



Construção de Biossensores de ADN para a Avaliação da Capacidade Antioxidante

ALEXANDRA DE BRITO VENTURA GONÇALVES DIAS
Outubro de 2014

Instituto Superior de Engenharia do Porto
Instituto Politécnico do Porto
Departamento de Física

Construção de Biossensores de ADN para a Avaliação da Capacidade Antioxidante

“Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto com o intuito de obter o grau de Mestre em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica”

Alexandra de Brito Ventura Gonçalves Dias

1080330

2014

Orientadoras:

Doutora Maria João Ramalhosa

Doutora Fátima Barroso

Doutora Rita Alves

Agradecimentos

Embora uma tese seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Às minhas orientadoras Doutora Fátima Barroso, Doutora Maria João Ramalhosa e Doutora Rita Alves, quero agradecer pelo ensinamento de novos conhecimentos, pelas suas palavras no momento certo, por toda a disponibilidade proporcionada e simpatia. Quero ainda agradecer todo o apoio que me deram, pois sem ele não seria possível a realização deste trabalho.

Às minhas colegas de laboratório Sofia Costa e Diana Cruz por todo o apoio e disponibilidade em me ensinar algo novo e desconhecido. Especialmente à minha colega Sofia Costa que me acompanhou durante todo o processo.

Aos meus amigos pelo apoio, paciência e ainda capacidade de me acalmar durante os momentos menos bons.

Ao ISEP, por me disponibilizar as instalações para a realização deste trabalho.

Por último, tendo consciência que sozinha nada disto teria sido possível, dirijo um agradecimento especial aos meus pais, por serem modelos de coragem, pelo seu apoio incondicional, incentivo, amizade e paciência demonstrados e total ajuda na superação dos obstáculos que ao longo desta caminhada foram surgindo.

Resumo

Nas inúmeras reações que ocorrem a nível celular, são gerados compostos que danificam o ADN. De modo a reparar o dano que ocorre a nível do material genético, os organismos vivos desenvolveram complexos sistemas de defesa. Estes sistemas são constituídos por antioxidantes que desempenham uma função determinante uma vez que promovem um efeito protetor no ADN através na eliminação ou da diminuição da produção de compostos prejudiciais para a saúde.

Com este trabalho pretendeu-se fazer uma simulação *in vitro* do sistema que ocorre a nível celular com recurso a biossensores eletroquímicos de ADN. A construção destes biossensores, consistiu na imobilização de dA₂₀ (cadeia simples de ADN constituída por uma sequência de 20 adeninas) num elétrodo de pasta de carbono (CPE). Seguidamente, efetuaram-se os estudos *in vitro* em três etapas e usando-se como técnica de deteção a voltametria de onda quadrada (SWV) :

- I. Indução de dano oxidativo no dA₂₀, através da imersão do CPE na solução contendo o composto oxidante (H₂O₂ ou HO[•]);
- II. Proteção do dA₂₀ promovido pela presença do antioxidante no meio reacional (imersão do dA₂₀-CPE na solução durante 30s);
- III. Observação do sinal eletroquímico do dA₂₀ por SWV (realizado entre 0,2-1,4 V);

Estes biossensores foram utilizados para a determinação da capacidade antioxidante total (TAC) de infusões. Tendo-se verificado que as infusões estudadas apresentam poder antioxidante com TAC a variar entre 200 a 1000 mgEAA/L.

Palavras-chave: Radicais livres; Eletroquímica; Contaminantes; Antioxidantes; Dano oxidativo; TAC; Biossensor; Bases púricas; ADN; CPE.

Abstract

In numerous reactions that occur at the cellular level, are generated compounds that damage DNA. In order to repair the damage that occurs to the genetic material level, living organisms have developed complex defense systems. These systems are comprised of antioxidants that play a decisive role as they promote a protective effect on DNA by eliminating or decreased production of compounds harmful to health.

With this work we intended to make a simulation of the in vitro system that occurs at the cellular level using electrochemical DNA biosensors. The construction of these biosensors, the immobilization consisted dA₂₀ (single stranded DNA consisting of a sequence of 20 adenines) a carbon paste electrode (CPE). Next, be effected in vitro studies in three stages using as the detection technique of square wave voltammetry (SWV):

- I. Induction of oxidative damage in the dA₂₀, the CPE through immersion in the solution containing the compound oxidant (H₂O₂ or HO[•]);
- II. dA₂₀ protection promoted by the presence of the antioxidant in the reaction medium (immersion dA₂₀-CPE in the solution for 30 s);
- III. Observation of the electrochemical signal dA₂₀ by SWV (conducted between 0.2-1.4V).

These biosensors were employed for the determination of total antioxidant capacity (TAC) for infusions. As it was found that infusions studied showed antioxidant power with TAC ranging from 200 to 1000 mgEAA/ L.

Keywords: Free radicals; Electrochemistry; Contaminants; Antioxidants; Oxidative damage; TAC; Biosensor; Purine bases; DNA; CPE.

Índice

| | |
|--|----|
| Agradecimentos | 2 |
| Resumo | 3 |
| Abstract..... | 4 |
| Lista de Figuras | 7 |
| Lista de Tabelas | 9 |
| Lista de Gráficos..... | 10 |
| Lista de abreviaturas | 11 |
| Ácido desoxirribonucleico..... | 11 |
| 1. Introdução..... | 14 |
| 1.1. Formação de ROS..... | 14 |
| 1.1.1 <i>Stress</i> Oxidativo..... | 16 |
| 1.1.2 Mecanismo de defesa antioxidante..... | 17 |
| 1.1.2.1 Compostos antioxidantes..... | 18 |
| 1.2 Técnicas analíticas de avaliação da capacidade antioxidante..... | 20 |
| 1.2.1 Métodos analíticos convencionais | 20 |
| 1.2.2 Técnicas Eletroquímicas..... | 22 |
| 1.2.3 Voltametria | 23 |
| 1.2.3.1 Voltametria de onda quadrada | 26 |
| 1.2.4 Instrumentação envolvida na técnica de voltametria..... | 27 |
| 1.2.4.1 Célula eletroquímica | 28 |
| 1.3 Biossensores | 29 |
| 1.3.1 Características de um Biossensor | 29 |
| 1.3.2 Estrutura e funcionamento..... | 30 |
| 1.3.2.1 Componente biológico | 31 |
| 1.3.2.1.1 Ácidos Nucleicos | 31 |
| 1.3.2.1.1.1 Comportamento eletroquímico do ADN..... | 33 |
| 1.3.2.1.1.2 Comportamento eletroquímico da Adenina | 34 |
| 1.3.2.2 Biossensor à base de ADN | 35 |
| 1.3.2.3 Sistema de Transdução..... | 36 |
| 1.3.2.3.1 Biossensores eletroquímicos e amperométricos | 37 |

| | | |
|---------|---|----|
| 1.4 | Objetivos..... | 40 |
| 2. | Procedimento experimental | 41 |
| 2.1 | Biossensor de dA ₂₀ | 41 |
| 2.2 | Material e Equipamento..... | 43 |
| 2.2.1 | Reagentes..... | 43 |
| 2.2.2 | Soluções..... | 44 |
| 2.2.2.1 | Soluções Oxidantes..... | 45 |
| 2.2.2.2 | Soluções Antioxidantes | 47 |
| 2.2.3 | Equipamento..... | 47 |
| 2.2.3.1 | Construção do eléctrodo de pasta de carbono (CPE) | 49 |
| 2.3 | Preparação das infusões..... | 50 |
| 2.4 | Procedimento experimental | 51 |
| 1) | Imobilização do dA ₂₀ no CPE | 51 |
| 2) | Indução de dano oxidativo no dA ₂₀ | 52 |
| 3) | Proteção do dA ₂₀ promovido pela presença do antioxidante..... | 53 |
| 4) | Proteção do dA ₂₀ promovido pela presença dos antioxidantes existentes nas infusões..... | 54 |
| 5) | Observação do sinal eletroquímico do dA ₂₀ por SWW..... | 54 |
| 3. | Resultados e Discussão..... | 56 |
| 3.1 | dA ₂₀ -CPE: AA na presença do oxidante H ₂ O ₂ | 57 |
| 3.2 | dA ₂₀ -CPE: AA na presença do radical hidroxilo HO•..... | 60 |
| 3.3 | Estudo do efeito da matriz das infusões no sinal eletroquímico do dA ₂₀ -CPE | 63 |
| 3.3.1 | Avaliação da matriz complexa: oxidante H ₂ O ₂ | 63 |
| 3.3.2 | Avaliação da matriz complexa: radical HO•..... | 67 |
| 3.4 | Determinação da TAC das infusões com recurso ao dA ₂₀ -CPE..... | 68 |
| 3.4.1 | Avaliação da TAC em infusões: Oxidante H ₂ O ₂ | 69 |
| 3.4.2 | Avaliação da TAC em infusões: Radical HO•..... | 72 |
| 3.5 | Comparação dos valores de TAC para os diferentes oxidantes..... | 74 |
| 4. | Conclusão | 76 |
| 5. | Referências | 77 |

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1: Reações de oxidação-redução que ocorrem durante a respiração e que envolvem o oxigênio [2]. | 15 |
| Figura 2: Esquema representativo do equilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes [5]. | 16 |
| Figura 3: Esquema resumido dos sistemas antioxidantes [9]. | 18 |
| Figura 4: Esquema representativo da SWV [16]. | 26 |
| Figura 5: Esquema representativo de um sistema eletroquímico para medidas voltamétricas [18]. | 27 |
| Figura 6: Célula eletroquímica; CE: eletrodo auxiliar; WE: eletrodo de trabalho e RE: eletrodo de referência [18]. | 28 |
| Figura 7: Composição de um biossensor mostra a organização dos seus componentes. (A) onde é feita a deteção do analito-alvo; (B) onde o sinal é convertido; (C) onde o sinal é processado [24]. | 30 |
| Figura 8: Estrutura básica dos nucleótidos [25]. | 32 |
| Figura 9: Esquema da estrutura do ADN [27]. | 33 |
| Figura 10: Processo de oxidação eletroquímica da adenina [18]. | 35 |
| Figura 11: Intensidades de pico obtidas a partir da SWV: a) leitura direta de adenina; b) exposição a um composto oxidante; c) efeito protetor promovido por um antioxidante [1]. | 42 |
| Figura 12: Estrutura química do ácido ascórbico [35]. | 47 |
| Figura 13: Imagens ilustrativas do equipamento, sendo a primeira imagem correspondente ao AUTOLAB e as duas restantes à célula eletroquímica. | 48 |
| Figura 14: Construção do CPE; A: ilustração do eletrodo; B: ilustração do pistão de aço inoxidável; C: pasta de carbono; D: CPE polido. | 49 |
| Figura 15: Esquema da 1ª etapa: I) Construção do CPE; II) Colocação da gota no CPE; III) Secagem com corrente de azoto. | 52 |
| Figura 16: Representação do ensaio do estudo do dano oxidativo. | 53 |
| Figura 17: Figura ilustrativa da medição do valor de pico. | 55 |
| Figura 18: Voltamograma da imobilização do dA ₂₀ . | 56 |
| Figura 19: Voltamograma de corrente máxima; dano induzido e proteção: I) i _{pM} ; II) i _{pP} e III) i _{pD} . | 57 |
| Figura 20: SWV do efeito protetor conferido pelo AA, 1) 10; 2) 15; 3) 20; 4) 25; 5) 30mg/L. | 59 |

| | |
|---|----|
| Figura 21: SWV do efeito protetor conferido pelo AA,1) 1; 2) 4; 3) 6; 4) 8mg/L..... | 62 |
| Figura 22: SWV correspondente à amostra 3 (sem tratamento): I) i_pP correspondente ao volume de 500 μ L; II) i_pP correspondente ao volume de 300 μ L; III) i_pP correspondente ao volume de 150 μ L..... | 64 |
| Figura 23: SWV correspondente a amostra 3 (com centrifugação): I) i_pP correspondente ao volume de 500 μ L; II) i_pP correspondente ao volume de 300 μ L; III) i_pP correspondente ao volume de 150 μ L com centrifugação. | 65 |
| Figura 24: SWV correspondente a amostra 3 (com filtração com seringa): A) i_pPs correspondentes ao volume de 150 μ L; B) i_pPs correspondentes ao volume de 300 μ L; C) i_pPs correspondentes ao volume de 500 μ L com seringa..... | 66 |
| Figura 25: SWV correspondente a amostra 8: I) i_pP correspondente ao volume de 400 μ L; II) i_pP correspondente ao volume de 300 μ L; III) i_pP correspondente ao volume de 200 μ L. | 68 |
| Figura 26: SWV para as amostras de 1 a 5 sendo que aparecem na seguinte ordem, do pico mais pequeno para o maior. Ordem: 1; 2; 5; 3; 4. | 70 |
| Figura 27: SWV para as amostras de 6 a 10 sendo que aparecem na seguinte ordem, do pico mais pequeno para o maior. Ordem: 8; 6; 10; 9; 7. | 71 |
| Figura 28: SWV dos i_pP para as amostras de 1 a 5 sendo que aparecem na seguinte ordem, do pico mais pequeno para o maior. Ordem: 4; 3; 1; 2; 5. | 73 |
| Figura 29: SWV dos i_pP para as amostras de 6 a 10 sendo que aparecem na seguinte ordem, do pico mais pequeno para o maior. Ordem: 10; 6; 7; 9; 8. | 73 |

Lista de Tabelas

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Métodos analíticos convencionais [10]. | 21 |
| Tabela 2: Quadro ilustrativo dos tipos de voltametria, [16]. | 25 |
| Tabela 3: Tabela resumo dos sistemas de deteção aplicados nos biossensores [24]. | 38 |
| Tabela 4: Reagentes utilizados e respetiva aplicação. | 43 |
| Tabela 5: Tabela da composição das amostras. | 50 |
| Tabela 6: Tabela com os parâmetros utilizados em SWV. | 53 |
| Tabela 7: Planificação dos ensaios do estudo da influência da concentração de AA na presença de H ₂ O ₂ na oxidação do dA ₂₀ -CPE. | 58 |
| Tabela 8: Dados obtidos de i _p P do dA ₂₀ -CPE quando se utilizou como antioxidante o AA na presença de H ₂ O ₂ | 58 |
| Tabela 9: Planificação dos ensaios do estudo da influência da concentração de AA na presença de HO• na oxidação do dA ₂₀ -CPE. | 60 |
| Tabela 10: Dados obtidos de i _p P do dA ₂₀ -CPE quando se utilizou como antioxidante o AA na presença do radical hidroxilo. | 61 |
| Tabela 11: Resultados obtidos para os valores de i _p P para o estudo do efeito da matriz das infusões. | 64 |
| Tabela 12: Composição do ensaio. | 67 |
| Tabela 13: Resultados obtidos para os valores de i _p P com a amostra sem tratamento na presença do radical hidroxilo. | 68 |
| Tabela 14: TAC das infusões quando se usou o oxidante H ₂ O ₂ | 69 |
| Tabela 15: TAC das infusões quando se usou o radical HO•. | 72 |
| Tabela 16: comparações entre oxidantes. | 74 |

Lista de Gráficos

| | |
|---|----|
| Gráfico 1: Curva de calibração do AA na presença de H_2O_2 | 60 |
| Gráfico 2: Curva de calibração do AA na presença de HO^{\bullet} | 62 |
| Gráfico 3: Concentrações obtidas (mgEAA/L) nas diferentes infusões analisadas na presença de H_2O_2 | 71 |
| Gráfico 4: Concentrações obtidas (mgEAA/L) nas diferentes infusões analisadas na presença do radical hidroxilo..... | 74 |
| Gráfico 5: Caparação dos valores obtidos para as concentrações de AA dos dois oxidantes..... | 75 |

Lista de abreviaturas

| | |
|----------|--|
| A | Amperes |
| AA | Ácido ascórbico |
| ABTS-RSA | 2,2' – Azinobis (3- etilbenzotiazolina) – 6 – ácido sulfónico – (atividade antioxidante radicalar) |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ATP | Adenosina trifosfato |
| BHA | Butil- hidroxianisol |
| BHT | Butil- hidroxitolueno |
| C_{AA} | Concentração de ácido ascórbico |
| CAT | Catálase |
| CE | Eléctrodo auxiliar |
| Ci | Concentração inicial |
| CPE | Eléctrodo de pasta de carbono |
| DPPH-RSA | (2,2 – Difetil – 1 - picrilhidrazila) – (atividade antioxidante radicalar) |
| E | Potencial |
| E_p | Potencial de pico |
| FAD | Dinucleotídeo flavina-adenina |
| FD | Fator de diluição |
| FRAP | Poder de redução do ferro |

| | |
|-------------------------------|---|
| GP | Galato de proprilo |
| GPHR | Glutaciona redutase |
| H ₂ O ₂ | Peroxido de hidrogenio |
| HMDE | Elétrodo de mercúrio de gota suspensa |
| HO [•] | Radical hidroxilo |
| i | Intensidade de corrente |
| i _p | Intensidade de pico |
| i _{pD} | Intensidade de pico do dano oxidativo |
| i _{pM} | Intensidade de pico máxima |
| i _{pP} | Intensidade de pico da proteção ao dano oxidativo |
| NAD | Dinucleotídeo nicotinamida-adenina |
| NADH | Dinucleotídeo de adenina nicotinamida |
| NADPH | Fosfato de dinucleótido de adenina nicotinamida |
| ORAC | Capacidade de absorção do radical oxigénio |
| PBS | Solução salina de fosfato |
| Q | Carga |
| RE | Elétrodo de referência |
| ROS | Espécies reativas de oxigénio |
| s | Segundos |

| | |
|---------------|------------------------------------|
| SOD | Superóxido dismutase |
| SSPE | Solução Salina de fosfato de sódio |
| SWV | Voltametria de onda quadrada |
| t | Tempo |
| TAC | Capacidade antioxidante total |
| TBHQ | Terc-butil-hidroquinona |
| THBP | Tri-hidroxi-butil-fenona |
| V | Volt |
| V_{AA} | Volume de AA |
| $V_{Fe^{2+}}$ | Volume de Ferro (II) |
| $V_{H_2O_2}$ | Volume de H_2O_2 |
| V_{HO} | Volume de HO^{\bullet} |
| V_{PBS} | Volume de PBS |
| V_t | Volume total |
| WE | Elétrodo de trabalho |

1. Introdução

Recentemente, a formação dos radicais livres e a ação dos antioxidantes têm tido crescente interesse em áreas como a biologia, a química dos alimentos e a tecnologia cosmética. A prevenção de reações de oxidação em alimentos ou produtos de cosmética, bem como o papel das espécies reativas de oxigénio (ROS) em doenças crónico-degenerativas são questões que têm sido alvo de diversos estudos.

As ROS geradas nos organismos vivos e/ou por fontes exógenas (como alguns compostos cancerígenos e reações ionizantes), quando em excesso, podem provocar danos oxidativos no ADN (ácido desoxirribonucleico) celular, dando origem a uma série de modificações, tais como, lesões nas bases azotadas, nos açúcares, quebras no ADN e nas interações ADN-proteína.

De modo a inibir ou eliminar as ações prejudiciais induzidas pelas ROS, os organismos vivos utilizam antioxidantes. Além disso, uma ingestão adequada de antioxidantes através da dieta alimentar, pode contribuir também para a manutenção do equilíbrio entre a produção de ROS e o nível de antioxidantes no organismo, contribuindo para a manutenção das funções fisiológicas do sistema [1].

Alguns alimentos (legumes, frutas, cereais integrais, vinho e infusões à base de plantas) são boas fontes de antioxidantes. Estes incluem na sua composição antioxidantes como vitaminas (A, E e C), compostos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico), flavonoides (quercetina e rutina), minerais (selénio e zinco) ou proteínas (transferrina, ceruloplasmina e albumina) [1].

1.1. Formação de ROS

O oxigénio constitui 21% da composição do ar e encontra-se em 53,8% da crosta terrestre. É indispensável para a produção de energia em seres vivos, animais e plantas. Contudo, quando os seres vivos, por questão de sobrevivência, utilizam este gás na cadeia respiratória, ocorrem reações de oxidação-redução que levam à formação de radicais livres. Estes radicais livres, quando em excesso, podem provocar danos reversíveis ou mesmo irreversíveis, inclusive morte celular. Estes efeitos variam conforme o tipo de organismo, o seu estado fisiológico, as suas defesas e a sua dieta alimentar. No mesmo ser vivo, diferentes tecidos e células podem ser afetados de distintos modos.

Assim, surgiram com a evolução dos seres vivos, mecanismos de defesa baseados na utilização de compostos antioxidantes, com a função de prevenir estes danos oxidativos [2].

Do ponto de vista químico, uma reação de oxidação-redução envolve a transferência de eletrões entre os reagentes. Para que isto aconteça, deve existir um composto que perde eletrões (oxidação) e um composto que ganha eletrões (redução).

Devido à sua configuração eletrónica, o oxigénio tende a receber um eletrão de cada vez, formando-se compostos intermédios altamente reativos, de onde se destacam o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e o radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Na Figura 1 encontra-se exemplificado sumariamente, as reações de oxidação-redução que ocorrem ao nível das mitocôndrias (durante a respiração aeróbia) e que envolvem o oxigénio.

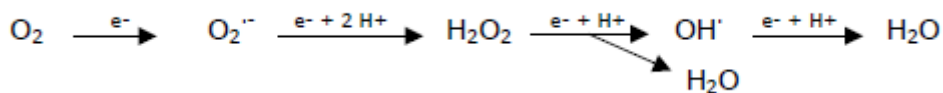


Figura 1: Reações de oxidação-redução que ocorrem durante a respiração e que envolvem o oxigénio [2].

Estas ROS produzidas em sistemas vivos intervêm numa série de processos degenerativos, devido ao facto de serem ou gerarem radicais livres.

São espécies químicas capazes de existir independentemente, que contêm um ou mais eletrões desemparelhados, sendo muito reativos e capazes de reagir com as biomoléculas existentes na célula (por exemplo, proteínas ou ácidos nucleicos). Os radicais livres possuem um tempo de semi-vida extremamente curto. A sua formação depende da perda ou ganho de um eletrão podendo ter origem endógena ou exógena.

De entre os processos endógenos de produção de radicais livres destaca-se a fosforilação oxidativa. Esta ocorre na mitocôndria e é responsável pela produção de energia no organismo através da adenosina trifosfato (ATP) [2].

O processo oxidativo, que ocorre regularmente na célula, é essencial para a vida e morte da mesma. O oxigénio molecular tem a capacidade de desemparelhar e formar os radicais livres que são instáveis. Estes podem ser produzidos por fontes enzimáticas e

não-enzimáticas e intervêm em funções fisiológicas como: apoptose, necrose e fagocitose. As ROS são neutralizadas pelo sistema de defesa do organismo. Os principais agentes de defesa são: enzimas e antioxidantes endógenos [3].

1.1.1 *Stress Oxidativo*

Denomina-se “*stress oxidativo*” o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes (com predomínio das primeiras) que pode resultar em danos celulares ou teciduais [4]. A Figura 2 mostra um esquema que demonstra a relação que deve existir entre a quantidade de ROS e antioxidantes existentes num organismo vivo [5].

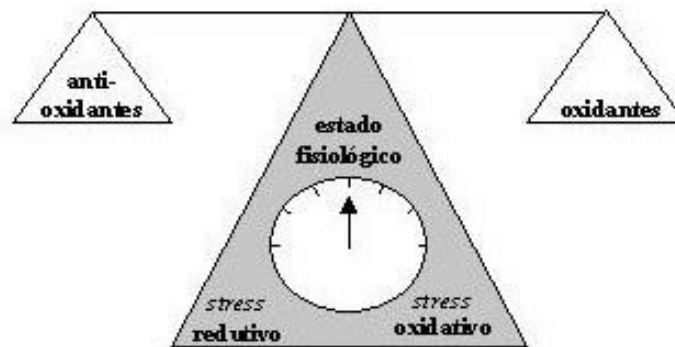


Figura 2: Esquema representativo do equilíbrio entre as moléculas oxidantes e antioxidantes [5].

A constante produção de ROS é compensada pela produção endógena ou ingestão de antioxidantes, com o objetivo de neutralizar os efeitos degenerativos dos radicais livres. Se esta neutralização não for possível, devido a uma ineficácia do mecanismo antioxidante, ou à formação elevada/exposição excessiva a radicais livres, ocorre uma situação de *stress oxidativo*.

Na presença de *stress oxidativo* podem ocorrer as seguintes situações [2]:

- Adaptação do organismo, através do aumento da resposta antioxidante;
- Dano celular, devido à degradação de lípidos, hidratos de carbono, proteínas e ADN;

- Morte celular por necrose ou apoptose (necrose consiste na morte da célula ou parte do tecido que compõe o organismo vivo, sendo a manifestação de que a célula sofreu uma lesão irreversível; apoptose é a morte celular programada).
- Desregulação da produção de energia (ATP, Dinucleotídeo de adenina nicotinamida (NADH), Fosfato de dinucleotídeo de adenina nicotinamida (NADPH)), do transporte de cálcio, da homeostase eletrolítica, etc.

1.1.2 Mecanismo de defesa antioxidante

Com a finalidade de impedir os danos oxidativos causados pelas ROS, o organismo vivo desenvolveu vários mecanismos de defesa, que o protegem das ações nefastas dos radicais livres, através da sua inibição [2]. Os sistemas de defesa antioxidante podem ser: endógenos ou exógenos (Figura 3).

Os mecanismos de defesa antioxidante incluem a utilização de enzimas, vitaminas, compostos fenólicos, minerais e proteínas. O consumo adequado de antioxidantes na dieta pode ajudar a manter o equilíbrio antioxidante e, como tal, manter as funções fisiológicas normais de um organismo vivo [6].

O equilíbrio entre os agentes oxidantes e redutores é essencial nos sistemas aeróbicos, assim como o equilíbrio entre as ROS e o sistema de defesa antioxidante. [7].

Os antioxidantes endógenos podem ser dividido em enzimáticos ou não enzimáticos [2,8]. Os antioxidantes endógenos enzimáticos são por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), a glutatona redutase (GPHR) e a Catalase (CAT). Os antioxidantes endógenos não enzimáticos são compostos sintetizados pelo organismo como a ceruloplasmina, a melatonina e o ácido úrico. Por sua vez, os antioxidantes exógenos provêm de fontes alimentares, sendo obtidos a partir da dieta. São compostos químicos como o ácido ascórbico (vitamina C), ácido lipóico, carotenoides, compostos fenólicos, minerais, entre outros, que ajudam a manter o equilíbrio antioxidante no organismo e, como tal, contribuem para a manutenção das funções fisiológicas [3,8].

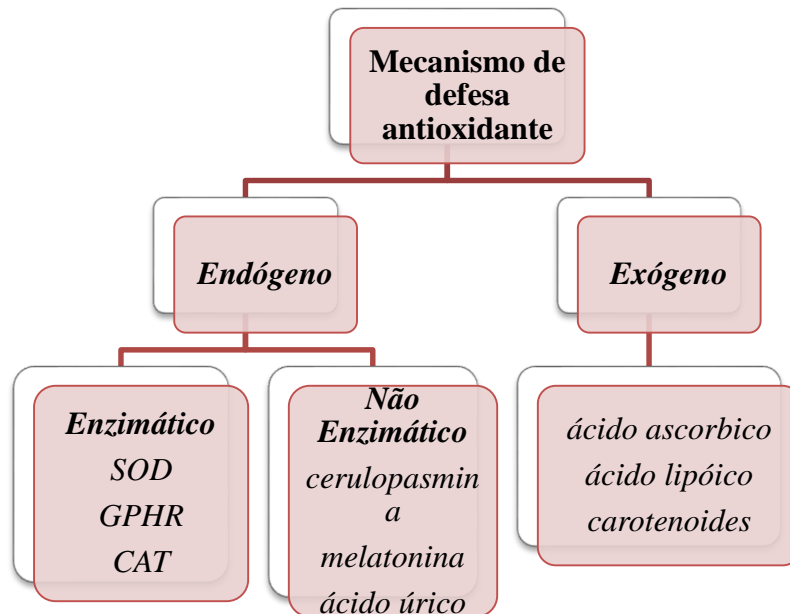


Figura 3: Esquema resumido dos sistemas antioxidantes [9].

1.1.2.1 Compostos antioxidantes

Um antioxidante é “*uma substância que, quando se encontra presente em baixas concentrações quando comparado com um substrato oxidável, protege esse substrato da oxidação e, em última análise, protege o organismo de efeitos prejudiciais provocados pelo dano oxidativo*” [6].

Para serem considerados antioxidantes, estes compostos devem possuir algumas propriedades, tais como [10]:

- Capacidade de ceder eletrões e/ou átomos de hidrogénios para o radical livre;
- Capacidade para alterar a estrutura do radical;
- Capacidade de quelatar metais decorrentes do processo de oxidação.

Os antioxidantes podem ser classificados como [10]:

- Primários ou secundários, de acordo com a forma como combatem os radicais livres;
- Naturais (provenientes da natureza) ou sintéticos (criados pelo Homem).

Como exemplo de antioxidantes sintéticos existem: o Butil- hidroxianisol (BHA), Terc-butil-hidroquinona (TBHQ), Galato de proprilo (GP), Butil- hidroxitolueno (BHT) e Tri-hidroxi-butil-fenona (THBP). Estes são usados na indústria alimentar [11,12].

Como exemplo de antioxidantes naturais temos: a vitamina C, os compostos fenólicos e os tocoferóis provenientes de vegetais e frutas.

A vitamina C (ácido ascórbico; AA) é um importante antioxidante que combate os radicais livres, sendo um nutriente anti-envelhecimento importante, tanto na dieta alimentar como para utilização tópica [13].

Uma das funções da vitamina C é favorecer o processo de cicatrização e também permitir a absorção do ferro presente nos alimentos de origem vegetal, sendo muito importante no tratamento da anemia. Além disso, ela melhora as defesas do organismo e ajuda no combate a infeções. Pode ser encontrada em várias frutas e vegetais como laranja, kiwi, limão, morangos, pimentos, brócolos, entre outros [13].

Aos compostos fenólicos têm vindo a ser atribuídos vários efeitos benéficos para a saúde. Estes são metabolitos secundários das plantas e encontram-se em frutas e vegetais. Dos efeitos benéficos descritos, podem citar-se: atividade antioxidante, anti-inflamatória, anti-microbiana e anti-carcinogénica [14].

Os tocoferóis estão presentes naturalmente em óleos vegetais inibindo a oxidação dos ácidos gordos insaturados. São usados como aditivos alimentares para prevenir a oxidação de óleos e gorduras [14,15].

Existem ainda outras substâncias como os carotenoides, presentes no tomate, pimento, cenoura, abóbora e laranja para os quais está descrita uma potencial atividade anticancerígena (exemplo licopeno, β -caroteno) [15].

São vários os fatores que influenciam a eficácia dos antioxidantes [3]:

- A sua energia de ativação;
- O potencial de oxidação/redução;
- A solubilidade e estabilidade ao pH.

Dependendo do grau de solubilidade os antioxidantes podem ser divididos em duas categorias: antioxidantes hidrofílicos e hidrofóbicos. Os antioxidantes hidrofílicos encontram-se no citoplasma da célula e no plasma sanguíneo (exemplos: ácido ascórbico

e ácido úrico), enquanto os antioxidantes hidrofóbicos protegem as membranas celulares da peroxidação lipídica (exemplos: a vitamina E e os carotenoides) [3].

1.2 Técnicas analíticas de avaliação da capacidade antioxidante

Várias metodologias têm sido propostas para a avaliação da capacidade antioxidante total (TAC) em amostras biológicas e produtos alimentares nomeadamente técnicas espectrofotométricas, quimiluminescência, fluorimetria, eletroquímica e cromatografia [6].

Estes métodos foram desenvolvidos para avaliar a TAC de várias matrizes, no entanto, o efeito protetor dos antioxidantes a nível celular pode também ser estudado através da monitorização da integridade do ADN. Para este efeito vários métodos inovadores nomeadamente biossensores eletroquímicos baseados em material do ADN têm vindo a ser desenvolvidos [1].

1.2.1 Métodos analíticos convencionais

A TAC pode ser determinada por meio de várias metodologias, nomeadamente pela transferência de um radical peróxido, a capacidade de redução do ião férrico ou capacidade de inibir um radical orgânico.

Os métodos convencionais mais utilizados para a determinação da TAC *in vitro* são: FRAP (poder de redução do ferro), ABTS-RSA [2,2' – Azinobis (3-etilbenzotiazolina) – 6 – ácido sulfónico – (atividade antioxidante radicalar)], DPPH-RSA [(2,2 – Difetil – 1 - picrilhidrazila) – (atividade antioxidante radicalar)] e ORAC (capacidade de absorção do radical oxigénio). Um outro também bastante utilizado é o método da deslocação do β -caroteno, que avalia o nível de inibição dos radicais livres no decorrer da peroxidação do ácido linoleico [10].

A tabela 1 mostra estes métodos e o seu princípio de funcionamento.

Tabela 1: Métodos analíticos convencionais [10].

| Método | Tipo de Método | Princípio de Funcionamento | Antioxidante Padrão | Vantagens / Desvantagens |
|---|--|--|--|---|
| Co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico | Colorimétrico (λ 470 nm) | Descoloração de uma solução de β -caroteno e ácido linoleico, em meio aquoso. | Butil-hidroxidotolueno (BHT). | Interferência de substâncias oxidantes ou redutoras no ensaio. Necessidade de elevadas temperaturas durante a sua execução. |
| Radical ABTS | Colorimétrico (λ máximo de 645, 734 e 815 nm) | Antioxidantes cedem eletrões ao catião radical ABTS ^{•+} . Ocorre um decréscimo na absorvância ao longo do tempo. | Trolox (análogo solúvel da vitamina E) | Pode ser utilizado em amostras hidrossolúveis e lipossolúveis. Método muito estável e de fácil execução. |
| DPPH[•] | ----- | Antioxidantes cedem eletrões ao radical DPPH [•] . Ocorre um decréscimo da absorvância durante a reação. | Trolox | Método rápido e fácil de executar. O uso da fluorescência permite que ocorram menos interferências da matriz. |

| | | | | |
|-------------|-----------------------------------|---|-----------------|--|
| ORAC | ----- | Medição do decréscimo da fluorescência como consequência do dano oxidativo. | Trolox | O uso da fluorescência permite que ocorram menos interferências da matriz. |
| FRAP | Colorimétrico (λ 593 nm) | Complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe^{III} -TPZ) que é reduzido a um complexo ferroso (Fe^{II} -TPZ), quando em presença de um antioxidante. | Ácido ascórbico | Método rápido, fácil de executar e económico. |

1.2.2 Técnicas Eletroquímicas

De todas as técnicas de análise, a eletroquímica distingue-se pois proporciona uma elevada faixa dinâmica de concentração e uma ampla sensibilidade. A baixa seletividade, as interferências de espécies e a afinidade com a superfície do eléctrodo, são as suas principais desvantagens. Estas características podem levar a um bloqueio do sinal ou ao aparecimento de sinais indesejados [16].

A eletroquímica baseia-se no estudo da resposta química de um sistema a um estímulo eléctrico. Esta técnica permite medir parâmetros como: potencial (E), corrente eléctrica (i), carga (Q) e tempo (t). Dependendo do parâmetro usado o sistema vai produzir diferentes respostas.

Quanto aos parâmetros acima mencionados pode dizer-se:

- O **potencial (E)** diz respeito à quantidade de força eletroquímica ou a energia do sistema. Conforme este potencial aumenta, mais força estará disponível para que uma reação aconteça. A unidade do potencial é o volt (V).
- A **corrente (i)** expressa a magnitude do fluxo de elétrons de um sistema. A unidade base da corrente é o ampere (A), no entanto a maior parte das experiências eletroquímicas apresenta este parâmetro em microampere ($1 \mu\text{A} = 10^{-6}\text{A}$). A oxidação é representada pela corrente no ânodo e a redução pela corrente no cátodo.
- A **carga (Q)** exprime a medida do número de elétrons usados por equivalente. Tem como unidade base o Coulomb (C). Esta pode ser determinada diretamente ou calculada através da multiplicação do tempo (t) pela corrente (i).
- O **tempo (t)** representa a medida de duração, sendo a sua unidade o segundo (s).

Existe uma longa lista de técnicas eletroquímicas, que resulta das diversas combinações de parâmetros e que podem utilizar diferentes tipos de elétrodos de trabalho (WE): voltametria; polarografia; técnicas de varrimento linear; cronoamperometria; cronopotenciometria; técnicas de pulso; entre outras [16].

De entre as técnicas de eletroquímica acima mencionadas dá-se destaque á voltametria, pois foi a técnica utilizada na realização deste trabalho.

1.2.3 Voltametria

A voltametria é uma técnica que permite a obtenção de informações qualitativas e quantitativas acerca de uma espécie química, a partir do registo de curvas corrente-potencial. Estas curvas resultam da combinação entre a reação química e elétrica da espécie química, numa célula eletroquímica constituída, pelo menos, por dois elétrodos: o WE e elétrodo de referência (RE). Existe também um outro elétrodo neste tipo de técnica, o elétrodo auxiliar (CE).

O potencial imposto entre estes eléctrodos é aplicado na forma de varrimento, ou seja, varia-se o potencial a uma velocidade constante ao longo do tempo. Tanto o potencial como a corrente são registados em simultâneo. A curva resultante é chamada de voltamograma e diz respeito a uma curva corrente vs. potencial.

Nesta técnica, o potencial imposto no eléctrodo, é um parâmetro de controlo e varia de forma sistemática, de maneira a produzir uma reacção redox sobre o eléctrodo. Quanto à corrente, esta resulta de transferência de electrões que acontece durante a redução ou oxidação sobre a superfície do eléctrodo [16,17].

Para podermos utilizar a voltametria para determinar a concentração de analito é necessário que este seja eletroativo, isto é, que reduza ou oxide numa região onde o potencial é aplicado, onde a transferência de electrões seja possível de maneira a criar um fluxo de electrões.

Existem diversos tipos de voltametria, que dependem da forma como o potencial é aplicado, e por consequência da forma como o sinal analítico (corrente) é adquirido. Para além do modo de aquisição, esta técnica varia também de acordo com as etapas utilizadas antes ou durante a medida do sinal, como a pré-concentração de analito (derivada da capacidade do analito reagir com o material do eléctrodo de trabalho); direcção ou inversão do varrimento.

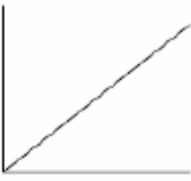
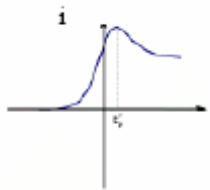
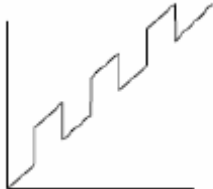
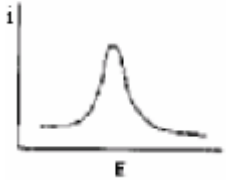
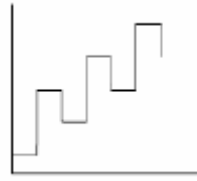
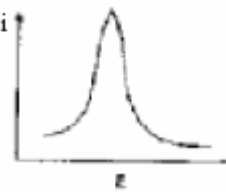
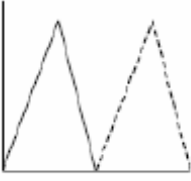
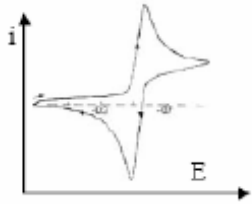
O tipo e a qualidade de informação quantitativa/qualitativa (a respeito do analito ou do processo que envolve a interacção entre o analito e o eléctrodo de trabalho) que se pretende obter determina a escolha do tipo de voltametria.

Tipos de voltametria [16]:

- *Varrimento linear*: o potencial aplicado varia ao longo do tempo;
- *Pulso diferencial*: as medidas de corrente e aplicações de potencial e pulsos de potencial são realizadas em intervalos de tempo muito pequenos;
- *Onda quadrada*: o potencial é aplicado na forma de uma onda quadrada simétrica de amplitude e sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada;
- *Cíclica*: é a técnica mais comum para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. Aplica-se um potencial com um valor onde no qual nenhuma redução ocorra.

Na tabela 2 podemos observar os diferentes tipos de resultados que se podem obter nas técnicas voltamétricas.

Tabela 2: Quadro ilustrativo dos tipos de voltametria, [16].

| TIPO DE VOLTAMETRIA | SINAL DE EXCITAÇÃO | CORRENTE RESULTANTE |
|----------------------------|---|---|
| Varrimento Linear |  |  |
| Pulso Diferencial |  |  |
| Onda Quadrada |  |  |
| Cíclica |  |  |

Vai-se dar destaque à voltametria da onda quadrada (SWV), pois foi a técnica utilizada ao longo deste trabalho.

1.2.3.1 Voltametria de onda quadrada

Como já foi referido anteriormente, neste trabalho vai-se dar destaque à voltametria de onda quadrada (SWV). Neste tipo de voltametria é aplicada ao WE uma onda quadrada simétrica de amplitude ΔE_p sobreposta a uma rampa de potencial em forma de escada determinada pela amplitude ΔE_s , a largura a e o período T . Pode observar-se a representação deste tipo de voltametria na figura 4.

Nesta técnica a corrente é amostrada duas vezes, a primeira no final do pulso direto, onde a direção do pulso e a direção do varrimento são iguais; a segunda no final do pulso onde a direção do varrimento e do pulso são contrárias. Esta dupla amostragem permite a minimização da contribuição da corrente captativa sobre a corrente total lida. O voltamograma resultante diz respeito à diferença entre estas duas correntes vs. a rampa de potencial aplicado [16].

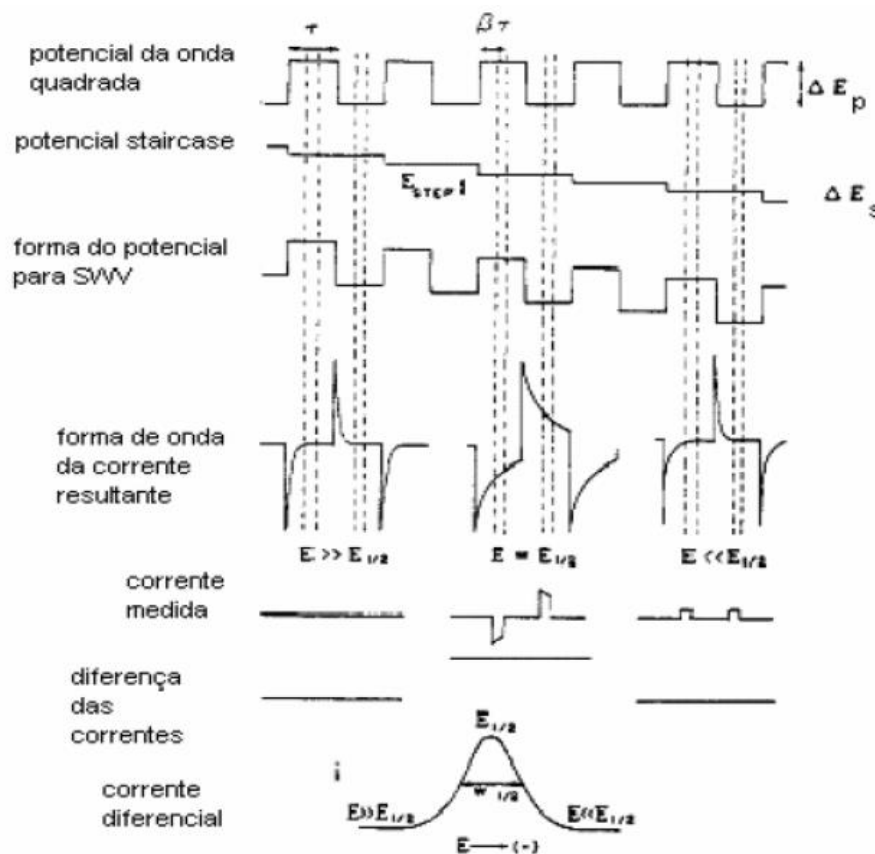


Figura 4: Esquema representativo da SWV [16].

Na figura 4 está também representado o pico de corrente consequente da SWV, este pico é definido por um potencial $E_{1/2}$ e a largura $W_{1/2}$. Uma das grandes vantagens desta técnica é a velocidade de aquisição dos dados. O uso de frequências de 1 a 100 Hz possibilitam o uso de velocidades de varrimento muito mais rápidas. Comparando com a voltametria de pulso o tempo de análise diminui de 3 a 5 minutos para 3 a 10 segundos, isto deve-se ao facto de, na voltametria de pulso a velocidade de varrimento variar entre 1 a 10 mV, enquanto na SWV a velocidade varia entre 100 a 1000 mV.

Do mesmo modo que a técnica de pulso diferencial, a SWV produz picos Faradaicos (denominada assim por que segue a lei de Faraday), cuja altura é proporcional à concentração da espécie eletroativa [16,18].

1.2.4 Instrumentação envolvida na técnica de voltametria

Um sistema de voltametria (Figura 5) tem como componentes básicos um potencióstato, um computador e uma célula eletroquímica.

O potencióstato tem o papel de aplicar o potencial desejado no eléctrodo de trabalho e monitorizar a corrente gerada. O computador ajusta os dados volumétricos, assim como a forma de onda do sinal aplicado. É no computador que os dados obtidos são visualizados [19].

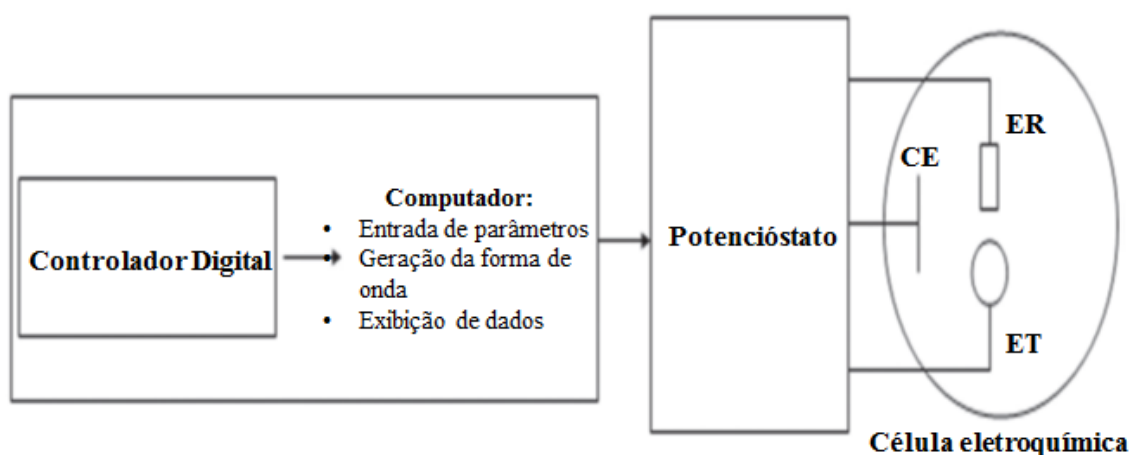


Figura 5: Esquema representativo de um sistema eletroquímico para medidas voltamétricas [18].

1.2.4.1 Célula eletroquímica

Nesta técnica, as análises são efetuadas num recipiente adequado, chamado de célula eletroquímica. Esta contém uma solução eletrolítica (eletrólito de suporte). As funções desta solução são: redução da resistência do meio e eliminação da corrente de migração. Pode ainda servir, como no caso deste trabalho, para manter o pH constante (solução tampão).

A célula é ainda composta pelos três eléctrodos referidos anteriormente que são:

- RE: é um eléctrodo de calomelano saturado (SCE) ou de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl);
- CE: normalmente de platina;
- WE: eléctrodo inerte de potencial variado, composto por um metal (mercúrio, platina ou ouro), carbono vítreo ou pasta de carbono.

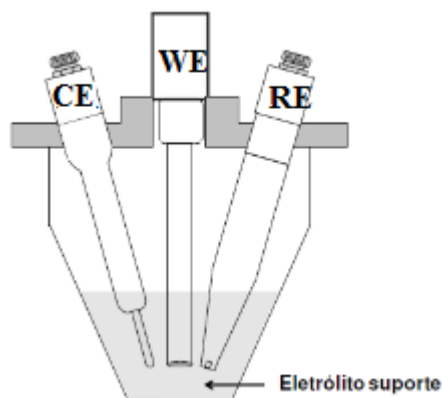


Figura 6: Célula eletroquímica; CE: eléctrodo auxiliar; WE: eléctrodo de trabalho e RE: eléctrodo de referência [18].

O RE tem como função fornecer um potencial eléctrico constante e definido, sem que seja substancialmente polarizado durante a experiência. Quanto ao CE, este é responsável por facultar a corrente requerida pelo WE, de maneira a sustentar a electrólise. Estes eléctrodos estão ligados a um potencióstato responsável por facultar o potencial, avaliar a corrente gerada e enviar um sinal para o dispositivo de registo, dando origem à curva corrente vs. potencial chamada de voltamograma.

O WE pode ser de diversas formas e tamanhos. Pode ser ainda, estacionário ou rotatório e composto por diversos materiais. A escolha do tamanho, estrutura e material

depende do critério de estabilidade e seletividade frente à espécie que se pretende analisar [18,20].

1.3 Biossensores

Os primeiros estudos sobre o desenvolvimento de biossensores tiveram origem no século passado. O primeiro a ser conhecido foi chamado de “elétrodo enzimático”, demonstrado por Clark e Lions em 1962 [21].

Biossensor é *“qualquer dispositivo de deteção que incorpore tanto um organismo vivo ou produtos derivados de sistemas biológicos (enzimas, anticorpos, ADN, etc.), como um transdutor que fornece a indicação, sinal ou outra forma de reconhecimento de uma substância específica no ambiente”* [22].

Estes dispositivos podem ser diferentes dependendo do seu tipo de deteção:

- Direta: (sensor de deteção direta ou sistema não reticulado) onde a interação biológica é medida diretamente, usa-se um ligante não-catalítico, como recetores celulares ou anticorpos;
- Indireta: (sensor marcado ou sistema reticulado) onde se usa anticorpos.

Consoante o tipo de construção, podem definir-se dois tipos de biossensores:

- 1) Os que dependem da ligação seletiva do analito-alvo ao ligante preso à superfície (como anticorpos ou sondas oligonucleotídicas);
- 2) Dispositivos de bioafinidade; os que utilizam uma enzima imobilizada para reconhecimento do substrato-alvo, dispositivos bioanalíticos [23].

1.3.1 Características de um Biossensor

Os biossensores podem ser construídos para uso contínuo ou descartável sendo considerados ferramentas promissoras para completar as técnicas analíticas existentes. Apresentam características únicas como [24]:

- Seletividade: capacidade que algumas macromoléculas biológicas detêm para discriminar diferentes tipos de substratos;
- Faixa de sensibilidade: faixa de concentração mensurável;
- Tempo: tempo de resposta; tempo de recuperação e tempo de vida útil;

- Estabilidade operacional: a resposta do biossensor varia em função dos diferentes fatores: geometria do sensor, modo de preparação, recetores e transdutores utilizados. Está dependente ainda da difusão externa e interna do substrato e das condições operacionais (pH, temperatura, natureza do tampão, composição da solução matriz que contém a amostra, concentração do analito e presença de solventes orgânicos e de outras substâncias);
- Pequeno tamanho: que possibilita a sua simples instalação no ambiente de medida e monitorização.

1.3.2 Estrutura e funcionamento

Os componentes que constituem um biossensor são: um componente biológico; um sistema de transdução (transdutor) e um sistema de processamento de dados e registo. Quanto ao componente biológico, pode dizer-se que efetua o reconhecimento da substância de interesse a partir de uma reação química produzindo um sinal que pode ser resultado de: uma variação de concentração de protões, libertação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação da massa, mudança de estado de oxidação, etc. No que respeita ao transdutor pode dizer-se que este converte o sinal, biológico, num sinal mensurável como: corrente, potencial, variação de temperatura, etc. A figura 7 demonstra de forma clara esta configuração [24].

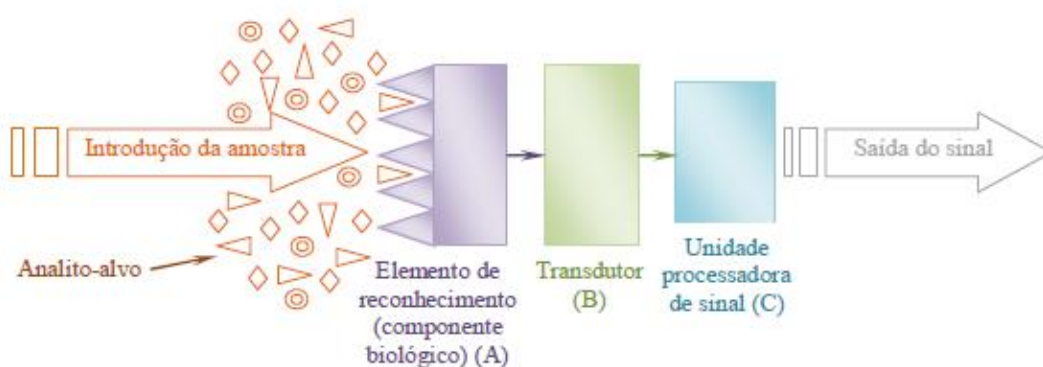


Figura 7: Composição de um biossensor mostra a organização dos seus componentes. (A) onde é feita a deteção do analito-alvo; (B) onde o sinal é convertido; (C) onde o sinal é processado [24].

Com estes tipos de biossensores pode efetuar-se uma deteção quantitativa e/ou qualitativa, de uma determinada espécie, devido ao facto de estes responderem seletivamente às espécies químicas em estudo, produzindo um sinal elétrico cuja intensidade depende da concentração da espécie química [24].

1.3.2.1 Componente biológico

Uma das características mais importantes de um biossensor é o facto de possibilitar a discriminação entre vários substratos, ou seja apresenta seletividade. A escolha do componente biológico exige alguns requisitos como: disponibilidade de domínios reativos para reagir/interagir com o analito; estabilidade frente ao meio e às condições de medição; possibilidade de modificação/imobilização sobre o eletrodo, por meios químicos, sem modificar o seu desempenho.

As enzimas foram e continuam a ser o elemento biológico mais utilizado na construção de biossensores [24].

Com base nas exigências acima citadas os componentes biológicos podem ser: enzimas, ácidos nucleicos, cofatores, recetores, anticorpos, células de microrganismos, organelos e tecidos (vegetais, animais e fúngicos). Assim dependendo do componente escolhido os biossensores podem ser divididos em várias classes: enzimáticos, microbiológicos, baseados em ADN e imunossensores [21, 24].

1.3.2.1.1 Ácidos Nucleicos

Os ácidos nucleicos encontram-se no núcleo das células eucarióticas, nas mitocôndrias, nos cloroplastos e no citosol das células procarióticas. Os ácidos nucleicos armazenam e transmitem a informação hereditária. Existem dois tipos de ácidos nucleicos (Figura 8) [25]:

- O ácido desoxirribonucleico – ADN;
- O ácido ribonucleico – ARN.

Estes ácidos nucleicos são polímeros de nucleótidos. Cada nucleótido é composto por três elementos:

- Uma base azotada;
- Uma pentose que no ADN é a desoxirribose;
- Um grupo fosfato.

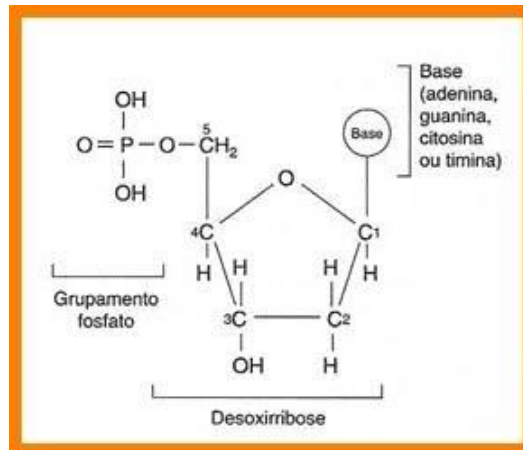


Figura 8: Estrutura básica dos nucleótidos [25].

As bases azotadas, na constituição do ADN, podem ser:

- Adenina (A);
- Citosina (C);
- Guanina (G);
- Timina (T);

O ADN é um polidesoxirribonucleótido formado por milhares de nucleótidos ligados entre si através de ligações fosfodiéster.

A ligação fosfodiéster ocorre entre o fosfato do carbono 5 da pentose de um nucleótido e o hidroxilo do carbono 3 da pentose do nucleótido seguinte.

Quanto à sua estrutura (Figura 9) o ADN consiste em duas cadeias complementares e antiparalelas em espiral (estrutura em dupla hélice) [26].



Figura 9: Esquema da estrutura do ADN [27].

1.3.2.1.1 Comportamento eletroquímico do ADN

O estudo sobre o comportamento eletroquímico do ADN tem um importante significado teórico e prático para a ciência. Até há presente data já se realizaram-se muitos estudos sobre o ADN. A descoberta da eletroatividade dos ácidos nucleicos realizou-se há meio século e deveu-se principalmente à descoberta da eletroatividade das bases que os compõem. Os seus principais objetivos focaram a redução do ADN nos elétrodos de mercúrio e na interação entre o elétrodo de trabalho e o ADN, nativo ou desnaturado [28].

Os estudos relativos ao comportamento eletroquímico do ADN em elétrodos de mercúrio demonstraram a redução eletroquímica de duas bases (citosina e adenina) originava a sinais catódicos e a reoxidação da guanina a sinais anódicos. Mais tarde, Palecek e Fojta descobriram que as bases adenina e guanina eram oxidáveis, ou seja, produzem corrente anódica em elétrodos de trabalho constituídos por carbono [18].

As bases purínicas (adenina e guanina) e as bases pirimídicas (citosina e timina) apresentam atividade eletroanalítica sendo suscetíveis de sofrer oxidação eletroquímica. Como nas bases purínicas os potenciais de oxidação são mais baixos (inferior a + 1 V vs. AgCl/Ag), estas tornam-se mais eficazes para estudos eletroquímicos.

No que concerne, ao potencial de oxidação e a intensidade de corrente no eletrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE), este é influenciado pela quantidade de guanina que se encontra na cadeia do oligonucleótido (oligonucleótido é um fragmento curto de uma cadeia simples de ácidos nucleicos, tipicamente com 20 ou menos bases) [18,28].

Os sinais eletroquímicos da adenina e da guanina dependem da estrutura da molécula de ADN, isto faz com que estes sinais sejam importantes na deteção de danos existentes na molécula.

Atualmente, para a realização destes estudos, são mais utilizados os eletrodos sólidos, principalmente os de carbono (pasta de carbono, carbono vítreo, grafite). A oxidação do ADN neste tipo de eletrodos está associada à oxidação irreversível da guanina e adenina. Estes eletrodos vieram substituir os eletrodos de mercúrio, estes deixaram de ser utilizados devido à toxicidade do mercúrio.

Existem várias metodologias para estudar os ácidos nucleicos. Os mais utilizados são as medições efetuadas através de técnicas eletroquímicas. Estas apresentam vantagens como: maior sensibilidade e confiabilidade, são relativamente simples e baratas. Os sensores eletroquímicos de ADN (ou baseados no material de ADN) têm vindo a tornar-se muito interessantes no que respeita à análise eletroquímica pois são muito mais rápidos que os métodos clássicos, além de possuírem todas as vantagens de análise eletroquímica. Estes biossensores de ADN são ainda muito eficazes no que respeita à deteção dos danos causados na molécula do ADN [18].

Com vista a uma melhor compreensão e aplicação dos métodos eletroquímicos é importante conhecer-se o comportamento eletroquímico dos ácidos nucleicos. De entre os ácidos nucleicos existentes destaca-se a adenina, pois o seu comportamento é analisado no presente estudo.

1.3.2.1.1.2 Comportamento eletroquímico da Adenina

A adenina é uma base púrica e possui uma grande importância em diferentes sistemas biológicos, participando na respiração celular na forma de adenosina trifosfato (ATP), dinucleotídeo nicotinamida-adenina (NAD) e dinucleotídeo flavina-adenina (FAD), participa ainda na síntese proteica como um componente químico do ADN [29].

De acordo com diversos estudos as bases do ácido nucleico sofrem redução e oxidação na superfície do eletrodo. A reação da adenina com os ROS dá origem a produtos como a 8-Hidroxi guanina, 2-Hidroxiadenina (isoguanina) e o 6-N-Hidroxi aminopurina. A Figura 10 demonstra o processo de oxidação electroquímica da adenina [18].

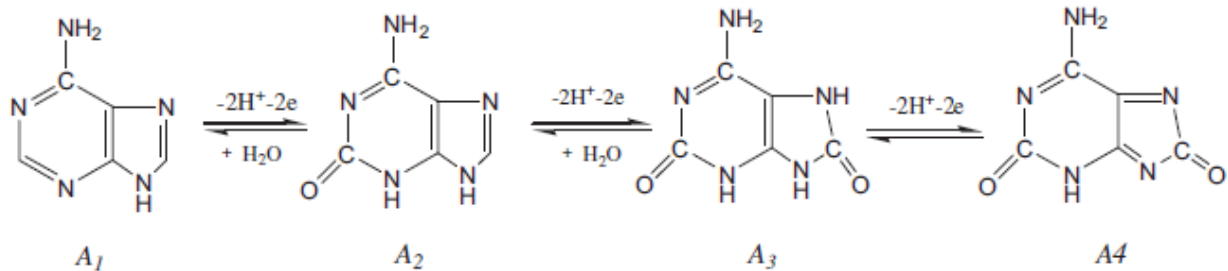


Figura 10: Processo de oxidação eletroquímica da adenina [18].

1.3.2.2 Biossensor à base de ADN

Um biossensor à base de ADN é um dispositivo que contém oligonucleotídeos, imobilizados na sua superfície e conectados a um transdutor. Este tipo de biossensor pode avaliar a presença de genes específicos ou genes mutantes relacionados com doenças humanas hereditárias.

A deteção eletroquímica pode ocorrer de duas formas:

- Por oxidação direta ou catalisada de bases de ADN;
- Por resposta eletroquímica produzida por uma enzima ou outro marcador redox, através de uma reação específica com sondas de ADN alvo.

O desenvolvimento de novas metodologias para a deteção de ADN e dos seus polimorfismos é possível devido ao mapeamento da sequência do genoma em organismos vivos, inclusive o genoma humano. Até à data, a maior parte dos métodos desenvolvidos são baseados na imobilização, de pequenas cadeias simples de oligodeoxinucleotídeos, numa superfície de metal, polimérica ou carbono vítreo. A análise de cadeias desconhecidas de ADN é feita a partir da colocação destas cadeias em contato com sondas

de sequências conhecidas e complementares, detendo-se a reação de hibridação entre estas duas cadeias [21,23].

Várias novas tecnologias de biossensores que envolvem ADN têm vindo a ser estudadas, isto deve-se ao facto de serem bastante rápidas. Estas tecnologias são baseadas na imobilização de cadeias de ADN em transdutores diferentes, que vão converter a reação de hibridização de cadeias complementares num sinal elétrico ou ótico. Algumas das aplicações deste biossensor são: a identificação de patologias, a monitorização da expressão dos genes e o diagnóstico de desordens genéticas [21,23].

1.3.2.3 Sistema de Transdução

A definição de transdutor é *“todo o dispositivo que transforma uma forma de energia em outra”*. No campo da instrumentação elétrica, é definido como *“todo o equipamento que converte qualquer grandeza física não elétrica (por exemplo temperatura, som, luz) num sinal elétrico”*. Como componente de um biossensor um transdutor é *“o equipamento que converte o produto de uma reação biológica num sinal elétrico quantificável e processável”*. Este equipamento permite detetar a presença, mudança, amplitude ou frequência de uma grandeza sujeita à medição, e fornecer à saída, um sinal elétrico que, quando processado e aplicado a um aparelho de medição, possibilita a quantificação do elemento medido [22,24].

Para a escolha do transdutor tem-se em conta três condições básicas: o transdutor deve adaptar-se ao material imobilizado; o transdutor deve ser específico para o analito de interesse (capaz de detetar as variações que ocorrem na reação biológica); essas variações devem ocorrer na faixa de concentração adequada. Deve ter-se em conta ainda outros aspetos como: a frequência de resposta; compatibilidade com o meio ambiente onde opera; exatidão; características elétricas (possibilidade de amplificação quando necessário, relação entre sinal e ruído) e ainda condições de aplicação e robustez (dimensões, peso e robustez mecânica e elétrica) [22,24].

Para além da classificação apresentada anteriormente podemos ainda classificar os biossensores de acordo com o tipo de deteção que utiliza. Segundo esta classificação existem biossensores:

- eletroquímicos: amperométricos; potenciométricos; condutimétricos (dependo do seu principio de medição);
- acústicos;
- óticos;
- calorimétricos.

De entre estes vários transdutores os mais utilizados são: os eletroquímicos; óticos e calorimétricos [22,24].

1.3.2.3.1 Biossensores eletroquímicos e amperométricos

De entre todos os tipos de biossensores, de acordo com o tipo de transdutor, já referidos, destacam-se os eletroquímicos, nomeadamente os voltamétricos, pois são o tipo de biossensores aplicados a este estudo.

Os biossensores eletroquímicos são: simples; sensíveis; confiáveis e de resposta rápida e utilizam uma instrumentação de baixo custo.

Fornecem uma abundância de informações que qualificam e descrevem determinados sistemas, baseiam-se sempre nas propriedades elétricas da solução do analito, quando este se encontra em contacto com a célula eletroquímica. Estas informações abrangem: velocidade de transferência de carga interfacial; velocidade de transferência de massa; a extensão de adsorção e constantes de equilíbrio de reações químicas.

Estes sensores apresentam a vantagem de as células eletroquímicas serem específicas para um estado de oxidação particular e a sua instrumentação ser relativamente barata.

O seu princípio de funcionamento baseia-se na medição da corrente produzida por uma reação química entre espécies eletroativas.

A reação química entre as espécies eletroativas ocorre num potencial determinado, onde é gerada a corrente que está relacionada com a espécie em estudo.

Com o uso de mediadores surgiu uma nova classe de transdutores amperométricos, estes mediadores são incorporados nos eléctrodos das seguintes formas:

adsorção, oclusão em filmes poliméricos, ligação covalente ou simplesmente misturados na pasta de carbono [24].

Na Tabela 3 apresentam-se os vários tipos de transdutores e os seus tipos de medição e aplicação típicos.

Tabela 3: Tabela resumo dos sistemas de deteção aplicados nos biossensores [24].

| Sistemas de Deteção | Sinal Medido | Aplicações Típicas |
|--|-------------------|--|
| <u>ELETROQUÍMICOS</u> | | |
| Condutimétrico | Condutância | Reações catalisadas por Enzimas |
| Amperométrico | Corrente elétrica | Susstratos enzimáticos e sistemas imunológicos (antigénio/anticorpo) |
| Potenciométrico | Voltagem | Iões, gases, espécies de redução-oxidação |
| Carga iónica ou de efeito de campo: ISFET (ião seletivo) ENFET (enzima) IMFET (imunológico) | | Iões, gases, susstratos enzimáticos, analitos imunológicos, iões em meio biológico, eléctrodos enzimáticos e imunoelectrodos |
| Impedimétrico | Impedância | Imunossensores enzimáticos |
| <u>ACÚSTICOS</u> | | |

| | | |
|--|---|--|
| Cristais piezoelétricos, equipamentos de superfície acustica | Variação de massa | Gases voláteis, vapores e analitos imunológicos |
| ÓTICOS | | |
| Optoelectrónicos, fibras óticas, equipamento de ondas guiadas | Variação de luminosidade (luminescência, fluorescencia), índice de refração | pH, substratos enzimáticos, analitos imunológicos |
| CALORIMÉTRICOS | | |
| Termístores, díodos | Calor | Enzimas, organelos, células íntegras ou tecidos, gases, poluentes, vitaminas |

Os biossensores são maioritariamente utilizados no diagnóstico clínico. Os biossensores de glicose representam 90% do mercado global deste tipo de dispositivos. Além destes, existem ainda, na categoria de diagnóstico clínico, os biossensores de colesterol, lactato, triglicérides e creatinina.

Na área de avaliação ambiental, estão a ser desenvolvidos biossensores para a avaliação da toxicidade de efluentes industriais e águas residuais.

Na indústria alimentar não é tão comum o uso de biossensores porque as amostras são complexas e mais difíceis de analisar [18].

Neste trabalho, desenvolveu-se um biossensor em material de ADN para a avaliação da TAC em infusões à base de plantas. Estas infusões são fontes ricas em substâncias antioxidantes, principalmente de flavonoides. Os seus efeitos benéficos chamam a atenção da comunidade científica e têm aparecido por todo o mundo diversos estudos epidemiológicos e ensaios clínicos, que apresentam uma relação positiva entre o consumo de chá e uma menor prevalência de algumas doenças degenerativas, como doenças cardiovasculares e alguns tipos de cancro [30].

1.4 Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram:

A construção de um biossensor eletroquímico através da imobilização de dA₂₀ (sequencia de 20 adeninas) num CPE para avaliar a TAC de infusões, para isso estudou-se:

- O dano oxidativo induzido por compostos oxidantes (H₂O₂ e HO[•]) no dA₂₀-CPE;
- A proteção promovida pelo AA, na presença dos compostos oxidantes, no dA₂₀-CPE;
- Determinar e comparar a TAC das infusões obtidas com a utilização de diferentes oxidantes.

A técnica eletroquímica utilizada neste estudo foi a SWV.

2. Procedimento experimental

Como previamente referido, ocorrem inúmeras reações a nível celular, onde são gerados compostos que podem danificar o ADN. De modo a reparar os danos provocados, os organismos vivos desenvolveram um sistema de defesa complexo. Este sistema é constituído por antioxidantes que desempenham uma função determinante, uma vez que promovem um efeito protetor no ADN através da eliminação ou redução da produção de compostos com efeitos prejudiciais à saúde.

No presente estudo pretende-se fazer uma simulação *in vitro* do sistema que ocorre a nível celular. Para isto, foram construídos biossensores de ADN (imobilização de cadeias simples de ADN, ssDNA) em elétrodos de pasta de carbono. Estes biossensores foram colocados em contacto com compostos oxidantes de modo a ser estudado o dano oxidativo que ocorre no ADN que se encontra imobilizado no sensor. Paralelamente, foi utilizado um antioxidante e amostras reais, ácido ascórbico e infusões de plantas, para visualizar a proteção que ocorre no ADN.

2.1 Biossensor de dA_{20}

Os biossensores vieram revolucionar a quantificação da TAC por meio da microanálise, o que origina uma diminuição de reagentes e amostra a utilizar, assim como uma redução de custos, um aperfeiçoamento das condições experimentais e rapidez nos ensaios.

Através da eletroquímica podemos, facilmente, avaliar a TAC, pois os ensaios eletroquímicos são baseados na transferência de eletrões e os antioxidantes possuem eletroatividade notável que é detetada electroquimicamente.

É através do efeito protetor que um antioxidante fornece, em relação aos danos oxidativos provocados por espécies oxidantes no ADN, que é avaliada a TAC. Para isso, as bases de ADN, púricas ou pirimídicas, são imobilizadas no elétrodo, que no presente trabalho se trata de um elétrodo de pasta de carbono (CPE). De entre as bases de ADN qualquer uma pode ser utilizada nestes estudos, no entanto, está provado que as bases púricas por possuírem potenciais de oxidação mais baixos produzem picos melhor definidos do que as bases pirimídicas [9,31].

De forma a cumprir o objetivo deste trabalho construiu-se um biossensor utilizando-se uma sonda simples de 20 adeninas (dA₂₀) com a finalidade de estudar:

- i. O dano oxidativo provocado por compostos oxidantes no dA₂₀ imobilizado no CPE;
- ii. O efeito protetor produzido pelo antioxidante no dA₂₀.

Este biossensor foi desenvolvido através da imobilização, por adsorção física, de uma cadeia simples de dA₂₀ no CPE, através da colocação direta de uma gota deste oligonucleótido no eletrodo.

O dano oxidativo causado no dA₂₀ foi produzido através da imersão do biossensor em soluções de compostos oxidantes de diferentes concentrações, durante um certo período de tempo. Este dano produz uma diminuição significativa no sinal voltamétrico, quando comparada com a corrente obtida no dA₂₀ quando não ocorreu nenhum processo oxidativo. Contudo quando se adiciona um antioxidante observa-se um aumento do sinal voltamétrico, que é atribuído à ação protetora ao dano oxidativo [32].

A figura 11 mostra a variação do sinal eletroquímico conforme a adição de antioxidantes ou de compostos oxidantes.

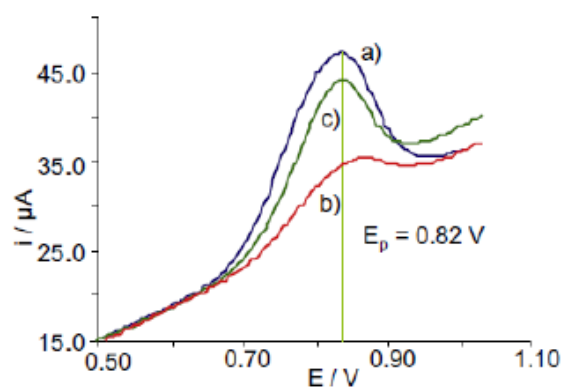


Figura 11: Intensidades de pico obtidas a partir da SWV: a) leitura direta de adenina; b) exposição a um composto oxidante; c) efeito protetor promovido por um antioxidante [1].

2.2 Material e Equipamento

2.2.1 Reagentes

Neste trabalho foram utilizados os reagentes, tal como foram recebidos, sem qualquer purificação adicional. Todos os ensaios foram realizados à temperatura ambiente. A Tabela 4 mostra quais os reagentes utilizados e qual a sua aplicação.

Tabela 4: Reagentes utilizados e respetiva aplicação.

| <i>Reagentes</i> | <i>Aplicação</i> |
|---|--|
| Etanol (Panreac) | Limpeza de material (célula eletroquímica) |
| Parafina (Uvasol, Merck) | Produção de pasta de carbono |
| Grafite (Ultra “F” purity Carbone Lorraine) | Produção de pasta de carbono |
| EDTA – ácido etilenodiamino tetraacético – (99%, Fluka) Fórmula química: C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ | Complexar o Fe ²⁺ |
| dA ₂₀ (Sigma) Local de armazenamento: congelador 4°C | Simulação do ADN |
| Sulfato de ferro II heptahidratado (≥ 99,0% Sigma Aldrich) Fórmula química: Fe ²⁺ Local de armazenamento: frigorífico | Geração do radical HO [•] |

| | |
|---|--|
| <p>Peróxido de hidrogénio (30% w/v, Panreac) Fórmula química: H_2O_2 Local de armazenamento: frigorífico</p> | <p>Oxidante: H_2O_2</p> |
| <p>Hidróxido de sódio ($\geq 98\%$, Panreac) Fórmula química: NaOH</p> | <p>Geração do radical HO^\bullet</p> |
| <p>Solução salina de fosfato de sódio (SSPE) concentrado 20x (Sigma Aldrich) Local de armazenamento: frigorífico</p> | <p>Tampão salino (SSPE)</p> |
| <p>Ácido ascórbico (Merk, 99,7%) - AA Fórmula química: $C_6H_8O_6$ Local de armazenamento: local seco</p> | <p>Antioxidante</p> |
| <p>Azoto (SYSADVANCE)</p> | <p>Imobilização do dA_{20}</p> |
| <p>Fosfato di-sódio di-hidratado (Merck) Fórmula química: Na_2HPO_4</p> | <p>Solução tampão (PBS)</p> |
| <p>Fosfato monossódico hidratado (Merck) Fórmula química: NaH_2PO_4</p> | <p>Solução tampão (PBS)</p> |
| <p>Água Fórmula química: H_2O</p> | <p>Limpeza de material; preparação de soluções</p> |
| <p>Ácido clorídrico Fórmula química: HCl</p> | <p>Ajustar o pH das soluções tampão</p> |

2.2.2 Soluções

No presente trabalho prepararam-se soluções tampão salinas de fosfato (PBS) de pH 7,4; soluções salinas de fosfato de sódio (SSPE); soluções de dA_{20} ; soluções de peróxido de hidrogénio; de Fe(II)-EDTA (responsável pela produção de radicais hidroxilo, HO^\bullet , resultante da reação de Fenton); soluções de AA.

Solução tampão de PBS

Para a preparação da solução salina de fosfato (PBS) 0,1mol/L foram preparadas as soluções de 0,1mol/L Na₂HPO₄ e de NaH₂PO₄, acertando-se o pH a 7,4 com HCl.

Solução tampão SSPE

A solução tampão SSPE 2x foi obtida por diluição de 20 vezes da solução SSPE em água ultrapura.

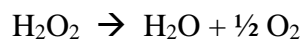
Soluções de dA₂₀

Foram preparadas soluções de dA₂₀ de concentração de 100mg/L a partir de uma solução-mãe de 964 mg/L em solução tampão SSPE 2x. Esta solução foi preparada num *eppendorf*, quase diariamente e armazenada no congelador.

2.2.2.1 Soluções Oxidantes

I) **Peróxido de Hidrogénio (H₂O₂)**

O peróxido de hidrogénio é um oxidante, que pode oxidar a maior parte das substâncias orgânicas, além de diversas substâncias inorgânicas. É um metabolito natural em muitos organismos o qual, quando decomposto, resulta em oxigénio molecular e água [33].



Equação 1

A solução de H₂O₂ de concentração 0,009 mol/L utilizada neste estudo foi preparada através de uma solução-mãe comercial de 9 mol/L.

Para a determinação rigorosa da concentração de H₂O₂ utilizou-se um método espectrofotométrico. Para tal, numa célula de quartzo colocou-se 3mL de H₂O (branco) e noutra (célula de referência) coloca-se também 3mL de H₂O, foram as duas colocadas no equipamento e fez-se o zero no equipamento de UV/Vis. Depois de zerar retirou-se 10μL

de água da célula de referência e colocou-se 10µL de H₂O₂ (cerca de 0,1 mol) e mediu-se a absorvância a 240nm.

Sabendo-se que o coeficiente de absorvância molar do H₂O₂ é 43,6M⁻¹cm⁻¹ e obtendo a absorvância (0,017 U.A.) calculou-se a concentração do peróxido comercial, usando a lei de Beer. Por fim multiplicou-se pelo fator de diluição e obteve-se a concentração no frasco comercial.

A lei de Beer, relaciona a absorção da radiação com as propriedades do material atravessado por esta radiação monocromática):

$$\text{Abs} = \epsilon \times L \times c$$

Equação 2

Onde, Abs: absorvância lida; ϵ : coeficiente de absorvância molar (M⁻¹cm⁻¹); L: percurso ótico (1 cm); c: concentração (mol/L). Obteve-se a concentração rigorosa de H₂O₂ de 0,117 mol/L.

II) Radical Hidroxilo (HO[•])

A reação de Fenton (Equação 3) foi usada para a produção do radical hidroxilo. Esta solução foi preparada através de uma mistura de Fe²⁺: EDTA: H₂O₂ (1x10⁻⁶ mol/L; 2x10⁻⁶ mol/L; 4x10⁻⁵ mol/L) na proporção molar de 1:2:40.



Equação 3

Para se obter esta solução foi necessário a preparação de uma solução de ferro em de EDTA de modo a conseguir-se solubilizar totalmente o Fe (II).

Para se efetuar reação de Fenton mistura-se na proporção de 1:40 as soluções de Fe²⁺ e de H₂O₂.

A Reacção de Fenton, faz a geração catalítica de radicais hidroxilo a partir da reação em cadeia entre o ião de ferro (Fe²⁺) e o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), em meio

ácido, tem vindo a demonstrar-se muito eficaz na oxidação de compostos orgânicos tóxicos e não biodegradáveis. Este reagente é aplicado essencialmente no tratamento de águas residuais, lamas e na remediação de solos contaminados [34].

2.2.2.2 Soluções Antioxidantes

No presente trabalho foi utilizado como antioxidante padrão, o AA (Figura 12). Este apresenta uma grande importância em sistemas bioquímicos, farmacológicos, eletroquímicos entre outros, sendo as suas propriedades químicas de oxidação- redução as de maior interesse [34].

O AA é um composto hidrossolúvel que existe naturalmente na maioria dos frutos e vegetais. A capacidade redutora do AA é de mais valia e caracteriza a sua função biológica. Este participa na hidroxilação de colagénio, na biossíntese de carnitina e na biossíntese de hormonas e aminoácidos.

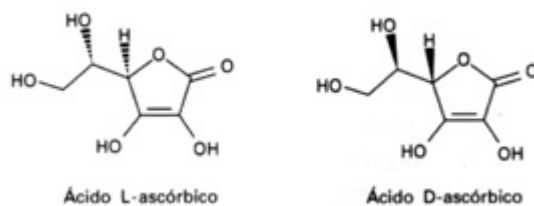


Figura 12: Estrutura química do ácido ascórbico [35].

A concentração de AA existente nos alimentos é afetada por vários fatores como: estação do ano, estágio de maturação, tempo de armazenamento [34].

Neste trabalho preparam-se diariamente e, ao abrigo da luz, soluções aquosas de AA de concentração 500mg/L.

2.2.3 Equipamento

Com o objetivo de avaliar o dano oxidativo provocado no biossensor baseado no dA_{20} e o efeito protetor promovido por antioxidantes no mesmo, recorreu-se a SWV. Para tal utilizou-se um potencióstato (Autolab Metrohm) com um *software* de aquisição e tratamento de dados GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4.9,

ECOCHÉMIE (Figura 13). Este *software* possibilitou a obtenção de voltamogramas de onda quadrada que demonstram a relação entre a intensidade de pico (i_p) em Amperes (A) e o potencial de pico (E_p), em Volts. Na medida voltamétrica usou-se um RE de Ag/AgCl, um CE de platina e um WE de pasta de carbono.

Nas pesagens dos reagentes usou-se, a balança analítica New Classic da METTLER com uma precisão de 0,00001g.

Para o ajuste do pH das soluções tampão utilizou-se um medidor de pH da marca CRISON.

Para a dissolução de compostos sólidos utilizou-se o banho de ultra-sons da BANDELIN.

Recorreu-se a uma placa de agitação da NAHITA para garantir a homogeneidade nos ensaios do dano oxidativo.

Foi utilizado um equipamento da SYSADVANCE para a utilização de azoto na secagem da gota de dA_{20} no CPE.

No cálculo da concentração rigorosa do H_2O_2 utilizou-se um espectrofotómetro UV-Vis da marca Thermo Scientific de modelo Evolution 300.

Para o tratamento das amostras de infusões utilizou-se a centrífugadora de marca Thermo Scientific de modelo HERAEUS FRESCO 21 Centrifuge.

No tratamento das amostras utilizou-se ainda os filtros de seringa PTFE da marca Teknokroma de 13mm de diâmetro com uma porosidade de 0,22 μ m.



Figura 13: Imagens ilustrativas do equipamento, sendo a primeira imagem correspondente ao AUTOLAB e as duas restantes à célula eletroquímica.

2.2.3.1 Construção do eléctrodo de pasta de carbono (CPE)

Com a finalidade de cumprir os objetivos deste trabalho procedeu-se à construção de um CPE modificado com dA₂₀.

A pasta de carbono consistiu numa mistura de 1,8g de parafina, que atua como ligante, e 5g de grafite (carbono). De modo a obter-se o aspeto desejado, foi necessário misturar e triturar os dois componentes até se atingir um aspeto brilhante, homogéneo e sem quaisquer pontos brancos. Esta pasta foi feita sempre que necessário e guardada num exsiccador de modo a evitar a degradação da mesma pela humidade.

O CPE é constituído exteriormente por um tubo de teflon e internamente por um pistão de aço inoxidável.

Para construir este CPE (Figura 14) utilizou-se uma microespatula e colocou-se a pasta de carbono no orifício do eléctrodo (Figura 14). Para não existirem resistências e/ou interferência precisou-se de polir a superfície do CPE até se obter uma área homogénea e sem espaços entre o interior do eléctrodo e a pasta de carbono.

Após cada ensaio, a superfície do eléctrodo foi renovada.

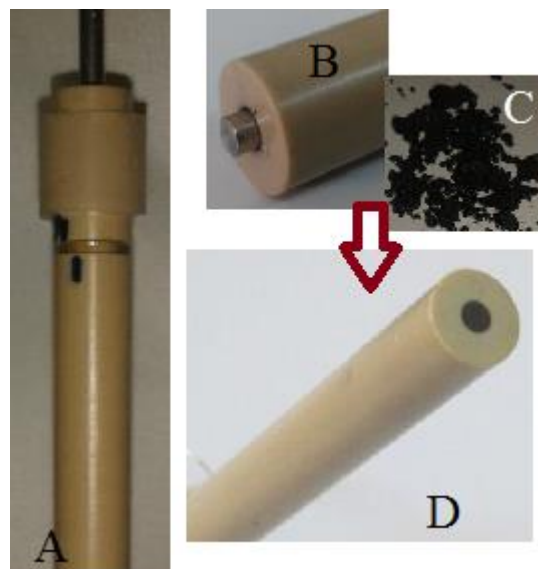


Figura 14: Construção do CPE; A: ilustração do eléctrodo; B: ilustração do pistão de aço inoxidável; C: pasta de carbono; D: CPE polido.

2.3 Preparação das infusões

A TAC de 10 amostras de infusões foi avaliada com recurso a este biossensor. As ervas foram recolhidas em supermercados existentes na região do Porto. A Tabela 5 apresenta a composição das amostras analisadas.

Tabela 5: Tabela da composição das amostras.

| Número | Nome | Marca | Ingredientes |
|--------|----------------------------|--------------------|--|
| 1 | Pura Vida - Prodrenant | Pingo Doce | Cavalinha (planta, 30%), alcachofra (folhas, 25%), urtiga verde (folhas, 25%), pilriteiro (folha, 20%) |
| 2 | Anti - Celulite | Naturefoods | Centela asiática (folhas, 25%), bétula (folhas, 20%), bodelha (planta, 20%), dente-de-leão (plata, 15%), gilbarbeira (raiz, 10%), erva prata (planta, 10%) |
| 3 | Alcachofra e Dente-de-leão | Ignoramus | Dente-de-leão (planta, 60%), alcachofra (folha, 20%), menta (folha, 20%) |
| 4 | Celulite | Ignoramus | Laranjeira (flor, 30%), funcho (sementes, 30%), milho (barbas, 15%), bodelha (caules, 15%), sene (folhas, 10%) |
| 5 | 33 Sene | Raízes da Natureza | Sene (100%) |
| 6 | Chá Preto | Tetley | Chá preto (100%) |

| | | | |
|----|-----------|------------|------------------------|
| 7 | Funcho | Ignoramus | Funcho (semente, 100%) |
| 8 | Menta | Aro | Menta (100%) |
| 9 | Cidreira | Tetley | Cidreira (100%) |
| 10 | Chá Verde | Pingo Doce | Sinensis (100%) |

Modo de preparação das infusões:

- ✓ Colocaram-se aproximadamente 200 ml de água ultrapura num gobelet;
- ✓ Ferveu-se a água;
- ✓ Colocou-se uma saqueta de chá na água durante 5 minutos;
- ✓ Suspendeu-se a saqueta e deixou-se pingar para a infusão;
- ✓ Colocou-se a infusão arrefecida num balão volumétrico de 200mL e fez-se o volume com água ultrapura.

2.4 Procedimento experimental

A parte experimental deste trabalho foi executada em 5 etapas:

- 1) Imobilização de cadeias simples de ADN, dA₂₀, através de uma adsorção física;
- 2) Indução de dano oxidativo no dA₂₀, através da imersão do CPE na solução contendo o composto oxidante;
- 3) Proteção do dA₂₀ promovido pela presença do antioxidante no meio reacional;
- 4) Observação do sinal eletroquímico do dA₂₀ por SWV;
- 5) Avaliação da TAC de infusões.

1) Imobilização do dA₂₀ no CPE

O dA₂₀ é uma cadeia simples de ADN que possui grupos de açúcar, grupos fosfato mas as suas bases são apenas adeninas e as ligações que existem são glicosídicas.

Neste trabalho a adsorção física [36,37] do dA₂₀ no CPE realizou-se através da colocação de uma gota de 4μL de uma solução de dA₂₀ (100mg/L) na superfície do eletrodo. Seguidamente a gota foi seca através de uma corrente de azoto. Esta corrente de azoto deve ser aplicada com pouca força de maneira a possibilitar que a gota permaneça na superfície do eletrodo e seque de modo uniforme por todo o eletrodo. Na Figura 15 é possível visualizar-se um esquema resumido desta etapa. Esta etapa repete-se sempre que se efetua um ensaio.

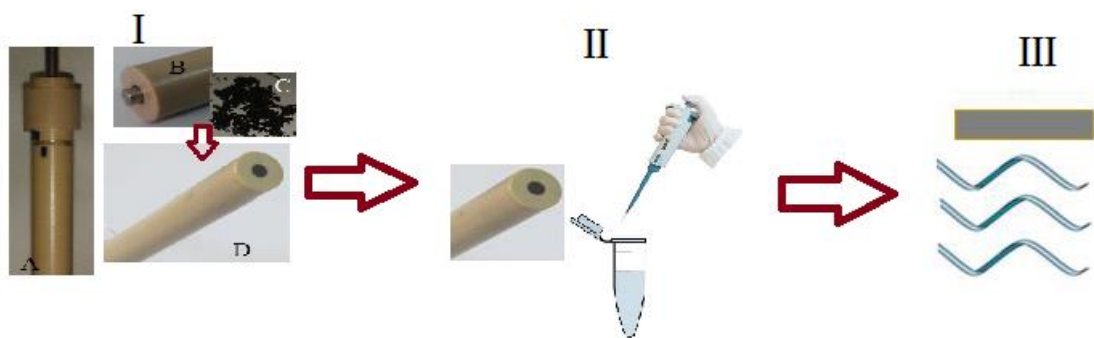


Figura 15: Esquema da 1ª etapa: I) Construção do CPE; II) Colocação da gota no CPE; III) Secagem com corrente de azoto.

2) Indução de dano oxidativo no dA₂₀

O estudo do dano oxidativo induzido por compostos oxidantes no dA₂₀ foi realizado na presença dos compostos: H₂O₂ e HO[•].

Após a imobilização do dA₂₀ no CPE, o dA₂₀-CPE, é imerso num reator (contendo o oxidante H₂O₂ ou HO[•]) e solução tampão PBS, durante 30s (Figura 16) [19].

A medição do *i_p* após a indução do dano oxidativo foi efetuada por SWV numa solução tampão de pH 7,4 por varrimento entre os potenciais de +0,70V e +1,50V.

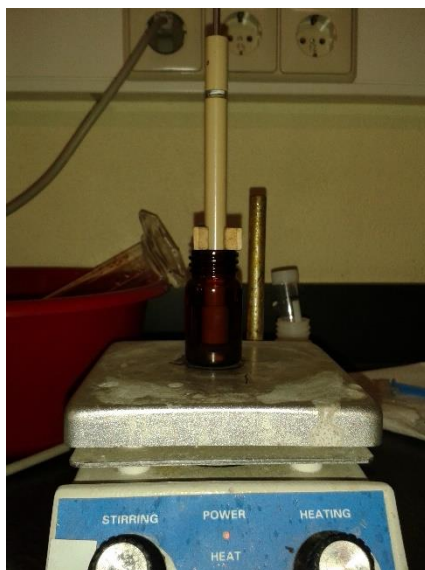


Figura 16: Representação do ensaio do estudo do dano oxidativo.

Na Tabela 6 são apresentados os parâmetros eletroquímicos utilizados na SWV.

Tabela 6: Tabela com os parâmetros utilizados em SWV.

| Parâmetros analíticos | dA ₂₀ -CPE |
|----------------------------|-----------------------|
| Frequência (Hz) | 25 |
| Step (mV) | 5,1 |
| Amplitude (V) | 0,02 |
| Intervalo de potencial (V) | +0,70 a +1,50 |
| Eletrólito | PBS pH 7,4 |

3) Proteção do dA₂₀ promovido pela presença do antioxidante

Nesta etapa estudou-se o efeito protetor causado pelo antioxidante, na presença de compostos oxidantes, no dA₂₀-CPE. O antioxidante padrão utilizado, como referido, foi o AA. Neste caso dA₂₀-CPE foi imerso, durante 30s, num reator contendo diferentes

concentrações de antioxidante, oxidante e solução tampão. Observaram-se relações lineares entre i_p e a concentração de AA e por consequente elaboraram-se curvas de calibração.

4) Proteção do dA_{20} promovido pela presença dos antioxidantes existentes nas infusões

Para avaliar a TAC das infusões, mergulhou-se o dA_{20} -CPE, por um determinado período de tempo, num reator que continha amostra real, composto oxidantes e solução tampão.

5) Observação do sinal eletroquímico do dA_{20} por SWV

Após a realização das etapas descritas, o dA_{20} -CPE foi lavado com água ultrapura e colocado na célula eletroquímica contendo eletrólito (PBS) a 0,1mol/L e pH 7,4. Em seguida realizou-se uma SWV de modo a ser possível observar o processo de eletro-oxidação do dA_{20} .

Depois de realizado o varrimento analisaram-se os dados obtendo-se como resultado experimental, o potencial de pico (E_p) e a intensidade de pico (i_p) (Figura 17). Neste trabalho experimental o estudo analítico consiste em efetuar a medição da:

- Corrente eletroquímica máxima (i_{pM}) – intensidade de pico máxima expressa como sendo o sinal do dA_{20} medida em solução tampão de fosfato (0,1 mol/L e pH 7,4) sem a ocorrência do ensaio de dano oxidativo ou da proteção;
- Corrente eletroquímica obtida após o dano oxidativo (i_{pD}) – intensidade de pico do dA_{20} obtida após o contacto do material baseado no ADN ao oxidante ($i_{pD} < i_{pM}$);
- Corrente eletroquímica obtida após os ensaios da proteção ao dano oxidativo (i_{pP}) – intensidade de pico do dA_{20} obtida após imersão do biossensor numa solução contendo antioxidante e radical hidroxilo ou peróxido de hidrogénio ($i_{pD} < i_{pP} < i_{pM}$).

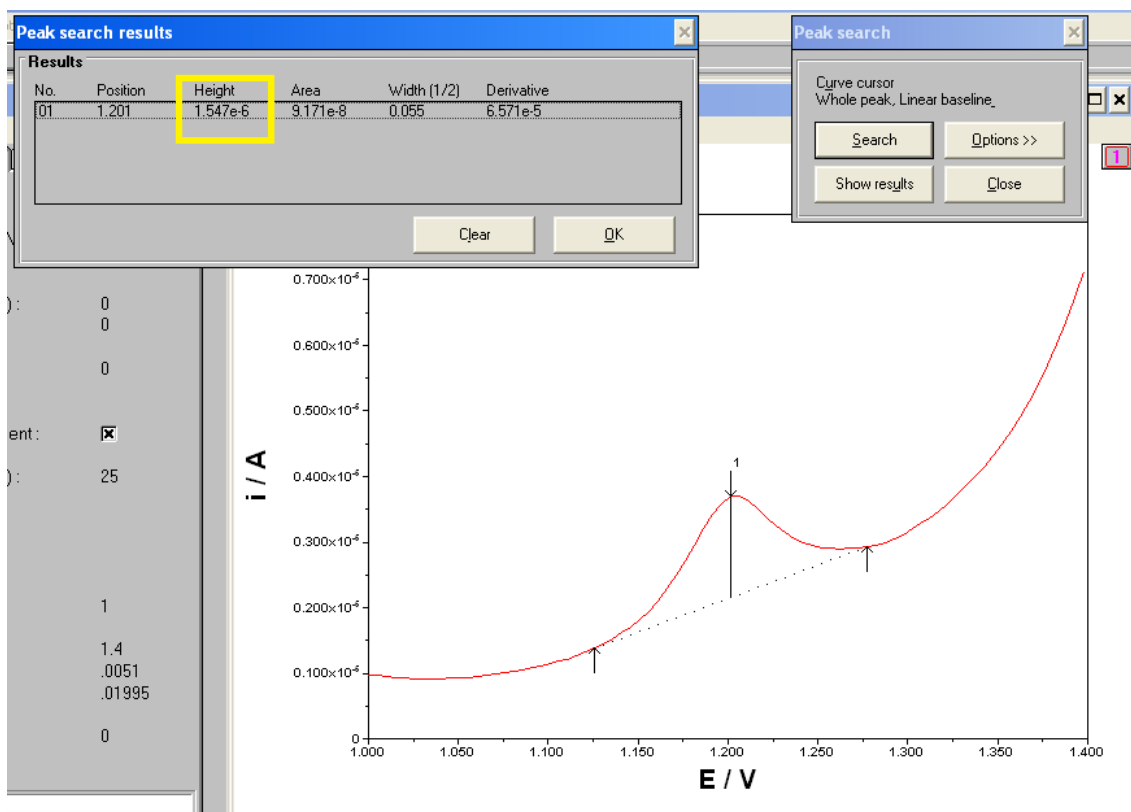


Figura 17: Figura ilustrativa da medição do valor de pico.

3. Resultados e Discussão

Como já foi referenciado, em secções anteriores, o objetivo principal deste estudo é avaliar a TAC nas amostras de infusões com recurso a um biossensor eletroquímico, nomeadamente o dA₂₀-CPE.

Tal como se encontra descrito na literatura [1,19], o dA₂₀, que se encontra imobilizado no CPE, apresenta eletroatividade, com um processo oxidativo ao E_p de cerca + 1,0 V, valor este que depende do pH, do eletrólito utilizado, da força iónica e do tipo de transdutor utilizado. A oxidação das adeninas existentes no dA₂₀ envolve um processo de redox de 2 electrões/molécula.

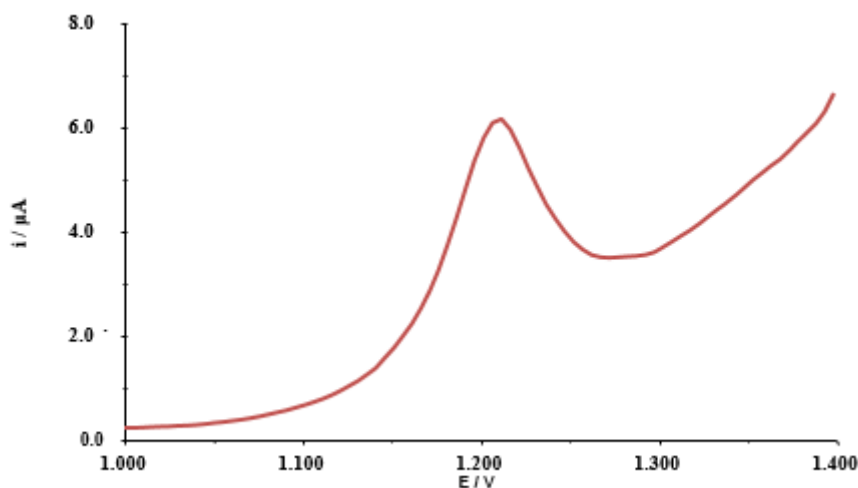


Figura 18: Voltamograma da imobilização do dA₂₀.

O dA₂₀ utilizado neste trabalho pretende simular a biomolécula de ADN e nesse sentido o dA₂₀ é suscetível de ser sofrer dano oxidativo na presença de substâncias fortemente oxidantes ou de ser protegido desses mesmos danos quando na presença de compostos antioxidantes. Tal como descrito, este processo pode ser monitorizado electroquimicamente conforme se visualiza na Figura 19 [9].

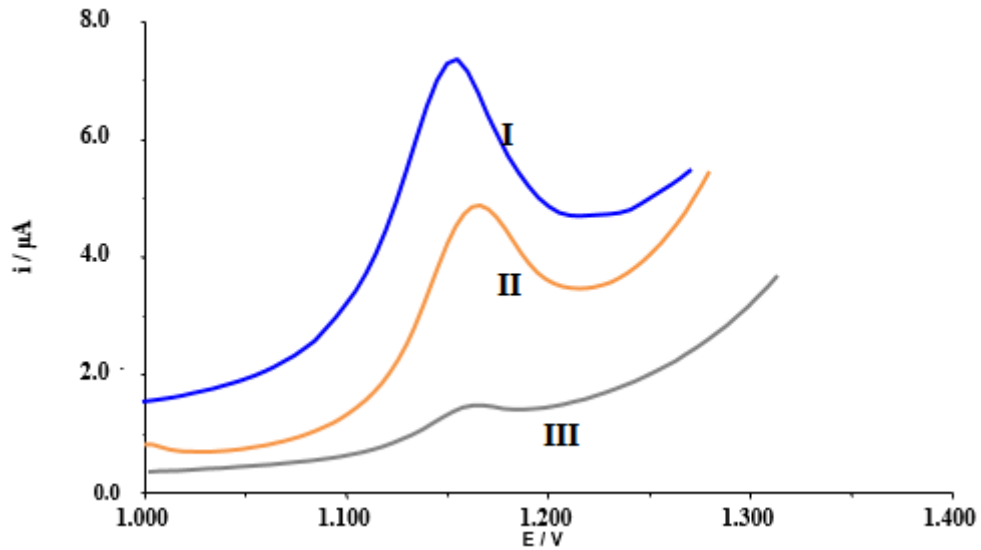


Figura 19: Voltamograma de corrente máxima; dano induzido e proteção: I) i_pM ; II) i_pP e III) i_pD .

Conforme se pode verificar, o AA promove, na presença de oxidantes, proteção no dA_{20} -CPE. Por isso, estudou-se o efeito da concentração de AA, na presença de H_2O_2 ou de OH^\cdot , na promoção da proteção do dA_{20} através da avaliação da i_p de oxidação do dA_{20} -CPE.

3.1 dA_{20} -CPE: AA na presença do oxidante H_2O_2

Após a construção do dA_{20} -CPE, este biossensor foi imerso num reator com o volume total (V_t) de solução de 10mL durante 30s e em constante agitação [19]. No reator as soluções foram colocadas com uma determinada ordem: primeiramente foi colocada a solução tampão PBS, seguidamente foi colocada a solução de AA com um volume específico para a concentração desejada (a partir de uma solução mãe de 500 mg/L) e por fim a solução contaminante de H_2O_2 de concentração 0,009 mol/L [19].

A Tabela 7 apresenta as concentrações e volumes das soluções utilizadas nestes ensaios.

Tabela 7: Planificação dos ensaios do estudo da influência da concentração de AA na presença de H₂O₂ na oxidação do dA₂₀-CPE.

| C_{AA} (mg/L) | V_{AA} (μL) | V_{H2O2} (μL) [0,009mol/L] | V_{PBS} (μL) |
|------------------------------|----------------------------|---|-----------------------------|
| 10 | 200 | 28 | 9772 |
| 15 | 300 | 28 | 9672 |
| 20 | 400 | 28 | 9572 |
| 25 | 500 | 28 | 9472 |
| 30 | 600 | 28 | 9372 |

Passado o tempo estipulado de incubação (30 s), retirou-se o dA₂₀-CPE do reator, lavou-se com água ultrapura e efetuou-se a leitura da *i_p* por SWV em solução tampão PBS de pH 7,4, num intervalo de potencial de +0,70V a +1,50V.

Na Tabela 8 estão indicados os resultados obtidos de *i_p* do dA₂₀-CPE para diferentes concentrações de AA (na presença do oxidante H₂O₂).

Tabela 8: Dados obtidos de *i_p* do dA₂₀-CPE quando se utilizou como antioxidante o AA na presença de H₂O₂.

| C_{AA} (mg/L) | <i>i_p</i> (μA) | Desvio Padrão (μA) | Erro Relativo (%) |
|--|--|-------------------------------------|------------------------------------|
| 0 | 0,22 | ---- | ---- |
| 10 | 0,58 | 0,04 | 7,35 |
| 15 | 1,16 | 0,06 | 5,49 |
| 20 | 1,40 | 0,02 | 2,02 |
| 25 | 1,87 | 0,09 | 5,29 |
| 30 | 2,14 | 0,02 | 0,93 |

Ao analisarmos a Tabela 8 verifica-se que o aumento da concentração de AA origina um aumento da i_p do dA_{20} e como consequência o aumento na promoção e eficácia da proteção por parte do AA no dA_{20} . Confirma-se que o AA é um antioxidante potente, tendo capacidade de oferecer proteção no dA_{20} -CPE na gama de concentração de AA entre 10 a 30 mg/L. Acima da concentração de 30 mg/L, o AA não tem capacidade de aumentar o nível de proteção.

Na Figura 20 apresentam-se os voltamogramas obtidos por SWV para o dA_{20} -CPE quando se utilizaram concentrações de AA crescentes (condições da Tabela 8).

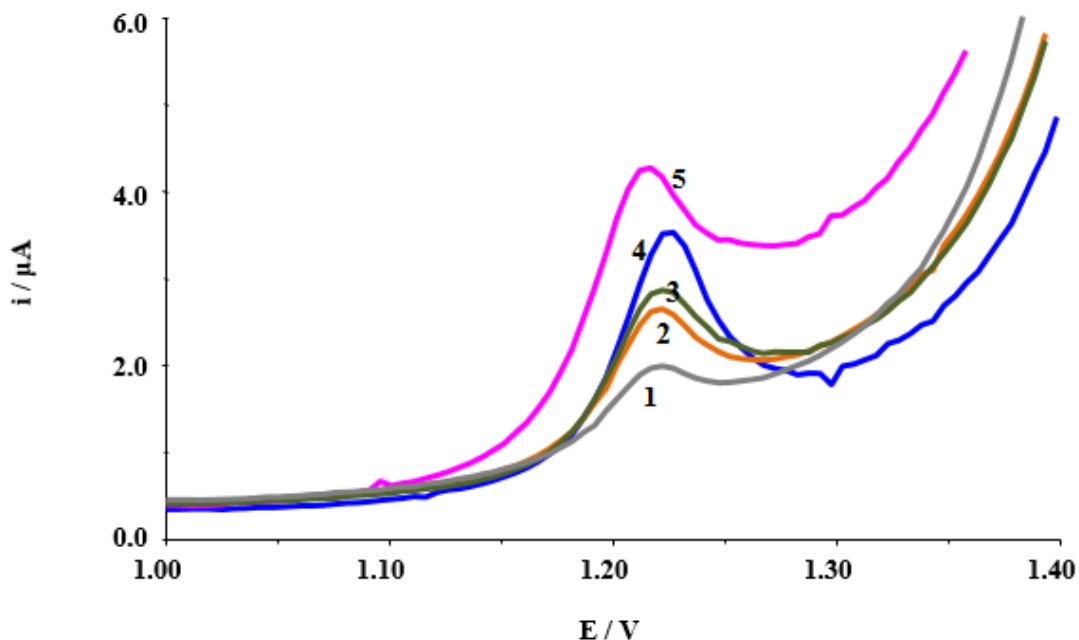


Figura 20: SWV do efeito protetor conferido pelo AA, 1) 10; 2) 15; 3) 20; 4) 25; 5) 30mg/L.

O Gráfico 1 representa a relação linear obtida entre i_p do dA_{20} -CPE e a concentração de AA. Conforme se pode observar, obteve-se uma reta de calibração com uma ordenada na origem de $0,11\mu A$, declive de $0,077\mu A/(mol/L)$ e coeficiente de correlação (r^2) de 0,9821. Os desvios associados às medições eletroquímicas foram inferiores a 8%.

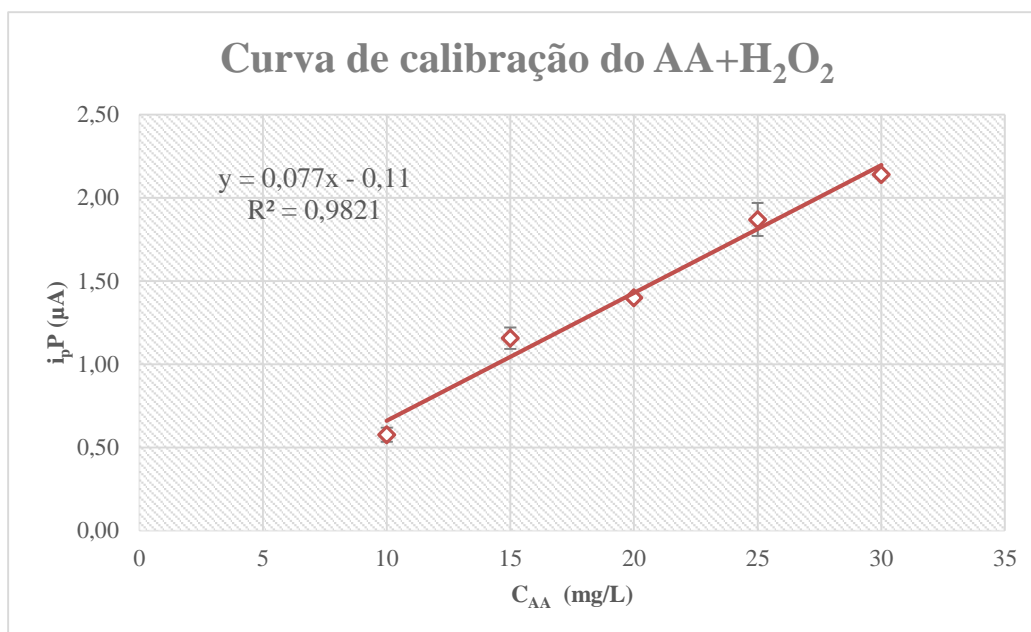


Gráfico 1: Curva de calibração do AA na presença de H₂O₂.

3.2 dA₂₀-CPE: AA na presença do radical hidroxilo HO[•]

Após construído o dA₂₀-CPE, este biossensor foi imerso num reator com o volume total (Vt) de solução de 2,5mL durante 30s mas contendo radical HO[•].

Tal como na situação anterior, no reator as soluções foram colocadas com uma determinada ordem: primeiramente foi colocada a solução tampão PBS, seguidamente foi colocada a solução de AA de concentração crescente, solução de Fe²⁺ de concentração 1,0x10⁻⁶ mol/L e seguidamente a solução de H₂O₂ de 4,0x10⁻⁵ mol/L. A Tabela 9 apresenta as concentrações e volumes das soluções utilizadas neste ensaio.

Tabela 9: Planificação dos ensaios do estudo da influência da concentração de AA na presença de HO[•] na oxidação do dA₂₀-CPE.

| C _{AA} (mg/L) | V _{AA} (µL) | V _{PBS} (µL) | V _{Fe²⁺} (µL) [1,0x10 ⁻⁶ mol/L] | V _{H₂O₂} (µL) [4,0x10 ⁻⁵ mol/L] |
|------------------------|----------------------|-----------------------|---|--|
| 1 | 5 | 2145 | 250 | 100 |
| 4 | 20 | 2130 | 250 | 100 |
| 6 | 30 | 2120 | 250 | 100 |
| 8 | 40 | 2110 | 250 | 100 |

Tal como no estudo anterior, efetuou-se a leitura da i_p do dA₂₀-CPE por SWV em solução tampão PBS de pH 7,4. Na Tabela 10 estão indicados os resultados obtidos aquando da utilização do antioxidante AA, na presença do radical hidroxilo, como protetor do dA₂₀-CPE ao dano oxidativo.

Tabela 10: Dados obtidos de i_p do dA₂₀-CPE quando se utilizou como antioxidante o AA na presença do radical hidroxilo.

| C_{AA} (mg/L) | i_p (μ A) | Desvio Padrão (μ A) | Erro Relativo (%) |
|--------------------|---------------------|-----------------------------|----------------------|
| 0 | 0,18 | ---- | ---- |
| 1 | 0,53 | 0,01 | 1,89 |
| 4 | 0,88 | 0,02 | 2,45 |
| 6 | 0,98 | 0,01 | 1,02 |
| 8 | 1,24 | 0,09 | 7,44 |

Ao analisarmos a Tabela 10 verifica-se que o aumento da concentração de AA dá origem também a um aumento da i_p do dA₂₀-CPE e como consequência o aumento e eficácia da proteção por parte do AA, no material baseado no ADN, relativamente ao radical hidroxilo. Neste caso, e contrariamente ao que ocorreu quando se utilizou como oxidante o H₂O₂, a gama de concentrações de AA necessária para promover a proteção do dA₂₀ variou entre 1 a 8 mg/L. Na Figura 21 apresentam-se os SWV para este estudo.

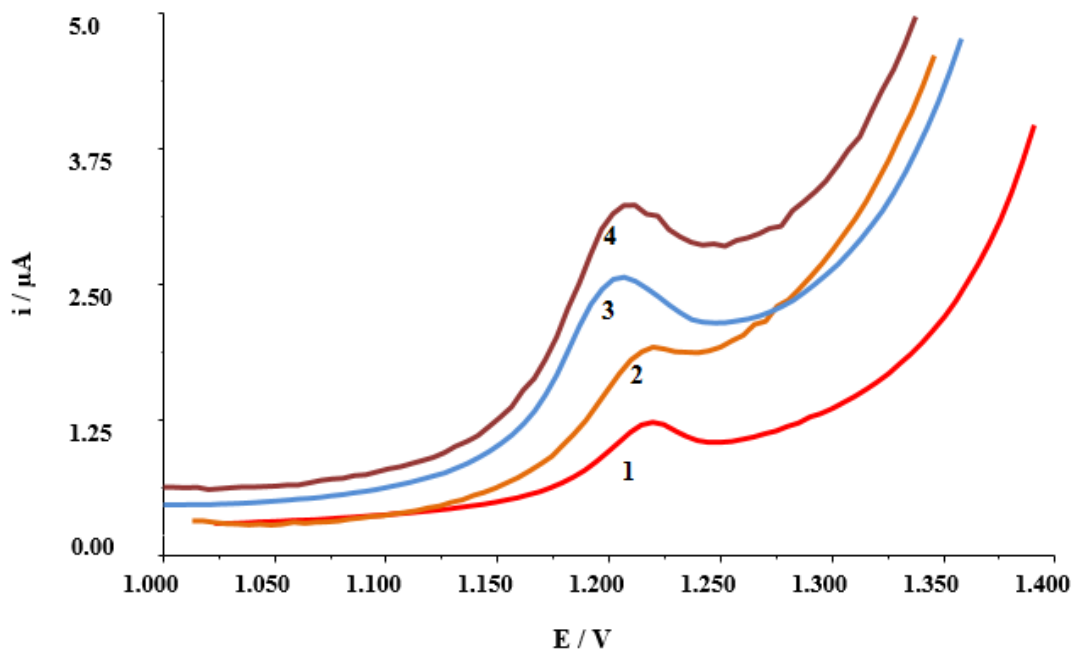


Figura 21: SWV do efeito protetor conferido pelo AA, 1) 1; 2) 4; 3) 6; 4) 8mg/L.

O Gráfico 2 mostra a relação linear obtida entre i_pP do dA_{20} -CPE e a concentração de AA, que pode ser representada matematicamente por uma equação de 1º grau e linear de ordenada na origem de $0,31\mu A$ e declive $0,12\mu A/(mol/L)$ tendo-se obtido um r^2 de 0,9827 e erros relativos inferiores a 10%.

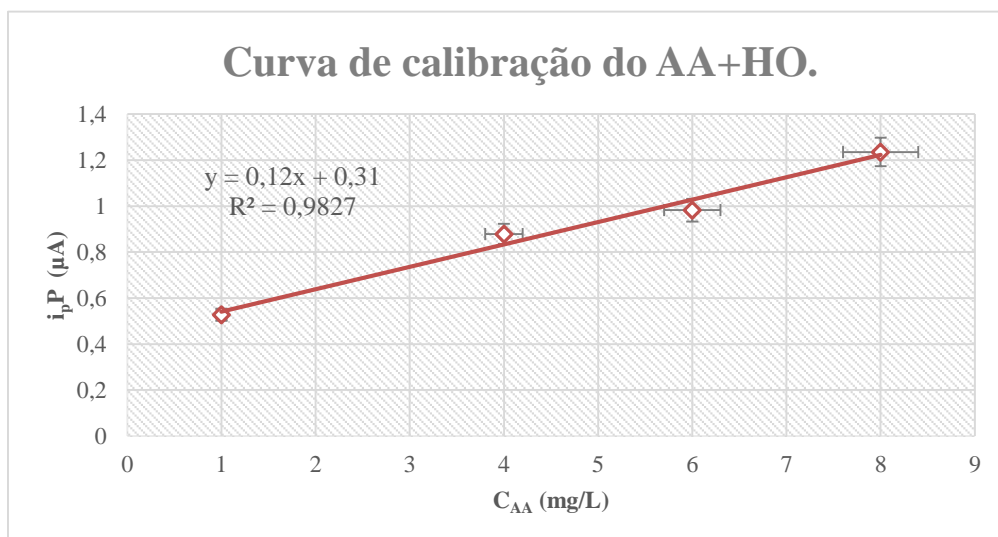


Gráfico 2: Curva de calibração do AA na presença de HO^\bullet .

3.3 Estudo do efeito da matriz das infusões no sinal eletroquímico do dA₂₀-CPE

Após a realização das curvas de calibração procedeu-se à análise das infusões, com o objetivo de determinar a capacidade antioxidante presente em cada uma das amostras. Contudo, primeiramente, avaliou-se as possibilidades de a complexa matriz das infusões interferirem no sinal eletroquímico e/ou de ocorrer sujamento do dA₂₀-CPE.

3.3.1 Avaliação da matriz complexa: oxidante H₂O₂

Foram realizados vários ensaios, utilizando duas amostras (a amostra 3 e a amostra 6, Tabela 5) e três volumes, de infusão a usar nos ensaios, diferentes (150µL; 300µL e 500µL) e com fatores de diluição de 66,66; 33,33; 20, respetivamente. Este estudo teve como finalidade estudar os possíveis sujamentos que poderão ocorrer no elétrodo. Para isso algumas amostras foram sujeitas a etapas de centrifugação e de filtração (com filtros PTFE).

Numa fase inicial, não se efetuou nenhum tratamento às amostras. Assim sendo, após a preparação das infusões, pipetaram-se de 150, 300 ou 500µL de amostra que foram colocados no reator (na presença de tampão e de composto oxidante H₂O₂). Na Figura 22 mostram-se os SWV referentes a este estudo. Conforme se pode visualizar, quanto maior for o volume de extrato de infusão colocado no reator menor é o sinal (pico) eletroquímico do dA₂₀.

Na Tabela 11 apresenta-se as i_p do dA₂₀-CPE obtidas no estudo do efeito da matriz das infusões no sinal eletroquímico do dA₂₀-CPE.

Tabela 11: Resultados obtidos para os valores de i_pP para o estudo do efeito da matriz das infusões.

| Amostra | $V_{CHÁ}$ | i_pP (μA) Sem Tratamento | Erro Relativo (%) | i_pP (μA) Com Centrifugação | Erro Relativo (%) | i_pP (μA) Com Filtração | Erro Relativo (%) |
|---------|-----------|-----------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------|--|-------------------|
| 3 | 150 | 0,97 | 3,07 | 0,50 | 7,29 | 0,71 | 38,02 |
| | 300 | 0,86 | 15,42 | 0,81 | 2,35 | 0,44 | 76,95 |
| | 500 | 0,77 | 1,94 | 0,73 | 3,09 | 0,36 | 66,92 |
| 6 | 150 | 1,36 | 6,61 | 1,05 | 9,44 | Para este chá não foram obtidos valores pois o chá preto não se consegue filtrar com a seringa, tem uma textura muito espessa. | |
| | 300 | 0,86 | 3,19 | 1,20 | 8,33 | | |
| | 500 | 0,63 | 6,40 | 0,70 | 5,42 | | |

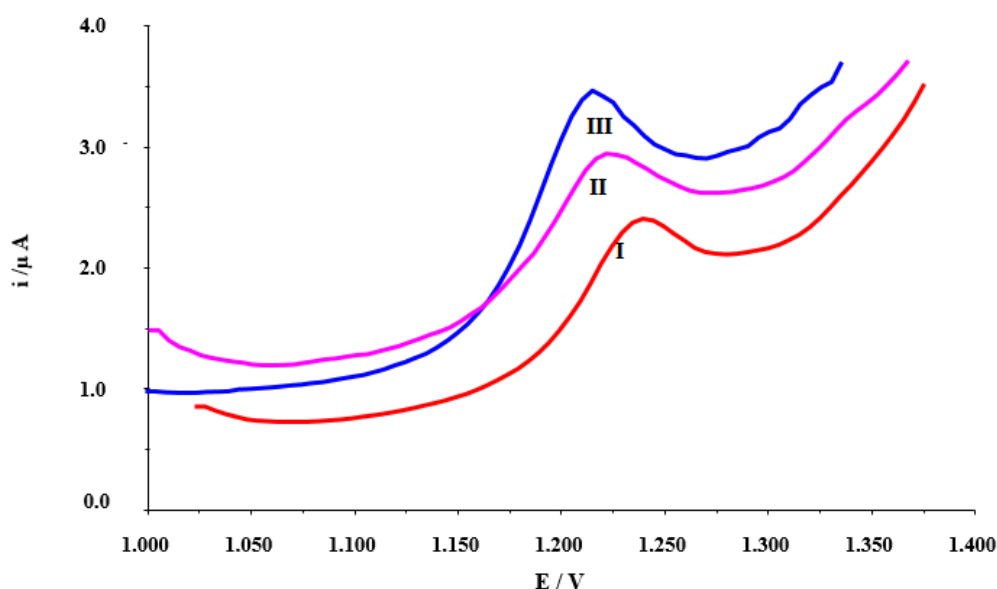


Figura 22: SWV correspondente à amostra 3 (sem tratamento): I) i_pP correspondente ao volume de $500\mu L$; II) i_pP correspondente ao volume de $300\mu L$; III) i_pP correspondente ao volume de $150\mu L$.

Conforme se pode verificar na Tabela 11, quanto maior for o volume de infusão utilizado no ensaio (o que corresponde a um menor fator de diluição), menor é o sinal analítico obtido com o dA_{20} -CPE. Numa primeira análise estes resultados podem parecer absurdos, contudo indicam que as amostras contêm interferências que inibem o sinal eletroquímico, e acima de tudo que têm a capacidade de sujar a superfície do elétrodo,

bloqueando a passagem dos eletrões, diminuindo assim o sinal eletroquímico. Por isso os próximos estudos foram efetuados com etapas de limpeza e de tratamento das amostras.

Nesta etapa, e de modo a estudar a possibilidade de as amostras sujarem o biossensor, as amostras 3 e 6 foram sujeitas a um tratamento de centrifugação durante 12 minutos a 14,8 rotações/segundo, tendo-se analisado somente o sobrenadante. Na Tabela 11 apresenta-se as i_pP do dA₂₀-CPE obtidas neste estudo e na Figura 23 os SWV das mesmas.

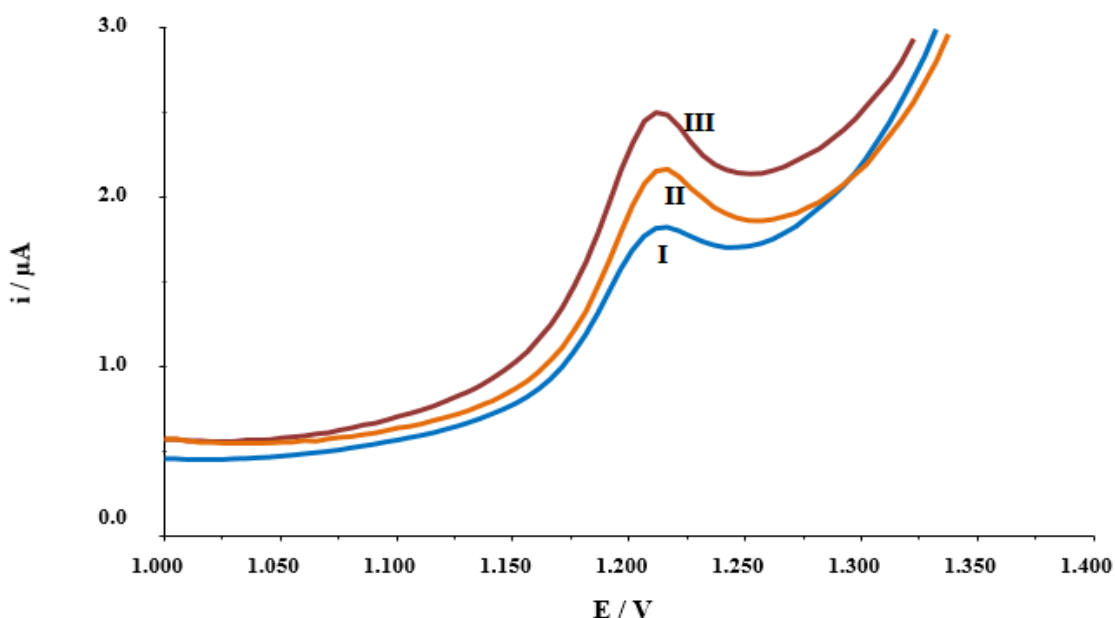


Figura 23: SWV correspondente a amostra 3 (com centrifugação): I) i_pP correspondente ao volume de 500 μ L; II) i_pP correspondente ao volume de 300 μ L; III) i_pP correspondente ao volume de 150 μ L com centrifugação.

Conforme se pode observar (e tal como aconteceu com as amostras não tratadas), as amostras que foram sujeitas a etapas de centrifugação, o sinal analítico também baixou com o aumento do volume utilizado. Este fenómeno indica que as amostras, mesmo que tratadas, continuam a sujar o eléctrodo. Contudo, se se comparar os resultados (i_pP do dA₂₀) obtidos nas amostras tratadas com as amostras não tratadas, verifica-se que as amostras tratadas (com centrifugação) originam i_pP do dA₂₀-CPE mais baixos do que quando se

usou as amostras não tratadas. Assim pode-se concluir que as amostras tratadas conferem menos proteção aos danos oxidativo induzido pelo H_2O_2 ao dA_{20} . A explicação para esta ocorrência, deve-se possivelmente ao facto de com a centrifugação serem removidos compostos antioxidantes.

Seguidamente, testou-se um novo método de tratamento das amostras, que se baseou na utilização de filtros de PTFE com seringa. Neste caso, a amostra foi colocada numa seringa e filtrada num filtro de PTFE porosidade de $0,22\ \mu m$. A amostra filtrada por este processo foi recolhido ao abrigo da luz e usada nos ensaios. Na Tabela 11 apresenta-se as i_p do dA_{20} -CPE obtidas e a Figura 24 representa os SWV desta etapa.

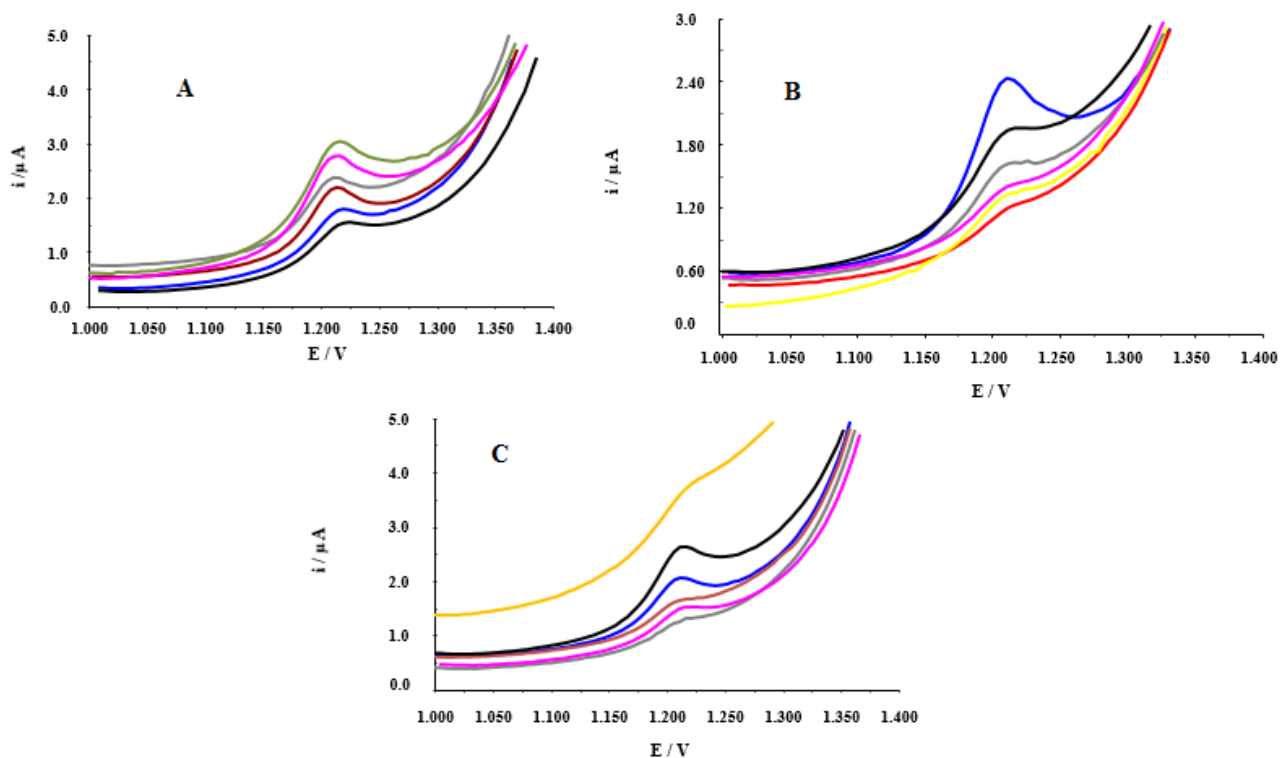


Figura 24: SWV correspondente a amostra 3 (com filtração com seringa): A) i_p Ps correspondentes ao volume de $150\ \mu L$; B) i_p Ps correspondentes ao volume de $300\ \mu L$; C) i_p Ps correspondentes ao volume de $500\ \mu L$ com seringa.

De acordo com a Tabela 11, este processo de limpeza não é adequado para tratar as amostras pois como se pode ver os resultados não são reprodutíveis, tendo uma variabilidade que oscila entre os 38 e os 77 %. Mais acresce que devido à viscosidade, algumas amostras não foram possíveis de ser filtradas, estragando os filtros.

Após a realização destes estudos, decidiu-se não efetuar tratamento de limpeza às amostras (a centrifugação remove uma boa parte dos antioxidantes presentes nas amostras e a filtração mostrou não ser eficaz), tendo-se utilizado para os restantes estudos, envolvendo o oxidante H_2O_2 , volumes de amostra de 150 μL .

3.3.2 Avaliação da matriz complexa: radical HO^\bullet

Como já se tinham testado os diferentes tipos de tratamentos de limpeza com o oxidante H_2O_2 , os estudos do efeito da matriz envolvendo o radical HO^\bullet consistiram somente em testar qual o volume mais adequado a ser utilizado no restante trabalho.

Foram realizados vários ensaios, utilizando uma amostra (a amostra 8) e três volumes diferentes (200 μL ; 300 μL e 400 μL) com fatores de diluição de 12,5; 8,33; 6,25, respetivamente. Neste caso, no reator colocou-se PBS, infusão, Fe (II) de concentração $1,0 \times 10^{-6}$ mol/L e H_2O_2 de $4,0 \times 10^{-5}$ mol/L. Estes dois últimos reagentes são utilizados para a geração do radical HO^\bullet . Na tabela 12, mostram os volumes de cada reagente utilizado neste estudo.

Tabela 12: Composição do ensaio.

| $V_{CHÁ}$ (μL) | V_t (μL) | $V_{Fe^{2+}}$ (μL) [$1,0 \times 10^{-6}$ mol/L] | $V_{H_2O_2}$ (μL) [$4,0 \times 10^{-5}$ mol/L] | V_{PBS} (μL) |
|--------------------------|----------------------|--|---|--------------------------|
| 200 | 2500 | 250 | 100 | 1950 |
| 300 | 2500 | 250 | 100 | 1850 |
| 400 | 2500 | 250 | 100 | 1750 |

Na Figura 25 observam-se os SWV obtidos neste estudo. Tal como aconteceu, quando se usou o H_2O_2 como indutor de dano oxidativo, neste estudo também o sinal eletroquímico diminuiu com o aumento do volume da infusão. Na Tabela 13 mostram-se

os resultados obtidos para as i_p do dA_{20} -CPE. Considerando que ocorre sujamento da superfície do biossensor, optou-se por se usar nos estudos seguintes o volume de 200 μ L.

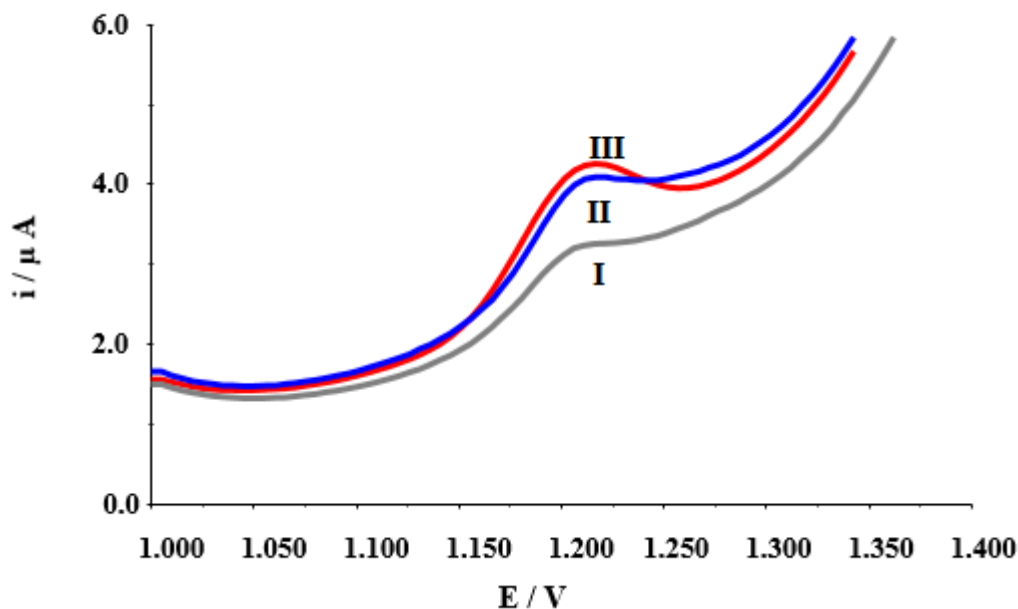


Figura 25: SWV correspondente a amostra 8: I) i_{pP} correspondente ao volume de 400 μ L; II) i_{pP} correspondente ao volume de 300 μ L; III) i_{pP} correspondente ao volume de 200 μ L.

Tabela 13: Resultados obtidos para os valores de i_{pP} com a amostra sem tratamento na presença do radical hidroxilo.

| Amostra | $V_{CHÁ}$ | Média i_{pP} (uA) | Erro relativo (%) |
|---------|-----------|---------------------|-------------------|
| 8 | 200 | 0,93 | 7,32 |
| | 300 | 0,90 | 3,18 |
| | 400 | 0,66 | 6,34 |

3.4 Determinação da TAC das infusões com recurso ao dA_{20} -CPE

A menos que indicado de outra forma, todos os ensaios da determinação da TAC em infusões constituem três etapas: (i) imobilização do dA_{20} no CPE; (ii) indução do dano

oxidativo no dA₂₀-CPE, usando o H₂O₂ ou o HO[•]; (ii) utilização das amostras para estudar a proteção no dA₂₀. O dano oxidativo é provocado através da imersão do biossensor numa mistura do oxidante preparado com a solução PBS na ausência de antioxidantes, durante 30s.

Para estudos eletroquímicos considerou-se que a corrente máxima obtida corresponde à corrente lida após a imobilização do dA₂₀ no CPE (i_{pM}).

Para a avaliação da TAC das infusões, foi utilizado o antioxidante AA e os oxidantes H₂O₂ e o radical HO[•], assim como dez amostras diferentes de infusões (Tabela 5).

A TAC foi avaliada através da observação da intensidade de pico obtida após o ensaio com amostras reais. Seguidamente, e com recurso às curvas de calibração determinou-se o valor de TAC.

3.4.1 Avaliação da TAC em infusões: Oxidante H₂O₂

Os resultados correspondentes à determinação da TAC das infusões usando como oxidante o H₂O₂, encontram-se na Tabela 14.

Tabela 14: TAC das infusões quando se usou o oxidante H₂O₂.

| Amostra | i _{pP} (μA) | Desvio Padrão (μA) | Erro Relativo (%) | TAC das infusões (mg EAA/L) | Desvio Padrão (μA) | Erro Relativo (%) |
|---------|----------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------|--------------------|-------------------|
| 1 | 1,23 | 0,08 | 6,14 | 1075 | 66 | 6,09 |
| 2 | 1,07 | 0,06 | 5,62 | 939 | 52 | 5,57 |
| 3 | 0,97 | 0,03 | 3,07 | 845 | 26 | 3,05 |
| 4 | 0,64 | 0,03 | 4,75 | 564 | 26 | 4,89 |
| 5 | 1,05 | 0,06 | 5,71 | 918 | 52 | 5,72 |
| 6 | 1,36 | 0,09 | 6,62 | 1187 | 78 | 6,58 |
| 7 | 0,35 | 0,03 | 9,64 | 310 | 29 | 9,44 |
| 8 | 1,47 | 0,14 | 9,86 | 1280 | 126 | 9,81 |
| 9 | 0,94 | 0,03 | 2,73 | 824 | 23 | 2,71 |
| 10 | 1,21 | 0,75 | 6,23 | 1057 | 66 | 6,20 |

Analisando a Tabela 14 e o Gráfico 3, verifica-se que tanto os erros relativos das i_p como das TAC são inferiores a 10%, demonstrando que o sistema eletroquímico é reprodutível. Verifica-se ainda que as infusões contêm um bom poder antioxidante tendo níveis de TAC variando entre 310 (amostra 7, funcho) e 1280 mg AAE/L (amostra 8, menta).

Se compararmos as amostras 3 (Alcachofra e Dente-de-leão) e 9 (Cidreira) ambas apresentam um valor de TAC muito próximo, 845 mgEAA/L e 824 mgEAA/L, respetivamente. Apesar de ambas amostras serem constituídas por plantas diferentes, serão constituídas por um perfil antioxidante semelhante e neste caso, tanto a planta de alcachofra, dente-de-leão e cidreira previnem distúrbios digestivos, distúrbios renais e de fígado, etc [38,39].

Nas Figuras 26 e 27 mostram-se os SWV obtidos na determinação da TAC das amostras reais.

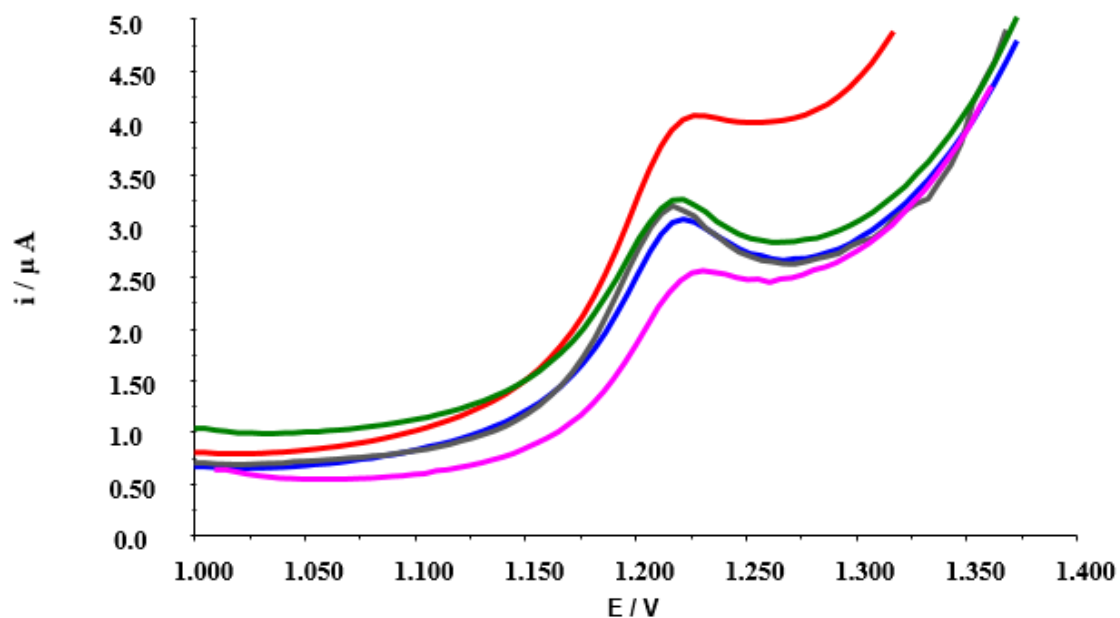


Figura 26: SWV para as amostras de 1 a 5 sendo que aparecem na seguinte ordem, do pico mais pequeno para o maior. Ordem: 1; 2; 5; 3; 4.

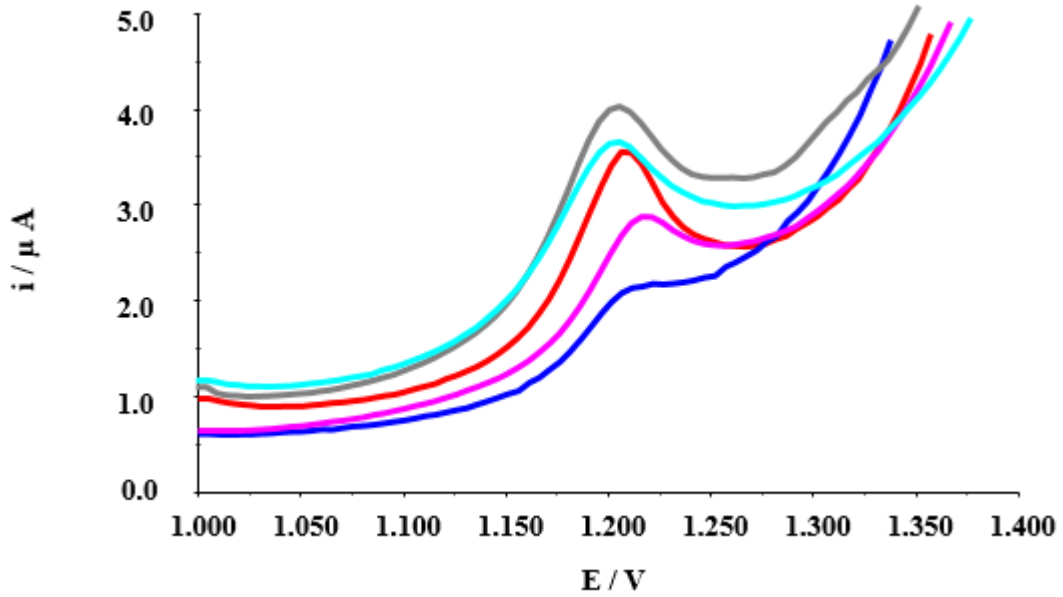


Figura 27: SWV para as amostras de 6 a 10 sendo que aparecem na seguinte ordem, do pico mais pequeno para o maior. Ordem: 8; 6; 10; 9; 7.

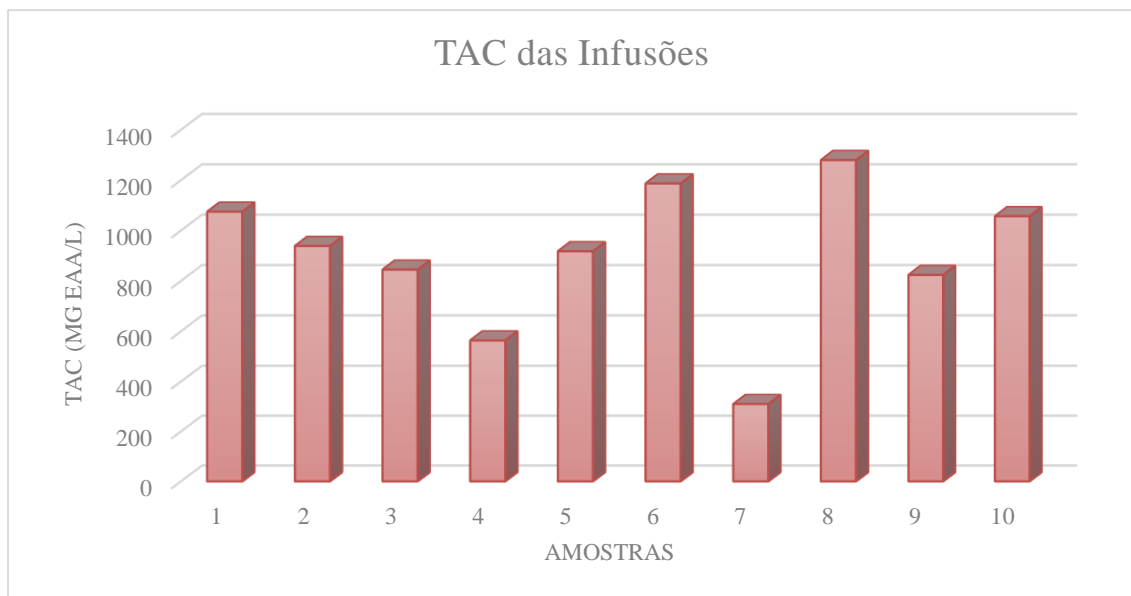


Gráfico 3: Concentrações obtidas (mgEAA/L) nas diferentes infusões analisadas na presença de H₂O₂.

3.4.2 Avaliação da TAC em infusões: Radical HO[•]

Os resultados correspondentes à medição da TAC das infusões usando o radical hidroxilo encontram-se na Tabela 15.

Tabela 15: TAC das infusões quando se usou o radical HO[•].

| Amostra | i _p P (μA) | Desvio Padrão (μA) | Erro Relativo (%) | TAC das infusões (mg EAA/L) | Desvio Padrão (μA) | Erro Relativo (%) |
|---------|-----------------------|--------------------|-------------------|-----------------------------|--------------------|-------------------|
| 1 | 0,86 | 0,03 | 3,26 | 107 | 3 | 3,26 |
| 2 | 0,73 | 0,04 | 5,86 | 91 | 5 | 5,86 |
| 3 | 0,86 | 0,05 | 6,28 | 107 | 7 | 6,28 |
| 4 | 1,18 | 0,07 | 6,11 | 147 | 9 | 6,11 |
| 5 | 0,62 | 0,04 | 6,02 | 77 | 5 | 6,02 |
| 6 | 1,24 | 0,05 | 4,26 | 155 | 7 | 4,26 |
| 7 | 0,95 | 0,05 | 4,71 | 118 | 6 | 4,71 |
| 8 | 0,93 | 0,07 | 7,31 | 116 | 8 | 7,31 |
| 9 | 0,94 | 0,03 | 2,54 | 123 | 3 | 2,54 |
| 10 | 1,83 | 0,14 | 7,88 | 229 | 18 | 7,88 |

Analisando a Tabela 15 e o Gráfico 4, e tal como no caso anterior, verifica-se que tanto os erros relativos das i_pP como das TAC são inferiores a 8%, sendo por isso um sistema reprodutível.

Foram comparados os valores de TAC obtidos nas diferentes amostras reais agora na presença do radical hidroxilo HO[•]. Verifica-se que a amostra 10 apresenta o maior valor de TAC (229 mgEAA/L) e a amostra 5 (77 mgEAA/L) o menor.

Neste estudo algumas amostras apresentam valores de TAC iguais, por exemplo a amostra 1 (Cavalinha, alcachofra, urtiga verde, pilriteiro) (107 mgEAA/L) e amostra 3 (alcachofra de dente-de-leão) (107 mgEAA/L). Por outro lado, outras amostras têm TAC com níveis muito próximos; as amostras 4 (Centela asiática, bétula, bodelha, dente-de-leão, gilbarbeira, erva prata) e amostra 6 (chá preto), com valores de TAC 147 mgEAA/L e 155 mgEAA/L, respetivamente. As amostras 7 (funcho) e 8 (menta) cada uma com 118

mgEAA/L e 115 mgEAA/L, respetivamente. Isto pode dever-se ao facto de estas amostras apresentarem constituições semelhantes.

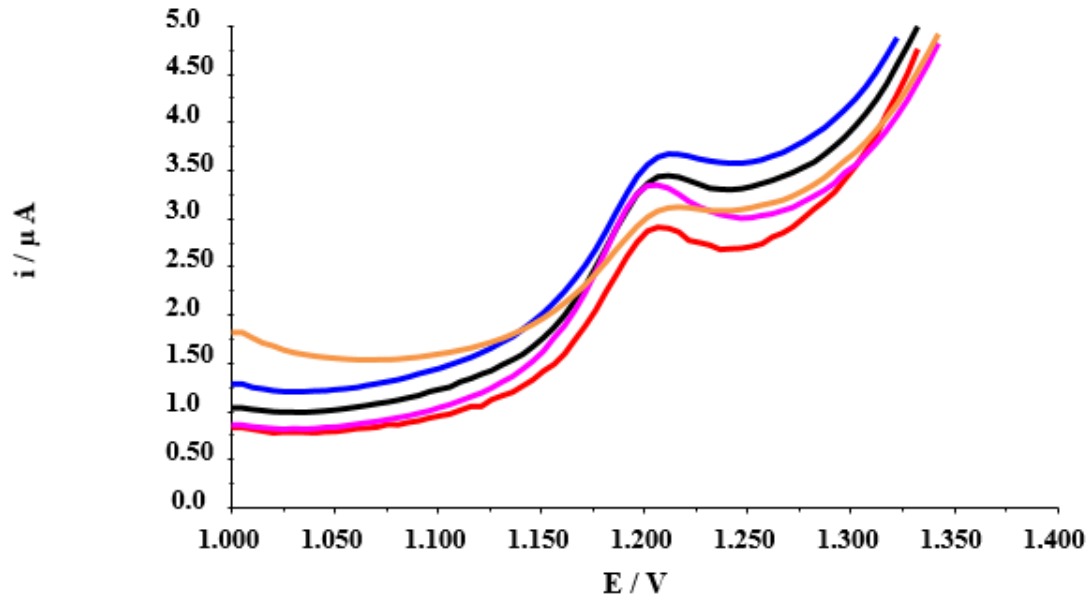


Figura 28: SWV dos i_pP para as amostras de 1 a 5 sendo que aparecem na seguinte ordem, do pico mais pequeno para o maior. Ordem: 4; 3; 1; 2; 5.

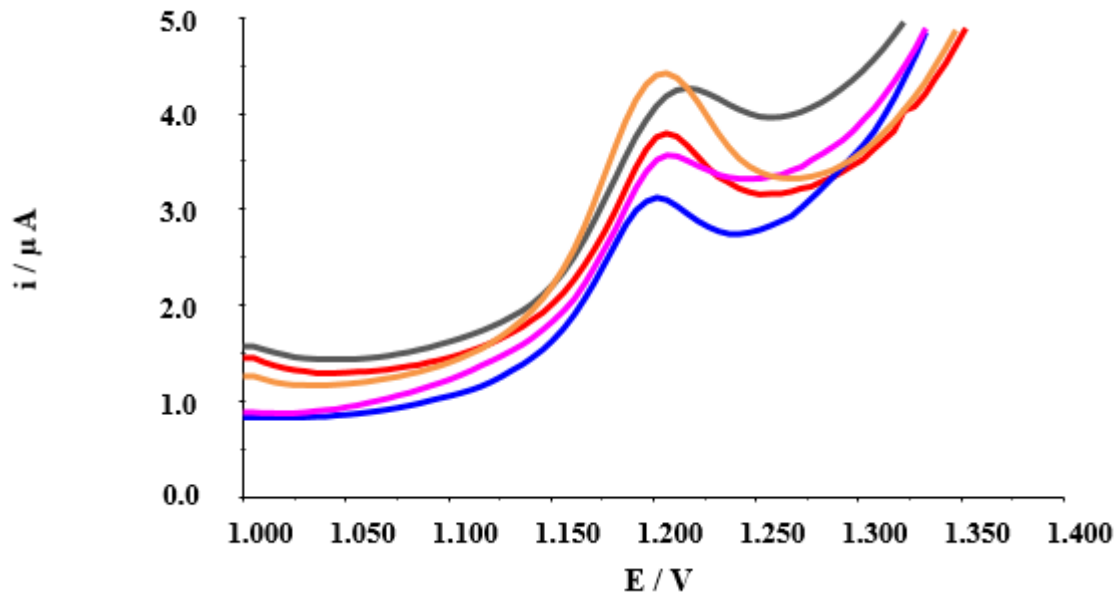


Figura 29: SWV dos i_pP para as amostras de 6 a 10 sendo que aparecem na seguinte ordem, do pico mais pequeno para o maior. Ordem: 10; 6; 7; 9; 8.

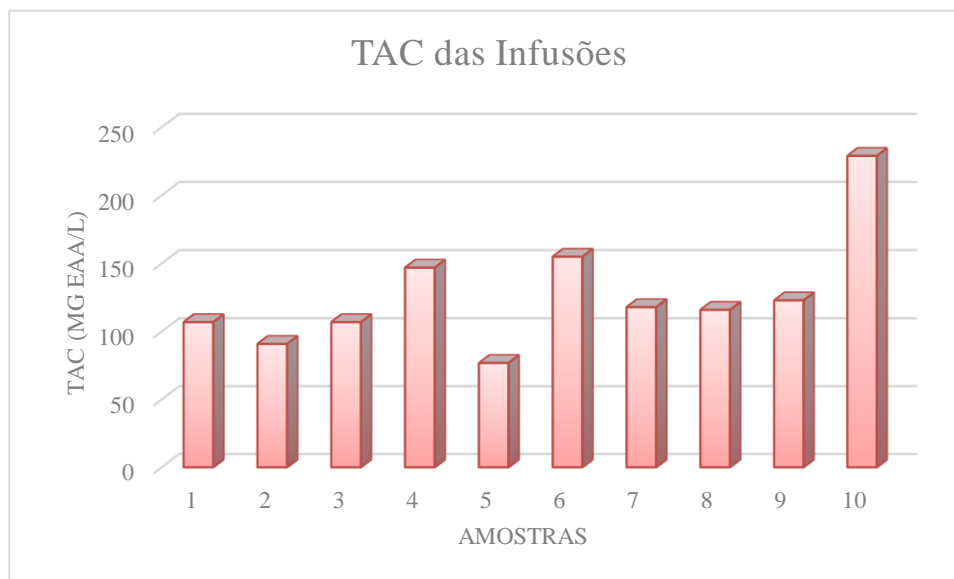


Gráfico 4: Concentrações obtidas (mgEAA/L) nas diferentes infusões analisadas na presença do radical hidroxilo.

3.5 Comparação dos valores de TAC para os diferentes oxidantes

Comparam-se também os resultados de TAC obtidos para cada oxidante. A Tabela 16 e o Gráfico 5 apresentam esse estudo.

Tabela 16: comparações entre oxidantes.

| Amostra | TAC - HO [•] (mgEAA/L) | TAC - H ₂ O ₂ (mgEAA/L) |
|---------|------------------------------------|--|
| 1 | 107 ± 3 | 1075 ± 66 |
| 2 | 91 ± 5 | 939 ± 52 |
| 3 | 107 ± 7 | 845 ± 26 |
| 4 | 147 ± 9 | 564 ± 26 |
| 5 | 77 ± 5 | 918 ± 52 |
| 6 | 155 ± 7 | 1187 ± 78 |
| 7 | 118 ± 6 | 310 ± 29 |
| 8 | 116 ± 8 | 1280 ± 126 |
| 9 | 123 ± 3 | 824 ± 23 |
| 10 | 229 ± 18 | 1057 ± 66 |

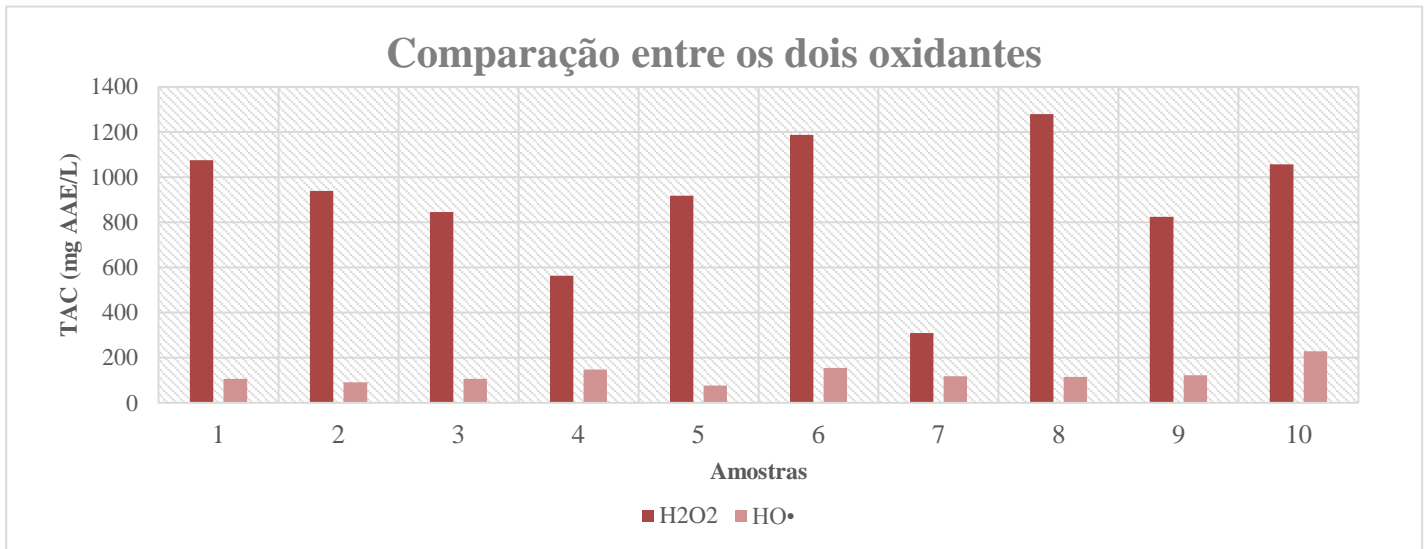


Gráfico 5: Caparação dos valores obtidos para as concentrações de AA dos dois oxidantes.

Da análise do Gráfico 5 podemos constatar que o H_2O_2 tem menos poder de provocar dano oxidativo no ADN do que o $HO\cdot$. Na presença de H_2O_2 obteve-se uma faixa de valores de TAC (310 - 1280 mgEAA/L) muito superior a faixa obtida para o radical hidroxilo (77 - 229 mgEAA/L). Pode-se concluir que o AA oferece uma maior proteção na presença de H_2O_2 do que na presença de $HO\cdot$.

4. Conclusão

A produção de ROS desempenha um papel central na vida da célula. Estes radicais são continuamente controlados e eliminados por sistemas de defesa antioxidantes endógenos ou exógenos, que podem ser enzimáticos ou não enzimáticos. Se a quantidade de antioxidantes existentes no organismo ficar comprometida o equilíbrio das reações de redução e oxidação na célula podem ficar perturbadas.

Neste trabalho foi desenvolvido e aplicado um biossensor baseado no material de ADN para a determinação da TAC em infusões, com o objetivo de testar a possibilidade de se utilizar este biossensor na monitorização da TAC em produtos alimentares.

Os estudos efetuados com recurso a este biossensor (dA_{20} -CPE) na determinação da TAC de amostras reais permitiu demonstrar que as infusões estudadas contêm uma boa capacidade antioxidante e possivelmente podem ser usadas pelos organismos como fonte de antioxidantes exógenos. De modo a diversificar este estudo, utilizou-se como oxidante e promotor do dano oxidativo do dA_{20} dois oxidantes existentes no organismo humano: H_2O_2 e HO^\bullet .

O estudo do efeito protetor proporcionado por antioxidantes no ADN foi efetuado utilizando o AA e confirmou-se que este tem a capacidade de proteger o material do dano oxidativo produzido pelos oxidantes.

O dA_{20} -CPE foi aplicado na avaliação da capacidade antioxidante em várias amostras reais na presença de H_2O_2 e HO^\bullet . Obtiveram-se valores de TAC para o H_2O_2 a variar de 310 - 1280 mgEAA/L e para o HO^\bullet a variar de 77 – 229 mgEAA/L.

Para continuação deste trabalho seria de interesse utilizar mais oxidantes e antioxidantes para comparar os valores obtidos.

5. Referências

- [1] Barroso M.F., Delerue-Matos C., Oliveira M.B.P.P. (2012). Electrochemical evaluation of total antioxidant capacity of beverages using a purine-biosensor. *Food Chemistry* **132**: 1055-1062.
- [2] Renz S.V. (2003). Oxidação e Antioxidantes. Disponível em http://www.ufrgs.br/lacvet/restrito/pdf/oxid_antiox.pdf. [acedido em 12/03/2014].
- [3] Noori S. (2012). An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system. *Open Access Scientific Reports* **1**:413.
- [4] Costa-Hong V., Bortolotto L.A., Jorgetti V., Consolim-Colombo F., Krieger E.M., Lima J.J.G. (2009). Oxidative stress and endothelial dysfunction in chronic kidney disease. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* **92**: 413-418.
- [5] Antioxidantes – um mecanismo de protecção. Disponível em <http://antioxidantes-mecanismo-de-proteccao.blogspot.pt/2009/03/stress-oxidativo-e-stress-reduativo.html> [acedido em 10/04/2014].
- [6] Barroso M.F., Delerue-Matos C. e Oliveira M.B.P.P. (2011). Electrochemical DNA-sensor for evaluation of total antioxidant capacity of flavours and flavoured waters using superoxide radical damage. *Biosensors and Bioelectronics* **26**: 3748–3754.
- [7] Maia M.S. (2003). Espécies reativas do metabolismo do oxigênio, antioxidantes e função espermática. Monografia. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp. Botucatu, Brasil.
- [8] Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **39**: 44-84.
- [9] Cruz D. (2013). Estudo eletroquímico do dano oxidativo promovido por RNS e PAH e o efeito protetor de antioxidantes no ADN. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia do Porto. Porto, Portugal.
- [10] Sucupira N.R., Silva A.B., Pereira G., Costa J.N. (2012). Métodos para determinação da atividade antioxidante de frutos. *Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde* **14**: 263-269.
- [11] Litesco S.C., Eremia S.A.V., Diaconu M., Tache A., Radu G.-L. (2011). Biosensors applications on assessment of reactive oxygen species and

- antioxidants. Em: Somerset V. (ed), *Environmental Biosensors*. Rijeka, Croacia: InTech, pp. 95-114.
- [12] Lista dos antioxidantes. Disponível em <http://www.quali.pt/aditivos-alimentares/498-lista-antioxidantes>. [acedido em 14/03/2014].
- [13] Zanin T., Frazão A. Alimentos ricos em vitamina C. Disponível em <http://www.tuasaude.com/alimentos-ricos-em-vitamina-c/>. [acedido em 18/04/2014].
- [14] Abe L.T., Mota R.V., Lajolo F.M., Genovese M.I. (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L.. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **27**: 394-400.
- [15] Brewer M.S. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Food Science and Food Safety* **10**:221-247.
- [16] Raymundo M.S. (2007). Avaliação da quantificação de nitritos e antioxidantes em alimentos por técnicas voltamétricas. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, Brasil.
- [17] Janegitz B.C., Junior L.H.M., Fatibello-Filho O. (2007). Determinação voltamétrica por redissolução anódica de Cu(I) em águas residuárias empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com quitosana. *Química Nova* **30**: 1673-1676.
- [18] Costa S.I.M. (2013). Biossensor enzimático para a avaliação da capacidade antioxidante. Tese de Mestrado. Instituto Superior de Engenharia do Porto. Porto, Portugal.
- [19] Agostinho T.C. (2012). Análise voltamétrica de 3,4-metilenodioximetanfetamina. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, São Paulo.
- [20] Ribeiro J.D. (2009). Estudo analítico e avaliação da actividade antibacteriana do óleo essencial da espécie pimenta dioica lindl. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba. PB, Brasil.
- [21] Vieira S.N. (2007). Contribuição para o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para a detecção de hepatopatias. Tese de Mestrado. Universidade Federal da Uberlândia. Uberlândia, Brasil.
- [22] Patacas R.C. (2007). Desenvolvimento, caracterização e optimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em

- microinterfaces gelificadas. Tese de Mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto, Portugal.
- [23] Calil S.S., Silva P.R.Q. (2011). Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. Instituto de Estudos Farmacêuticos. Disponível em: <http://www.cpgls.ucg.br/6mostra/artigos/SAUDE/SIMONE%20SAAD%20CALIL%20PAULO%20ROBERTO%20QUEIROZ.pdf>. [acedido em 16/05/2014].
- [24] Silva L.M.C. (2011). Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para fenol e uréia com foco na aplicação ambiental. Tese de Doutoramento. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil.
- [25] RNA. Disponível em http://universo-de-vida.blogspot.pt/2009_09_01_archive.html. [acedido em 18/05/2014].
- [26] Capela C. Ácidos nucleicos. Disponível em <http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0CB8QFjAA&url=http%3A%2F%2Fnebm.ist.utl.pt%2Frepositorio%2Fdownload%2F2918%2F1&ei=FpJOVMH1LtbsaPyTgegL&usg=AFQjCNH08eh4KzQ9ScKTAchHedGVvaFYnqQ&sig2=oOVXzHjBiry539Ok24VnpQ>. [acedido em 10/05/2014].
- [27] Gonçalves F.S. DNA. Disponível em <http://www.infoescola.com/biologia/dna/>. [acedido em 20/02/2014].
- [28] Wang H.-S., Ju H.-X., Chen H.-Y.. (2001). Voltammetric Behavior and Detection of DNA at Electrochemically Pretreated Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis* **13**: 1105-1109.
- [29] Vilela C.G. Unidades fundamentais dos ácidos nucléicos. Disponível em http://200.156.70.12/sme/cursos/EBI/EB15/pdfs/mod1_aula2.pdf. [acedido em 23/05/2014].
- [30] Cid H., Peres E., Rietveld A., Carvalho R.B., Borges N., Graça P. Os benefícios do chá para a saúde. Disponível em http://www.lipton.pt/cha_saude/documents/chasaude_beneficios.pdf. [acedido em 25/05/2014].
- [31] Ferrari C.K.B. (2010). Capacidade antioxidante total (CAT) em estudos clínicos, experimentais e nutricionais. *J Health Sci Inst.* **28**: 307-310.
- [32] Neto A.F., Silva J.C.B., Fagundes D.J., Percário S., Novo N.F., Juliano Y., Neto A.A.M. (2005). Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total

- e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. *Acta Cirurgica Brasileira* **20**: 375-380.
- [33] Mattos I.L., Shiraishi K.A., Braz A.D., Fernandes J. R. (2003). Peróxido de hidrogénio: importância e determinação. *Química Nova* **26**: 373-380.
- [34] Fornaro A., Coichev N. (1998). Ácido L-ascórbico: reações de complexação e de óxido-redução com alguns íons metálicos de transição. *Química Nova* **21**: 624-650.
- [35] Vannucchi H., Rocha M.M. (2012). Ácido ascórbico (vitamina C). Em: Funções plenamente reconhecidas de nutrientes. Publicações ILSI Brasil, pp. 3-11.
- [36] Fundamentos e princípios físico-químicos. Disponível em http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=450&id=188&option=com_content&task=view. [acedido em 26/06/2014].
- [37] Forças de van der Waals. Disponível em: http://www.visaportal.com.br/blog/arquivos/62/For_as%20intermoleculares.pdf. [acedido em 14/05/2014].
- [38] Benefícios do chá de erva-cidreira. Disponível em <http://www.tuasaude.com/beneficios-do-cha-de-erva-cidreira/>. [acedido em 27/06/2014].
- [39] Dente de leão – Seu chá é rico em propriedades e emagrece. Disponível em <http://chabeneficios.com.br/dente-de-leao-seu-cha-e-rico-em-propriedades-e-emagrece/>. [acedido em 27/06/2014].