas eliminações [2]. Deve-se, por esse motivo, investir em processos de desinfecção cada vez mais eficientes com o intuito de removê-las [3].

Uma das formas de se evitar a proliferação de doenças através de veiculação hídrica é a desinfecção da água, que é fundamental para inativar patógenos e eliminar possíveis surtos de microrganismos. Porém, esse processo pode contribuir para a formação de subprodutos de desinfecção, através da reação desses desinfetantes (cloro, cloraminas e radiação ultravioleta) com a matéria orgânica natural, em água [4]. Há, nesse processo, formação de um grupo de compostos denominados halobenzoquinonas (HBQs) que se enquadram na categoria de contaminantes emergentes (CE) [5].

Em busca de uma prova direta de que os subprodutos de desinfecção, como clorobenzoquinonas (CBQs), podem causar câncer de bexiga CHEN et [6], com uso de uma espécie bacteriana *E. coli* (Escherichia coli) como modelo, confirmaram que esses contaminantes, tais como 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona (DCBQ), Figura 1, causaram lesões oxidativas no DNA e morte celular desta bactéria.

Figura 1. Estrutura química da 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona



Os estudos encontrados na literatura para a determinação das HBQs em meio aquoso e suas consequências em organismos vivos são frequentemente espectrofotométricos e cromatográficos, devido, principalmente, às baixas concentrações (ng L^{-1}) destas em água e a sua elevada eficiência na identificação e quantificação [2,3,4,7]. O método cromatográfico, geralmente, leva muito tempo para uma única análise, devido aos processos de pré-tratamento da amostra e separação antes da detecção do sinal analítico [8].

Tendo em vista a existência de outros métodos tidos como não convencionais, este trabalho fará uso de métodos eletroquímicos, que se vale de uma vasta gama de eletrodos que nos possibilitam sensibilidade, seletividade, simplicidade, custo moderado e possibilidade de miniaturização do método na identificação de diversos analitos [9].

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Estudar o comportamento eletroquímico da 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona (DCBQ) em meio aquoso, bem como a sua interação com DNA, além da obtenção de uma nova metodologia analítica para determinação desse contaminante.

2.2. Específicos

- ✓ Investigar as propriedades redox da 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona sobre eletrodo de carbono vítreo (ECV), em eletrólito suporte em diferentes valores de pH, utilizando voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (VOQ) e voltametria de pulso diferencial (VPD);
- ✓ Investigar a degradação química da DCBQ nos diferentes meios estudados, utilizando VC, VPD e VOQ;
- ✓ Verificar a degradação espontânea da DCBQ em solução aquosa por espectrofotometria UV-Vis;
- ✓ Desenvolver e caracterizar os biossensores eletroquímicos de DNA, utilizando VPD;
- ✓ Investigar a interação da DCBQ com DNA utilizando os biossensores eletroquímicos de DNA e em soluções de *dsDNA* incubadas;
- ✓ Investigar os mecanismos causadores dos danos oxidativos durante a interação;
- ✓ Desenvolver uma metodologia analítica para determinação de DCBQ, utilizando VOQ;
- ✓ Otimizar os parâmetros experimentais e voltamétricos, a fim de obter as melhores figuras de mérito.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Contaminantes emergentes (CE)

O uso de áreas naturais para fins urbanos e industriais está cada vez maior, juntamente com o aumento populacional urbano. Em 2030, estima-se que 60% da população mundial viverá em área urbana e isso gerará um impacto drástico nos ecossistemas e bacias hidrográficas [10].

Os estudos ambientais acerca dos CE têm crescido ao longo dos anos. Estes contaminantes podem ser definidos como uma substância ou um microrganismo no qual a ocorrência deu-se recentemente e, portanto, muitos dos seus efeitos ainda são incertos. A escassez de estudos mais detalhados sobre esse tema, no que tange a determinação do seu grau de interação com o meio ambiente, provocou na comunidade científica interesse na sua determinação e catalogação, dividindo-os em classes. Algumas das classes investigadas são os fármacos, os produtos de higiene pessoal, os plastificantes e os agrotóxicos [11].

A presença destas substâncias no meio ambiente propicia uma série de efeitos tais como: desenvolvimento de microrganismos resistentes a antibióticos, mudança na reprodução e padrões migratórios de peixes devido à presença de compostos estrogênicos, além de não se conhecer os efeitos biológicos de misturas de micropoluentes complexos [12].

Os diversos produtos de origem antropogênica, proporcionam desafios substanciais, talvez insuperáveis para sua regulação e controle, tendo em vista a rapidez com que novas drogas e compostos bioativos são produzidos, seus mecanismos de ação são novos para sistemas biológicos, o que torna o impacto ao meio ambiente incerto [13]. O problema dos CE é, portanto, a falta de conhecimento a médio ou longo prazo, tanto na saúde humana, quanto no ambiente terrestre e aquático [14]. Isto constitui um problema de saúde pública, uma vez que esses compostos (CE) foram encontrados em sistemas de abastecimento de água potável [12].

3.1.1. Halobenzoquinonas (HBQs)

A citotoxicidade e genotoxicidade das HBQs têm sido extensivamente estudadas e apresentam um complexo mecanismo de ação [7,15]. Derivados de quinonas podem ser

tóxicos às células por diferentes mecanismos, incluindo o ciclo redox, alquilação, indução de quebras nas fitas do DNA e geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) [15,16,17]. As ERO (superóxido, peróxido de hidrogênio, etc.) podem ser formadas por meio do radical semiquinona, um subproduto da reação redox das quinonas [15].

DU *et al.* [7] estudaram quatro HBQs, 2,6-dicloro-1,4-benzoquinona (DCBQ), 2,6-dicloro-3-metil-1,4-benzoquinona (DCMBQ), 2,3,6-tricloro-1,4-benzoquinona (TCBQ) e 2,6-dibromobenzoquinona (DBBQ), que recentemente foram confirmadas como subprodutos de desinfecção, na água potável. A DCBQ foi encontrada em 100% dos sistemas analisados por DU *et al.* [7]. O estudo sugeriu que estes contaminantes são citotóxicos para células e essa toxicidade é, em parte, devido ao estresse oxidativo relacionado à formação de espécies reativas de oxigênio (ERO).

QIN *et al.* [4], ao estudarem um conjunto de HBQs, dentre elas a DCBQ, comprovaram que em águas não tratadas este contaminante não estava presente, e que após o uso de processos de desinfecção, como cloração, cloraminas e irradiação UV nas estações de tratamento, este contaminante era gerado, tornando-se, portanto, um subproduto de desinfecção de água. Estes resultados são extremamente relevantes, uma vez que a exposição à DCBQ está associada a casos de câncer de bexiga [4,7].

Com o desenvolvimento de técnicas mais sensíveis, como a extração em fase sólida (SPE, do inglês Solid Phase Extraction) e cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC/MS), ficou mais evidente a presença desses compostos oriundos do processo de desinfecção da água. KOSAKA *et al.* [18] discorrem acerca de pesquisas feitas nos EUA, Canadá, Japão, dentre outros, que comprovam que a DCBQ está presente na água potável. Estudos sugerem vários precursores que levam a formação da DCBQ após a cloração, tais como, fenol, bisfenol A, produtos de higiene pessoal (loções corporais e protetores solares), além de aminas, que comprovam a formação desses compostos a partir da matéria orgânica natural (MON) [18].

WANG *et al.* [19] utilizaram a extração em fase sólida (SPE) com cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS) para analisar água de piscina, que precisa ser clorada para ser utilizada. Perceberam que após a adição do agente comercial contendo hipoclorito de sódio para o tratamento da água da piscina, a concentração de DCBQ aumentou com o tempo até atingir um valor máximo em 36h. Houve, portanto, a detecção de concentrações de DCBQ de $3,1 \pm 1,9 \text{ ng L}^{-1}$ antes da cloração e de $26,6 \pm 3,4$ a $299,0 \pm 7,1 \text{ ng L}^{-1}$ após a cloração.

QIN *et al.* [4] por espectrometria de massa com ionização por “electrospray” detectou a presença da DCBQ em águas após tratamento de desinfecção em concentrações de 14,3-54,6 ng L⁻¹. Para tanto, foi feito um processo de pré-concentração a partir de amostras de água por extração em fase sólida, com o objetivo de melhorar os limites de detecção, que possibilitou encontrar a DCBQ em água potável clorada.

WANG *et al.* [3] estudaram possíveis precursores de HBQs em efluentes antes das etapas de tratamento utilizando a metodologia de extração em fase sólida (SPE) e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) e encontraram a DCBQ em concentrações de 16 a 205 ng.L⁻¹. Nenhum dos métodos utilizados, tais como, coagulação de carbono orgânico dissolvido, carvão ativado e ozonização são suficientes para provocar a redução nos precursores de HBQs, visto que após suas aplicações, ainda foi possível detectá-las.

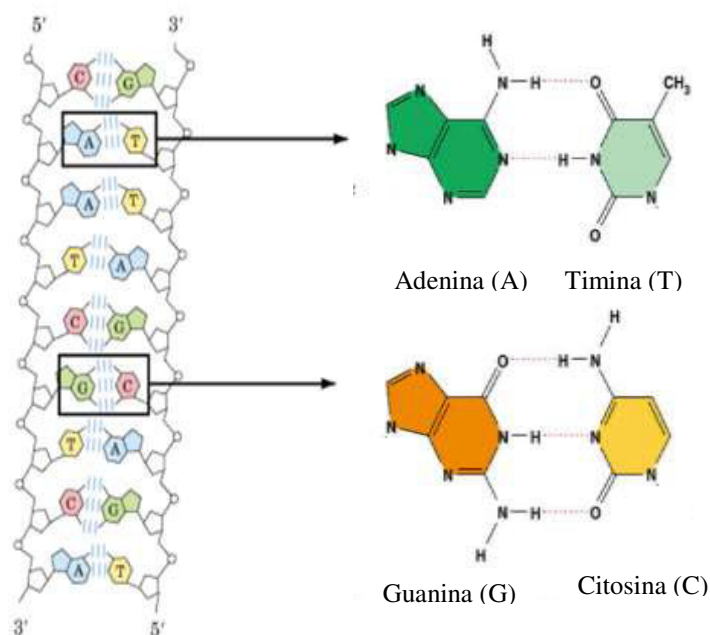
3.2. Ácido desoxirribonucleico

O ácido desoxirribonucleico (do inglês *Desoxyribonucleic Acid* - DNA) é a molécula responsável pela transmissão de características hereditárias através do armazenamento de informações que são necessárias para a replicação de organismos vivos [20]. Este pode se apresentar como DNA de cadeia simples (*ssDNA*) ou DNA de cadeia dupla (*dsDNA*).

O DNA fita dupla apresenta uma estrutura, Figura 2, com duas cadeias polinucleotídicas antiparalelas. Estas, são formadas por unidades nucleotídicas monoméricas, sendo cada nucleotídeo composto por três componentes químicos: um grupo fosfato, um açúcar que é a desoxirribose e uma base nitrogenada [20].

A estrutura da cadeia do DNA é formada por grupos fosfatos e pentoses que estão unidos alternadamente por ligações fosfodiéster, enquanto que as cadeias de dupla hélice são mantidas juntas por ligações de hidrogênio entre os pares de bases adenina (A) – timina (T) e guanina (G) – citosina (C). São essas bases que transportam a informação genética e o açúcar juntamente com o grupo fosfato que definem a estrutura molecular da cadeia [21].

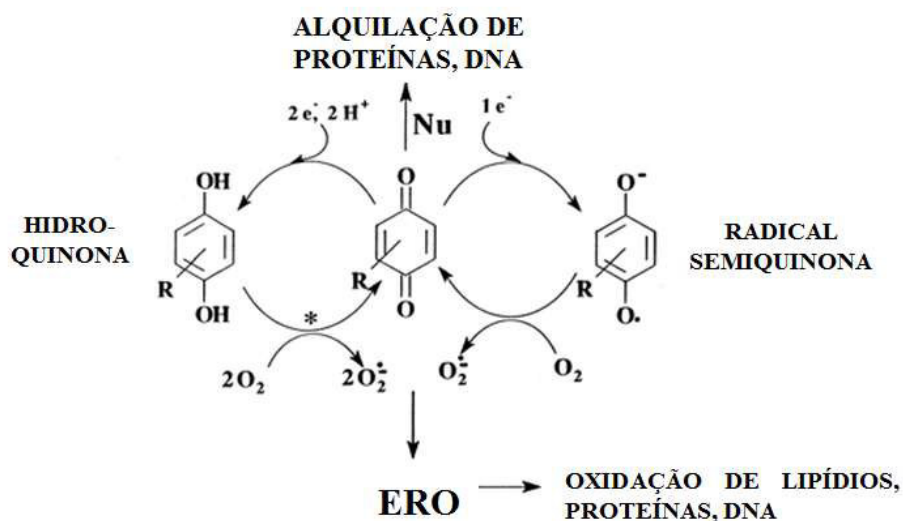
Figura 2. Estrutura do DNA de dupla hélice.



3.2.1. Danos ao DNA causados por quinonas

As quinonas quando estudadas, farmacologicamente, demonstraram propriedades microbicidas, antitumorais, dentre outras, atuando de diversas formas, destacando-se o estresse oxidativo que provocam, ao induzirem a formações de ERO, Esquema 1 [22].

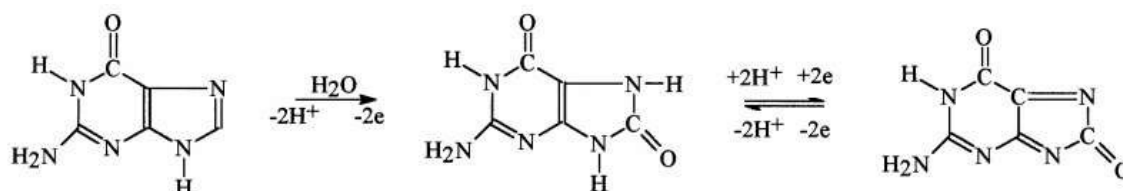
Esquema 1. Formação de ERO por quinonas [15].



Os danos oxidativos, causados por ERO, por exemplo, causam mutação nas bases do DNA, devido às múltiplas modificações que este pode sofrer, como por exemplo, a

oxidação de bases. A base mais facilmente oxidada é a guanina, que tem como principal produto de oxidação a 8-oxoguanina (8-oxoGua), essa base ao sofrer essa oxidação leva a um pareamento errôneo (Figura 3). Essa modificação química nas bases do DNA causa perturbação molecular à maquinaria genética que leva ao mau funcionamento das células [20].

Figura 3. Mecanismo da oxidação da guanina [23].



Uma das formas de investigar a interação de moléculas com DNA é a voltametria de pulso diferencial, que detecta alterações conformacionais e danos oxidativos no DNA. Esta técnica consegue detectar a 8-oxoGua, produto da oxidação da guanina, e a 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA), que é o produto de oxidação da adenina, funcionando dessa forma como biomarcadores de lesões oxidativas ao DNA. A mutagênese ocorre devido ao emparelhamento incorreto das bases pirimidínicas durante a replicação do DNA [24].

Os mecanismos de ação para toxicidade da DCBQ, ainda são muito pouco compreendidos. Estudos feitos *in vivo* por ZUO *et al* [25] mostram evidências de que a DCBQ provoca danos ao DNA. Uma das técnicas utilizadas foi LA-QPCR (do inglês, Long amplicon quantitative PCR assay), que detecta qualquer lesão no DNA, tais como quebra ou formação de adutos no DNA de cadeia simples. O ensaio de cometa, também já foi usado pra comprovar que a DCBQ induziu ao dano no DNA de *C. elegans*, que são células embrionárias, que foram cultivadas *in vitro*.

Os efeitos tóxicos da exposição da DCBQ ao corpo humano, organismo com um maior nível de organização biológica, ainda não é completamente entendido. Há a necessidade de se fazer vários outros estudos, para se avaliar quais os reais efeitos sobre a saúde humana, no entanto, não se deve descartar a possibilidade de efeitos tóxicos, genotóxicos e carcinogênicos provocados pela exposição a longo prazo de tal produto químico [25].

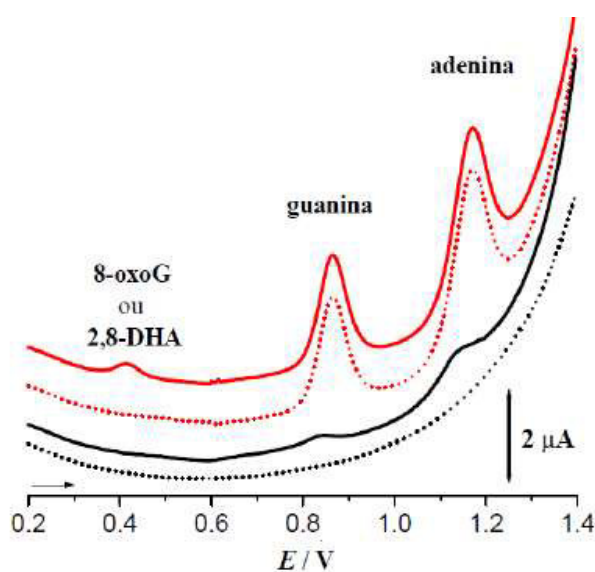
3.2.2. Eletroquímica do DNA

3.2.2.1. Propriedades eletroquímicas do DNA

Para determinação da interação específica do DNA, são analisados os picos de oxidação eletroquímica de seus componentes: nucleotídeos, nucleosídeos, bases purínicas e pirimidínicas, que são usados como sinal biológico [24].

Durante a oxidação eletroquímica do DNA sobre eletrodo de carbono vítreo (ECV) notam-se dois picos de oxidação, que correspondem, respectivamente, a oxidação de resíduos da guanina (+ 0,85 V) e a adenina, Figura 4 (+ 1,15 V) [20,21,26]. Esses picos de oxidação podem ser usados como sondas dos pares de bases G – C e A – T, da dupla hélice do DNA [27].

Figura 4. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos sobre um eletrodo de carbono vítreo em solução tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 4,5, com: 60 µg mL⁻¹ de ssDNA (•••) 1^a e (—) 10^a varredura, e 60 µg mL⁻¹ de dsDNA (•••) 1^a e (—) 40^a varredura de potencial [20].



As técnicas eletroquímicas propiciaram a análise estrutural dos ácidos nucleicos e sua determinação em baixas concentrações. Uma vasta quantidade de compostos pode interagir com os ácidos nucleicos, levando a alterações na estrutura do DNA, na inserção das bases durante a replicação e alterações químicas nestas, gerando com isso mutações [23].

A Figura 4, mostra uma diferença nos sinais analíticos correspondentes ao ssDNA (forma mais flexível) e ao dsDNA (forma mais rígida) devido a uma maior dificuldade de transferência de carga dos grupos adenina e guanina que se encontram no interior da dupla

hélice do *dsDNA* que do *ssDNA*, exatamente devido a diferença de suas formas, ou seja, no *ssDNA* a adenina e guanina se encontram nas proximidades da superfície do eletrodo, e isso propicia uma maior corrente de oxidação dessas bases [26].

Os picos decorrentes da oxidação eletroquímica dos componentes do DNA, Figura 4, que são biomarcadores de lesões oxidativas do DNA, encontraram nos transdutores de carbono, que possui uma extensa janela positiva de potencial, uma elevada sensibilidade na detecção das interações específicas do DNA, ao monitorar os picos de oxidação de suas bases [24]. Essa resposta eletroquímica, nos permite concluir se o analito interagiu com o DNA e, ainda, se houve formação da 8-oxoGua ou 2,8-DHA, que é responsável pelo dano ao DNA [24].

3.2.2.2 *Biossensores eletroquímicos de DNA*

A utilização de eletrodos modificados com DNA é extremamente vantajosa, devido ao estudo de mecanismos de interação de compostos com DNA, a modificação se dá por meio de ligações covalentes ou por adsorção, podendo ser modificados eletrodos de ouro, mercúrio, grafite, pasta de carbono e carbono vítreo [23].

Um biossensor eletroquímico de DNA é um eletrodo que apresenta o DNA imobilizado na sua superfície, que serve de reconhecimento molecular, onde os diferentes agentes químicos ao interagirem com o DNA em sua superfície, provocam alterações que podem ser detectadas [28]. A explicação da interação entre o agente químico e o DNA por métodos eletroquímicos se dá através da análise do comportamento deste agente, na ausência e presença do DNA [29].

É essencial, portanto, para garantir uma estabilidade, acessibilidade, reatividade e orientação do filme de DNA, ter um excelente controle sobre a cobertura da superfície do eletrodo, com o objetivo de evitar eventos não específicos de ligação e ou adsorção, logo, um biossensor eletroquímico de DNA, precisa dos seguintes requisitos, uma elevada especificidade e sensibilidade [30].

3.3. **Técnicas voltamétricas**

Esse conjunto de técnicas vem sendo bastante utilizado nas mais diversas áreas, tais como, medicina, bioquímica, biologia molecular, química ambiental, físico-química, dentre

outras. Tais técnicas nos fornecem informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias, além de estudos de processos de oxidação e redução em diversos meios, de adsorção em superfícies e de mecanismo de transferência de elétrons [31]. Essas técnicas nos fornecem informações decorrentes do monitoramento da corrente que flui em uma célula eletroquímica, após aplicação de um potencial a um eletrodo [32].

São técnicas que nos possibilitam o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica, como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga e, devido a isso, podem ser utilizadas na quantificação de espécies de interesse nas diferentes áreas de estudo. Além disso, são técnicas que não precisam de pré-purificação ou separação prévia da amostra, ou seja, a análise é feita diretamente nela, independentemente de apresentar partículas sólidas dispersas ou materiais coloridos [31,33].

As informações obtidas sobre o analito decorrem da medida da intensidade da corrente elétrica que surge entre os eletrodos de trabalho e auxiliar, quando se aplica uma diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e de referência [34].

3.3.1. Microeletrodos

Microeletrodos são eletrodos que apresentam dimensões micrométricas. Alguns, como Pt, Au e carbono vítreo, podem ser adquiridos comercialmente, porém o custo benefício se torna inviável para atividades rotineiras. Devido a isso, há uma necessidade crescente no desenvolvimento de técnicas para sua construção e caracterização [35].

Estes dispositivos podem ser fabricados de forma isolada ou na forma de arranjos, possibilitando, com isso, várias configurações, tais como, disco, anel, arranjo de disco, cilíndricos, dentre outras. Desta forma a definição de “microeletrodo” de maneira mais ampla, determina que este seja qualquer eletrodo cuja dimensão em uma dada condição experimental, seja menor ou mesmo comparável a da camada de difusão. Sob essas condições, torna-se possível obter um perfil de estado estacionário ou pseudo estado estacionário (microeletrodos cilíndricos). Isto, possibilita, obtenção de um comportamento eletroquímico diferenciado, ou seja, os voltamogramas apresentaram perfil signoidal referente ao estado estacionário [36].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e soluções

Os eletrólitos suporte com diferentes valores de pH foram preparados com reagentes de pureza analítica, conforme Tabela 1, assim como os demais reagentes que esse trabalho fez uso.

Tabela 1. Reagentes e procedência dos reagentes utilizados.

Reagentes	Fórmula química	Procedência
Cloreto de potássio	KCl	Merck
Etanol (96%)	C ₂ H ₆ O	Emsure
2,6-dicloro-1,4-benzoquinona	C ₆ H ₂ Cl ₂ O ₂	Sigma
Ácido acético	CH ₃ COOH	Isofar
Acetato de sódio	CH ₃ COONa	Isofar
Fosfato dissódico	Na ₂ HPO ₄	Isofar
Fosfato monossódico	NaH ₂ PO ₄	Isofar
Borato de sódio	Na ₂ B ₄ O ₇	Isofar
Hidróxido de sódio	NaOH	Isofar
Ácido clorídrico	HCl	Vetec
Ácido desoxirribonucleico de sódio sal de timo de bezerro	<i>ds</i> DNA	Sigma-Adrich
Ferricianeto de Potássio	K ₃ [Fe(CN) ₆]	Merck
Ácido Fosfórico	H ₃ PO ₄	Merck

Soluções estoque de DCBQ 1 mmol L⁻¹ foram preparadas em etanol e mantidas à 4°C para posterior utilização. Estas foram preparadas diariamente a fim de evitar o processo de degradação.

As soluções utilizadas como eletrólitos suporte, na concentração 1,0 mol L⁻¹, foram as seguintes: tampão acetato pH's 3,7-5,3, tampão fosfato pH's 6,0-10,6, tampão borato pH's 9,2 e 9,7, e solução de KCl + NaOH pH 12,6. Estas soluções foram preparadas

utilizando reagentes de grau analítico e água deionizada obtida pelo sistema Millipore Milli-Q System, Millipore S.A., Molsheim, França (condutividade $\leq 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$). A medida do pH das soluções foi realizada por meio de um pH-metro 827 pH lab, Metrohm Swiss Made, equipado com eletrodo de vidro.

A solução padrão de *dsDNA* foi preparada pela dissolução de aproximadamente 1,7 mg em 5 mL de água deionizada. Manteve-se esta solução por 24 h a uma temperatura de 4 °C para garantir a homogeneização e evitar a sua degradação. Após esse período, sua concentração real foi determinada por espectrofotometria UV-Vis, por meio da multiplicação da absorbância encontrada, experimentalmente, pelo fator de conversão ($1 \text{u } A_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de *dsDNA*) [37]. As concentrações específicas utilizadas durante as medidas voltamétricas estão referidas no texto.

Antes de cada medida eletroquímica, as soluções foram saturadas com gás nitrogênio (N_2) (White Martins) durante 10 min. No decorrer das varreduras o fluxo de gás N_2 foi mantido sobre a superfície da solução para evitar a presença de oxigênio sobre a mesma.

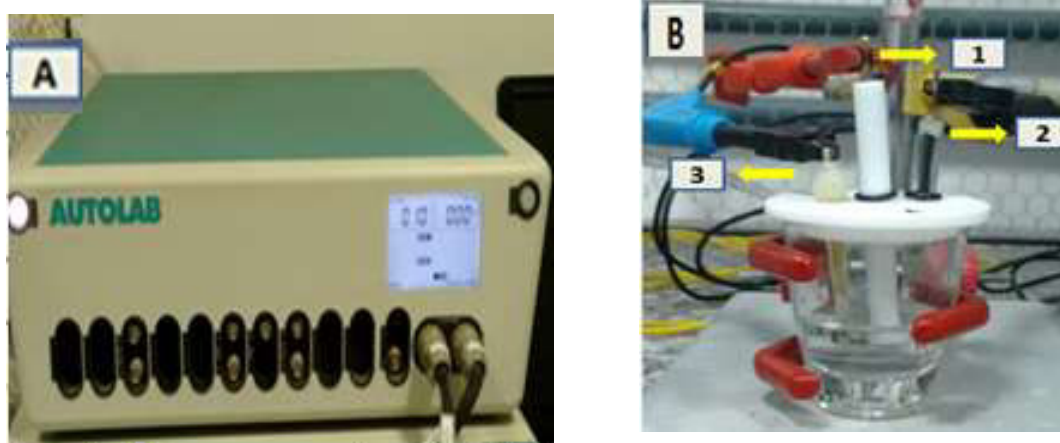
Todos os experimentos foram realizados a 25 °C.

4.2. Instrumentação

4.2.1. Medidas voltamétricas

Todas as medidas voltamétricas foram realizadas em um Potenciostato Autolab PGSTAT 302N, Metrohm, Figura 5A, acoplado a um computador com o *Software* GPES (General Purpose Electrochemical System), versão 4.9. Para os estudos, utilizou-se uma célula eletroquímica de compartimento único com capacidade de 10 mL, Figura 5B. O eletrodo de carbono vítreo (ECV, $\Phi = 3 \text{ mm}$) foi utilizado como eletrodo de trabalho, o de referência foi um de $\text{Ag/AgCl/KCl}_{\text{sat}}$ e Pt como eletrodo auxiliar. Para as medidas utilizando microeletrodo de ouro, fez-se uso do Potenciostato Ivium-n-Stat.

Figura 5. (A) Potenciostato AUTOLAB PGSTAT. (B) Célula eletroquímica: (1) Eletrodo de trabalho; (2) Eletrodo auxiliar e (3) Eletrodo de referência.



A Tabela 2 mostra os parâmetros experimentais utilizados nos estudos voltamétricos [38].

Tabela 2. Parâmetros experimentais utilizados nos estudos voltamétricos.

Técnica	Parâmetros	Especificações
VC	Incremento de potencial (ΔE_s)	3mV
	Velocidade de varredura (ν)	50 mV s ⁻¹
VPD	Largura do pulso (ΔE_t)	70 ms
	Amplitude de pulso (ΔE_p)	50 mV
	Velocidade de varredura (ν)	5 mVs ⁻¹
VOQ	Frequência (f)	50 Hz
	Incremento de potencial (ΔE_s)	2 mV
	Amplitude de pulso (ΔE_p)	50 mV
	Velocidade de varredura efetiva (ν_{ef})	100 mV s ⁻¹

4.2.2. Medidas espectrofotométricas

As medidas espectrofotométricas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (Orion AquaMate 8000). Todos os espectros para o estudo da DCBQ, a fim de verificar o processo de degradação, foram registrados numa faixa compreendida entre 200 e 800 nm em uma cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico.

4.2.3. Tratamento dos dados voltamétricos

Após as medidas voltamétricas de pulso diferencial foi realizado um tratamento matemático para correção da linha de base com a função *moving average* com um *step window* de 2 mV. Esta função está disponível no *software* GPES versão 4.9.

Este tratamento nos voltamogramas teve como finalidade melhorar a visualização e identificação dos picos em relação à linha de base sem qualquer artefato. Isso nos permitiu obter valores de corrente de pico a partir dos voltamogramas originais.

4.3. Limpeza da superfície do ECV

O polimento da superfície do eletrodo foi realizado utilizando um papel de filtro (gramatura 80 g m⁻²) umedecido com spray de diamante (tamanho da partícula = 1 µm) da Kemet International Ltd, UK. Em seguida, o eletrodo foi lavado com água deionizada a fim de remover qualquer resíduo. Após o polimento, medidas voltamétricas foram realizadas para condicionar a sua superfície.

4.4. Degradação química da DCBQ

A degradação espontânea da DCBQ em solução aquosa foi investigada por técnicas voltamétricas (VC, VPD e VOQ) e espectrofotométrica (UV-Vis).

As soluções de DCBQ, preparadas em diferentes eletrólitos de suporte, utilizadas nos experimentos eletroquímicos iniciais, foram incubadas em diferentes tempos (0 h, 24 h, 48 h e 8 dias) e as medidas registradas. Após cada medida voltamétrica, as soluções foram armazenadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Para verificar a degradação da DCBQ em meio aquoso foi feito um estudo espectrofotométrico nos mesmos tempos do estudo acima.

4.5. Investigação voltamétrica da interação da DCBQ com DNA

A interação entre a DCBQ e o *dsDNA* foi investigada em função do tempo de incubação por meio de soluções de *dsDNA* incubadas e biossensores eletroquímicos de *dsDNA*, utilizando um ECV e a VPD.

4.5.1. Preparação das soluções de *dsDNA* incubadas

Soluções de *dsDNA* $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (previamente preparada em água) diluída em tampão acetato pH 4,5 foram incubadas com soluções DCBQ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ (degradada por 27 dias em tampão acetato pH 4,5) por diferentes tempos de incubação. Os voltamogramas foram registrados diretamente em solução sobre ECV, previamente limpo e condicionado.

Soluções de *dsDNA* de controle foram preparadas, armazenadas e analisadas seguindo as mesmas etapas descritas acima e nos mesmos tempos de incubação para a interação DCBQ-*dsDNA*, porém na ausência do contaminante.

4.5.2. Preparação do biossensor eletroquímico de *dsDNA* e procedimento de incubação

O biossensor eletroquímico de *dsDNA* foi preparado por meio da deposição, na superfície do ECV, previamente limpa e condicionada, de $10 \mu\text{L}$ de uma solução de *dsDNA* $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (previamente preparada em água) diluída em tampão acetato pH 4,5. Após a secagem dessa primeira camada, o mesmo procedimento foi repetido três vezes. Esse processo de imobilização gera uma cobertura completa e uniforme da superfície do ECV, de modo que os picos obtidos se devem apenas às modificações estruturais do *dsDNA* e não pela adsorção não-específica do contaminante.

Após a modificação, o eletrodo foi lavado com água deionizada e imerso numa solução de DCBQ $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ (recentemente preparada e/ou degradada em tampão acetato pH 4,5) por diferentes tempos de incubação. Em seguida, o eletrodo foi retirado da solução, lavado com água deionizada para remover as moléculas de DCBQ não ligadas/adsorvidas e transferido para a célula eletroquímica contendo apenas tampão acetato pH 4,5, onde os voltamogramas de pulso diferencial foram registrados. Para cada tempo de incubação estudado um novo biossensor eletroquímico de *dsDNA* foi preparado.

Biossensores de *dsDNA* de controle foram preparados e analisados seguindo as mesmas etapas descritas acima e nos mesmos tempos de incubação para a interação DCBQ-*dsDNA*, porém na ausência do analito.

4.6. Construção do microeletrodo de ouro

Uma fibra de ouro com diâmetro de $25 \mu\text{m}$ foi conectada a um fio Ni/Cr através de

cola de prata (PC-9145). Esta fibra foi posicionada no centro, dentro da pipeta de Pasteur. Em seguida, o fio Ni/Cr foi fixado com parafilme para garantir sua imobilização no interior da pipeta.

Para finalizar o processo, a pipeta foi colocada em posição horizontal, para garantir maior estabilidade do sistema e melhor posicionamento da fibra, sobre o maçarico e rotacionada levemente até que todo o vidro fosse fechado. Após essa etapa foi feito o polimento do eletrodo para expor a superfície da fibra [36].

A resposta eletroquímica dos microeletrodos foi avaliada e registrada, por meio de voltamogramas cíclicos, para a espécie eletroativa $K_3[Fe(CN)_6]$, o qual possui comportamento bem definido e reversível [39].

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Comportamento eletroquímico da DCBQ

O comportamento eletroquímico da DCBQ foi investigado sobre um ECV em vários eletrólitos suporte com diferentes valores de pH, utilizando as técnicas de voltametria cíclica (VC), voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ).

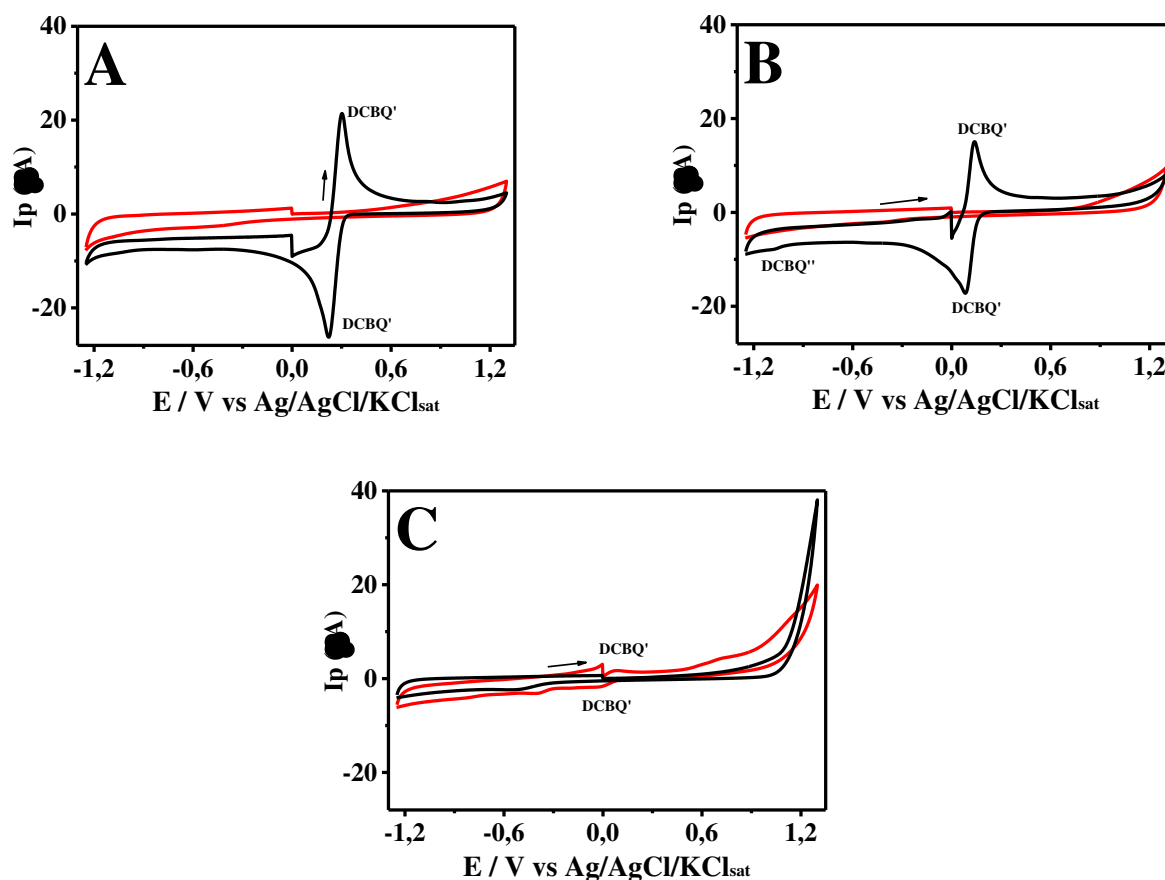
5.1.2 Voltametria Cíclica

Na Figura 6 está ilustrado o perfil voltamétrico da solução de DCBQ 1 mmol L^{-1} em solução tampão, saturada com gás N_2 , a uma velocidade de 50 mV s^{-1} . Os voltamogramas foram registrados com potencial de varredura iniciando em $0,00 \text{ V}$ entre um limite positivo de $+ 1,30 \text{ V}$ e finalizada em $- 1,25 \text{ V}$, verificando-se o aparecimento de um pico anódico reversível (DCBQ') para os pH's 4,5, 7,0 e 9,2. A Figura 6A apresenta apenas o pico anódico reversível (DCBQ'). Na Figura 6B (pH 7,0) verificou-se, além do pico anódico reversível, um pico catódico irreversível (DCBQ''). A Figura 6C ainda apresenta dois outros picos em potenciais próximos de $+ 0,72 \text{ V}$ e $- 0,40 \text{ V}$, que podem ser provenientes de processo de degradação extremamente acentuado que ocorre em pH 9,2.

Observa-se na Figura 6 a diminuição nas correntes de pico redox (DCBQ') com a diminuição da concentração hidrogeniônica do meio, indicando que o comportamento voltamétrico é influenciado pelo pH da solução [40]. Em solução aquosa o processo de redução da DCBQ é favorecido em meio ácido, levando à conversão da benzoquinona à hidroquinona [4].

O efeito da velocidade de varredura sobre a corrente de pico anódico foi estudada em uma solução recém-preparada de DCBQ 1 mmol L^{-1} em tampão fosfato pH 7,0, Figura 7. As leituras foram feitas em diferentes velocidades de varredura (25 a 500 mV s^{-1}). Entre uma medida e outra, o ECV foi sempre polido, para que pudéssemos garantir a limpeza da superfície do eletrodo, com o objetivo de evitar problemas de adsorção da DCBQ e/ou de seus produtos não eletroativos.

Figura 6. Voltamogramas cíclicos obtidos sobre ECV em solução tampão acetato pH 4,5 (A), tampão fosfato pH 7,0 (B) e tampão borato pH 9,2 (C), saturado com N₂: (—) na ausência e (—) na presença de DCBQ 1 mmol L⁻¹; v = 50 mV s⁻¹.



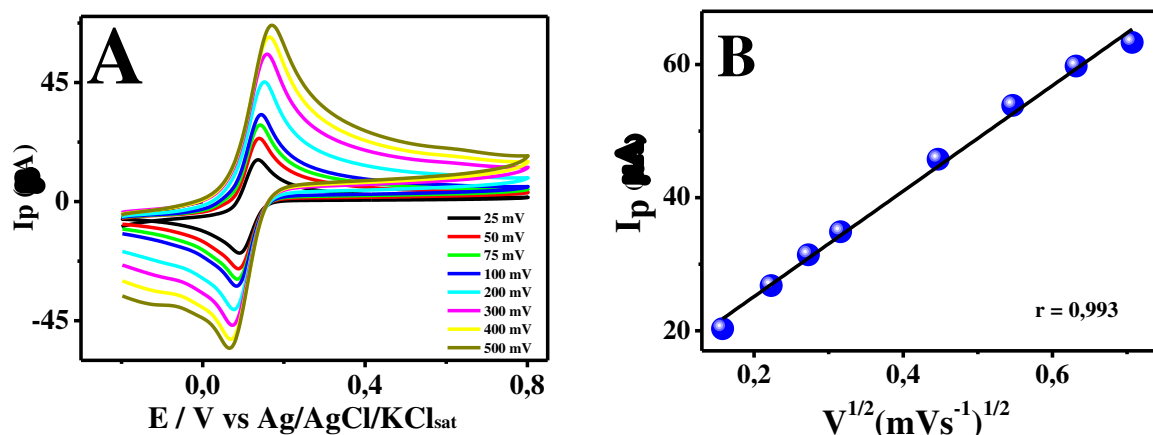
Com o aumento da velocidade de varredura houve o deslocamento do pico anódico para potenciais mais positivos, assim como o aumento da corrente de pico (Figura 7A). Há também uma dependência linear da corrente de pico anódico com a raiz quadrada da velocidade de varredura, Figura 7B, mostrando que esse processo de oxirredução é controlado por difusão [41].

A corrente de pico em ampéres para um sistema reversível controlado por difusão é dada pela equação de Randles-Sevcik (Equação 1):

$$I_{pa} \text{ (A)} = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A [\text{DCBQ}] D_{\text{DCBQ}}^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação 1}$$

onde, I_{pa} é a intensidade de corrente de pico, n é o número de elétrons transferidos no processo de oxirredução, A é a área da superfície do eletrodo, D é o coeficiente de difusão, C é a concentração das espécies no seio da solução e v é a velocidade de varredura.

Figura 7. A) Voltamogramas cíclicos obtidos sobre ECV a partir de uma solução 1 mmol L⁻¹ de DCBQ em tampão fosfato pH 7,0, registrados em diferentes valores de velocidade de varredura. B) Relação I_{pa} vs. $v^{1/2}$.



Considerando o valor encontrado para a inclinação da reta (Figura 7B) de $7,92 \times 10^{-5}$ A/V s⁻¹, o número de elétrons transferidos durante a oxirredução da DCBQ ($n = 2$), a área do eletrodo ($2,965 \times 10^{-2}$ cm²), concentração da solução de DCBQ em mmol L⁻¹ e a velocidade de varredura em V s⁻¹, foi possível calcular o D_{DCBQ} em tampão fosfato pH 7,0, obtendo-se um coeficiente de difusão de $1,232 \times 10^{-5}$ cm² s⁻¹, valor este, maior que o encontrado na literatura para a benzoquinona ($4,60 \times 10^{-6}$ cm² s⁻¹) que é uma molécula semelhante à DCBQ [42]. Isto pode ser justificado devido as reações eletroquímicas serem mais lentas em superfícies de carbono que em eletrodos metálicos, ou seja, a cinética de transferência de elétrons depende da estrutura e preparação da superfície do eletrodo. Na superfície do carbono, a transferência de elétrons tem maior dificuldade, logo as reações de oxido-redução são mais lentas [43].

Devido a forte adsorção da DCBQ na superfície do ECV, esse eletrodo não foi utilizado para determinação do número de elétrons envolvido no processo de oxirredução da DCBQ. Para esse estudo fizemos opção de utilizar microeletrodo de ouro que não sofre passivação durante as adições do analito.

5.1.3. Voltametria de pulso diferencial

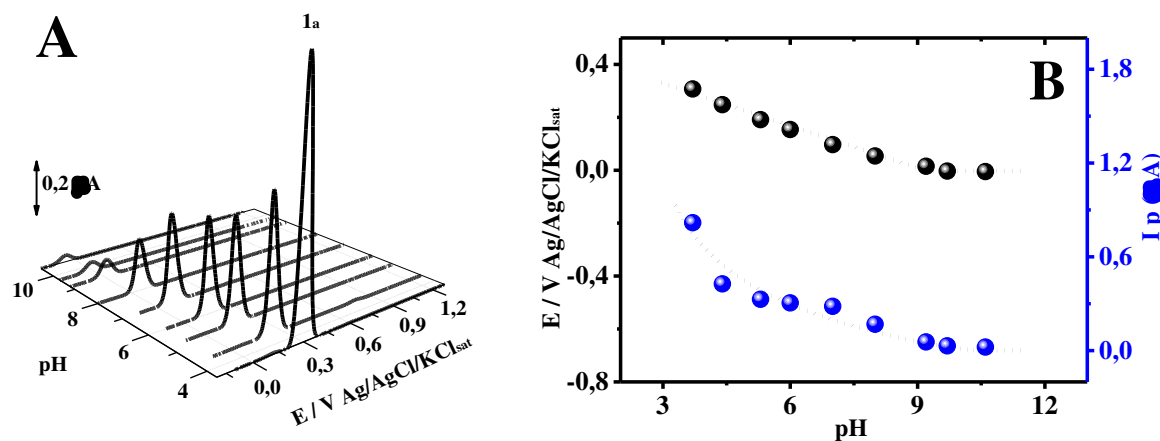
A partir do estudo do comportamento eletroquímico da DCBQ, feito por meio da voltametria cíclica, percebeu-se que houve oxidação eletroquímica em um processo reversível em todos os pH's estudados. Foi escolhido um intervalo de potencial que

compreende o pico principal 1_a (DCBQ^{•-}), que se refere à oxidação da 2,6-diclorobenzeno-1,4-diol, que é o par redox da DCBQ.

A voltametria de pulso diferencial (VPD) foi utilizada com o objetivo de investigar a influência do pH para o potencial de oxidação do pico 1_a. Para tanto, se fez um estudo em uma vasta escala de pH que variou de 3,7 a 12,6. As soluções recém-preparadas de DCBQ 10 μmol L⁻¹ em diferentes eletrólitos de suporte foram utilizadas para obtenção dos voltamogramas.

Os voltamogramas apresentados na Figura 8A correspondem a primeira varredura de potencial registrados após a adição da DCBQ em cada solução tampão. A Figura 8B mostra que o potencial de oxidação do pico 1_a é dependente do pH até pH 9,2. Ao avaliar o comportamento da corrente de pico em função do pH, foi observado um máximo de corrente de pico em pH 3,7, e em relação ao E_{p1a} , houve deslocamento para valores mais negativos com o aumento do pH do meio, comportamento este, que é típico de processos onde ocorre prévia protonação da espécie [44].

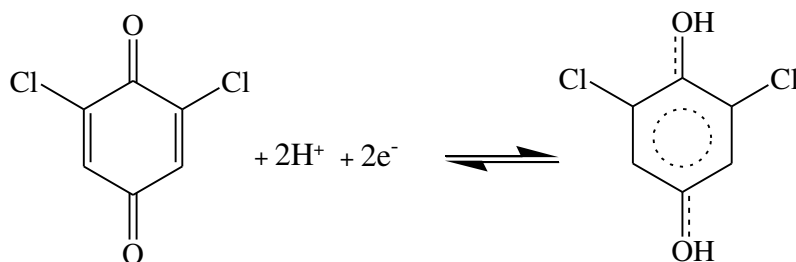
Figura 8. A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1ª varredura obtidos após a adição de uma solução 10 μmol L⁻¹ de DCBQ ao eletrólito suporte em função do pH. B) Gráfico do (●) E_p e (●) I_p do pico 1a vs. pH.



A relação linear E_{p1a} vs. pH mostrou uma inclinação de $-52,8$ mV por unidade de pH, indicando que o mecanismo de oxirredução da DCBQ envolve a transferência de igual número de prótons e elétrons [44,45].

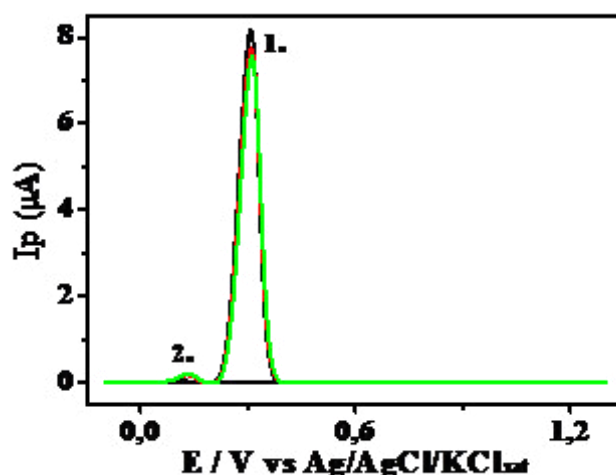
QIN *et al.* [4] propuseram o mecanismo de oxirredução da DCBQ de acordo com o Esquema 1.

Esquema 2. Adaptado de QIN, F. *et al.* [4].



Voltamogramas sucessivos foram registrados em cada solução tampão, sem efetuar a limpeza da superfície do eletrodo, e mostraram que a corrente do pico 1_a decresce com o aumento do número de varreduras, como pode ser observado na Figura 9 que corresponde oxidação de DCBQ em solução tampão pH 3,7 após três varreduras sucessivas. Este fenômeno ocorre devido à adsorção da DCBQ e/ou de seus produtos de oxidação não eletroativos, o que resulta na diminuição da área eletroativa disponível na superfície do eletrodo [46].

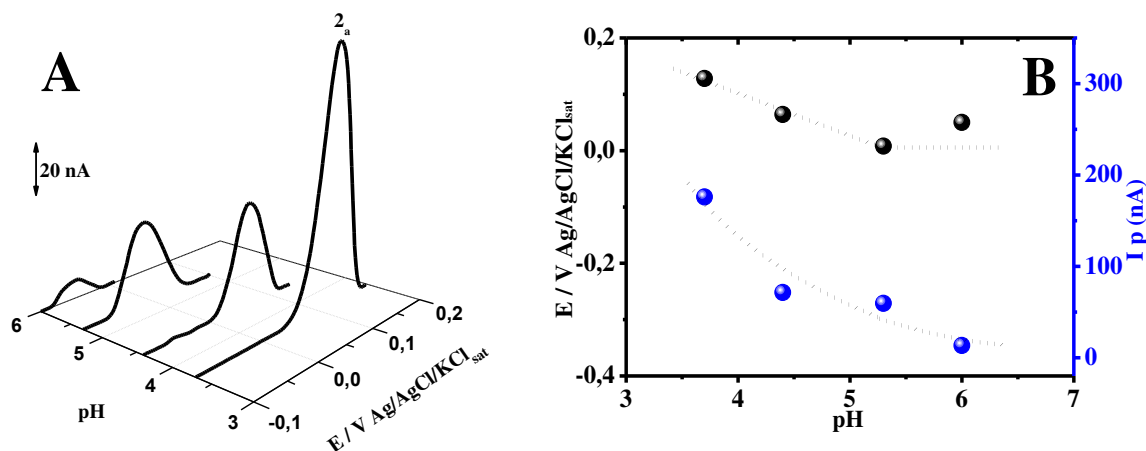
Figura 9. Voltamogramas de pulso diferencial obtidos em solução de DCBQ 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,7: (—) 1^a, (—) 2^a e (—) 3^a varreduras.



Em pH's ácidos, após varreduras sucessivas, observou-se a formação de um produto de oxidação pico 2_a, (Figura 9) reversivelmente oxidado em um processo dependente do pH até pH 5,4, Figura 10A. Ao avaliar o comportamento da corrente de pico em função do pH, assim como para o pico 1_a foi observado um máximo de corrente de pico em pH 3,7, para o pico 2_a e em relação ao E_{p2a} , houve deslocamento para valores mais negativos com o aumento do pH do meio.

A inclinação da reta de -74 mV por unidade de pH obtida indica a perda igualitária de prótons e elétrons para esse processo de oxidação, Figura 10B [45]. Para $\text{pH} > 5,4$, o potencial do pico 2_a tornou-se constante com o aumento do pH do meio.

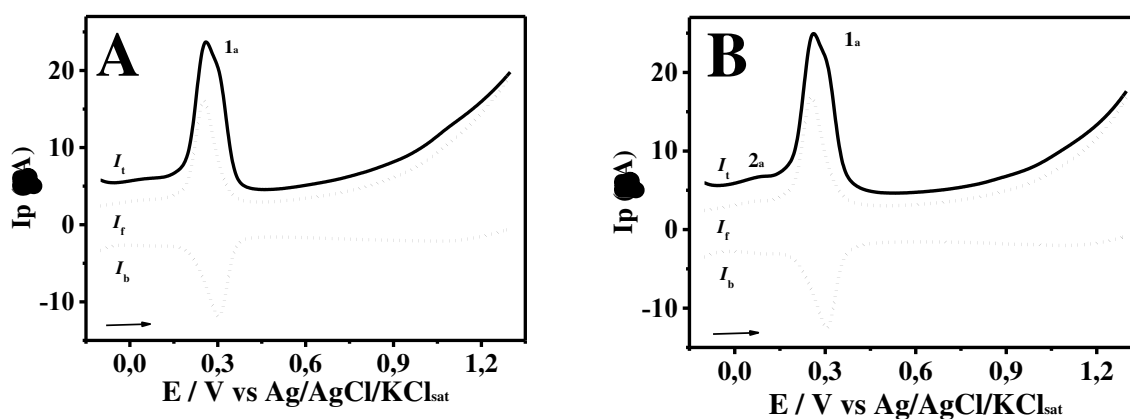
Figura 10. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 2ª varredura obtidos após a adição de uma solução $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCBQ ao tampão em função do pH. A) gráfico 3D segunda varredura B) Gráfico do (●) E_p e (●) I_p do pico 2_a vs pH.



5.1.4. Voltametria de onda quadrada

Voltamogramas de onda quadrada foram registrados em uma solução de DCBQ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ após sua adição ao tampão acetato pH 4,5. O pico 1_a , que é o pico de oxirredução da DCBQ, está situado $E_{p1a} = + 0,25 \text{ V}$, Figura 11A. A reversibilidade dessa reação foi confirmada pela obtenção das componentes de corrente direta e reversa da corrente total, onde as componentes direta e inversa para a DCBQ mostraram o mesmo valor de potencial e mesma intensidade de corrente. Esse comportamento é similar ao obtido em VC.

Figura 11. Voltamogramas de onda quadrada obtidos após a adição de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DCBQ ao tampão acetato pH 4,5: (A) 1ª e (B) 2ª varreduras; I_t – corrente total, I_f – corrente direta, I_b – corrente reversa.



A oxirredução da DCBQ (pico 1_a) em solução tampão acetato pH 4,5 gera um produto de oxidação (pico 2_a), que se forma após varreduras sucessivas, conforme

apresentado na Figura 9 e Figura 11B. O pico 2_a, observado a partir da segunda varredura de potencial, apresenta potencial de pico em +0,09 V, Figura 11B. As componentes de corrente direta e reversa do pico 2_a indicam que é um processo redox reversível.

O comportamento eletroquímico da DCBQ e de seu produto de oxidação foram investigados por voltametria de onda quadrada. Os voltamogramas confirmaram a reversibilidade desses dois processos redox em todos os valores de pH estudados (pH's 3,0 a 6,0).

5.2. Comportamento eletroquímico da DCBQ degradada

A fim de verificar a ocorrência da degradação espontânea da DCBQ em solução aquosa, as mesmas soluções de DCBQ analisadas inicialmente em diferentes eletrólitos suporte foram incubadas e mantidas ao abrigo da luz por vários períodos de tempo. Após a incubação por tempos determinados, essas soluções foram novamente analisadas e verificou-se a diminuição da intensidade da corrente do pico 1_a e o aparecimento de um novo pico de oxidação em um valor de potencial menor. Esse fenômeno é atribuído ao processo de degradação da DCBQ em solução, com formação homogênea de produto(s) de degradação (*pd*DCBQ) eletroativo(s).

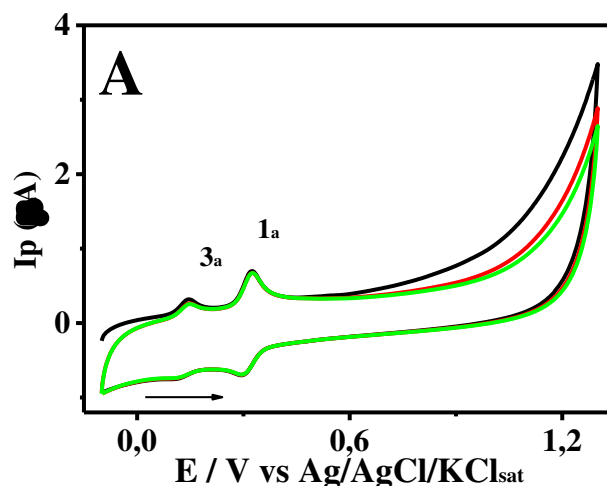
Assim, o comportamento eletroquímico de oxirredução da DCBQ degradada foi investigado em vários eletrólitos de suporte, utilizando VC, VPD e VOQ.

5.2.1. Voltametria Cíclica

A oxidação eletroquímica da DCBQ degradada em solução foi inicialmente investigada por VC. Os voltamogramas cíclicos foram registrados em uma solução de DCBQ 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,7 após 8 dias de incubação, Figura 12. No voltamograma registrado no sentido positivo da primeira varredura, o pico 1_a ocorreu em $E_{p1a} = + 0,33 \text{ V}$ e um novo pico anódico, pico 3_a, surgiu em $E_{p3a} = + 0,14 \text{ V}$, correspondendo à oxirredução do(s) *pd*DCBQ formado(s) em solução. Ao mudar a direção da primeira varredura para o sentido inverso, dois picos catódicos foram detectados, indicando que a oxirredução da DCBQ e do(s) *pd*DCBQ são processos reversíveis. As varreduras sucessivas obtidas na mesma solução, sem a limpeza da superfície do eletrodo, não detectaram o aparecimento de nenhum novo pico. Porém, mostraram uma diminuição

nas correntes dos picos 1_a e 3_a , devido à adsorção da DCBQ, do(s) *pd*DCBQ e/ou de seus produtos de oxirredução na superfície do eletrodo.

Figura 12. Voltamogramas cíclicos obtidos após 8 dias de incubação de solução de DCBQ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 3,7: (—) 1^a , (—) 2^a e (—) 3^a varreduras; $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.



5.2.2. Voltametria de pulso diferencial

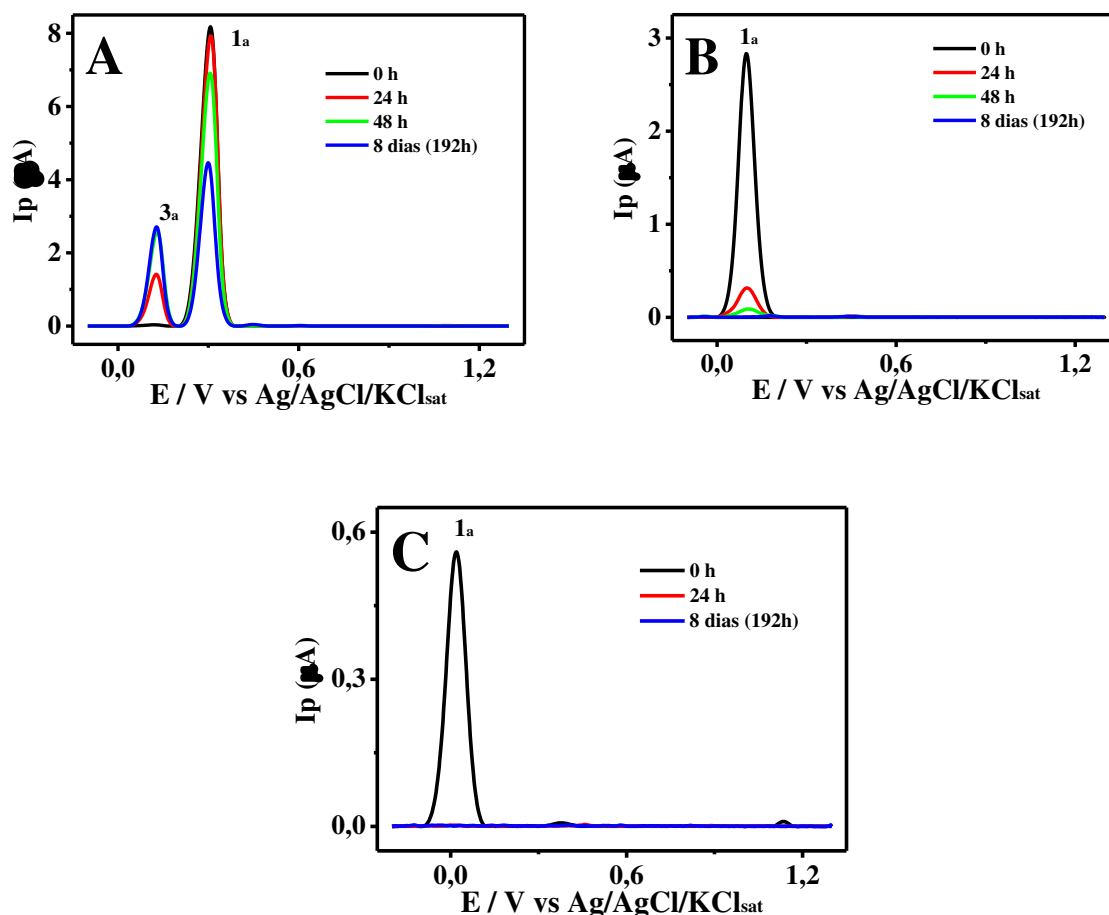
O comportamento de oxidação eletroquímica da DCBQ degradada em solução foi investigado por VPD em uma ampla faixa de pH, que variou de 3,7 a 12,6. Os voltamogramas foram registrados em soluções de DCBQ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes eletrólitos suporte, após 24 h, 48 h e 8 dias de incubação.

Os voltamogramas obtidos para a DCBQ em tampão acetato pH 3,7 após 24 h de incubação mostraram o pico 1_a , em $E_{p1a} = +0,31 \text{ V}$, e o pico 3_a , em $E_{p3a} = +0,13 \text{ V}$, Figura 13A. Houve uma pequena redução da intensidade de corrente do pico 1_a , comparada com a corrente obtida após a adição da solução de DCBQ ao tampão, Figura 13A. O ligeiro decréscimo da corrente do pico 1_a com o tempo de incubação corresponde ao decréscimo da concentração da DCBQ, atribuído à degradação desse composto, que em solução aquosa gera produto(s) de degradação. Simultaneamente, a corrente do pico 3_a aumentou com o aumento do tempo de incubação, indicando um aumento da concentração dos *pd*DCBQ formados em solução. Comportamento semelhante foi observado apenas em soluções tampão com $3,7 \leq \text{pH} \leq 6,0$, visto que nos demais pH's o pico 3_a não apareceu.

As Figura 13B e 12C, correspondentes às soluções em pH 7,0 e 9,2 respectivamente, mostram a diminuição do pico 1_a com o aumento do tempo de incubação.

No entanto, não foi possível observar o aparecimento de outro processo redox, que é provavelmente devido á formação de compostos não eletroativos da DCBQ.

Figura 13. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida obtidos em solução de DCBQ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes tempos de incubação em: (A) tampão acetato pH 3,7, (B) tampão fosfato pH 7,0 e (C) tampão borato pH 9,2.



A diminuição da intensidade e desaparecimento da corrente do pico 1_a com o aumento do tempo de incubação foi mais acentuada em meios neutro e básicos, Figura 14. Esses dados indicam que possivelmente o processo de degradação/decomposição da DCBQ é mais acentuado em meio básico.

A fim de verificar a influência do pH no potencial de oxirredução do pico 3_a , voltamogramas de pulso diferencial foram registrados a partir de uma solução de DCBQ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubada por 8 dias em eletrólitos suporte com diferentes valores de pH, Figura 15.

Figura 14. Variação da corrente do pico 1a para 0 h, 24 h, 48 h e 8 dias de incubação em função do pH em solução tampão, com este variando de 3,7 a 12,6.

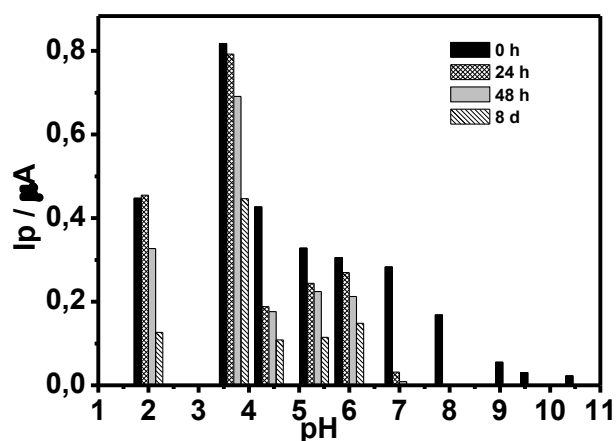
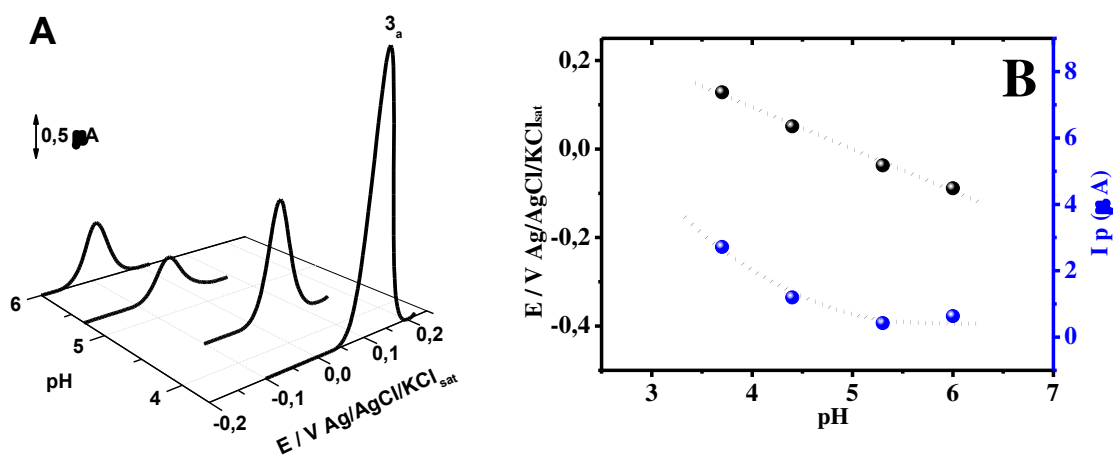


Figura 15. A) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida da 1ª varredura obtidos para uma solução de DCBQ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão após 8 dias de incubação em função do pH. B) Gráfico da variação do (●) E_p e (●) I_p com o pH para o pico 3a.



Na primeira varredura, o pico 3_a apareceu apenas em tampões acetato, $3,7 \leq \text{pH} \leq 6,0$, Figura 15A. O potencial do pico 3_a foi deslocado para valores menos positivos com o aumento do pH. A relação linear E_{p3a} vs. pH mostrou uma inclinação de $-94,8 \text{ mV}$ por unidade de pH, indicando que o mecanismo de oxidação para essa reação envolve o mesmo número de elétrons e prótons [45]. Levando em consideração o valor encontrado de $W_{1/2} \approx 52 \text{ mV}$, o processo de oxidação do(s) *pd*DCBQ ocorre com a perda de dois elétrons e dois prótons.

A intensidade da corrente do pico 3_a decresce à medida que o pH aumenta, mostrando um máximo de corrente em pH 3,7, Figura 15B.

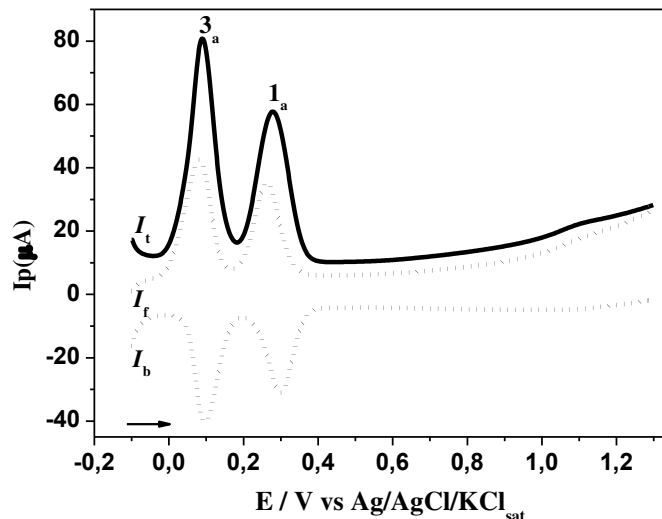
5.2.3. Voltametria de onda quadrada

A oxirredução eletroquímica da DCBQ degradada/decomposta foi investigada por VOQ, a fim de verificar o comportamento do(s) seu(s) produto(s) de degradação/decomposição quanto à reversibilidade. Voltamogramas foram registrados a partir de uma solução de DCBQ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ incubada por 8 dias em tampões acetato $3,7 \leq \text{pH} \leq 6,0$.

A primeira varredura obtida em tampão acetato pH 4,5 mostrou o pico 3_a , em $E_{p3a} = + 0,09 \text{ V}$, Figura 16. Através das componentes direta e inversa da corrente total foi confirmada a reversibilidade desse processo, visto que as componentes direta e inversa ocorreram no mesmo potencial e com a mesma intensidade de corrente, constatando, assim como por VC, a reversibilidade da reação de oxirredução do(s) *pd*DCBQ.

Comportamento semelhante em relação à reversibilidade para o pico 3_a foi verificado nos outros pH's estudados.

Figura 16. Voltamogramas de onda quadrada obtidos após 8 dias de incubação de solução de DCBQ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão acetato pH 4,4: (—) 1ª varredura; I_t – corrente total, I_f – corrente direta e I_b – corrente inversa.

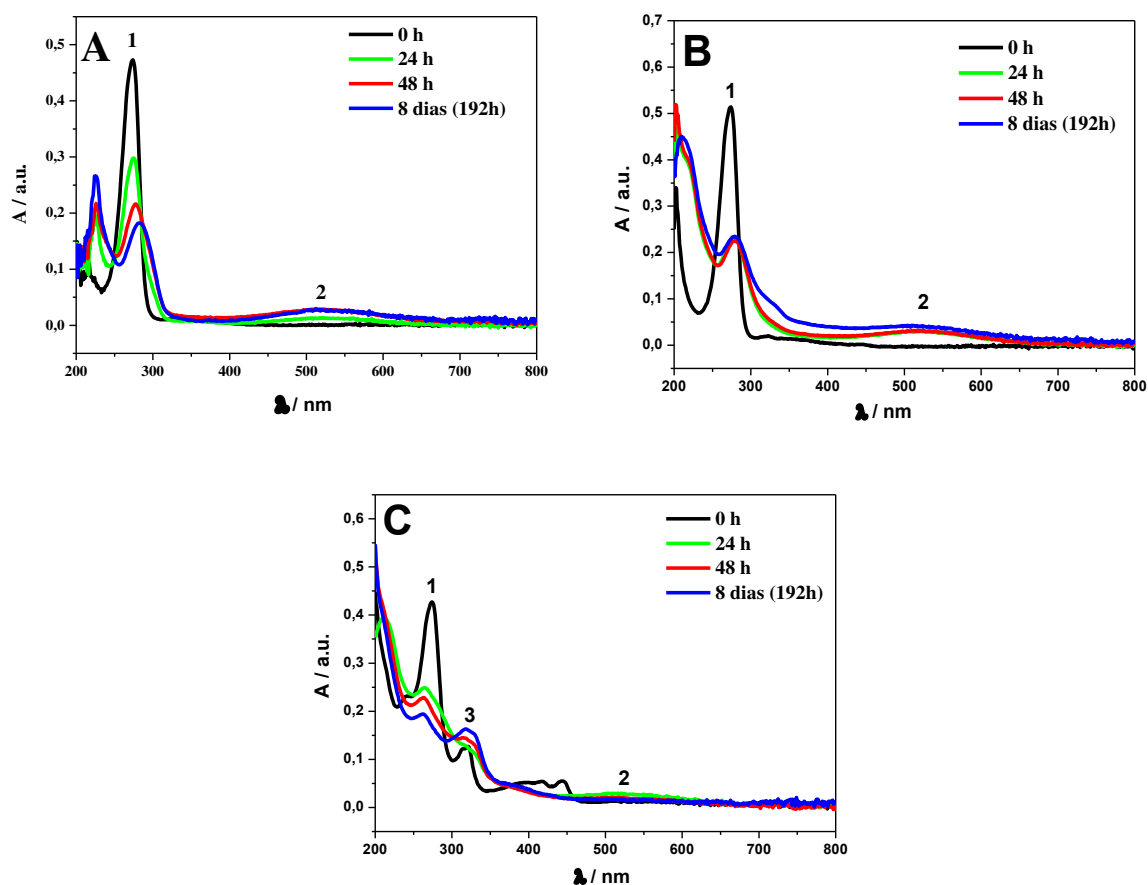


5.3. Análise espectrofotométrica da DCBQ

Medidas espectrofotométricas foram realizadas para complementar e confirmar os estudos voltamétricos de degradação/decomposição da DCBQ. Espectros de absorção UV-Vis foram registrados em soluções de DCBQ $33,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ recentemente preparadas em eletrólitos suporte com diferentes valores de pH e após incubação por 24 h, 48 h e 8 dias.

O espectro de absorção de uma solução de DCBQ recentemente preparada em tampão acetato pH 4,5 mostrou apenas uma banda, com máximo de absorção em $\lambda = 272$ nm (banda 1), referente à DCBQ, Figura 17A, que também foi obtido por Franzen *et al.* [47]. Após 24 h de incubação no tampão, uma nova banda apareceu, com máximo de absorção em $\lambda = 519$ nm (banda 2) e simultaneamente foi constatada a diminuição da banda 1. Após 48 h e 8 dias de incubação houve uma diminuição sucessiva da banda 1 e simultaneamente um aumento progressivo da banda 2, indicando que a DCBQ se degrada ao(s) produto(s) responsáveis pela banda 2 com o aumento do tempo de incubação, Figura 17A.

Figura 17. Espectros de absorção UV-Vis em solução de DCBQ $33,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ em diferentes tempos de incubação em: (A) tampão acetato pH 4,5 (B) tampão fosfato pH 7,0 e (C) tampão borato pH 9,2.



Comportamento semelhante para a degradação da DCBQ e formação de seu(s) produto(s) foi observado em tampão fosfato pH 7,0 e tampão borato pH 9,2, Figura 17B e 16C. No entanto, em pH 9,2, percebeu-se a formação de uma outra banda (banda 3), que pode ser atribuído a um maior processo de degradação neste meio [4], gerando espécies que não são eletroativas, logo não foram detectadas por meio das técnicas eletroquímicas.

Os experimentos espectrofotométricos aqui apresentados confirmam a ocorrência da degradação/decomposição da DCBQ observada pelas técnicas voltamétricas e mostram que o processo de degradação desse contaminante em solução aquosa é mais acentuado em meio básico.

5.4. Interação da DCBQ com DNA

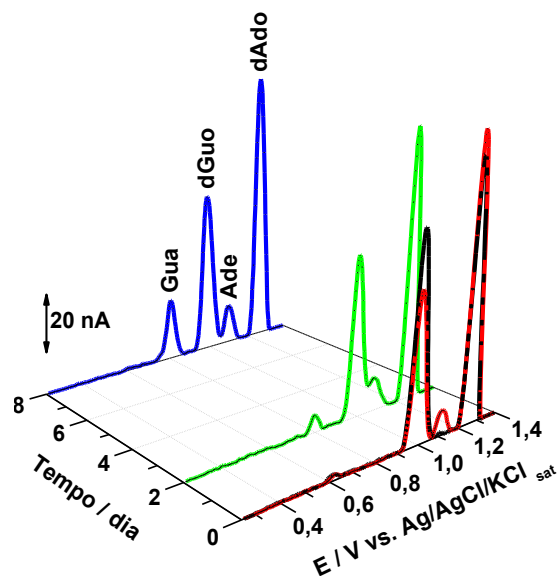
A fim de investigar o mecanismo de ação da DCBQ e do(s) seu(s) produto(s) de degradação/decomposição na indução de mudanças conformacionais no DNA, clivagem de ligações de hidrogênio e/ou danos oxidativos ao DNA, um estudo da interação entre *dsDNA* e DCBQ ou *pdDCBQ* foi realizado utilizando VPD.

Os efeitos da interação entre DCBQ-*dsDNA* e *pdDCBQ*-*dsDNA* foram avaliados comparando as alterações na intensidade de corrente dos picos de oxidação característicos do DNA - as bases purínicas desoxiguanosina (*dGuo*), $E_{pa}^1 \approx +1,05$ V, e desoxiadenosina (*dAdo*), $E_{pa}^2 \approx +1,30$ V [21] com as soluções de *dsDNA* de controle e os biossensores de *dsDNA* de controle, e monitorando o aparecimento dos produtos de oxidação da guanina, 8-oxoguanina (8-oxoGua), e/ou adenina, 2,8-dihidroxiadenina (2,8-DHA), onde ambos os picos ocorrem em $E_{pa} \approx +0,45$ V [48,38], cuja ocorrência é uma indicação de danos oxidativos nas bases do DNA. Além disso, a evidência de uma interação específica entre os resíduos de *dGuo* e *dAdo* também é verificada eletroquimicamente pelo aparecimento de guanina livre (Gua), em $E_{pa} \approx +0,85$ V, e adenina livre (Ade) em $E_{pa} \approx +1,15$ V [49]. Os picos de oxidação de guanina e adenina correspondem à oxidação do carbono C1' da desoxirribose que provoca a libertação das bases [24].

5.4.1. Avaliação voltamétrica da interação da DCBQ com *dsDNA* utilizando soluções de *dsDNA* incubadas

Para o estudo inicial da interação entre os produtos de degradação da DCBQ (*pdDCBQ*) e o *dsDNA* em soluções incubadas de *dsDNA*, os experimentos foram realizados utilizando soluções de *dsDNA* $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ incubadas com DCBQ $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ degradada (27 dias de degradação em tampão acetato pH 4,5) em diferentes períodos de tempo (10 min, 2 e 8 dias), com a utilização de ECV, Figura 18.

Figura 18. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida em tampão acetato pH 4,5: *dsDNA* 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de controle (—) e incubado com *pdDCBQ* 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (27 dias de degradação em tampão acetato pH 4,5) durante (—) 10 min, (—) 2 e (—) 8 dias.



O voltamograma obtido para a interação *pdDCBQ-dsDNA* após 10 min de incubação na solução de *pdDCBQ* mostrou que a intensidade de corrente dos picos de *dsDNA* permaneceu constante, quando comparado com a solução *dsDNA* de controle, Figura 18. Além disso, um novo pico de oxidação foi detectado em $E_{pa} = + 1,12$ V. Esse pico é atribuído à oxidação da Ade libertada da dupla hélice do *dsDNA* pelo contaminante. Os picos do *dsDNA* permaneceram constantes. Após 2 dias de incubação, um novo pico anódico apareceu, em $E_{pa} = + 0,81$ V, referente à oxidação da Gua libertada. Após 8 dias de incubação, os picos do *dsDNA* permaneceram constantes, porém a corrente dos picos da Gua e Ade aumentaram devido ao aumento da concentração dessas bases livres com o aumento do tempo de interação.

Sob as condições experimentais estudadas, observa-se que não houve dano oxidativo no *dsDNA* causado pelo(s) produto(s) de degradação da DCBQ.

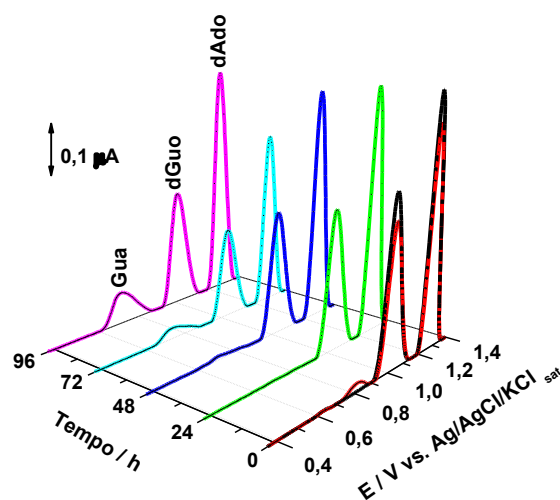
5.4.2. Avaliação voltamétrica da interação da DCBQ com *dsDNA* utilizando biossensores de *dsDNA*

O estudo da interação entre DCBQ e *dsDNA* foi realizado através da imersão do biossensor eletroquímico de *dsDNA*, previamente preparado, numa solução recém-preparada de DCBQ 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e incubado durante 10 min, 24h, 48h, 72h e 96h. Após a incubação, o biossensor foi lavado com água deionizada, assegurando desse modo a

remoção de moléculas não ligadas ao *dsDNA* e, em seguida, transferido para o tampão acetato pH 4,5, onde os voltamogramas foram registrados. Os biossensores de *dsDNA* de controle também foram preparados e analisados. Teve-se como objetivo assegurar que as mudanças observadas nos voltamogramas dos biossensores na presença de DCBQ foram de fato decorrentes da interação da DCBQ-*dsDNA* com o passar do tempo.

Os voltamogramas registrados para o biossensor de *dsDNA* de controle em tampão acetato pH 4,5 mostraram dois picos anódicos, em $E_{pa}^1 = + 1,00$ V e $E_{pa}^2 = + 1,26$ V, referentes à *dGuo* e *dAdo*, respectivamente, Figura 19.

Figura 19. Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida em tampão acetato pH 4,5: biossensor de *dsDNA* $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de controle (—) e incubado com DCBQ $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ durante (—) 10 min, (—) 24h, (—) 48h, (—) 72h e (—) 96h.



Os voltamogramas com os biossensores de *dsDNA* incubados em soluções de DCBQ apresentaram três picos de oxidação, Figura 19, mostrando que a DCBQ interage com o *dsDNA*. Após 10 minutos, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h de incubação de um novo biossensor de *dsDNA* na solução de DCBQ $50 \mu\text{mol L}^{-1}$, observou-se que a intensidade de corrente dos picos do *dsDNA* permaneceu constante, em comparação com os picos do *dsDNA* de controle, Figura 19. Um novo pico de oxidação em $E_{pa} = + 0,81$ V, referente à oxidação da Gua libertada do *dsDNA* pelo contaminante, apareceu após 48 h de interação. Após esse tempo a intensidade de corrente desse pico aumentou indicando um aumento na formação da Gua livre em solução.

Após o período de incubação estudado, não foi detectado nenhum pico em $E_{pa} = + 0,45$ V, referente à aos biomarcadores 8-oxoGua e/ou 2,8-DHA, Figura 19. Isto indica que não houve dano oxidativo ao *dsDNA* provocado pela DCBQ nas condições experimentais estudadas.

Sob as condições experimentais estudadas, observa-se que a DCBQ e o(s) seu(s) produto(s) de degradação interagem com o *dsDNA*, causando a libertação das bases livres Gua e Ade ao longo do tempo de incubação.

A interação entre DCBQ-*dsDNA* não foi devido à interação direta da DCBQ com *dsDNA*, mas, provavelmente, devido à interação de *dsDNA* com o(s) produto(s) formado(s) durante a degradação química da DCBQ em solução aquosa. Os biossensores eletroquímicos de *dsDNA* mostraram, claramente, durante os estudos da interação da DCBQ-*dsDNA*, Figura 19, que as interações causadas no DNA por DCBQ foram observados apenas após um determinado tempo de incubação, quando o(s) seu(s) produto(s) estavam presente(s) em solução em uma concentração suficiente para interagir com a estrutura de dupla hélice.

6. Metodologia para a determinação da DCBQ

A ausência de estudos eletroquímicos acerca da DCBQ, no que se refere ao desenvolvimento e aplicação de metodologias eletroanalíticas na determinação e quantificação deste analito, sugere um grau de importância que é justificado pelos possíveis danos que este pode causar.

Para o estudo da metodologia para determinação da DCBQ, fizemos uso de microeletrodo de ouro em virtude deste não apresentar passivação à medida que foram feitas as adições de DCBQ. O ECV não se mostrou adequado para esse procedimento em razão da alta capacidade de adsorção da DCBQ em sua superfície.

Os microeletrodos apresentam inúmeras vantagens, tais como: corrente de estado estacionário para processos faradáicos obtida em longo espaço de tempo, razão corrente capacitiva/corrente faradaica é aumentada, queda ôhmica é desprezível, razão sinal/ruído é melhorada em relação a macroeletrodos, além do aumento do transporte de massa da espécie eletroativa para superfície do eletrodo [36].

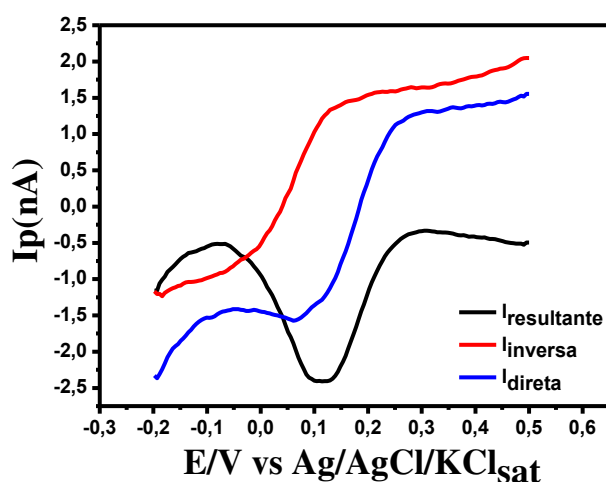
6.1. Detecção da DCBQ sobre microeletrodo de Au

A voltametria de onda quadrada (VOQ) foi a técnica eletroanalítica escolhida em virtude de sua alta sensibilidade, limites de detecção que podem ser comparados as técnicas cromatográficas e espectrofotométricas [31]. Nas respostas obtidas com a VOQ, a corrente

medida é uma resultante (I_{total}) entre as correntes de varredura nos sentidos direto (I_f) e inverso (I_b) da aplicação dos pulsos de potencial [50]. A separação das correntes pode ser usada para observar a presença de picos no sentido de varredura (direta e inversa), e com isso avaliar o tipo de reação redox que está acontecendo no sistema.

Ao analisar a Figura 20 observa-se a presença de uma corrente no sentido direto da aplicação dos pulsos de potencial, uma no sentido reverso e uma corrente resultante. A corrente resultante é a diferença entre as correntes diretas e inversas, e quanto maior a reversibilidade da reação maior é a contribuição da corrente inversa, aumentando significativamente a corrente resultante e, conseqüentemente, a resposta em termos de intensidade de corrente [31].

Figura 20. Voltamogramas de onda quadrada e componentes de corrente para DCBQ 1mmol L^{-1} em tampão fosfato $0,1\text{ mol L}^{-1}$, em microeletrodo de ouro, com $f = 10\text{ Hz}$; $a = 50\text{ mV}$ e incremento de varredura = 5 mV .

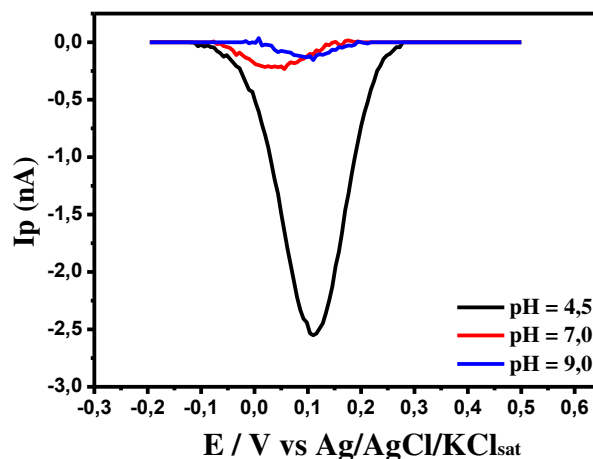


O processo redox da DCBQ foi investigado também, a partir de medidas feitas por voltametria de onda quadrada (VOQ), em tampão fosfato $\text{pH} = 4,5$, na faixa de potencial de $0,5\text{ V}$ a $-0,2\text{ V}$, utilizando os parâmetros: amplitude de 50 mV , frequência 2 Hz e incremento de varredura 6 mV , para os pH 's $4,5$, $7,0$ e $9,0$, Figura 21.

Há, portanto, uma diminuição na corrente limite com o aumento da concentração hidrogeniônica do meio, Figura 21, revelando que o comportamento voltamétrico é diretamente influenciado pelo pH [40]. Em solução aquosa o processo de redução da DCBQ é beneficiado em meio ácido, confirmando os resultados obtidos em ECV, Figura 14, ou seja, as correntes de pico diminuíram com a elevação do pH , no processo de conversão da benzoquinona à hidroquinona [4]. Diante disto escolheu-se o $\text{pH} 4,5$, que

apresentou maiores valores de corrente para desenvolver a metodologia de detecção da DCBQ sobre microeletrodo de ouro.

Figura 21. Voltamogramas de onda quadrada do microeletrodo de Au 15,45 μm de raio obtidos em solução tampão fosfato na presença de DCBQ 1 mmol L^{-1} , com $f = 2$ Hz; $a = 50$ mV e incremento de varredura = 6 mV.



Diante do estudo do comportamento eletroquímico acima citado, realizou-se a determinação do coeficiente de difusão da DCBQ. Para tanto, construiu-se um gráfico de corrente versus concentração da solução. O coeficiente de correlação obtido foi igual a 0,997 e a inclinação da reta (m) com o valor de $4,22 \times 10^{-9}$ nA/mol.L^{-1} . A inclinação da reta corresponde à Equação 2.

$$m = 4nFrD \quad \text{Equação 2}$$

Em que,

n é número de elétrons transferidos na reação ($n = 2$),

F é a Constante de Faraday (96485 C mol),

D é o coeficiente de difusão da espécie e

r é o raio do microeletrodo ($r = 15,45 \mu\text{m}$).

Por meio da Equação 2 o coeficiente de difusão da DCBQ foi calculado obtendo-se valor de $D = 3,53 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Este valor de coeficiente de difusão calculado está próximo ao da benzoquinona ($4,60 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), que como já mencionado, é uma espécie semelhante [42].

6.2. Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

Os parâmetros da voltametria de onda quadrada, frequência de pulso (f), amplitude de pulso (a) e incremento de varredura (ΔE_s) foram investigados variando os seus valores em uma determinada faixa, com o intuito de obter valores de corrente de pico sensíveis, com melhor resolução e adequados para o desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a detecção da DCBQ.

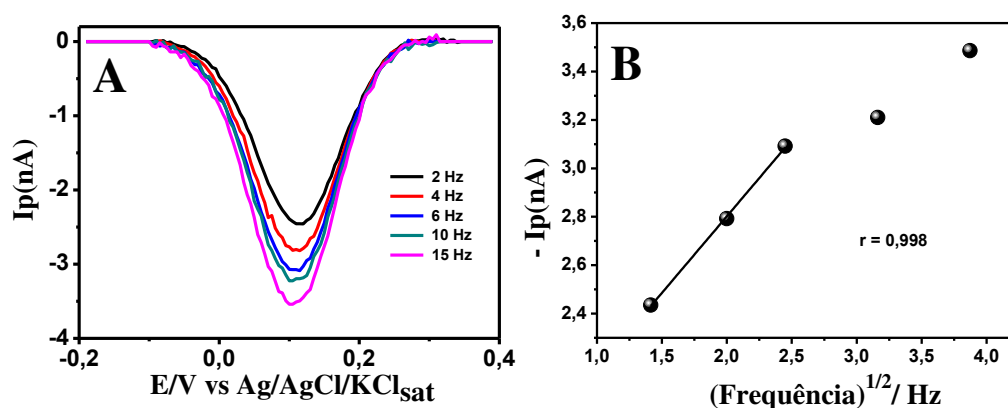
A partir da determinação dos parâmetros da voltametria de onda quadrada, uma curva analítica foi construída e os cálculos dos limites de detecção e quantificação foram feitos através dos valores dos coeficientes de regressão linear.

6.2.1. Variação da frequência de aplicação dos pulsos

A frequência, para VOQ, é um dos parâmetros associados com a intensidade da corrente de pico e, portanto, com a sensibilidade do método analítico, além da velocidade que é resultado do produto da frequência pelo incremento de varredura.

A Figura 22A, mostra os voltamogramas de onda quadrada para a DCBQ 1 mmol L^{-1} em microeletrodo de ouro. Os valores de amplitude de pulsos e incremento de varredura foram mantidos constantes em 50 mV e 3 mV , respectivamente, e variou-se a frequência entre 2 e 15 Hz . Pode-se observar que à medida que se aumenta o valor da frequência de aplicação dos pulsos de potencial, há também um aumento na intensidade da corrente de pico (I_p) e deslocamento dos potenciais de pico para valores mais negativos.

Figura 22. A) Voltamogramas de onda quadrada obtido com microeletrodo de ouro em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$, na presença de DCBQ 1 mmol L^{-1} , em diferentes frequências, amplitude 50 mV e incremento de varredura 3 mV . B) Gráfico de corrente de pico (I_p) em função da raiz quadrada da frequência de pulsos aplicados.



Para aplicações analíticas deste trabalho escolheu-se a frequência de 2 Hz em virtude de apresentar melhor qualidade de sinal de corrente, isto é, por exibir valores onde a corrente de pico apresentou melhor perfil voltamétrico.

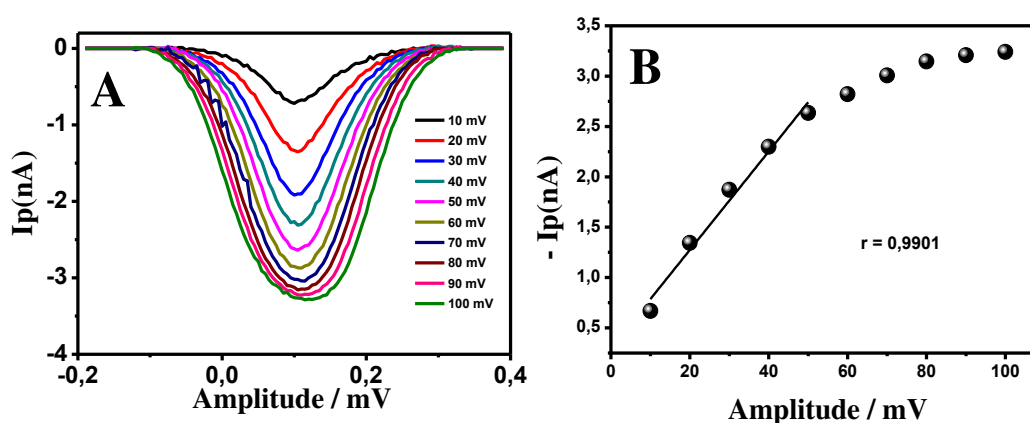
Além disso, foi possível avaliar o comportamento da corrente de pico com a variação da raiz quadrada frequência em uma faixa de 2-15 Hz.

No intervalo de frequência entre 2 – 6 Hz há uma linearidade que não prossegue nos demais valores de frequência estudados, Figura 22B. Em processos reversíveis percebe-se um processo linear entre a corrente de pico e raiz quadrada da frequência [31].

6.2.2. Variação da amplitude de aplicação dos pulsos

Para o estudo da amplitude de pulso a frequência e o incremento de varredura foram fixados em 2 Hz e 3 mV, respectivamente. A variação da amplitude foi realizada no intervalo de 10 a 100 mV. A Figura 23A apresenta os voltamogramas de onda quadrada em microeletrodo de ouro da DCBQ 1 mmol L^{-1} . Estando de posse dos valores das correntes e potenciais de pico dos voltamogramas de onda quadrada obtidos com variação da amplitude, construiu-se um gráfico com a corrente de pico em relação a amplitude de pulso de potencial (Figura 23B).

Figura 23. A) Voltamogramas de onda quadrada obtido com microeletrodo de ouro em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,5$, com adição da DCBQ 1 mmol L^{-1} em diferentes amplitudes, frequência 2 Hz e incremento de varredura 3 mV. B) Gráfico da corrente de pico em função da amplitude de pulsos.



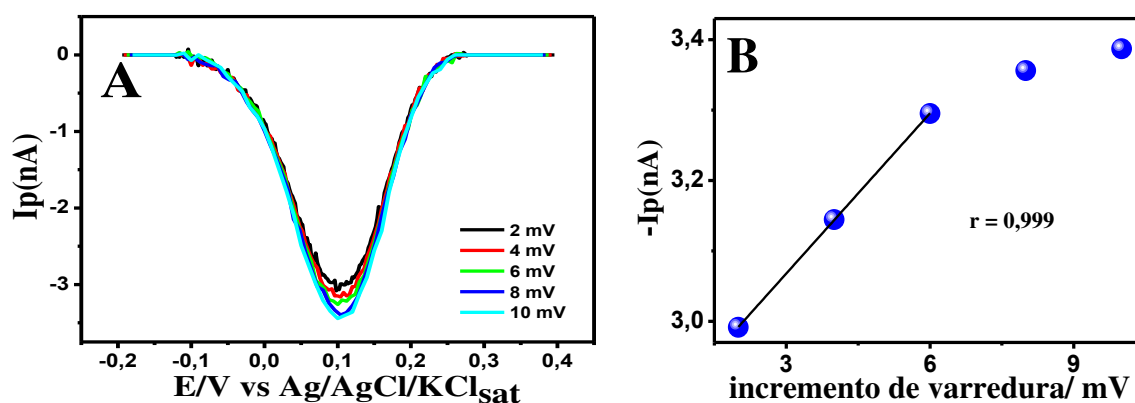
A Figura 23B apresenta a dependência da corrente de pico com a amplitude de pulso de potencial, o qual é possível identificar que para amplitudes de pulso menores que 50 mV a corrente de pico é diretamente proporcional à amplitude aplicada, porém para valores

acima desta relação não permanece linear, além de termos um alargamento no voltamograma, que possibilitam perda de seletividade do método. Em vista disso, optou-se como parâmetro ótimo a amplitude de 50 mV.

6.2.3. Variação do incremento de potencial

O estudo do incremento de varredura foi feito variando-se seu valor entre 2 e 10 mV. Manteve-se constante os valores de frequência e amplitude de pulso nos valores de 2 Hz e 50 mV, respectivamente. Os voltamogramas de onda quadrada da variação do incremento de onda estão contidos na Figura 24A.

Figura 24. A) Voltamogramas de onda quadrada de uma solução DCBQ 1 mmol L⁻¹ obtido com microeletrodo de ouro em solução tampão fosfato 0,1 molL⁻¹, pH = 4,5. Frequência 2 Hz e amplitude 50 mV. B) Dependência da corrente de pico da redução da DCBQ com o incremento de potencial de varredura.



A partir dos valores das I_p e incremento de potencial foi plotado o gráfico apresentado na Figura 24B. Como já mencionado anteriormente, na VOQ a velocidade é obtida a partir do produto entre a frequência e o incremento de varredura [31]. Isto confirma o comportamento crescente da intensidade da corrente de pico com o aumento do incremento de varredura.

O aumento do incremento de potencial é uma alternativa para tornar o método mais sensível em VOQ, assim como o aumento da amplitude de pulsos [31], no entanto, o perfil voltamétrico mais definido e estável foi obtido em velocidades mais baixas. A frequência de 2 Hz possibilitou melhores resultados e ao observar-se o intervalo de linearidade do incremento de potencial, decidiu-se pelo valor de 6 mV, para este. Desta forma, foi obtida maior qualidade na resposta da corrente de pico.

A Tabela 3 mostra um resumo da otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada: os intervalos de frequência, amplitude e incremento de potencial utilizados; e os valores selecionados como ótimo.

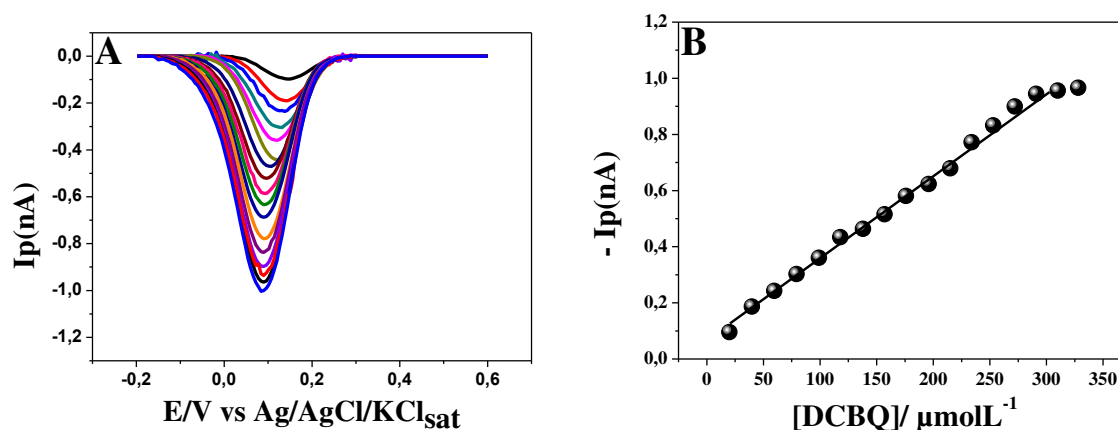
Tabela 3. Tabela com os parâmetros avaliados, intervalos estudados e valores escolhidos

Parâmetros	Intervalos estudados	Valores escolhidos
Frequência	2 – 15 Hz	2 Hz
Amplitude	10 – 100 mV	50 mV
Incremento	2 – 10 mV	6 mV

6.2.4. Curva analítica

Após a otimização dos parâmetros da VOQ, procedemos com a construção da curva analítica, que foi construída a partir das correntes de pico obtidas após adições sucessivas de 10 μL do DCBQ ao eletrólito suporte que geraram concentrações de 19,9 μmolL^{-1} a 328 μmolL^{-1} , Figura 25A.

Figura 25. A) Voltamogramas de onda quadrada para diferentes concentrações da DCBQ sobre microeletrodo de ouro em solução tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 4,5) com amplitude= 50 mV, incremento= 6 mV e $f = 2$ Hz. B) Curva analítica.



A partir da dependência linear da corrente de pico com a concentração da DCBQ em solução, Figura 25B, encontrou-se a equação da reta (Equação 3) com coeficiente de correlação igual a 0,996.

$$I_p(\text{nA}) = 0,0524 + 3,04[\text{DCBQ}](\mu\text{molL}^{-1}) \quad \text{Equação 3}$$

A partir da análise da Figura 25B é possível constatar que a faixa linear entre a intensidade do sinal de corrente e a concentração do analito foi observada entre 19,9 a 291,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a sensibilidade encontrada foi de 3,0 nAL μmol^{-1} .

6.2.5. Limite de detecção (LD) e Limite quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD), é a menor concentração de um analito que dará um sinal três vezes superior ao nível de ruído da linha de base [51]. Este foi calculado nas mesmas condições experimentais expostas anteriormente, utilizando-se a seguinte relação:

$$LD = \frac{3S_b}{s} \quad \text{Equação 4}$$

em que S_b é o desvio padrão da média de medidas do branco e s é a inclinação da reta obtida na curva analítica.

O desvio-padrão da média das medidas do branco, foi determinado a partir da média das correntes medidas em 10 voltamogramas na ausência de analito, tomadas no potencial equivalente àquele do pico de redução da DCBQ. Nesse caso, o valor do desvio encontrado foi de $S_b = 6,18 \times 10^{-12}$.

O LQ é definido como sendo a menor concentração do analito que pode ser quantificado na amostra, com exatidão e precisão aceitáveis, sob as condições experimentais adotadas. Pode ser estimado por meio da razão sinal/ruído, do desvio-padrão e por processos estatísticos [52]. Para o cálculo do LQ, utilizou-se a relação abaixo:

$$LQ = \frac{10S_b}{s} \quad \text{Equação 5}$$

Desta forma, os valores de LD e LQ encontrados foram de 6,1 e 20,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Sendo o valor do LD muito acima do valor encontrado por QIN *et al.* [4], que por meio de espectrometria de massa com ionização por electrospray detectou DCBQ em água em concentrações de 0,08 nmol L^{-1} . No entanto, para se obter concentrações tão baixas houve uma série tratamento da amostra, como a pré-concentração por extração em fase sólida da amostra, específica para halobenzoquinona, o que faz com este método seja extremamente dispendioso.

A metodologia eletroanalítica desenvolvida neste trabalho fez uso de um microeletrodo de outro, de fácil construção e baixo custo, sem etapas de pré-concentração,

ou seja, apenas fazendo a adição do analito ao eletrólito suporte, tornando mais viável a sua utilização mesmo que com valores de concentrações bem mais elevados.

A repetibilidade das medidas foi avaliada considerando-se 10 medidas sucessivas realizadas em uma mesma solução, contendo DCBQ 1 mmol L⁻¹. O valor médio das correntes foi de 2,6 nA, com desvio padrão relativo de 0,94%. O valor encontrado mostra que o método sugerido apresenta precisão aceitável.

A reprodutibilidade foi investigada, comparando-se os valores de picos de correntes catódica, do processo de redução relativos à DCBQ, fazendo-se o polimento do microeletrodo após cada medida. O desvio padrão relativo medido para 10 voltamogramas, avaliados no mesmo dia, sob condições de trabalho diferentes, foi de 4,5%. Este resultado indica que a área de trabalho do microeletrodo apresentou uma pequena variação e que o erro está dentro do limite aceitável.

Um dos métodos mais utilizados para validar os processos analíticos é o ensaio de recuperação, que é definida como a proporção da quantidade da substância de interesse, presente ou adicionada na porção analítica do material teste, que é extraída e passível de ser quantificada [53], relaciona-se com a exatidão, que é quando determinado analito é recuperado no processo frente a quantidade real presente na amostra. A exatidão classifica-se como erro sistemático percentual e ocorre pela perda de substâncias devido a baixa extração, medidas volumétricas imprecisas ou substâncias interferentes na amostra, dentre outros [52].

O estudo da recuperação consistiu na construção de uma curva pelo método de adição padrão, Figura 26(A e B) que foi obtida por adições conhecidas do constituinte a uma amostra que, teoricamente, possui concentração inicial igual a zero. As medidas foram feitas em triplicata para cada amostra.

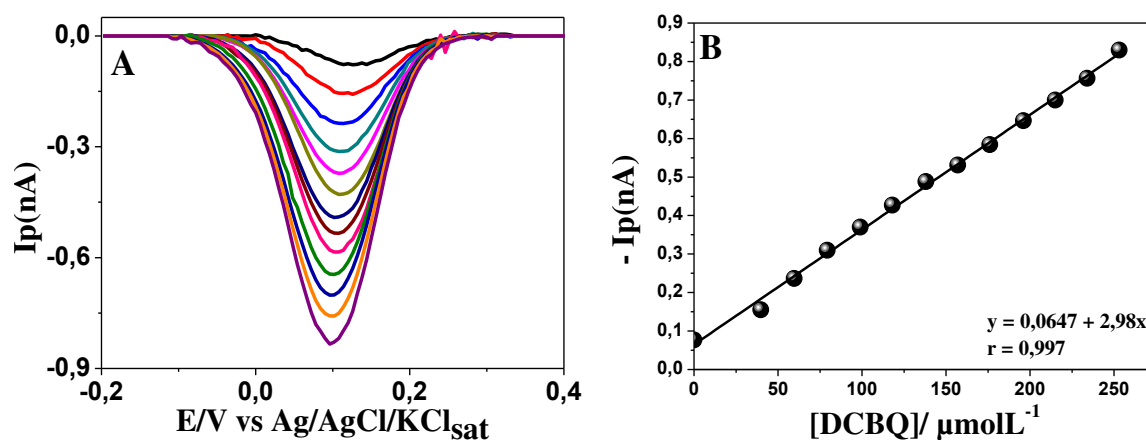
Para o cálculo da taxa de recuperação empregou-se a equação da reta obtida na curva de adição padrão:

$$I_p(nA) = 0,0647 + 2,98[DCBQ](\mu mol L^{-1}), r = 0,997$$

A partir daí, obteve-se a concentração da DCBQ (desconhecida) igual a 21,6 $\mu mol L^{-1}$ e sabendo que o valor real corresponde a 19,9 $\mu mol L^{-1}$, foi então calculada a relação porcentual através da seguinte expressão matemática:

$$Rec \% = \frac{|Concentração_{desconhecida} - Concentração_{real}|}{Concentração_{real}} \times 100 \quad \text{Equação 6}$$

Figura 26. A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão fosfato (pH = 4,5) contendo adições sucessivas de 0,253 mmol L⁻¹ da DCBQ, utilizando microeletrodo de Au de 15,45 μm de raio, com a = 50 mV, f = 2 Hz e incremento = 6 mV e B) Curva de recuperação em eletrólito suporte.



A quantidade obtida foi de 108,9%, ou seja, está 8,89% maior que o valor real. No entanto, está dentro do limite de erro aceitável, uma vez que conforme a literatura [54] a faixa de recuperação admitida é de 80 - 110 %.

A Tabela 4 apresenta os intervalos de recuperação tolerável para determinadas concentrações.

Tabela 4. Intervalo de recuperação aceitável do analito [54].

Concentração do Analito	Intervalo de recuperação aceito (%)
≥ 10	98 – 102
≥ 1	97 – 103
$\geq 0,1$	95 – 105
$\geq 0,01$	90 – 107
$\geq 0,001 - \geq 0,00001$	80 – 110
$\geq 0,000001$	60 – 115
$\geq 0,0000001$	40 – 120

7. CONCLUSÃO

A DCBQ sofre oxidação eletroquímica reversível e dependente do pH até pH 9,2, com a transferência de dois elétrons e dois prótons. Esse processo leva à formação de um produto de oxidação da DCBQ, o qual sofre reação redox reversível em um processo dependente do pH até pH 5,4, envolvendo a transferência de dois elétrons e dois prótons.

Após a incubação em eletrólito suporte por tempos determinados foi observado que a DCBQ sofre degradação espontânea, levando à formação homogênea de produto(s) de degradação (*pd*DCBQ) eletroativo(s) em $3,7 \leq \text{pH} \leq 6,0$. Esse(s) produto(s) sofre(m) oxidação eletroquímica em um processo reversível e dependente do pH, ocorrendo com a perda de dois elétrons e dois prótons. O estudo de degradação em toda a faixa de pH estudada evidenciou que a DCBQ possivelmente se degrada acentuadamente em meio básico. As medidas espectrofotométricas confirmaram a degradação desse contaminante em solução aquosa.

O estudo da interação do contaminante DCBQ com *ds*DNA, usando soluções de *ds*DNA incubadas e biossensores eletroquímicos de *ds*DNA, mostrou que a DCBQ e o(s) *pd*DCBQ interagem com o *ds*DNA, através da libertação das bases Gua e Ade. Em adição, a interação da DCBQ-*ds*DNA não mostrou dano oxidativo causado ao DNA pelo(s) produtos(s) formados pela DCBQ, visto que a 8-oxoGua/2,8-DHA não foi detectado.

A metodologia analítica desenvolvida para determinação da DCBQ, após a otimização das condições experimentais, mostrou ser eficiente, obtendo-se voltamogramas estáveis e bem reprodutíveis. Uma faixa de linearidade para a curva analítica foi obtida em 19,9 a 291,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limites de detecção e de quantificação iguais a 6,1 e 20,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. JING, Y. et al. Effect of effluent organic matter on the adsorption of perfluorinated compounds onto activated carbon. **Journal of Hazardous Materials**, v. 225-226, p. 99–106, 2012.
2. PAL, A. et al. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. **Science of The Total Environment**, v. 408, p. 6062–6069, 2010.
3. WANG, W. et al. Precursors of Halobenzoquinones and Their Removal During Drinking Water Treatment Processes. **Environmental Science e Technology**, v. 49 (16), p. 9898-9904, 2015.
4. QIN, F. et al. A toxic disinfection by-product, 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone, identified in drinking water. **Angewandte Chemie International Ed. in English**, v. 49(4), p. 790-792, 2010.
5. BULL, R. J. et al. **Use of Toxicological and Chemical Models to Prioritize DBP Research**. Denver, CO: Awwa Research Foundation (Project 2867), 2006.
6. CHEN, Z. et al. Chloro-benzoquinones cause oxidative DNA damage through iron-mediated ROS production in Escherichia coli. **Chemosphere**, v. 135, p. 379-386, 2015.
7. DU, H. et al. Cytotoxicity and Oxidative Damage Induced by Halobenzoquinones to T24 Bladder Cancer Cells. **Environmental Science e Technology**, v. 47 (6), p. 2823–2830, 2013.
8. AHAMMAD, A. J. S. et al. Simultaneous Determination of Hydroquinone and Catechol at an Activated Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 22, p. 694-700, 2010.
9. ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, p. 835-841, 2002.
10. LÓPEZ-DOVAL, U. C. et al. Nutrients, emerging pollutants and pesticides in a tropical urban reservoir: Spatial distributions and risk assessment. **Science of the Total Environment**, v. 575, p. 1307–1324, 2017.
11. MATAMOROS, V. et al. Occurrence and behavior of emerging contaminants in surface water and a restored wetland. **Chemosphere**, v. 88, p. 1083-1089, 2012.
12. MUNOZ, M. et al. Application of CWPO to the treatment of pharmaceutical emerging pollutants in different water matrices with a ferromagnetic catalyst. **Journal of Hazardous Materials**, v. 331, p. 45-54, 2017.
13. BRAVO, J. E. B. Contaminantes emergentes en el agua. **My science work**, v. 10, 2009.
14. DEBLONDE, T.; COSSU-LEGUILLE, C.; HARTEMANN., P. Emerging pollutants in

- wastewater: A review of the literature. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 214, p. 442–448, 2011.
15. BOLTON, J. L. et al. Role of Quinones in Toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13(3), p. 135–160, 2000.
 16. BARRY, H.; JOHN, M. C. G. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4. ed. [S.l.]: Oxford University Press, 2007.
 17. O'BRIEN, P. J. Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 80, p. 1-41, 1991.
 18. KOSAKA, K. et al. Formation of 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone from aromatic compounds after chlorination. **Water Research**, v. 110, p. 48–55, 2017.
 19. WANG, W. et al. Halobenzoquinones in Swimming Pool Waters and Their Formation from Personal Care Products. **Environmental science e technology**, v. 47(7), p. 3275–3282, 2013.
 20. DICULESCU, V. C.; PAQUIM, A.-M. C.; BRETT, A. M. O. Electrochemical DNA Sensors for Detection of DNA Damage. **Sensors**, v. 5(6), p. 377–393, 2005.
 21. BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P. The electrochemical oxidation of DNA. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 6, p. 97-100, 1995.
 22. SILVA, M. N. D.; FERREIRA, V. F.; SOUZA., M. C. B. V. D. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, p. 407-416, 2003.
 23. LA-SCALEA, M. A.; SERRANO, S. H. P.; GUTZ, I. G. R. Eletrodos modificados com DNA: uma nova alternativa em eletroanálise. **Química nova**, v. 22(2), p. 417-424, 1998.
 24. OLIVEIRA, S. C. B.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. In situ evaluation of chromium-DNA damage using a DNA-electrochemical biosensor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, p. 1633-1641, 2010.
 25. ZUO, Y.-T. et al. Toxicity of 2,6-dichloro-1,4-benzoquinone and five regulated drinkingwater disinfection by-products for the *Caenorhabditis elegans* nematode. **Journal of Hazardous Materials**, v. 321, p. 456–463, 2017.
 26. BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O.; SERRANO, S. H. P. On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 366, p. 225-231, 1994.
 27. BRETT, A. M. O. et al. Synthetic oligonucleotides: AFM characterisation and electroanalytical studies. **Bioelectrochemistry**, v. 67, p. 181–190, 2005.

28. FOJTA, M. Electrochemical Sensors for DNA Interactions and Damage. **Electroanalysis**, v. 14, p. 1449–1463, 2002.
29. RAUF, S. et al. Electrochemical approach of anticancer drugs–DNA interaction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 37, p. 205–217, 2005.
30. WANG, J. Electrochemical nucleic acid biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 469, p. 63–71, 2002.
31. SOUZA, D. D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, p. 81-89, 2003.
32. SETTLE, F. **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**. 2. ed. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1997.
33. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.
34. PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual Química**, v. 5 (4), p. 516-537, 2013.
35. FERTONANI, F. L.; BENEDETTI, A. V. Microeletrodos: I. Construção e caracterização. **Eclética Química**, v. 22, p. 1678-4618, 1997.
36. PAIXÃO, T. R. L. C.; BERTOTTI, M. Métodos para fabricação de microeletrodos visando a detecção em microambientes. **Química Nova**, v. 32, p. 1306-1314, 2009.
37. FASMAN, G. D. **Handbook of Biochemistry and Molecular Biology**. 3. ed. Cleveland, Ohio: CRC Press, 1975.
38. DICULESCU, V. C.; PIEDADE, J. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Electrochemical behaviour of 2,8-dihydroxyadenine at a glassy carbon electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 70, p. 141-146, 2007.
39. FABER, M. et al. MICROELETRODOS: III. ARRANJOS DE MICROELETRODOS, CONSTRUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO. **Eclética Química**, v. 25, p. 1678-4618, 2000.
40. SABY, C.; MALE, K. B.; LUONG, J. H. T. A Combined Chemical and Electrochemical Approach Using Bis(trifluoroacetoxy)iodobenzene and Glucose Oxidase for the Detection of Chlorinated Phenols. **Analytical Chemistry**, v. 69 (21), p. 4324–4330, 1997.
41. BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica. Princípios, Métodos e Aplicações**. New York: Oxford University Press Inc., v. I, 1996.
42. ZHANG, J. et al. A long path length spectroelectrochemical behavior analysis of the coabsorption system. **Talanta**, v. 52, p. 903–908, 2000.

43. BAIO, J. A. F.; RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, É. T. G. CONSTRUÇÃO DE ELETRODO DE GRAFITE RETIRADO DE PILHA COMUM: APLICAÇÕES DIDÁTICAS. **Química Nova**, v. 37(6), p. 1078-1084, 2014.
44. CABRAL, M. F. et al. Estudo do comportamento eletroquímico do herbicida ametrina utilizando a técnica de voltametria de onda quadrada. **Ecletica Química**, v. 28(2), p. 41-47, 2003.
45. SMITH, E. T. Examination of $n = 2$ reaction mechanisms that reproduce pH-dependent reduction potentials. **Analytica Chimica Acta**, v. 572, p. 259–264, 2006.
46. JÓZSA, É. et al. Kinetic studies of hydroxyquinone formation from water soluble benzoquinones. **New Journal of Chemistry**, v. 38, p. 588-597, 2014.
47. FRANZEN, S. et al. Nonphotochemical Base-Catalyzed Hydroxylation of 2,6-Dichloroquinone by H₂O₂ Occurs by a Radical Mechanism. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 116(5), p. 1666-1676, 2012.
48. BRETT, A. M. O.; PIEDADE, J. A. P.; SERRANO, S. H. P. Electrochemical Oxidation of 8-Oxoguanine. **Electroanalysis**, v. 12, p. 969-973, 2000.
49. OLIVEIRA-BRETT, A. M. et al. Voltammetric determination of all DNA nucleotides. **Analytical Biochemistry**, v. 332, p. 321-329, 2004.
50. HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa Livros**. 5. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos, 2001.
51. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**. Philadelphia: Saunders, v. 5, 1998. 917 p.
52. BRITO, N. M. et al. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS: ESTRATÉGIA E DISCUSSÃO. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. v. 13, p. 129-146, 2003.
53. RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
54. BRITO, N. M. et al. AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO E DA PRECISÃO DE MÉTODOS DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS MEDIANTE ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. v.12, p. 155-168, 2002.