

Departamento de Física

**BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE**

“Dissertação apresentada no Instituto Superior de Engenharia do Porto para a
obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Computação e Instrumentação Médica”

Sofia Isabel Marques Costa.

24-10-2013

Orientadores: Doutora Cristina Delerue-Matos.

Doutora Maria de Fátima Barroso.

AGRADECIMENTOS

À Doutora Maria de Fátima Barroso agradeço toda a disponibilidade para me ajudar no procedimento experimental, assim como, em todos os conhecimentos teóricos que constituem a base desta tese de mestrado. Foi um prazer trabalhar e aprender consigo.

À Doutora Cristina Delerue-Matos agradeço por me ter permitido a utilização do laboratório GRAQ/REQUIMTE, por me ter aceitado como membro desta equipa durante a realização de todo o trabalho laboratorial, assim como, pelo apoio prestado e possibilidade de ir a congressos como parte ativa, em que saliento o Encontro dos Jovens Investigadores da Universidade do Porto e III Jornadas de eletroquímica e Inovação em que tive a possibilidade de apresentar um poster.

Aos meus irmãos e Hugo Noverça, pela incansável paciência nos momentos maus e por partilharem as alegrias momentâneas dos bons momentos no decorrer deste trabalho.

Agradeço a todos os colegas de laboratório, salientando os colegas de eletroquímica, Begoña, Helder da Silva, Maria Freitas e Susana Machado pelo apoio prestado ao longo de todo o meu trabalho, incansável paciência nos maus momentos e por me encorajarem a lutar pelos meus objetivos.

Agradeço por fim aos meus pais, pois sem eles nada era possível, apoiaram-me sempre em todas as minhas escolhas académicas, partilharam todas as alegrias e tristezas por que passei durante o desenvolvimento deste trabalho e devo salientar que é graças a educação que me deram, em que me obrigaram sempre a lutar e nunca permitiram que desistisse de atingir os meus objetivos, por mais difíceis que fossem que conclui esta tese de mestrado.

RESUMO

Os radicais livres formam-se naturalmente nos organismos vivos, pois a sua produção/geração está interligada com o processo de produção de energia (respiração), processos inflamatórios (fagocitose), regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas relevantes. Estes também podem ser introduzidos por vias exógenas (poluição, radiação, tabaco, alimentação, etc). Os radicais livres têm capacidade de reagir com o material nucleico (ADN e ARN), proteínas e substâncias oxidáveis, causando danos oxidativos responsáveis pelo envelhecimento e originar doenças degenerativas, tais como, o cancro, arteriosclerose, artrite reumatoide, entre outras. De forma a combater os efeitos pejorativos provocados pelos radicais, os organismos vivos desenvolveram complexos sistemas de defesa antioxidante. Estes sistemas são constituídos por antioxidantes endógenos, produzidos pelos seres vivos, tais como enzimas ou por antioxidantes exógenos obtidos por via da alimentação (por exemplo o ácido ascórbico). Neste sentido, um antioxidante tem capacidade de eliminar ou reduzir a propagação da cadeia de geração de radicais livres.

Neste trabalho foi desenvolvido um biossensor enzimático para a quantificação da capacidade antioxidante total de matrizes alimentares. A construção deste biossensor consistiu na eletroimobilização da adenina no eléctrodo de pasta de carbono (EPC) ou na adsorção física da dA_{20} na superfície do EPC. O dano oxidativo foi induzido pelo radical hidroxilo gerado pela reação de Fenton. Nesta dissertação, foi estudada a capacidade de alguns antioxidantes em eliminar o efeito pejorativo dos radicais livres e combater a integridade das bases de adenina ou do dA_{20} . Os antioxidantes estudados foram o ácido ascórbico e alguns ácidos fenólicos como o ácido hidroxibenzoico (ácido gálico) e ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeico e ácido cumárico). Estes antioxidantes têm a capacidade de neutralizar o radical hidroxilo e proteger a adenina/ dA_{20} imobilizado na superfície do EPC. O comportamento da Lacase foi estudado na presença do ácido gálico e do ácido ascórbico. Os estudos eletroquímicos foram realizados através da voltametria de onda quadrada (VOQ), sendo que a interação entre a adenina/ou o dA_{20} imobilizada na superfície do EPC e os radicais livres na ausência e presença de antioxidantes foi avaliada por meio de mudanças no pico anódico produzido pela oxidação da adenina / dA_{20} .

Os resultados demonstraram que estes biossensores permitem a avaliação da capacidade antioxidante total em águas aromatizadas.

Palavras-Chave: Radicais livres; biossensor enzimático, ADN, Antioxidantes, eletroquímica, eléctrodo de pasta de carbono.

ABSTRACT

Free radicals are formed naturally in living organisms, since the production/generation is interconnected with the process of energy production (respiration), inflammatory response (phagocytosis), regulation of cell growth, intercellular signaling and synthesis of relevant biological substances. Radicals may also be introduced by exogenous pathways (pollution, radiation, tobacco, diet, etc.). The free radicals are capable of reacting with nucleic material (DNA and RNA), proteins and oxidizable substances causing oxidative damage responsible for aging and lead to degenerative diseases such as cancer, atherosclerosis, and rheumatoid arthritis, among others.

In order to combat the derogatory effects caused by radicals, living organisms have developed complex antioxidant defense systems. These systems are composed by endogenous antioxidants, produced by living organisms, such as enzymes or exogenous antioxidants obtained by means of diet (for example ascorbic acid). In this context, an antioxidant is capable to eliminate or reduce the spread of the generation chain radicals.

In this thesis we developed a biosensor to quantify enzymatic antioxidant capacity of food matrices. The construction of the biosensor consists on the adenine electroimmobilization in the carbon paste electrode (CPE) or physical adsorption of dA₂₀ on the CPE surface. Oxidative damage was induced by hydroxyl radical generated by the Fenton reaction. The ability of certain antioxidants to eliminate the derogatory effect of free radicals and combat the integrity of the adenine bases or dA₂₀ was studied. Ascorbic acid and some phenolic acids such as hydroxybenzoic acid (gallic acid) and hydroxycinnamic acids (caffeic acid, coumaric) were used as antioxidants. These have the capability to neutralize the hydroxyl and protect adenine/ dA₂₀ on the EPC surface. The behavior of laccase was studied in the presence of gallic acid and ascorbic acid. Electrochemical studies were performed by square wave voltammetry (swv), and interaction between adenine/dA₂₀ and free radicals in the absence and presence of antioxidants were evaluated by changes in the anodic peak produced by the oxidation of adenine/dA₂₀. The results demonstrated that these biosensors allow the assessment of total antioxidant capacity in flavored waters.

Key words: Free radicals, enzymatic biosensor, DNA, antioxidants, electrochemical, carbon paste electrode.

ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$	Oxigénio Singlete
2tp	Período
AA	Ácido ascórbico
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3- etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
Aca	Ácido cafeico
Acu	Ácido cumárico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácido gálico
Ag/AgCl	Eléctrodo de prata/cloreto de prata
AU	Ácido úrico
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
Cat	Catálase
CAT	Capacidade antioxidante total
EA	Eléctrodo auxiliar
E_c	Potencial de condicionamento
E_d	Potencial de deposição
E_f	Potencial final
E_i	Potencial inicial
E_p	Potencial de pico de oxidação
EPC	Eléctrodo de pasta de carbono
ER	Eléctrodo de referência
ET	Eléctrodo de trabalho
GP	Galato de propilo
GPH-Px	Glutaciona peroxidase
GPHR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
H_2O_2	Peróxido de hidrogénio
HMDE	Eléctrodo de gota suspensa

HO•	Radical hidroxilo
I _p	Intensidade de pico
I _p B	Intensidade de pico máximo
I _p D	Intensidade de pico obtido após dano oxidativo
I _p P	Intensidade de pico da adenina ou dA ₂₀ após imersão no biossensor
L•	Radicais lipídicos
LH•	Lípidos membranares
LOOH	Lípidos hidroperóxidos
LOO•	Radical peroxilo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NO•	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico mitocondrial
O ₂	Oxigénio no estado fundamental
O ₂ •-	Superóxido
O ₃	Ozono
ONOO-	Peroxinitrilo
PBS	Solução tampão salina de fosfato
RNOS	<i>Reactive species of oxygen and nitrogen</i> , espécies reativas de nitrogénio e oxigénio
RO ₂ •	Peróxilo
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , espécies reativas de oxigénio
SCE	Eletrodo de calomelano saturado
SFE	Extração com fluído supercrítico
SMDE	Eléctrodo de gota de mercúrio estático
SOD	Superóxido dismutase
SPME	Microextração em fase sólida

SPR	Ressonância de superfície de plasma
SSPE	Solução Salina de fosfato de sódio
TBHQ	<i>terc</i> -butil-hidroquinona
t_c	Tempo de condicionamento
t_d	Tempo de deposição
THBP	2,4,5-tri-hidroxibutilfenona
TRIS-HCL	Solução tampão tris (Hidroximetil) aminometano –HCl
VOQ/SWV	Voltametria de Onda quadrada/ <i>Square wave voltametry</i>
ΔE_p	Pulso de potencial
ΔE_s	Potenciais com altura constante
Δi ou i_t	Corrente total ou resultante

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	2
RESUMO.....	3
ABSTRACT.....	4
ABREVIATURAS	5
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABELAS.....	14
1.1. INTRODUÇÃO.....	15
1.2. RADICAIS LIVRES.....	15
1.2.1. <i>Stress Oxidativo</i>	17
1.3. ANTIOXIDANTES	19
1.3.1. <i>Mecanismo de ação Antioxidante</i>	21
1.4. COMPOSTOS FENÓLICOS	22
1.4.1. <i>Classes de Compostos Fenólicos</i>	22
1.4.1.1. Ácidos Fenólicos.....	22
Ácido Gálico	23
Ácido Cafeico	24
Ácido ascórbico	24
1.5. MÉTODOS ANALÍTICOS DE QUANTIFICAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES .	25
1.6. BIOSENSORES	26
1.6.1. <i>Estrutura do Biossensor</i>	26
1.6.2. <i>Componentes biológicos dos biossensores</i>	28
1.6.3. <i>Transdutores</i>	29
1.6.4. <i>Aplicações dos Biossensores</i>	30
1.7. VOLTAMETRIA	31
1.7.1. <i>Instrumentação em Voltametria</i>	32
1.7.1.1. Potencióstato.....	32
1.7.1.2. Célula eletroquímica e elétrodos	33
1.7.1.3. Elétrodo de pasta de carbono	35

1.7.2. TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS.....	36
<i>Voltametria de Onda Quadrada</i>	36
1.8. ADN E ELETROQUÍMICA	38
1.8.1. <i>Ácido desoxirribonucleico</i>	38
Filamentos polinucleotídeos	39
1.8.2. <i>Interação do ADN com superfícies de Carga elétrica</i>	41
1.8.3. <i>Mecanismo de Oxidação Eletroquímica da Adenina</i>	42
2.1. PARTE EXPERIMENTAL.....	44
2.1.1. <i>Reagentes e Soluções</i>	44
2.1.2. <i>Equipamentos</i>	45
2.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	46
2.2.1. <i>Preparação da Pasta de Carbono</i>	46
2.2.2. <i>Preparação do Eléctrodo de Pasta de Carbono</i>	46
2.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	47
2.3.1. <i>Etapa Experimental I: Imobilização do material baseado no ADN</i>	
48	
Imobilização da adenina no EPC	48
Imobilização do dA ₂₀ no EPC	48
2.3.2. <i>Etapa Experimental II: Estudo do dano oxidativo induzido no</i>	
<i>material baseado no ADN</i>	49
2.3.3. <i>Etapa Experimental III: Estudo do efeito protetor conferido pelo</i>	
<i>antioxidante no material baseado no ADN</i>	50
2.3.4. <i>Etapa experimental IV: Detecção do sinal eletroquímico do</i>	
<i>material baseado no ADN</i>	50
2.3.5. <i>Etapa Experimental V: Estudo do comportamento do biossensor</i>	
<i>na presença da enzima lacase</i>	51
<i>Estudo do comportamento do AG na presença da Lacase</i>	52
2.3.6. <i>Estudo do Efeito protetor ao dano oxidativo no dA₂₀-EPC</i>	
<i>promovido por antioxidantes na presença da amostra real</i>	52
3.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
3.1.1. <i>Comportamento eletroquímico da adenina-EPC</i>	53
3.1.2. <i>Otimização das condições experimentais da Eletroimobilização da</i>	
<i>adenina</i>	53

3.1.3. <i>Estudo do dano Oxidativo induzido na Adenina-EPC</i>	55
3.1.4. <i>Influência do tipo de tampão nos ensaios do dano oxidativo</i>	57
3.1.5. <i>Otimização das condições experimentais da imobilização do dA₂₀</i> 58	
3.1.6. <i>Estudo do efeito protetor, ao dano oxidativo, no dA₂₀-EPC</i> <i>promovido por antioxidantes</i>	60
Antioxidante: Ácido Gálico	60
Antioxidante: Ácido Ascórbico	63
Antioxidante: Ácido Cafeico	65
Antioxidante: Ácido Cumárico	67
3.1.7. <i>Atividade da Enzima</i>	69
3.1.8. <i>Comportamento do AG na presença da lacase</i>	70
3.1.9. <i>Comportamento eletroquímico-Amostra real na presença do AG</i> 72	
3.1.10. <i>Comportamento eletroquímico-Amostra real na presença do AA</i> 74	
CONCLUSÃO	77
BIBLIOGRAFIA	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Esquema representativo das principais reações que envolvem espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de nitrogénio (RNOS) (adaptado de Ferreira e Abreu, 2007a).....	18
Figura 1.2: Sistema de defesa antioxidante. Adaptado de Barroso <i>et al.</i> , 2011.	21
Figura 1.3: Estrutura química dos ácidos fenólicos (D'Archivio <i>et al.</i> , 2007). .	23
Figura 1.4: Configuração de um biossensor (adaptado Calil e Silva, 2011).	27
Figura 1.7: Forma de aplicação do potencial na VOQ (Souza <i>et al.</i> , 2004).....	36
Figura 1.8: (i) Sinal de excitação para VOQ e Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para um processo redox de um sistema reversível (ii) e de um sistema irreversível (iii) (Adaptado de Souza, Machado e Avaca, 2003).	37
Figura 1.9: Estrutura química do nucleotídeo (adaptado de Crick e Watson, 2008).	39
Figura 1.10: Estrutura detalhada do filamento polinucleotídico A estrutura mostra o emparelhamento das bases entre purinas (em azul e verde) e pirimidinas (vermelho, laranja), e as ligações fosfodiéster (adaptado de Crick e Watson, 2008).	40
Figura 1.11: Estrutura Helicoidal do ADN (adaptado de Crick e Watson, 2008).	41
Figura 1.12: Esquema da reação do processo de oxidação eletroquímica da adenina (Song <i>et al.</i> , 2010).....	43
Figura 2.13: Potencióstato da marca Metrohm: Autolab, modelo PGSTAT 12..	45
Figura 2.14: Preparação do eléctrodo de Pasta de carbono.	47
Figura 2.15: Esquema representativo da construção de um biossensor de base púrica.	48
Figura 2.16: Esquema experimental: A) Construção do EPC; B) Imobilização da dA ₂₀ ; C) dA ₂₀ no EPC.....	49
Figura 2.17: Representação do ensaio do estudo do dano oxidativo.....	50
Figura 3.18: VOQ obtida para o adenina-EPC em PBS pH 7,4.	53
Figura 3.19: Influência da concentração de adenina eletro-imobilizada no i _p B da adenina (E _c + 1,8 V, E _d + 0,4 V). (Tempo de condicionamento 180s e tempo de deposição 240s).	55

Figura 3.20: VOQ representativo do dano oxidativo. Neste voltamograma é possível verificar-se uma diminuição da i_p da Adenina (b) após o dano oxidativo provocado pelo radical hidroxilo (a). 56

Figura 3.21: Representação gráfica da influência da concentração de Fe^{2+} e do tempo de incubação na i_p da adenina-EPC. 57

Figura 3.22: VOQ em PBS pH7,4 do dA_{20} -EPC. 59

Figura 3.23: Representação gráfica da influência da concentração de dA_{20} adsorvida ao EPC na i_pB 60

Figura 3.24: VOQ do efeito protetor conferido pelo AG. Neste VOQ é possível observar-se um aumento da i_p da dA_{20} com o aumento da concentração de AG. De (a) a (e) estão representadas as diferentes concentrações de AG. Assim, (a) 5mg/L, (b) 8mg/L, (c) 10mg/L, (d) 15mg/L e (e) 20mg/L. 61

Figura 3.25: Curva de calibração do AG. 62

Figura 3.26: VOQ representativo do dano oxidativo e respetiva proteção conferida pelo AG. Neste VOQ é possível observar-se a i_pB da dA_{20} intacta (c), i_p da dA_{20} após o dano oxidativo (a) e i_p da dA_{20} após proteção conferida pelo AG. 62

Figura 3.27: VOQ do efeito protetor conferido pelo AA Neste VOQ é possível observar-se um aumento da i_p da dA_{20} com o aumento da concentração de AG. De (a) a (e) estão representadas as diferentes concentrações de AA. Assim, (a) 1mg/L, (b) 2mg/L, (c) 4mg/L, (d) 6mg/L e (e) 8mg/L. 64

Figura 3.28: Curva de Calibração do AA. 64

Figura 3.29: VOQ representativo do dano oxidativo e respetiva proteção conferida pelo AA. Neste VOQ é possível observar-se a i_pB do dA_{20} intacto (c), i_p da dA_{20} após o dano oxidativo (a) e i_p da dA_{20} após proteção conferida pelo AA. 65

Figura 3.30: VOQ do efeito protetor conferido pelo Aca Neste VOQ é possível observar-se um aumento da i_p da dA_{20} com o aumento da concentração de Aca. De (a) a (d) estão representadas as diferentes concentrações de Aca. Assim, (a) 0,1mg/L, (b) 0,6mg/L, (c) 0,8mg/L, e (d) 0,9mg/L. 66

Figura 3.31: Curva de calibração do Aca. 66

Figura 3.32: VOQ representativo do dano oxidativo e respetiva proteção conferida pelo Aca. Neste VOQ é possível observar-se a i_pB da dA_{20} intacta (c), i_p da dA_{20} após o dano oxidativo (a) e i_p da dA_{20} após proteção conferida pelo Aca. 67

Figura 3.33: VOQ do efeito protetor conferido pelo Acu. Neste VOQ é possível observar-se um aumento da i_p da dA_{20} com o aumento da concentração de Acu. De (a) a (e) estão representadas as diferentes concentrações de Acu. Assim, (a) 0,2mg/L, (b) 0,4mg/L, (c) 0,5mg/L, (d) 0,8mg/L (e) 1mg/L. 68

Figura 3.34: Curva de calibração do ácido cumárico. 68

Figura 3.35: VOQ representativo do dano oxidativo e respetiva proteção conferida pelo Acu. Neste VOQ é possível observar-se a i_pB da dA_{20} intacta (c), i_p da dA_{20} após o dano oxidativo (a) e i_p da dA_{20} após proteção conferida pelo Acu..... 69

Figura 3.36: Esquema de reação da lacase com um substrato (Adaptado de Call e Muck, 1997). 69

Figura 3.37: Absorvância (nm). 70

Figura 3.38: Curva de calibração do AG na presença da lacase..... 71

Figura 3.39: VOQ do dA_{20} -EPC após ensaio de proteção ao dano oxidativo na presença de lacase e concentrações crescentes de AG: (a) 5mg/L, (b) 8mg/L, (c) 10mg/L (d) 15mg/L e (e) 20mg/L. 72

Figura 3.40: Resultados dos Ensaios Experimentais (Amostra real-AG): Concentração da enzima $1,6 \times 10^{-5}$ mg/mL, tempo de incubação 30s, Concentração do AG de 5mg/L, proporção Fe^{2+} , EDTA e H_2O_2 de 1:2:40. 73

Figura 3.41: Resultados dos ensaios experimentais (Amostra real-AA): Concentração da enzima $1,6 \times 10^{-5}$ mg/mL, tempo de incubação 30 s, Concentração do AA de 1 mg/L, proporção Fe^{2+} , EDTA e H_2O_2 de 1:2:40. 75

Figura 3.42: Capacidade antioxidante total. 76

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Categorias dos métodos analíticos para avaliação da capacidade antioxidante.	25
Tabela 3.2: Influência do E_c na i_p da adenina-EPC com um t_c de 180s.	54
Tabela 3.3: Influência do E_d na i_p da adenina-EPC com um t_d de 240s e concentração (200mg/L).....	54
Tabela 3.4: Dados do VOQ obtidos para o estudo do dano oxidativo.	56
Tabela 3.5: Estudo da influência do tipo de solução tampão na i_pD da adenina-EPC.....	58
Tabela 3.6: Valores de i_pB e respetivos desvios padrão e erros relativos obtidos na otimização da concentração de dA_{20} -EPC.....	59
Tabela 3.7: Dados obtidos quando se utilizou como antioxidante o AG.....	61
Tabela 3.8: Dados obtidos quando se utilizou como antioxidante o AA.....	63
Tabela 3.9: Resultados obtidos quando se utilizou como antioxidante o Aca....	65
Tabela 3.10: Dados obtidos quando se utilizou como antioxidante o Acu.....	67
Tabela 3.11: Resultados experimentais do comportamento do AG na presença da lacase.	70
Tabela 3.12:Ensaio Experimentais (Amostra real-AG): Concentração da enzima $1,6 \times 10^{-5}$ mg/mL, tempo de incubação 30 s, Concentração do AG de 5 mg/L, proporção Fe^{2+} , EDTA e H_2O_2 de 1:2:40.....	72
Tabela 3.13: Ensaio Experimentais (Amostra real-AA): Concentração da enzima $1,6 \times 10^{-5}$ mg/mL, tempo de incubação 30s, Concentração do AA de 1 mg/L, proporção Fe^{2+} , EDTA e H_2O_2 de 1:2:40.....	74

Capítulo 1

1.1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o interesse pelos testes de diagnóstico à base de ácido desoxirribonucleico (ADN) tem sido crescente. O desenvolvimento de sistemas que permitam a deteção de ADN é motivado por aplicações em muitos campos: diagnóstico de ADN, deteção rápida de agentes infecciosos biológicos e aplicações forenses. A deteção de mutações genéticas ao nível molecular abre a possibilidade de realização de diagnósticos confiáveis, mesmo antes de qualquer sintoma da doença aparecer (Barroso *et al.*, 2012). É com o intuito de estudar os danos moleculares no ADN causados por radicais livres e o sistema de defesa antioxidante que se desenvolveu este biossensor enzimático para avaliação da capacidade antioxidante. Neste primeiro capítulo será efetuada uma revisão bibliográfica dos conceitos mais relevantes que foram necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

1.2. RADICAIS LIVRES

Um radical livre é um átomo ou molécula que tem um eletrão de valência desemparelhado, sendo por isso muito reativo. A maioria dos radicais livres possui um tempo de meia vida extremamente curto (Weiss, 1935; Cadogan, 1973, Hey, 1973; Aruoma, 1998).

Os radicais livres mais abundantes na natureza, são formados a partir do oxigénio no estado fundamental (O_2), daí designarem-se genericamente por espécies reativas de oxigénio (ROS), ou a partir do óxido nítrico (NO) tomando a designação genérica de espécies reativas de nitrogénio e oxigénio (RNOS) (Rover *et al.*, 2001, Halliwell e Gutteridge, 2007).

Os radicais livres são gerados quando átomos ou moléculas absorvem radiação ultravioleta ou visível, durante as reações de oxidação-redução ou através de processos de catálise enzimática. Devido à grande reatividade dos radicais livres, estes podem reagir entre si, ou com outros radicais e moléculas. O rendimento e a seletividade deste tipo de

reação são influenciados pela concentração dos radicais, pela transferência de apenas um elétron do radical, que aumenta o tempo de semi-vida e, quando não existem ligações fracas, qualquer molécula que possua o radical tem capacidade de interação (Aruoma, 1998).

Uma das formas de produção de radicais livres ocorre a nível celular, nomeadamente no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular, e por serem fortemente reativos, as biomoléculas tais como proteínas, lípidos, hidratos de carbono e ADN são alvos preferenciais dos danos oxidativos induzidos pelos radicais (Halliwell e Aruoma, 1991; Mello *et al.*, 2006).

Nos organismos vivos, os radicais livres que são produzidos com maior relevância são o radical hidroxilo (OH•) o superóxido (O₂•-), o óxido nítrico (NO•) e o peróxido (RO₂•). Outros compostos, tais como, o peroxinitrito (ONOO-), o ácido hipocloroso (HOCl), o peróxido de hidrogénio (H₂O₂), o oxigénio singlete (¹O₂) e o ozono (O₃), também produzidos a nível celular, e embora não sejam radicais livres têm uma grande capacidade de produzir dano oxidativo nas biomoléculas (Barroso *et al.*, 2012).

O radical OH• é uma das espécies de radicais mais reativas, que induz lesões no ADN e pode ser produzido através da reação de Fenton (equação 1), descrita pela primeira vez em 1984 (Mello *et al.*, 2006; Perron e Brumaghin, 2009).



A nível químico, o ¹O₂ é formado quando o oxigénio no estado fundamental absorve energia (Brum, 2009).

Esta também pode ser gerada, pelos organismos vivos, gerado pelos fagócitos e pelas reações catalisadas por peroxidases. De acordo com Caetano (2009) esta espécie não apresenta restrição na transferência de elétrons, tornando-se assim muito reativa. Devido à sua forte reatividade, o ¹O₂ tem elevada capacidade de oxidar grupos essenciais de aminoácidos, provocando danos oxidativo às proteínas (Caetano, 2009).

Embora os ROS e os RNOS possam provocar danos oxidativos nas biomoléculas, estes têm um papel muito importante a nível celular, pois os radicais livres atuam como mediadores de um elevado número de processos biológicos, quer através da modificação de algumas moléculas bioativas ou cooperando com estas. Por isso, é de extrema

importância para os processos fisiológicos a manutenção do equilíbrio entre os radicais livres e os antioxidantes (Mo, 2005).

1.2.1. Stress Oxidativo

Os múltiplos distúrbios celulares e moleculares produzidos pelas ROS e RNOS é denominado “stress oxidativo” (Davies, 1994; Simón *et al.*, 2008).

Quando as ROS e as RNOS estão presentes em concentrações reduzidas ou moderadas, existe uma contribuição benéfica para a célula, pois estas ROS estão envolvidas em diversos processos fisiológicos de sinalização e de regulação celular (Ferreira *et al.*, 2007; Fridovich, 1999).

No entanto, por vezes surgem situações em que o equilíbrio entre a produção ROS e RNOS e o mecanismo de defesa antioxidante é destruído devido a uma produção descontrolada de radicais livres ou a uma falha nas defesas antioxidantes presentes nas células (Ferreira *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007; Simón *et al.*, 2008).

Quando o stress oxidativo está presente nas células as ROS e/ou RNOS em excesso causam danos celulares, tais como, oxidação dos lípidos celulares, proteínas e uma variedade de modificações no ADN, incluindo quebras na cadeia de ADN e lesões nas bases e açúcares que constituem o ADN, provocando a alteração e inutilização das biomoléculas que as impede de realizar as funções para as quais estão destinadas (Ferreira *et al.*, 2007; Valko *et al.*, 2007; Simón *et al.*, 2008, Barroso *et al.*, 2012).

O stress oxidativo pode ser originado por causas naturais, tais como, prática de exercício físico excessivo ou em processos inflamatórios. No entanto, este também pode estar relacionado com causas não naturais, tais como, a presença de xenobióticos no organismo ou em situações patológicas. Diversos tipos de cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares, desordens do foro neurológico, entre outras, estão relacionados com a produção descontrolada de radicais livres no organismo humano (Valko *et al.*, 2007). A produção exagerada de radicais livres está relacionada com processos de envelhecimento (Simon *et al.*, 2008).

Os fenómenos físico-químicos podem iniciar a oxidação de um substrato, que progride de forma contínua, na presença do substrato, até que algum mecanismo de defesa bloqueie essa oxidação. As substâncias alvo podem ser o oxigénio, ácidos gordos poliinsaturados, fosfolípidios, colesterol e ADN (Ferreira e Abreu, 2007a).

As características essenciais da oxidação mediada pelos radicais livres englobam a iniciação, propagação, ramificação e as etapas de terminação (Ferreira e Abreu, 2007a).

De acordo com as estimativas pensa-se que 70 % das doenças crónicas podem ser prevenidas, e considerando que a produção excessiva de ROS e RNOS está intimamente ligada com este tipo de doenças torna-se primordial controlar a produção e propagação dos radicais nos organismos vivos (Ferreira e Abreu, 2007a). A manutenção dos níveis adequados de antioxidantes, como efetuar uma dieta equilibrada (maior consumo de vegetais, leguminosas e frutos) e o evitar comportamentos que aumentem a produção de radicais livres, tais como, consumo de tabaco e a exposição excessiva a poluentes ambientais e xenobióticos têm um papel de relevo para tentar obter o controlo da produção de ROS e RNOS. Na Figura 1.1 é possível visualizar um esquema que representa as principais reações de produção de ROS e RNOS na cadeia respiratória e a nível das mitocôndrias, que ocorre na maioria dos organismos vivos. Conforme se pode observar o primeiro radical formado é o radical superóxido, seguindo-se o radical hidroxilo e o peróxido de hidrogénio. Estes radicais têm a capacidade de reagir com lípidos membranares (LH), promovendo o processo de peroxidação lipídica dando origem a radicais lipídicos (L•), radicais peroxilo (LOO•) e lípidos hidroperóxidos (LOOH). A síntese do óxido nítrico mitocondrial (NOS) gera óxido nítrico (NO•), que se combina com o anião superóxido para originar peroxinitrilo (ONOO⁻). Quando em excesso, todos estes ROS podem causar danos mitocondriais e celulares (Ferreira e Abreu, 2007a).

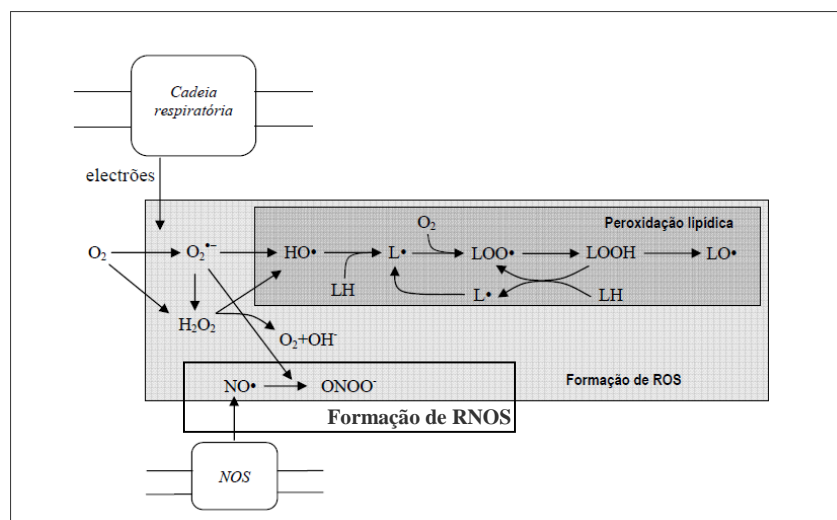


Figura 1.1: Esquema representativo das principais reações que envolvem espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de nitrogénio (RNOS) (adaptado de Ferreira e Abreu, 2007a).

1.3.ANTIOXIDANTES

Os agentes antioxidantes são substâncias que retardam ou previnem reações de oxidação mesmo quando estão presentes em baixas concentrações ou em termos biológicos são compostos que são capazes de eliminar o radical hidroxilo ou o radical superóxido, os quais são responsáveis pela iniciação e propagação da cadeia de radicais e consequentemente pela criação de processos degenerativos (Manach *et al.*, 2004; Sucupira *et al.*, 2012; Skeva e Grousi, 2012).

Para serem considerados bons redutores, os antioxidantes devem possuir algumas características, tais como, capacidade de ceder eletrões e hidrogénios ao radical livre, de acordo com o seu potencial de redução; capacidade de transformar estruturalmente o radical e poder de quelatação de metais de transição decorrentes no processo de oxidação (Manach *et al.*, 2004). Os antioxidantes, dependendo da forma como combatem os radicais livres podem ser classificados em primários (compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação do radical) ou secundários (retardam reações de auto-oxidação), ou como naturais (quando provenientes da natureza) e sintéticos (quando preparados pelo Homem) (Sucupira *et al.*, 2012).

O mecanismo de ação dos antioxidantes, nas diferentes fases do processo oxidativo, é variável, podendo atuar de maneira a reduzir a concentração do oxigénio; de modo a evitar o início da cadeia de propagação da formação dos radicais, ou de forma a quelatar os iões metálicos existentes na célula, ou decompor produtos primários a compostos não radicais (Sucupira *et al.*, 2012).

As pesquisas efetuadas com antioxidantes naturais tiveram início em meados dos anos 80 e tinham como objetivo a substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos, em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico aos quais se atribuem efeitos deletérios ao organismo animal quando utilizados em doses elevadas (Silva *et al.*, 2007).

Alguns dos antioxidantes sintéticos utilizados nas indústrias alimentícias são: o butil-hidroxitolueno (BHT), o butil-hidroxianisol (BHA), *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ), 2,4,5-tri-hidroxibutifenona (THBP) e galato de proprilo (GP) (Litescu *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2007).

Alguns exemplos de antioxidantes naturais são os tocoferóis, vitamina C, e compostos fenólicos (Sucupira *et al.*, 2012) Estes são mais eficazes que os compostos sintéticos e trazem benefícios à saúde. Os compostos fenólicos são responsáveis pelas propriedades antioxidantes de diversas frutas, ervas e condimentos. É de considerar que a maioria das vantagens associadas a alimentos de origem vegetal está relacionada com as suas propriedades nutritivas e atividade antioxidante (Litescu *et al.*, 2011; Pisoschi e Negulescu, 2011; Barroso *et al.*, 2011).

Nos alimentos também se podem encontrar outras substâncias com capacidades antioxidantes, tais como, os carotenoides (β -e α -caroteno, licopeno), que se encontram em alimentos com pigmentação amarela, laranja ou vermelha (tomate, abóbora, pimentão, laranja), precursores da vitamina A, tendo ambos efeitos protetores contra o cancro. A vitamina E, componente dos óleos vegetais é a principal vitamina antioxidante transportada na corrente sanguínea pelas lipoproteínas, protege os lípidos da peroxidação; e a vitamina C (ácido ascórbico) (AA) muito consumida pelos seres humanos, pois está presente em diversos produtos alimentares inibe a formação de metabolitos nitrosos carcinogénicos (Barroso *et al.*, 2011a; Pisoschi e Negulescu, 2011).

O mecanismo de defesa antioxidante endógeno pode ser classificado em enzimático e não enzimático, como é possível visualizar na Figura 1.2 (Bianchi e Antunes, 1999; Barroso *et al.*, 2011a, Barroso *et al.*, 2011b). O mecanismo de defesa antioxidante enzimático está presente em todo o organismo, quer no meio intracelular quer no meio extracelular em quantidades elevadas. As defesas antioxidantes enzimáticas são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (Cat), a glutathione peroxidase (GPH-Px), a glutathione reductase (GPHR), entre outras (Valko *et al.*, 2007; Barroso *et al.*, 2012).

O sistema de defesa antioxidante endógeno não enzimático é constituído por compostos sintetizados pelo organismo tais como, a bilirrubina, a ceruloplasmina, a melatonina, a coenzima Q e o ácido úrico; enquanto, que sistema de defesa antioxidante exógeno não enzimático é composto por substâncias obtidas através da dieta regular ou através de suplementos, como o α -tocoferol (vitamina E), o AA (vitamina C), o ácido lipóico, os carotenóides, os flavonóides, entre outros (Valko, 2007; Hamid *et al.*, 2010).

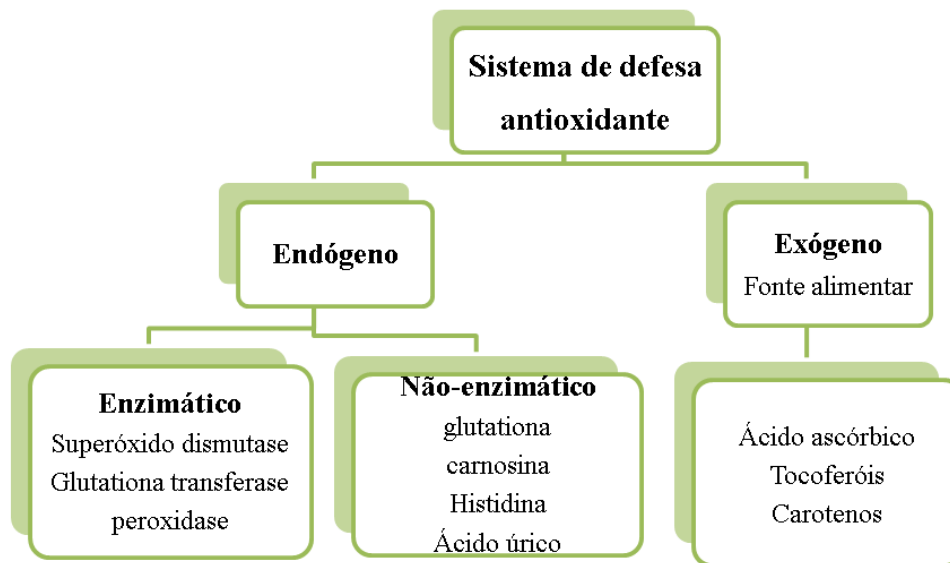


Figura 1.2: Sistema de defesa antioxidante. Adaptado de Barroso *et al.*, 2011.

1.3.1. Mecanismo de ação Antioxidante

Os antioxidantes de baixo peso molecular são moléculas pequenas que se infiltram nas células, acumulando-se em compartimentos específicos associados ao dano oxidativo, sendo posteriormente regenerados pela célula (Pisoschi e Negulescu, 2011)

Nos tecidos humanos os antioxidantes de baixo peso molecular são obtidos através de diversas fontes. Por exemplo, a glutaciona (GSH), a nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) e a carnosina são sintetizadas pelas células, enquanto, que o ácido úrico (AU) e bilirrubina são produtos residuais do metabolismo celular. Por outro lado, o AA, os tocoferóis e os polifenóis são antioxidantes obtidos a partir da dieta alimentar. Dos diferentes antioxidantes de baixo peso molecular é dada uma grande importância ao AA pois este possui propriedades fortemente redutoras e é muito usado como agente antioxidante, em produtos alimentares e bebidas. Para além disto, o AA possui propriedades terapêuticas, sendo relevante para a ativação da resposta imunitária, para a cicatrização de feridas, na osteogénese, a desintoxicação do organismo, na absorção ferro, na biossíntese de colagénio, na prevenção da coagulação dos vasos sanguíneos entre outros processos metabólicos (Pisoschi e Negulescu, 2011).

O AA é facilmente oxidado sofrendo uma rápida degradação devido ao calor, luz e da presença de catiões de metais pesados. O estudo do mecanismo de ação dos

antioxidantes, quer nos organismos vivos quer no processamento de alimentos, tem sido muito abordado, pois os níveis em excesso de radicais livres são prejudiciais para o ser humano (Pisoschi e Negulescu, 2011).

1.4.COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários de plantas (Chirinos *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2013) sendo amplamente conhecidos pelas suas propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas, e estudados para o possível desenvolvimento de medicamentos contra o cancro (Chirinos *et al.*, 2010; Verma *et al.*, 2013). Estes compostos são constituídos por um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo, sendo que a sua estrutura é variável, podendo ser uma molécula fenólica simples (ácidos fenólicos) ou um polímero complexo com elevada massa molecular, tais como, taninos condensados. (Balasundram *et al.*, 2006).

1.4.1. Classes de Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos englobam uma grande diversidade de moléculas com estrutura de polifenol, como por exemplo, vários grupos hidroxilo em anéis aromáticos e moléculas com um anel de fenol, como é o caso dos ácidos fenólicos (Gulcin, 2006).

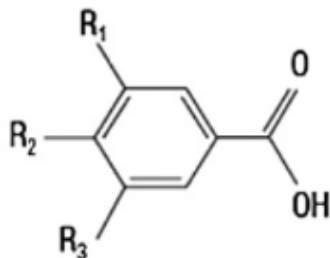
Existem diversas classes de polifenóis, de acordo com o número de anéis de fenol que possuem e os elementos estruturais que são responsáveis pela ligação destes anéis uns aos outros (D'Archivio *et al.*, 2007; Skeva e Girousi, 2012).

Os grupos de compostos fenólicos fundamentais são, os flavonoides, ácidos fenólicos, taninos (hidrolisáveis e condensados), estilbenos e lignanas (D'Archivio *et al.*, 2007).

1.4.1.1.Ácidos Fenólicos

Os ácidos fenólicos devido à sua estrutura são considerados fenóis simples. Estes podem ser classificados em dois subgrupos, ácidos hidroxibenzoicos e hidroxicinâmicos (Figura 1.3) (Gulcim, 2006; Verma *et al.*, 2013).

Ácidos Hidroxibenzoicos



Ácidos hidroxicinâmicos

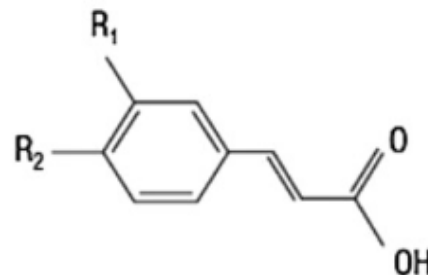


Figura 1.3: Estrutura química dos ácidos fenólicos (D'Archivio *et. al.*, 2007).

O maior subgrupo de compostos fenólicos é a família dos compostos hidroxicinâmicos. (Sanchez *et al.*, 1998; Sroka e Cisowski, 2003). Estes compostos são metabolitos fenilpropanóides e ocorrem amplamente em plantas (Herrmann, 1989), e produtos vegetais (Clifford, 1999). Os seus derivados são ingredientes bioativos de alimentos vegetais. Eles exibem uma grande capacidade antioxidante *in vitro* que pode ter um impacto benéfico na saúde *in vivo* (Gulcim, 2006).

A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos depende do número e das posições do grupo hidroxilo em relação ao grupo funcional carboxilo. (Rice *et al.*, 1996).

O poder antioxidante dos ácidos fenólicos cresce com o aumento do grau de hidroxilação, como acontece com o ácido gálico tri-hidroxilado, que apresenta uma elevada capacidade antioxidante (Rice *et al.*, 1996).

Quando comparados com os ácidos hidroxibenzoicos, os ácidos hidroxicinâmicos correspondentes apresentam uma atividade antioxidante superior (Andreasen, 2001).

A maior atividade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos é devida ao grupo -CH=CH-COOH, o que garante uma maior capacidade de doação de -H e estabilização de radicais do que o grupo -COOH presente nos ácidos hidroxibenzoicos (Rice *et al.*, 1996).

Ácido Gálico

O ácido gálico (ácido 3,4,5 – trihidroxibenzoico) (AG) é um polifenol muito usado pois é seletivamente citotóxico contra uma grande variedade de células tumorais. Este encontra-se presente em diversos alimentos de origem vegetal, tais como, amoras e

morangos, mangas, sementes de uva e alfarroba. Este também se encontra presente em bebidas como o vinho tinto, chás e café (Ferk *et al.*, 2011; Chirinos *et al.*, 2010).

O AG afeta várias vias farmacológicas e bioquímicas, tem um forte poder antioxidante, anti-inflamatório, anti- mutagénico e propriedades anticancerígenas. Contudo, pode apresentar propriedades pró-oxidantes dependentes da sua concentração quando em presença de iões metálicos. As propriedades pró-oxidantes do ácido gálico têm sido identificadas como indutoras da apoptose celular. Em alguns estudos comprova-se o efeito protetor deste ácido na carcinogénese química induzida (Chirinos *et al.*, 2010).

Ácido Cafeico

O ácido cafeico (ácido 3,4-di-hidroxicinâmico) (Aca) demonstrou ser um protetor do α - tocoferol em lipoproteínas de baixa densidade. Além disso, quando conjugado com os ácidos clorogénicos e caftárico demonstrou ser um antioxidante ainda mais potente em diversos sistemas. O Aca e seus derivados são bons substratos de polifenol-oxidases, e sob determinadas condições, podem sofrer oxidação em tecidos de plantas ou produtos de origem vegetal (Gulcin, 2006).

Ácido ascórbico

Desde a descoberta da vitamina C nos anos 80 (ácido ascórbico), que o número das funções biológicas que possui está em crescimento (Du *et al.*, 2012).

O AA é um agente redutor solúvel em água e antioxidante dador de eletrões, podendo sofrer duas oxidações consecutivas que originam o radical ascorbato e o ácido deidroascórbico. O ascorbato pode ser regenerado a partir do radical ascorbato e do ácido deidroascórbico, por processos enzimáticos e não enzimáticos. A auto-oxidação do ascorbato, que dá origem a peróxido de hidrogénio está muito dependente do pH e esta oxidação é acelerada na presença de metais catalíticos (Du *et al.*, 2012).

O ascorbato pode também ter efeitos pró-oxidantes. Na verdade, a combinação de ferro e ácido ascórbico tem sido utilizado como um sistema de oxidação. A combinação destes dois reagentes é utilizada para a hidroxilação de alcanos, aromáticos e outras oxidações. Este serve como cofator de muitas enzimas, como é o caso das hidroxilases (Du *et al.*, 2012).

1.5.MÉTODOS ANALÍTICOS DE QUANTIFICAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES

Diversos métodos analíticos foram desenvolvidos com o objetivo de medir a capacidade antioxidante total (CAT) ou a quantificação de antioxidantes individuais em produtos alimentares, bebidas, alimentos processados e amostras biológicas (Tabela 1). A quantificação dos antioxidantes individuais presentes em amostras pode ser efetuada com recurso a técnicas cromatográficas associada a várias técnicas de extração, tais como, a microextração em fase sólida (SPME), extração com fluido supercrítico (SFE) e extração assistida por micro-ondas (Barroso *et al.*,2011).

No entanto, devido à complexidade da composição dos alimentos e das amostras biológicas, a separação de cada substância antioxidante e o estudo da mesma é caro. (Barroso *et al.*,2011).

Os vários métodos analíticos de avaliação da capacidade antioxidante são divididos em categorias distintas descritas na Tabela 1.:

Tabela 1: Categorias dos métodos analíticos para avaliação da capacidade antioxidante.

Capacidade antioxidante	Princípio do método	Determinação do produto final
Espectrometria		
DPPH	Reação antioxidante com um radical orgânico	Colorimetria
ABTS	Reação antioxidante com um radical catião orgânico	Colorimetria
FRAP	Reação Antioxidante com um complexo de Fe (III)	Colorimetria
PFRAP	Redução de ferricianeto de potássio por antioxidantes e reação subsequente de ferrocianeto de potássio com Fe ³⁺	Colorimetria
CUPRAC	Redução de Cu (II), a Cu (I), por antioxidantes	Colorimetria
ORAC	Reação antioxidante com radicais peróxido, induzidos por AAPH (2,2'-azobis-2-amidino-propano)	Perda de fluorescência da fluoresceína
HORAC	Capacidade antioxidante para eliminar os radicais OH gerados por Co (II) baseado na reação de fenton	Perda de fluorescência da fluoresceína
TRAP	Capacidade antioxidante para eliminar os radicais derivados do luminol, gerados a partir da decomposição do AAPH	Chemiluminescência têmpera
Fluorimetria	Emissão de luz por uma substância que absorve a radiação eletromagnética ou a luz de um outro comprimento de onda diferente	Gravação de fluorescência em espectros de excitação / emissão

Assim, uso de sensores eletroquímicos para a avaliação da capacidade antioxidante total em amostras torna-se uma alternativa favorável relativamente aos métodos óticos. Estes métodos não requerem equipamentos caros e sofisticados, são bastante sensíveis e devido à facilidade em miniaturizar podem abrir portas à portabilidade. Como para a avaliação da capacidade antioxidante muitos dos ensaios são efetuados segundo as reações de transferência de eletrões que ocorrem nas amostras alimentícias, estes poderão ser monitorizados de forma simples por técnicas eletroquímicas.

É de salientar que os antioxidantes naturais que fazem parte da dieta do ser humano possuem uma eletroatividade nativa que não se deve desprezar e que pode ser estudada para a sua deteção. De acordo com estes factos, a deteção eletroquímica dos antioxidantes é uma medida direta da capacidade redutora total dos antioxidantes que se encontram em amostras, sem o uso de espécies reativas (Barroso *et al.*, 2011).

1.6. BIOSSENSORES

Um biossensor é uma ferramenta analítica que combina biomoléculas imobilizadas com transdutores químicos ou físicos de modo a originar uma superfície onde seja possível efetuar-se a medição direta de um analito específico. Este é capaz de combinar a especificidade de um componente biológico ativo para o analito a analisar com a sensibilidade de um transdutor de modo a efetuar a conversão de um sinal biológico num sinal elétrico proporcional à concentração do analito (Salgado, 2001).

Através dos biossensores são obtidas informações analíticas quantitativas utilizando um elemento biológico reconhecedor incorporado a um transdutor capaz de converter a resposta química num sinal adequado (Salgado, 2001).

1.6.1. Estrutura do Biossensor

Um biossensor é composto essencialmente por três componentes: o elemento biológico de reconhecimento; o elemento transdutor (natureza variada de acordo com a propriedade físico-química detetada decorrente da interação com o bioreceptor) e um processador de sinal que permita a análise dos resultados (Figura 1.4) (Lee *et al.*, 2008; Lee, 2008a).

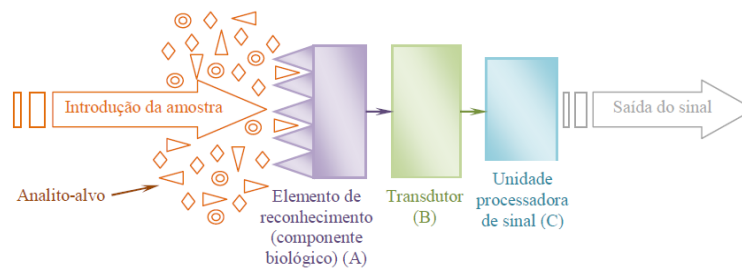


Figura 1.4:Configuração de um biossensor (adaptado Calil e Silva, 2011).

O sistema de reconhecimento engloba a zona que entra em contacto com o analito a ser estudado e origina um sinal. Pode ser um recetor, enzima, anticorpo, ácido nucleico, aptâmero, entre outros (Pathak *et al.*, 2007; Chambers *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Calil e Silva, 2011). O sensor tem o papel de identificar a composição das espécies, visto que os reagentes já se encontram imobilizados no sistema. As técnicas de imobilização mais frequentes são a adsorção física (interações do tipo ligação iónica, ligação polar e ligação por ponte de hidrogénio), ligação cruzada (reticulação), oclusão ou aprisionamento, ligação covalente e covalente cruzada, encapsulamento e microencapsulamento. De acordo com a estabilidade das técnicas de imobilização é determinada a sensibilidade e confiabilidade do sinal do biossensor, devido à preservação dos sítios ativos da molécula (Mehrvar e Abdi, 2004; Yantasee *et al.*, 2007; Calil e Silva, 2011).

O transdutor funciona como uma interface, pois mede a alteração física ou química que ocorre na reação com o biorrecetor, transformando essa energia numa resposta mensurável, tal como, massa, carga, calor ou luz. Existem diversos tipos de transdutores, tais como, eletroquímico, ótico, piezoelétrico e calorimétrico (Mehrvar, 2000; Pathak *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2008; Calil e Silva, 2011).

O funcionamento do biossensor engloba a especificidade e a elevada sensibilidade do componente biológico com o substrato. Posteriormente, dessa interação entre o componente biológico e o substrato ocorrem alterações nos parâmetros físico-químicos que são transformados num sinal elétrico quantificável através da utilização de um transdutor adequado (Araya *et al.*, 2008; Monošík *et al.*, 2012).

Dos diferentes materiais e transdutores usados para o fabrico dos biossensores, os eletroquímicos são os mais usados, pois possuem resposta rápida, são económicos e tem capacidade de automação, podendo ser utilizados num número elevado de amostras (Mello e Kubota, 2007).

O papel da unidade processadora de sinal é filtrar, amplificar e analisar o sinal transduzido, transferindo-o para um monitor ou guardando-o num dispositivo. De forma a poder ser utilizado como instrumento de análise, o biossensor deve ser seletivo, possuir uma faixa de sensibilidade, exatidão e precisão; tempo de resposta e de recuperação; frequência de amostragem; estabilidade operacional e reprodutibilidade dos resultados (Arya *et al.*, 2008).

1.6.2. Componentes biológicos dos biossensores

Diversos componentes biológicos podem ser utilizados nos biossensores, tais como:

Enzimas: Os elementos de reconhecimento baseados em enzimas catalíticas são usados nos biossensores devido à variedade de produtos de reação mensuráveis de um processo catalítico, que incluem prótons, elétrons, luz e calor. Como exemplo, temos o caso da enzima urease que é bastante utilizada como sensor para biorreconhecimento devido à necessidade de determinação/monitorização da ureia em aplicações médicas (Chambers *et al.*, 2008).

Anticorpos: A utilização de anticorpos como elemento de reconhecimento baseia-se na alta sensibilidade e especificidade das interações antígeno/anticorpo. Os biossensores imunológicos têm como grande vantagem o facto de não ser preciso purificar a amostra antes da deteção (Chambers *et al.*, 2008).

Recetores: Os recetores são proteínas com natureza transmembranar com capacidade de se ligarem a moléculas específicas, denominadas de moléculas ligantes, originando uma resposta celular específica. O recetor induzido sofre uma mudança conformacional, que origina eventos subsequentes, como a abertura do canal, criação do segundo mensageiro adenil/guanilciclase, e reações em cascata que envolvem um elevado número de outras proteínas, tais como, as proteínas G, tirosina quinases, fosfatases, fosforilases e fatores de transcrição. Estes são bastante utilizados nos biossensores devido à elevada especificidade e afinidade do ligante (Chambers *et al.*, 2008).

Ácidos Nucléicos e Aptâmeros: As propriedades físicas do ADN, tais como, a pureza e o comprimento médio da cadeia influenciam o funcionamento dos biossensores de ADN (Ravera *et al.*, 2007). Estes biossensores de ADN têm recebido atenção

considerável pois a monitorização da integridade do ADN é uma maneira de avaliar a nível celular a capacidade antioxidante (Skeva e Girousi, 2012).

1.6.3. Transdutores

Para se decidir qual o transdutor a utilizar devem considerar-se três requisitos básicos: ser adequado, de modo a adaptar-se ao material biológico imobilizado; ser muito específico para o analito a usar, possuir capacidade de detetar qualquer variação específica que ocorra no decorrer da reação biológica e que essa variação se dê na concentração adequada (Mello e Kubota, 2007).

Os transdutores mais utilizados para a construção dos biossensores são: os eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos e condutimétricos), óticos, calorimétricos e piezoelétricos (Monošik *et al.*, 2012).

Nos **transdutores eletroquímicos**, as reações químicas entre as biomoléculas imobilizadas e o analito alvo, produzem ou consomem iões ou eletrões, afetando as propriedades elétricas mensuráveis da solução (Monošik *et al.*, 2012). Estes são os biossensores mais usados nos testes de monitorização e diagnóstico em análises clínicas (Mehrvar e Abdi, 2004). As vantagens que apresentam são: custo reduzido, elevada sensibilidade, *screening* rápido e estabilidade (Song *et al.*, 2006).

Os **transdutores amperométricos** são baseados na medida da corrente que resulta da oxidação/redução eletroquímica de uma espécie eletroativa. É neste momento que se dá a transferência de eletrões do analito para o eletrodo ou vice-versa. As propriedades do analito determinam a direção do fluxo de eletrões e o seu controlo pode ser efetuado através da aplicação de um potencial elétrico no eletrodo. A célula amperométrica pode possuir dois ou três eletrodos (Thévenot *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2008).

Os **transdutores potenciométricos** são baseados na determinação da diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o de referência ou de dois eletrodos de referência separados por uma membrana seletiva permeável, não ocorrendo fluxo de corrente significativa entre estes. (Thévenot *et al.*, 2001).

Os **transdutores condutimétricos** estão relacionados com a medição de alterações na condutância, pois ao utilizar-se enzimas que catalisam reações podem produzir ou gastar espécies iónicas, modificando a quantidade de portadores de carga

móvel no eletrólito. A condutividade não é específica para cada composto iónico, mas é uma função linear da concentração iónica (Wang *et al.*, 2008).

Os **transdutores óticos**, baseados na medição da luz observada ou emitida como um resultado de uma reação química ou biológica são constituídos por fibra ótica, guia de onda planar e ressonância de superfície de plasma (SPR). (Thévenot *et al.*, 2001). Estes podem ser aplicados em sistemas de deteção direta. As fibras óticas são utilizadas para conduzir as ondas de luz até detetores adequados, tais como, um eléctrodo ou um semiconductor (Mehrvar e Abdi, 2004).

Nos **transdutores piezoeléctricos**, a superfície do biossensor é revestida com uma substância biologicamente ativa que efetua as ligações de forma seletiva.

Esta superfície é colocada numa solução que contém analitos que se ligam à substância ligante. A frequência das oscilações baixa de forma proporcional ao aumento da massa do cristal (Mehrvar e Abdi, 2004). Os cristais mais usados em sistemas piezoeléctricos são os cristais de quartzo, devido ao facto da sua frequência ter a capacidade de oscilar na ordem dos megahertz de forma proporcional à massa do cristal, além de serem muito sensíveis às variações de massa. Devido à elevada sensibilidade, foi criado um sensor cujo nome se intitula microbalança de cristal de quartzo, que possui a capacidade de detetar as alterações de nanogramas que ocorrem na sua massa quando ocorre a ligação do alvo ao sensor (Wang *et al.*, 2011).

Os **transdutores calorimétricos ou termistores** (Thévenot *et al.*, 2001) conseguem detetar substratos, de acordo com o calor que ocorre nas reações bioquímicas do analito com uma substância biológica ativa adequada, como uma enzima. O mais usado acopla as substâncias diretamente ao termistor, que deteta o calor que ocorre na reação bioquímica. Em muitas reações enzimáticas, grande parte do calor é disperso sem ser detetado, sendo uma das causas da diminuição da sensibilidade dos biossensores calorimétricos (Mehrvar e Abdi, 2004).

1.6.4. Aplicações dos Biossensores

Têm havido um enorme progresso no desenvolvimento dos biossensores, utilizados no diagnóstico clínico. Os biossensores mais utilizados para diagnóstico clínico são os biossensores de glucose, que representam 90% do mercado global de biossensores (Monošík *et al.*, 2012).

Existem, ainda, outros biossensores disponíveis no mercado para avaliação do colesterol, lactato, triglicéridos e creatinina (Monošík *et al.*, 2012).

Em comparação com a área médica, na indústria alimentar, é menos comum o uso de biossensores, pois as amostras possuem composições muito variáveis, tornando o processo de construção do biossensor, a unificação e otimização das condições mais difíceis de medição (Monošík *et al.*, 2012).

Para a avaliação ambiental, nos últimos anos foram desenvolvidos biossensores para avaliação da toxicidade dos efluentes industriais e águas residuais (Monošík *et al.*, 2012). Na União Europeia, devido às exigências mais rigorosas para tratamento de água (Directiva 91/271/CEE do Conselho), efluentes industriais e de águas residuais urbanas têm de obedecer certos limites de toxicidade antes que o efluente possa ser descarregado para o meio ambiente. Devido a este facto, nos últimos anos foram desenvolvidos biossensores para avaliação da sua toxicidade. Os ensaios de toxicidade Microtox[®] (Azure, Bucks, Reino Unido) baseiam-se na utilização das bactérias luminescentes, *Vibrio fischeri*, para medir a toxicidade a partir de amostras ambientais. Outro exemplo é o Cellsense[®], que é um sensor amperométrico que incorpora células bacterianas de *Escherichia coli* para avaliação rápida da ecotoxicidade. Este utiliza ferricianeto para desviar os eletrões do sistema respiratório das bactérias imobilizadas em elétrodos de carbono adequados. A corrente resultante é proporcional à atividade respiratória bacteriana (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004).

1.7. VOLTAMETRIA

A voltametria consiste numa técnica eletroquímica que estuda as relações entre a corrente, o potencial e o tempo no decorrer da eletrólise do analito. Para a execução da técnica é aplicado um potencial variável na célula eletroquímica, verificando-se uma resposta de corrente proporcional à concentração do analito que decorre em função do sinal de excitação.

Esta técnica é muito utilizada em análises clínicas de rotina e em investigação. (Skoog *et al.*, 2009).

1.7.1. Instrumentação em Voltametria

Atualmente o sistema eletroanalítico utilizado para medidas voltamétricas é composto por três módulos: um potencióstato, uma célula eletroquímica e um computador como se pode observar na Figura 1.5 (Gulaboski e Pereira, 2008).

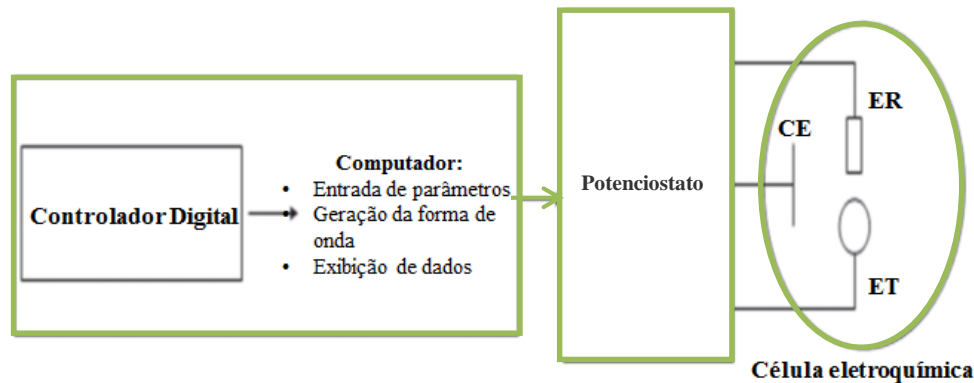


Figura 1.5: Esquema simplificado de um sistema eletroquímico projetado para medidas voltamétricas. (adaptado de Gulaboski e Pereira, 2008).

Na grande parte dos sistemas eletroquímicos o computador, os conversores e os microcontroladores encontram-se separados, permitindo que o potencióstato funcione autonomamente (Gulaboski e Pereira, 2008).

1.7.1.1. Potencióstato

O potencióstato é responsável pela aplicação de um potencial exato e identificação de alterações no decorrer da análise. Este é composto por circuitos potencióstato eletrómero, vários conversores e amplificadores, assim como microprocessadores com memória interna.

Atualmente podem-se encontrar diferentes tipos de potencióstatos, cujas diferenças são o tamanho, a potência e a sofisticação. A escolha do equipamento a utilizar é efetuada de acordo com o tipo de análise voltamétrica, a informação requerida e o tamanho dos elétrodos. A voltametria cíclica pode ser realizada com a maioria dos potencióstatos disponíveis comercialmente, a deteção quantitativa de alguns analitos requer o uso de microelétrodos e uma técnica voltamétrica sensível normalmente mais cara (Gulaboski e Pereira, 2008).

1.7.1.2. Célula eletroquímica e eletrodos

Para se efetuar uma análise voltamétrica são utilizados três eletrodos, o eletrodo de trabalho, o de referência e o eletrodo auxiliar que se encontram mergulhados numa solução que contém o analito e um eletrólito, como é possível observar-se na Figura 1.6 (Silva, 2012)

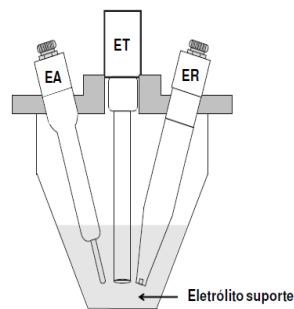
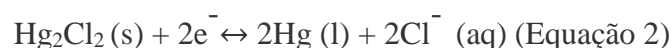


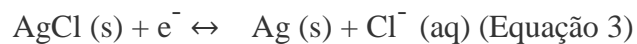
Figura 1.6: Célula eletroquímica utilizada para se efetuar uma análise voltamétrica. Legenda: ET: Eletrodo de trabalho; ER: Eletrodo de referência; EA: Eletrodo auxiliar (adaptado de Silva, 2012).

A célula eletroquímica é o recipiente onde a amostra é colocada. O analito é dissolvido num solvente apropriado, em seguida colocado num eletrólito iónico, onde normalmente os três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) se encontram. As células podem ter diferentes formatos, sendo normalmente constituídas por vidro, teflon ou material de polietileno (Gulaboski e Pereira, 2008).

Os eletrodos em eletroquímica encontram-se normalmente todos submersos na célula eletroquímica, no entanto, em alguns sistemas o eletrodo de referência pode ser colocado num recipiente separado, de modo a evitar-se contaminações, sendo ligado à célula através de uma ponte de eletrólito (Gulaboski e Pereira, 2008).

Os eletrodos de referência mais usados em soluções aquosas experimentalmente são o eletrodo de calomelano saturado (SCE) ou eletrodo de prata/cloreto de prata (Ag/AgCl) e o eletrodo auxiliar normalmente é de platina ou grafite. O potencial do eletrodo de calomelano é associado à equação 2 enquanto, que o potencial do eletrodo prata/cloreto de prata é associado à equação 3.





Entre o eléctrodo de trabalho e o eléctrodo de referência é aplicado um potencial e efetua-se o varrimento num determinado período de tempo (Silva, 2012). A curva de corrente versus a diferença de potencial criada entre os dois eléctrodos é denominada de voltamograma (Silva, 2012).

Quanto ao eléctrodo auxiliar, normalmente é utilizado um arame de platina, grafite ou uma peça fina de ouro para a sua construção.

O contra-eléctrodo (ou eléctrodo auxiliar) tem o papel de preservar a eletroneutralidade do sistema, através de uma reacção eletroquímica onde ocorre a redução do ião H^+ ou oxidação da água contrariando a reacção que ocorre no eléctrodo de trabalho (Gulaboski e Pereira, 2008).

Existe uma grande variedade de eléctrodos de trabalho (polarizáveis) que podem ser um metal como o mercúrio, platina ou ouro, carbono vítreo e constituído por pasta carbono (Silva, 2012).

O mercúrio devido a possuir um sobrepotencial muito negativo para a redução de iões de hidrogénio e graças a constante renovação da sua superfície torna-se fácil de utilizar (Gulaboski e Pereira, 2008). Este eléctrodo foi muito utilizado nos estudos eletroquímicos como eléctrodo de trabalho pois também permite estudar as reacções redox de compostos orgânicos e inorgânicos, assim como para alguns processos de adsorção e cristalização (Gulaboski e Pereira, 2008).

Como desvantagem este eléctrodo possui um potencial de oxidação reduzido, entre $\pm 0,1$ e $\pm 0,3\text{V}$, dependendo do pH, não sendo possível analisar a oxidação de alguns compostos. Atualmente tem sido menos procurado devido à sua toxicidade (Gulaboski e Pereira, 2008). Este pode ser utilizado em diferentes medições, tais como, o eléctrodo de gota suspensa de mercúrio (HMDE) (Qiong *et al.*, 2006), eléctrodo de gota de mercúrio estático (SMDE), ou mesmo como eléctrodos de filme de mercúrio. Em alguns casos particulares, o mercúrio pode ser usado para análise de iões metálicos, halogenetos, sulfuretos e aniões. Atualmente tem sido menos procurado devido à sua toxicidade.

Cada vez mais se utilizam eléctrodos metálicos e eléctrodos de carbono, sendo que os eléctrodos de carbono tem vindo a sofrer algumas alterações. Relativamente aos eléctrodos de carbono, existe uma grande variedade de eléctrodos de carbono, tais como,

elétrodos de pasta de carbono (Luque *et al.*, 2000), elétrodos de carbono vítreo (Desimoni, Brunetti e Cosio, 2006), elétrodos serigrafados, elétrodos de diamante, e de bismuto revestidos com materiais, entre outros exemplos (Gulaboski e Pereira, 2008).

1.7.1.3. Eléctrodo de pasta de carbono

O eléctrodo de pasta de carbono, criado em 1958 por Adams (Hocebar e Ogorevc, 2007), é um eléctrodo heterogéneo de carbono que consiste numa mistura preparada a partir de pó de carvão, como grafite, carbono vítreo e outros materiais carbonáceos e um produto imiscível em água e não condutor ligante (Nossol e Zarbin, 2008).

Estes eléctrodos são muito utilizados quer em eletroquímica como em estudos de eletroanálise devido a possuírem uma corrente muito baixa em comparação com os eléctrodos de grafite sólida ou de metais nobres. Estes também têm as vantagens de possuírem um custo reduzido, poderem incorporar diferentes substâncias durante a sua preparação, serem fáceis de preparar, fácil renovação da sua superfície e facilidade de miniaturização. Com estes eléctrodos podem-se preparar sensores com a composição pretendida e, conseqüentemente, com propriedades pré-determinadas (Serban e Murr, 2004; Nossol e Zarbin, 2008).

A seleção do componente da pasta de carbono (pó de carbono líquido e ligante), o seu rácio na mistura e a forma como são preparados (homogeneização da pasta) são aspetos essenciais pois determinam as propriedades, características e comportamentos dos eléctrodos de pasta de carbono (Nossol e Zarbin, 2008).

Diversos artigos publicados nos últimos anos demonstram que a escolha do pó de carbono e do líquido ligante é um dos fatores mais importante para a preparação destes eléctrodos.

Variados tipos de materiais carbonáceos podem ser usados, tais como, grafite, grafite pirolítica altamente orientada, carbono vítreo, negro de acetileno, diamante, nanofibras de carbono e nanotubos de carbono (Nossol e Zarbin, 2008). As características dos materiais à base de carbono, tais como, o tamanho da estrutura, estrutura das partículas, porosidade, condutividade, pureza, composição da superfície e capacidade de adsorção dos materiais carbonáceos influenciam as propriedades do eléctrodo de pasta de carbono obtido, tornando necessárias medições de teste adequadas e caracterização eletroquímica para cada eléctrodo de carbono preparado com material de carbono novel (Nossol e Zarbin, 2008).

1.7.2. TÉCNICAS VOLTAMÉTRICAS

Em eletroquímica podem-se usar várias técnicas voltamétricas, tal como a voltametria de onda quadrada (VOQ), a voltametria cíclica e a voltametria diferencial de impulso. Neste trabalho foi usado a VOQ por isso seguidamente descreve-se em que consiste esta técnica.

Voltametria de Onda Quadrada

A voltametria de onda quadrada (VOQ) é uma técnica voltamétrica em que a variação do potencial é realizada sob a forma de escada, assim os pulsos de potencial (ΔE_p) com a mesma amplitude são sobrepostos a uma escada de potenciais com altura constante (ΔE_s) com duração de um período (2τ). Quando terminam os pulsos diretos (A-catódico) e inversos (B-anódico) é criado um pico simétrico com posição, largura e altura característicos do sistema avaliado (ΔI) (Souza *et al.*, 2004).

Na Figura 1.7 é apresentado a forma de aplicação do potencial da VOQ.

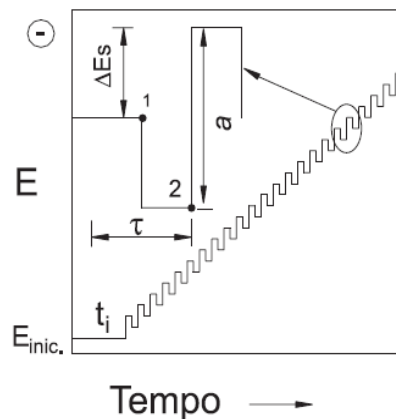


Figura 1.5: Forma de aplicação do potencial na VOQ (Souza *et al.*, 2004).

Este sinal possui uma elevada sensibilidade e rejeição a correntes capacitivas (Bard e Faulkner, 2001; Souza, Machado e Avaca 2003).

Através desta técnica é aplicado um perfil de potencial com impulsos ao eletrodo de trabalho. Assim, em cada impulso é verificada uma variação de potencial instantânea de um potencial inicial (E_i) para um potencial final (E_f). Podem identificar-se três tipos de curvas nesta técnica: a corrente I_l (ou i_d) obtida quando o pulso de potencial direto

termina – corrente direta, a corrente I_2 (ou i_r) registrada no fim do pulso inverso – corrente inversa e a corrente total ou resultante (ΔI ou i_t) que resulta da diferença das anteriores. As correntes i_1 e i_2 possuem sinais contrários. (Souza, Machado e Avaca 2003). Na Figura 1.8 é possível demonstrar o sinal de excitação e os voltamogramas correspondentes às amostragens de corrente.

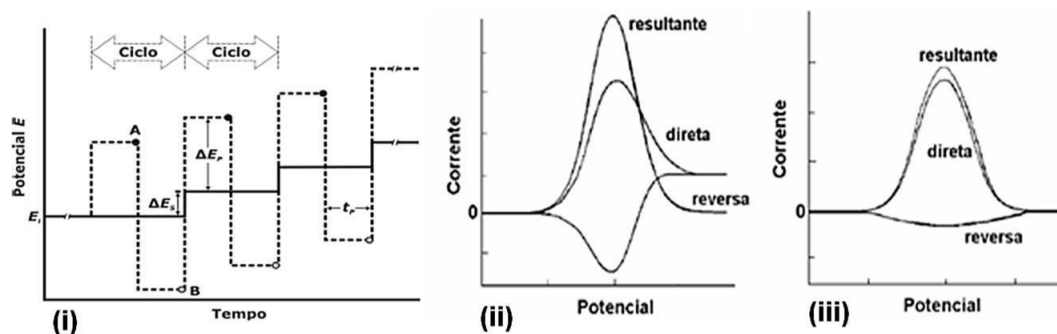


Figura 1.6: (i) Sinal de excitação para VOQ e Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada para um processo redox de um sistema reversível (ii) e de um sistema irreversível (iii) (Adaptado de Souza, Machado e Avaca, 2003).

Esta técnica foi descoberta em 1953, através de estudos realizados por Barker e colaboradores, que tentavam encontrar uma solução para compensar a corrente capacitiva residual obtida nas análises polarográficas. Só nos anos 80, através de pesquisas realizadas por Osteryoung foi possível incorporá-la nos polarógrafos, devido ao varrimento rápido que esta técnica permite realizar (Souza, Machado e Avaca, 2003). Esta é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápida e sensível. Os limites de deteção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas (Souza, Machado e Avaca, 2003).

Quando comparada a outras técnicas voltamétricas, a VOQ apresenta como vantagem o desenvolvimento da teoria e dos modelos matemáticos utilizados nos critérios de diagnóstico de tipos de processos redox tendo em conta as espécies eletroativas adsorvidas na superfície do eléctrodo e reações redox totalmente irreversíveis. Estes critérios de diagnóstico têm elevada importância na eletroquímica, salientando a análise de compostos orgânicos, pois os processos de adsorção causam um efeito complexo nas respostas voltamétricas. Este efeito está relacionado com a quantidade em que o reagente, produto, ou ambas as espécies adsorvem, da força e da dependência do potencial de adsorção, do eletrólito suporte usado e, também, da forma de aplicação do potencial.

Convém ter em conta que estes processos redox totalmente irreversíveis são muito encontrados em variados tipos de compostos orgânicos contendo anéis aromáticos homocíclicos ou heterocíclicos com grupos ligantes eletroativos. Estes grupos são superfícies ativas ocorrendo reduções e/ou oxidações totalmente irreversíveis, devido à reduzida velocidade de transferência de carga, ou, muitas vezes, por uma rápida desativação do produto de reação redox, devido a um processo de protonação irreversível seguido por uma transferência de carga (Souza, Machado e Avaca, 2003). As vantagens de maior relevo desta técnica são:

Ausência da interferência proveniente da corrente capacitiva, já que as medidas de corrente são realizadas ao final do degrau de potencial onde a corrente capacitiva já se tornou negligenciável, melhorando a resolução dos dados experimentais, a sensibilidade analítica e, ainda, possibilitando a realização das análises em altas velocidades de varredura;

Análise de componentes de corrente direta e reversa possibilita a obtenção de dados mecanísticos semelhantes àqueles obtidos por voltametria cíclica, porém com maior sensibilidade, devido à minimização das correntes capacitivas.

No entanto, independentemente do tipo de reações de oxidação-redução a ser estudadas esta fornece os melhores resultados em termos de intensidade de corrente e perfil voltamétrico (Souza *et al.*, 2004).

1.8. ADN E ELETROQUÍMICA

1.8.1. Ácido desoxirribonucleico

Os estudos realizados por Watson e Crick que permitiram a descoberta do Ácido desoxirribonucleico (ADN) marcaram o início da biologia molecular (Watson e Crick, 1953).

A molécula de ADN é um biopolímero formado por nucleótidos. Cada nucleótido é composto por um grupo fosfato, um açúcar e uma base azotada. Os açúcares dos ácidos nucleicos são constituídos por pentoses (Figura 1.9) e a base azotada pode ser de dois tipos: purina ou pirimidina (Pierce, 2004).

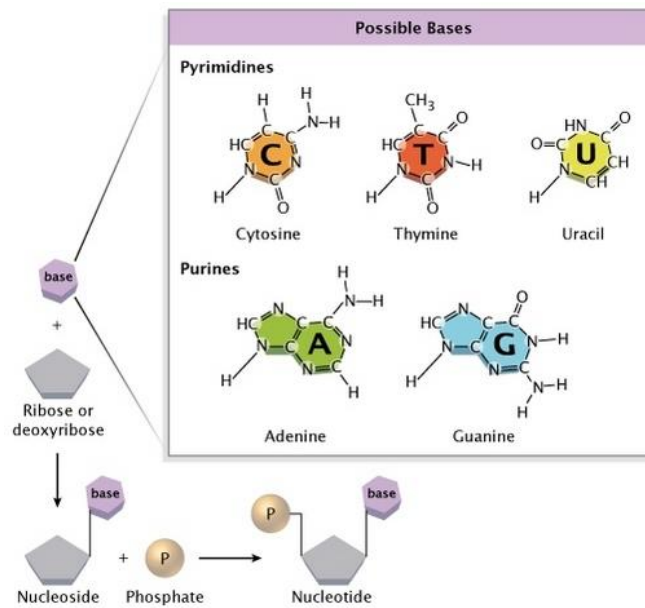


Figura 1.7: Estrutura química do nucleotídeo (adaptado de Crick e Watson, 2008).

Cada purina é formada por um anel de seis lados ligado a um anel de cinco lados, enquanto cada pirimidina é composta apenas por um anel de seis lados. O ADN possui duas purinas (a adenina e a guanina, que diferem nas posições das suas duplas ligações e nos grupos ligados ao anel de seis lados) e duas pirimidinas (timina e a citosina que diferem nos grupos ou átomos ligados aos átomos de carbono do anel e no número de ligações duplas no anel) (Pierce, 2004).

Num nucleótido, a base azotada forma sempre uma ligação covalente com o átomo de carbono 1' do açúcar (pentose). O açúcar (desoxirribose) e a base junta denominam-se de nucleosídeo (Pierce, 2004).

O grupo fosfato consiste num átomo de fósforo ligado a quatro átomos de oxigénio. Estes grupos fosfato presentes em cada nucleótido provocam frequentemente uma carga negativa, que torna o ADN ácido. O fosfato está sempre ligado ao átomo de carbono 5' do açúcar no nucleótido (Pierce, 2004).

Filamentos polinucleotídeos

O ADN é formado por muitos nucleotídeos ligados entre si por ligações covalentes, que unem o grupo fosfato 5' de um nucleotídeo ao carbono 3' do nucleotídeo seguinte. Estas ligações denominadas de ligações fosfodiéster são ligações covalentes relativamente fortes. Vários nucleotídeos ligados desta forma constituem um filamento

polinucleotídico. A estrutura do filamento polinucleotídico é composta por açúcares e fosfatos alternados sendo que as bases se projetam do eixo longo do filamento. As cargas negativas dos grupos fosfato são muitas vezes neutralizadas pela associação das cargas positivas de proteínas, metais ou outras moléculas (Pierce, 2004).

Uma característica importante do filamento polinucleotídico é o seu sentido, ou polaridade. Numa das pontas do filamento um grupo fosfato está apenas ligado ao átomo de carbono 5' do açúcar no nucleotídeo. Essa ponta possui a designação de 5', enquanto a ponta contrária, denominada de 3' possui um grupo OH ligado ao átomo carbono 3' do açúcar (Pierce, 2004).

A estrutura secundária do ADN refere-se à sua configuração tridimensional, ou seja, a estrutura helicoidal fundamental (Pierce, 2004).

A estrutura secundária consiste em dois filamentos polinucleotídicos enrolados um no outro, formando uma dupla hélice. Nas extremidades da hélice encontram-se as ligações açúcar-fosfato, enquanto, que no interior da molécula as bases estão aglomeradas (Figura 1.10) (Pierce, 2004).

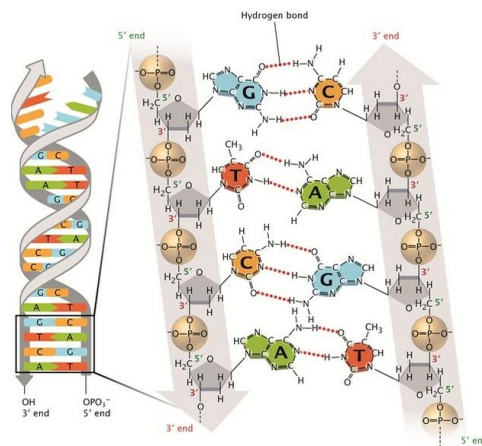


Figura 1.8: Estrutura detalhada do filamento polinucleotídico A estrutura mostra o emparelhamento das bases entre purinas (em azul e verde) e pirimidinas (vermelho, laranja), e as ligações fosfodiéster (adaptado de Crick e Watson, 2008).

Os dois filamentos de polinucleotídicos possuem polaridade inversa, assim sendo, a ponta 5' de um filamento é oposta a ponta 3' do outro (Pierce, 2004).

A união destes filamentos é mantida por dois tipos de forças moleculares. As pontes de hidrogénio unem as bases em filamentos opostos, no entanto, quando comparadas com as ligações covalentes fosfodiéster são ligações mais fracas. O fato

destas ligações serem mais fracas, facilita o seu rompimento e restabelecimento que é muitas vezes necessário para funções importantes do ADN (Pierce, 2004).

A natureza das pontes de hidrogénio impõe uma limitação aos tipos de bases que se podem unir. A adenina une-se à timina por meio de duas pontes de hidrogénio, enquanto, que a guanina normalmente estabelece ligação com a citosina por três pontes de hidrogénio. Assim sendo, a ligação entre a citosina e a guanina é mais forte que a ligação adenina-timina. A especificidade das ligações entre as bases faz com que os filamentos do ADN não sejam idênticos, mas sim complementares. A segunda força que une os dois filamentos de ADN é a interação entre os pares de bases, que contribuem para a estabilidade da molécula de ADN. Deste modo, a sequência de bases pode sofrer variações que permitem que o ADN transporte a informação genética (Figura 1.11) (Pierce, 2004).

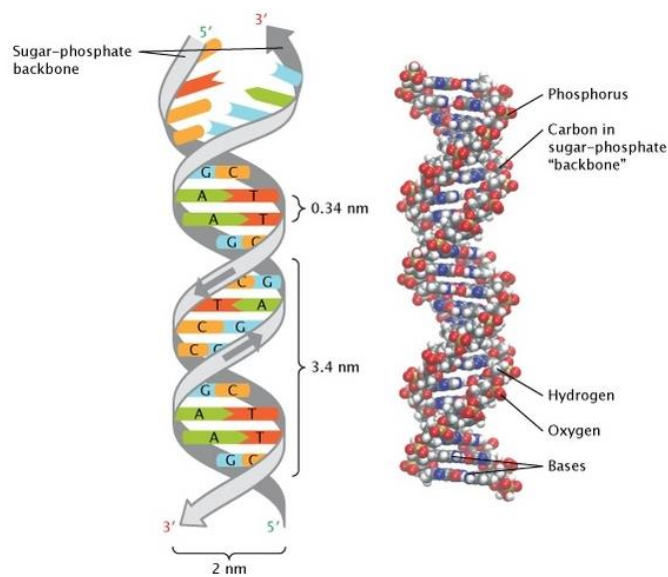


Figura 1.9: Estrutura Helicoidal do ADN (adaptado de Crick e Watson, 2008).

1.8.2. Interação do ADN com superfícies de Carga elétrica

A eletroatividade dos ácidos nucleicos foi descoberta há meio século e deve-se essencialmente, à eletroatividade das bases que constituem as cadeias dos ácidos nucleicos (Palecek, 2002). Os primeiros estudos relativos ao comportamento eletroquímico do ADN foram realizados em elétrodos de mercúrio, em que a redução eletroquímica de duas das bases, adenina e citosina originaram sinais catódicos e a

reoxidação da guanina sinais anódicos (Stempkowska *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2010). Contudo, os estudos conduzidos por Paleček e Fojta demonstraram que as bases, adenina e guanina são oxidáveis (produção de corrente anódica) em elétrodos de carbono. (Oliveira *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2002; Stempkowska *et al.*, 2007).

Existem mais estudos publicados envolvendo a oxidação eletroquímica das bases púricas do que as bases pirimídicas, porque o processo de eletro-oxidação das bases púricas envolve potenciais de oxidação mais baixos, logo é menos suscetível a interferências (Brett *et al.*, 2004).

No entanto e de acordo com os estudos publicados, a quantidade de guanina presente na cadeia do oligonucleótido influencia quer o potencial de oxidação, quer a intensidade de corrente no elétrodo de mercúrio de gota suspensa (HMDE) (Tomschik, *et al.*, 1999). Nomeadamente aos sinais eletroquímicos da adenina e da guanina, são influenciados pela estrutura do ADN, característica esta, que é que muito útil para se efetuar a deteção de danos existente na molécula de ADN (Fojta, 2002; Stempkowska *et al.*, 2007).

Devido à toxicidade do mercúrio, os elétrodos de mercúrio entraram em desuso, sendo que atualmente os elétrodos sólidos são muito utilizados, nomeadamente os elétrodos de carbono (pasta de carbono, carbono vítreo, grafite), sendo que a oxidação do ADN nestes elétrodos está relacionada com a oxidação irreversível da adenina e guanina (Stempkowska *et al.*, 2007; Gonçalves *et al.*, 2010).

Dos diversos métodos existentes para o estudo científico dos ácidos nucleicos, as medições realizadas através de técnicas eletroquímicas, nomeadamente os sensores eletroquímicos de ADN são bastante utilizados pois são ferramentas simples, relativamente baratas, sensíveis, confiáveis e muito mais rápidos que os métodos tradicionais (Paleček, 2002; Alvarez *et al.*, 2004; Wang, 2002; Fojta, 2002).

1.8.3. Mecanismo de Oxidação Eletroquímica da Adenina

A base púrica adenina desempenha um papel fundamental em diversos sistemas biológicos. Os níveis de concentração de adenina são considerados marcadores importantes para algumas patologias, tais como, sida, cancro, estado de energia celular do miocárdio e avanço na doença. Devido a estes factos existe um grande interesse em

desenvolver metodologias para a deteção e quantificação da adenina em amostras biológicas (Kuralay e Haluk, 2013).

As bases púricas, adenina e guanina estão envolvidos na transdução de energia solar e sinalização mediada por reações de oxidação enzimática. Os processos eletroquímicos que envolvem a oxidação destas bases são semelhantes aos que envolvem reações de oxidação enzimática e possuem uma grande importância para compreender as interações que causam danos oxidativos à biomolécula de ADN (Brett, Diculescu e piedade, 2002; Gonçalves, *et al.*, 2010).

Existem diversos estudos realizados sobre as reações eletroquímicas dos ácidos nucleicos que demonstram que as bases do ácido nucleico podem sofrer redução e oxidação na superfície de elétrodos (Song, *et al.*, 2010).

Os produtos de reação da adenina com os ROS incluem a 8-hidroxi guanina, 2-hidroxi adenina (isoguanina) e o 6-N-hidroxiaminopurina (Cohn *et al.*, 2010).

A Figura 1.12 mostra o processo da oxidação eletroquímica da adenina. Conforme se pode visualizar este processo envolve no total 6 eletrões por molécula de adenina para originar o ião primário dicarbonio intermediário, que por ser instável sofre diversas reações: oxidação eletroquímica de ácido parabânico, ureia, dióxido de carbono e amoníaco; redução eletroquímica para originar o 4-aminopurpurico, o dióxido de carbono e amoníaco e a hidrólise de alantoína, dióxido de carbono e amónia (Dryhurst e Elving, 1968; Gonçalves *et al.*, 2010).

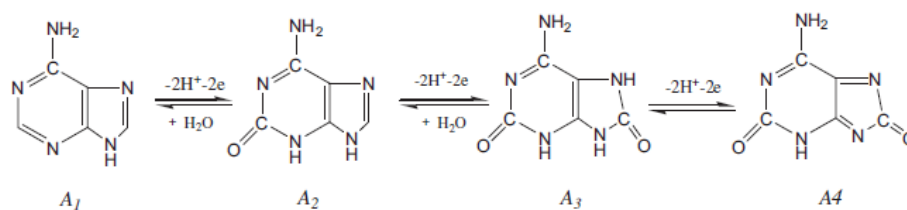


Figura 1.10: Esquema da reação do processo de oxidação eletroquímica da adenina (Song *et al.*, 2010).

Capítulo 2

O objetivo do trabalho descrito neste capítulo foi desenvolver biossensores para a determinação da capacidade antioxidantes de bebidas de modo a avaliar a possibilidade de usar biossensores como método analítico alternativo, sensível e rápido para monitorizar a capacidade antioxidante de águas aromatizadas.

2.1. PARTE EXPERIMENTAL

2.1.1. Reagentes e Soluções

Os reagentes utilizados neste trabalho foram usados sem qualquer purificação adicional: etanol (Panreac), parafina (Uvasol, Merck), grafite (Ultra “F” purity Carbone Lorraine), EDTA (99%,Fluka), Adenina (99% Sigma Aldrich), Lacase Trameters versicolor (Sigma Aldrich), (Polya20 (DST, Sigma Aldrich), sulfato de ferro II heptahidratado ($\geq 99,0\%$, Sigma Aldrich), peróxido de hidrogénio (30% w/v, Panreac), hidróxido de sódio ($\geq 98\%$, Panreac), hidrogenofosfato di-sódio dihidratado (99,5%,Merk), di-hidrogenofosfato de sódio monohidratado (99%,Merk), cloreto de sódio (99,5%, Panreac) solução salina de fosfato de sódio (SSPE) concentrado 20 \times (Sigma Aldrich), ácido orto-fosfórico (85%, Panreac), ácido gálico (98%, Sigma Aldrich), ácido cafeíco ($\geq 99,0\%$, Fluka), ácido cumárico (Sigma Aldrich), ácido ascórbico (Merk, 99,7%).

Para a preparação da solução tampão salina de fosfato (PBS) 0,1mol/L foram preparadas as soluções de 0,1mol/L NaH_2PO_4 e de Na_2HPO_4 , acertando o pH a 7,4.

Para a preparação do PBS a 0,2 mol/L foram preparadas as soluções de 0,02mol/L de H_3PO_4 e de 0,3mol/L de NaCl acertando o pH a 7,4 e a 6,5.

A solução tampão SSPE 2 \times foi obtida por diluição de 10 vezes da solução SSPE em água ultra pura.

A lacase foi preparada no PBS 0,1mol/L com pH de 5,5.

A sonda de dA_{20} de concentração inicial de $100\mu\text{M}$ foi diluída numa solução tampão de SSPE $2\times$ de forma a obterem-se a concentração de 620mg/L . Após a preparação das soluções de dA_{20} estas foram guardadas no congelador.

A solução de Fenton, responsável pela produção de radicais hidroxilo foi preparada por uma mistura de Fe^{2+} : EDTA: H_2O_2 ($1\times 10^{-6}\text{mol/L}$: 0.02mol/L : $4\times 10^{-5}\text{mol/l}$) na proporção molar de 1:2:40.

As soluções de antioxidante padrão (ácido ascórbico, ácido gálico, ácido cafeico e ácido cumárico) foram preparadas diariamente, imediatamente antes da sua utilização, e foram preparadas por dissolução do sólido padrão em água ultra-pura até se obter a concentração pretendida.

Para a preparação da lacase com uma concentração de $2,02\text{mg/mL}$ foi necessário pesar 1 mg de acase e dissolver em 0,5 mL de PBS pH 5,5 e colocar a enzima no frigorífico.

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida a partir de um sistema de ultrapurificação de água Milipore Simplicity 185 (Resistividade= $18,2\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$ a 25°C).

2.1.2. Equipamentos

Todo o trabalho experimental foi efetuado à temperatura ambiente, que ligeiramente variável, encontrando-se normalmente entre 15°C a 18°C . Os ensaios eletroquímicos foram realizados num potencióstato/galvanostato de marca Autolab Metrohm, modelo PGSTAT 12 (Figura 2.13) com sistema de aquisição e tratamento de dados *General Purpose Electrochemical system for Windows (GPES)* versão 4,9 Eco Chemie B.V.



Figura 2.11: Potencióstato da marca Metrohm: Autolab, modelo PGSTAT 12.

A técnica eletroquímica escolhida para a realização deste trabalho foi a VOQ. As medições voltamétricas foram realizadas numa célula eletroquímica constituída por um eléctrodo de referência de Ag/AgCl, um eléctrodo de trabalho de pasta de carbono de diâmetro 3 mm e um contra-eléctrodo de platina.

Todas as medições eletroquímicas foram realizadas com eletrólito (PBS, Tris-HCl ou SSPE 2x) 0,1 mol/L a pH 7,4 e à temperatura ambiente.

Para a medição de volumes de líquidos utilizou-se material de vidro comum de laboratório, bem como, micropipetas (marca VWR) de 20 μL , 100 μL , 200 μL e de 1000 μL .

Todas as pesagens foram realizadas numa balança analítica (Mettler Toledo), com precisão de 0,00001 g e numa balança analítica (Kern), com precisão de 0,001g.

O Ultrassons Sonorex Digital 10P (Bandelin) foi utilizado de forma a ajudar à dissolução de alguns reagentes e garantir a obtenção de soluções homogéneas.

O agitador magnético Magnetic Stirrer Modelo NO 690/1 foi utilizado em todos os ensaios do estudo do dano oxidativo e da protecção promovida por antioxidantes de modo a garantir a obtenção de homogeneidade do meio reacional.

O acerto do pH das soluções foi realizado usando um potenciómetro Meter GLP 22 (Grison).

2.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.2.1. Preparação da Pasta de Carbono

A pasta de carbono utilizada, neste trabalho, foi preparada usando-se óleo de parafina líquida e grafite em pó. Para isso fez-se uma mistura de 1,8 g de óleo de parafina líquida com 5 g de pó de grafite de grau espectroscópico. Esta mistura foi triturada num almofariz até à obtenção de uma pasta cinzenta uniforme e brilhante (Barroso *et al.*, 2011a).

2.2.2. Preparação do Eléctrodo de Pasta de Carbono

O eléctrodo de pasta de carbono (EPC) é constituído exteriormente por um tubo de teflon e internamente por um pistão de aço inoxidável (Figura 2.14). Conforme se pode

visualizar na Figura 2.14 para se preparar um EPC a pasta de carbono é introduzida na cavidade do corpo do eletrodo, e posteriormente, a superfície do EPC é alisada e compactada através da execução de pressão do EPC contra uma folha branca e simultaneamente efetuada uma ligeira pressão manual no êmbolo (Barroso *et al.*, 2011a).

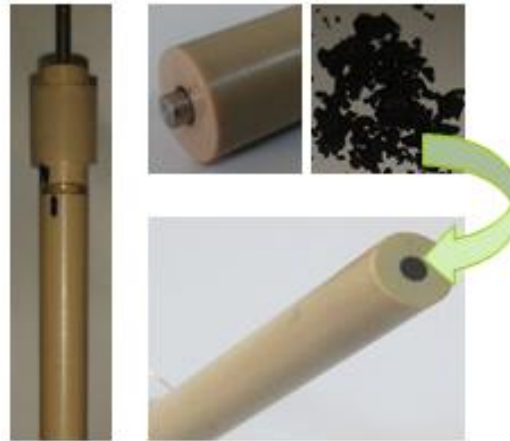


Figura 2.12: Preparação do eletrodo de Pasta de carbono.

Ao fim de cada ensaio, é necessário remover a pasta de carbono existente no interior do EPC e efetuar a limpeza do eletrodo com papel absorvente de modo a garantir que o interior do eletrodo não apresente resíduos de pasta de carbono.

2.3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A execução da parte experimental deste trabalho foi realizada em 5 etapas: i) imobilização da base púrica, adenina, ou de cadeias simples de ADN, dA₂₀ (por eletroimobilização ou por adsorção física); ii) Indução de dano oxidativo na adenina ou do dA₂₀ através da imersão do EPC modificado no radical hidroxilo (gerado pela reação de Fenton); iii) Proteção da adenina e do dA₂₀ promovido pela presença de antioxidantes no meio reacional; iv) Detecção do sinal eletroquímico da adenina ou do dA₂₀ por VOQ; v) Estudo do comportamento do biossensor na presença da enzima lacase. De seguida, encontra-se a descrição detalhada destas 5 etapas:

2.3.1. Etapa Experimental I: Imobilização do material baseado no ADN

Imobilização da adenina no EPC

Para efetuar uma imobilização eficaz da adenina é necessário primeiro efetuar uma etapa de tratamento da superfície do eletrodo. Para isso, o EPC foi mergulhado em PBS 0,1mol/L pH 4,6 tendo-se aplicado um potencial de condicionamento (E_c) de + 1,8 V durante 180 s (Figura 2.15). Este condicionamento do eletrodo permite que sejam criadas todas as condições ótimas para que a adenina seja devidamente imobilizada na superfície do EPC. A nível experimental efetuou-se uma otimização do E_c e do tempo de condicionamento (t_c).

Está descrito que a aplicação de E_c elevados num meio reacional ácido faz aumentar as propriedades hidrofílicas da superfície do EPC permitindo assim, um aumento da resolução do sinal analítico.

Após ter sido efetuado o tratamento da superfície do eletrodo, o EPC foi mergulhado numa solução de PBS 0,1 mol/L a pH 7,4 e contendo uma concentração rigorosa de adenina. A eletrodeposição da adenina foi efetuada pela aplicação de um potencial de deposição (E_d) de + 0,4 V durante 240 s. Nestas condições a adenina fica aderida à superfície do EPC (Figura 2.15). Na concretização desta etapa, otimizaram-se os parâmetros de E_d , tempo de deposição (t_d) e concentração da adenina.

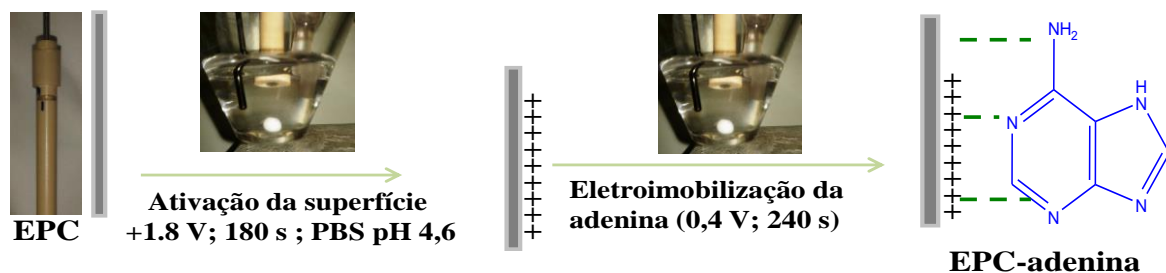


Figura 2.13: Esquema representativo da construção de um biossensor de base púrica.

Imobilização do dA₂₀ no EPC

A adsorção física do dA₂₀ no EPC foi realizada pela colocação de 4 µL de uma solução de dA₂₀ (200mg/L) na superfície do eletrodo. Posteriormente, a gota foi seca por uma corrente de azoto, que deve ser aplicada suavemente de modo a garantir que a gota permaneça na superfície do eletrodo e seque uniformemente por todo o eletrodo. Na

Figura 2.16 pode visualizar-se um esquema que resume o processo de imobilização de dA₂₀ na superfície do EPC. Nesta etapa fez-se o estudo da otimização da concentração do dA₂₀ a ser imobilizada no EPC.

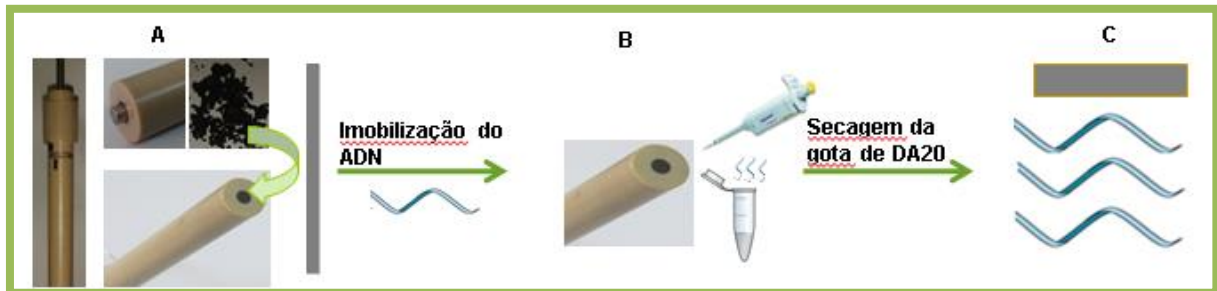
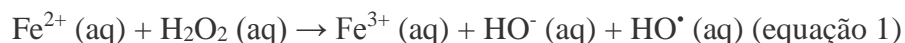


Figura 2.14: Esquema experimental: A) Construção do EPC; B) Imobilização da dA₂₀; C) dA₂₀ no EPC.

2.3.2. Etapa Experimental II: Estudo do dano oxidativo induzido no material baseado no ADN

O estudo do dano oxidativo induzido por radicais na adenina-EPC ou no dA₂₀-EPC foi realizado na presença do radical hidroxilo. Este radical foi obtido a partir da reação de Fenton (equação 1).



Uma das formas mais eficazes de produzir o radical HO[•] é usando a reação de Fenton. Nesta reação, o ião metálico de Fe (II) reage com o peróxido de hidrogénio produzindo o radical hidroxilo. Esta reação é espontânea sendo que o radical livre gerado é muito reativo, muito instável (tempo de semi-vida extremamente curto), e apresenta a capacidade de oxidar uma variedade de biomoléculas, tais como, proteínas, ácidos gordos, hidrocarbonetos e ADN (Mello *et al.*, 2006).

De acordo com a literatura (Mello *et al.*, 2006) para que a produção de HO[•] seja maximizada, o H₂O₂ deve ser usado em excesso e usando-se uma razão molar de Fe²⁺:EDTA:H₂O₂ de 1:2:40. A presença de EDTA na reação é para aumentar a solubilidade do Ferro.

Para estudar o efeito do radical hidroxilo no material baseado no ADN que se encontra adsorvido na superfície do eléctrodo, o EPC foi colocado num reator, durante um determinado período de tempo, que continha solução tampão (SSPE 2x), e os reagentes necessários para iniciar a reação de Fenton ($\text{Fe}^{2+}:\text{EDTA}:\text{H}_2\text{O}_2$) (Figura 2.17). Neste estudo fez-se a otimização da concentração de Fe^{2+} (os restantes reagentes, EDTA e H_2O_2 foram usados na proporção descrita anteriormente) e do tempo de incubação.

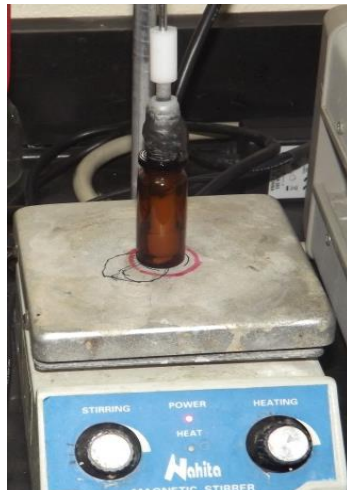


Figura 2.15: Representação do ensaio do estudo do dano oxidativo.

2.3.3. Etapa Experimental III: Estudo do efeito protetor conferido pelo antioxidante no material baseado no ADN

Nesta etapa do trabalho, estudou-se o efeito protetor promovido por antioxidantes, na presença de radicais livres, na adenina-EPC e no dA_{20} -EPC. Os antioxidantes utilizados foram o ácido ascórbico (AA), o ácido gálico (AG), o ácido cafeico (Aca) e o ácido cumárico (Acu).

Neste caso, o EPC foi mergulhado, por um determinado período de tempo, num reator que continha um concentração rigorosa de antioxidante e de HO^\bullet dissolvidos em solução tampão.

2.3.4. Etapa experimental IV: Detecção do sinal eletroquímico do material baseado no ADN

Após a realização das etapas I, II e III, o EPC modificado com adenina ou dA_{20} foi lavado com água ultrapura e colocado na célula eletroquímica contendo eletrólito

(PBS) a 0,1 mol/L e pH 7,4. De seguida efetuaram-se VOQ no intervalo de potenciais de + 0,7 V a + 1,5 V de modo a ser possível visualizar o processo de oxidação da adenina e do dA₂₀. Os parâmetros analíticos da VOQ usados foram: frequência de 25Hz, amplitude de 0,01995 V e incremento de potencial 0,0051 V.

Após a concretização da VOQ analisaram-se os dados tendo-se obtido como resultado experimental, o potencial de pico de oxidação (E_p) e a intensidade de pico (i_p). Neste trabalho experimental o estudo analítico consistiu em efetuar a mediação da:

Corrente eletroquímica máxima (i_{pB}) – intensidade de pico máxima expressa como sendo o sinal da adenina ou do dA₂₀ 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 da adenina ou do dA₂₀ obtida após o contacto do material baseado no ADN ao radical hidroxilo ($i_{pD} < i_{pB}$).

Corrente eletroquímica obtida após os ensaios da proteção ao dano oxidativo (i_{pP}) – intensidade de pico da adenina ou do dA₂₀ obtida após imersão do biossensor numa solução contendo antioxidante e radical hidroxilo ($i_{pD} < i_{pP} < i_{pB}$).

2.3.5. Etapa Experimental V: Estudo do comportamento do biossensor na presença da enzima lacase

Nesta fase do trabalho, estudou-se o comportamento do biossensor na presença da lacase, de modo a verificar se esta enzima traz vantagens a este sistema. Para tal, o primeiro passo foi verificar a atividade da lacase de modo a garantir que estava em condições de ser utilizada.

Atividade enzimática da lacase

A atividade da enzima foi determinada por oxidação do ABTS (Ácido 2,2'azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfónico)) a 414 nm. Numa célula o ensaio branco constituído por 3mL de PBS a pH 5,5 e uma gota de ABTS de concentração 25mM. . Noutra célula colocou-se 3mL de PBS a pH 5,5, uma gota de ABTS de concentração 5mM e uma gota de lacase cuja concentração foi de 2,08mg/L. Por fim, foi efetuada a medição da absorvância de 15 em 15 segundos, durante três minutos. Para comprovar a atividade da enzima, o ABTS que é incolor na forma reduzida, sofre uma mudança de cor para verde após a oxidação provocada pela lacase.

Estudo do comportamento do AG na presença da Lacase

Nesta etapa do trabalho, estudou-se o efeito protetor promovido pelo AG na presença da lacase. Para tal, passou-se a utilizar o PBS 0,2mol/L a pH 6,5 pois corresponde ao pH ótimo de atuação da lacase.

Neste caso, o EPC foi mergulhado, por um determinado período de tempo, num reator que continha um concentração rigorosa de AG e da lacase dissolvidos em solução tampão.

2.3.6. Estudo do Efeito protetor ao dano oxidativo no dA₂₀-EPC promovido por antioxidantes na presença da amostra real

Nesta etapa do trabalho, estudou-se o efeito protetor promovido por antioxidantes, na presença da água aromatizada, da enzima lacase e de radicais livres, no dA₂₀-EPC. Os antioxidantes utilizados foram o AA e o AG.

A amostra real consiste numa água aromatizada com sabor a laranja, sendo que os ingredientes constituintes desta água são: água mineral natural de luso (83,4%), sumos de fruta concentrados (10,8% maçã e 0,3% laranja), extrato natural de fruta, acidificante: ácido cítrico, aroma natural de laranja com outros aromas naturais, sumo concentrado de cenoura púrpura, extrato de cártamo.

Com esta amostra foram realizados diversos testes utilizando o AG e o AA como antioxidantes. Para estes estudos optou-se por utilizar a concentração mais baixa (obtida na curva de calibração) de AG (5mg/L) e AA (1mg/L).

Neste caso, o EPC foi mergulhado, por um determinado período de tempo, num reator que continha um concentração rigorosa de antioxidante, amostra real, lacase e de HO[•] dissolvidos em solução tampão.

Capítulo 3

3.1. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1.1. Comportamento eletroquímico da adenina-EPC

O estudo do comportamento eletroquímico da adenina imobilizado do EPC foi estudado por VOQ utilizando-se como eletrólito o PBS a pH 7.4. Conforme se pode visualizar na Figura 3.18 a adenina apresenta um processo oxidativo ao E_p de 1,0 V. Este valor de potencial está de acordo com o que se encontra descrito na literatura, estando referenciado que a oxidação eletroquímica da adenina envolve 2 elétrões/molécula, sendo que o E_p da adenina é dependente do pH, do tampão utilizado e da força iónica e do tipo de transdutor utilizado (Hamel, *et al.*, 2008).

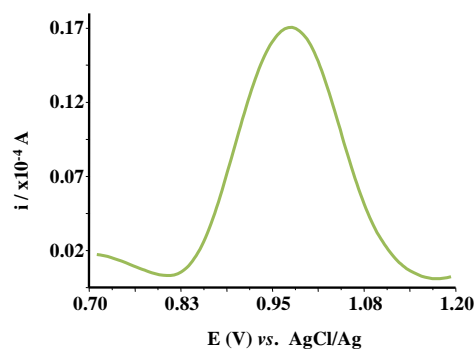


Figura 3.16: VOQ obtida para o adenina-EPC em PBS pH 7,4.

3.1.2. Otimização das condições experimentais da Eletroimobilização da adenina

De modo a otimizar o processo da imobilização da adenina ao EPC estudou-se a influência do E_c , do E_d e da concentração de adenina na i_pB obtida aquando a realização da VOQ do adenina-EPC.

A influência do E_c foi estudada numa de gama de potenciais entre + 1,0 V e + 1,8 V mantendo-se o E_d a + 0,4 V. Conforme se pode visualizar na Tabela 3.2 à medida que

o E_c aumentou o i_p também aumentou, obtendo-se um valor máximo de i_p quando se utilizou um E_c de + 1,8 V. A partir deste valor de E_c , tornou-se impossível efetuar medidas voltamétricas pois a pasta de carbono existente no EPC deteriorou-se. A deterioração da pasta de carbono deveu-se ao facto de os potenciais utilizados (superior a + 1,8 V) já não se enquadrarem na zona de potenciais aceitáveis para trabalhar com EPC. Para os estudos seguintes o valor escolhido para o E_c foi de + 1,8 V. Para estes estudos o t_c foi de 180s e o t_d de 240s.

Tabela 3.2: Influência do E_c na i_p da adenina-EPC com um t_c de 180s.

E_c (V)	i_p médio (μA)
1,0	1,83
1,2	2,39
1,6	5,38
1,8	16,1

O estudo da influência do E_d foi executado numa gama de potenciais que variou entre + 0,4 V e + 0,8 V (Tabela 3.3). A i_p máxima do Adenina-EPC foi obtida quando se utilizou um E_d de + 0,4 V. Estes resultados obtidos ($E_c = 1,8$ V e $E_d = 0,4$ V) vão de encontro com os resultados descritos na literatura (Skeva e Girousi, 2012)

Tabela 3.3: Influência do E_d na i_p da adenina-EPC com um t_d de 240s e concentração (200mg/L)

E_d (V)	i_p médio (μA)
0,4	16,1
0,6	2,24
0,8	7,36

A Figura 3.19 representa a influência da concentração da adenina eletro-imobilizada no EPC no sinal eletroquímico obtido no processo de eletro-oxidação da adenina. A i_p máxima foi obtida quando se utilizou uma concentração de adenina de 200 mg/L. Foi impossível efetuar estudos para concentrações superiores a 200 mg/L devido à dificuldade crescente em se dissolver a adenina mas também porque quanto maior for a

quantidade de adenina adsorvida à superfície do eletrodo maior é a resistência à passagem da corrente gerada na reação redox.

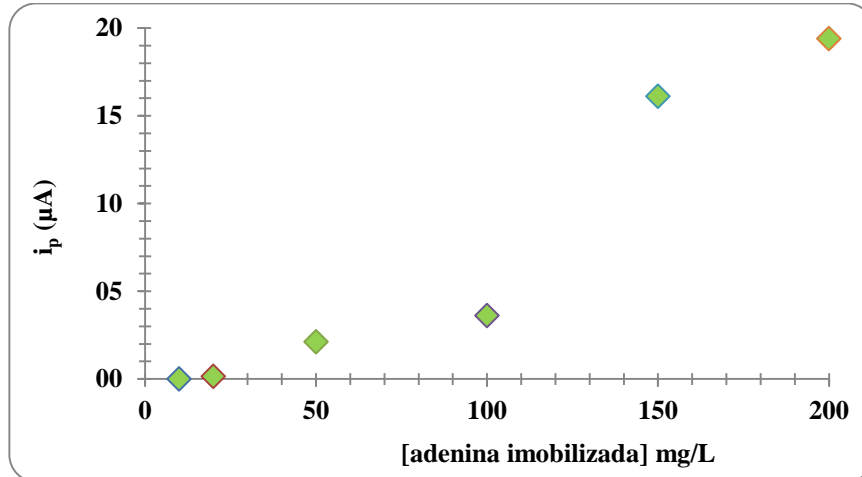


Figura 3.17: Influência da concentração de adenina eletro-imobilizada no i_p B da adenina ($E_c + 1,8$ V, $E_d + 0,4$ V). (Tempo de condicionamento 180s e tempo de deposição 240s).

3.1.3. Estudo do dano Oxidativo induzido na Adenina-EPC

O estudo do dano oxidativo, provocado por radicais livres na adenina, foi efetuado colocando-se o adenina-EPC num reator, por um determinado período de tempo, que continha o radical hidroxilo (gerado pela reação de Fenton e no momento exato do ensaio). De acordo com a literatura, o radical hidroxilo provoca danos no ADN celular através da produção de diversas alterações no ADN tais como, remoção e oxidação das bases e rotura da dupla hélice, entre outras (Mello *et al.*, 2006).

Neste estudo, estudou-se a influência da concentração de Fe^{2+} (a concentração de EDTA e de H_2O_2 foram usadas na proporção de 1:2:40; Fe^{2+} :EDTA. H_2O_2) e do tempo de incubação na i_p D da adenina-EPC.

A Figura 3.20 mostra, a título de exemplo, VOQ obtido após se colocar o adenina-EPC em contato com o radical hidroxilo. Conforme se pode visualizar, efetivamente ocorreu dano oxidativo na adenina, que se comprova pela existência de diminuição da i_p D da adenina-EPC, quando comparado com a i_p B do sinal da adenina intacta.

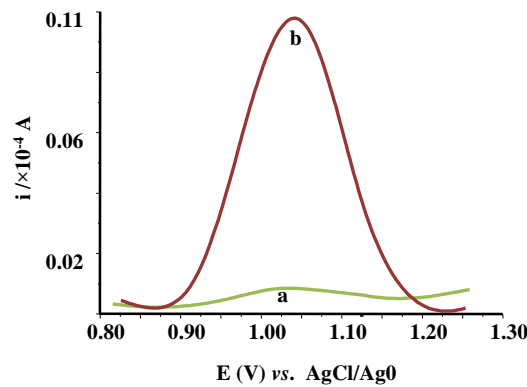


Figura 3.18: VOQ representativo do dano oxidativo. Neste voltamograma é possível verificar-se uma diminuição da i_p da Adenina (b) após o dano oxidativo provocado pelo radical hidroxilo (a).

Na Tabela 3.4 e na Figura 3.21 encontram-se representados os resultados obtidos relativos ao estudo do dano oxidativo. Conforme se pode visualizar a concentração dos reagentes da reação de Fenton (Fe^{2+} e H_2O_2) e o tempo de incubação têm uma forte influência na i_pD da adenina-EPC. O aumento do tempo de incubação, que se reflete numa maior exposição da adenina ao radical hidroxilo induz um maior dano oxidativo na adenina que se traduz numa diminuição mais acentuada da i_pD da adenina-EPC.

Os resultados demonstram que quanto mais concentrado é o Fe^{2+} maior o dano oxidativo provocado a adenina. A análise da Tabela 3.4 comprova este facto.

Tabela 3.4: Dados do VOQ obtidos para o estudo do dano oxidativo.

Concentração Fe^{2+} (mol/L)	Tempo de incubação(s)	i_p médio (μA)	Desvio Padrão(μA)
$1,0 \times 10^{-3}$	0	15,0	0,52
	5	4,95	2,25
	15	1,67	0,58
	60	0,45	0,07
$1,0 \times 10^{-4}$	0	5,62	0,23
	5	0,61	1,08
	15	0,50	0,38
	60	0,35	0,11
$1,0 \times 10^{-5}$	0	4,75	0,16
	5	0,49	0,34
	15	0,38	0,27
	60	0,20	0,24

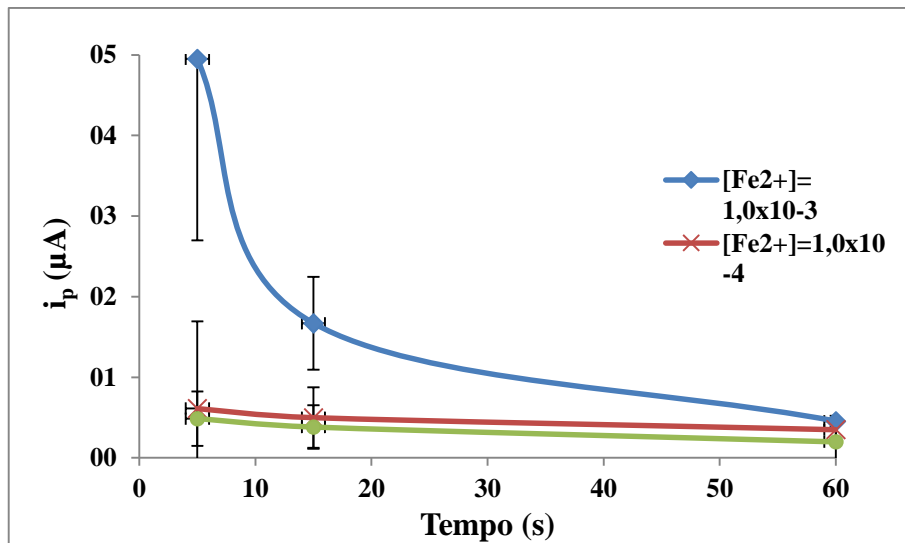


Figura 3.19: Representação gráfica da influência da concentração de Fe^{2+} e do tempo de incubação na i_p da adenina-EPC.

Embora se consiga verificar que existe dano oxidativo na base púrica, confirmado pela diminuição da i_pD da adenina, também é possível constatar que as medidas eletroquímicas são irreprodutíveis estando associadas a um grande desvio padrão. De forma a diminuir a irreprodutibilidade do sinal voltamétrico, fez-se o estudo da influência do tipo de solução tampão utilizado no ensaio do dano oxidativo na i_pD da adenina-EPC.

3.1.4. Influência do tipo de tampão nos ensaios do dano oxidativo

De modo a estudar a influência da constituição do tampão utilizado nos ensaios do dano oxidativo na i_pD da adenina-EPC, os ensaios foram realizados com diferentes tipos de tampões: Tris-HCl, PBS e SSPE 2X a pH 7,4.

Os dados obtidos neste estudo encontram-se registados na Tabela 3.5. Conforme se pode verificar mesmo quando se testaram diferentes tipos de solução tampão continuou a existir irreprodutibilidade do sinal eletroquímico, tendo-se também constatado que a corrente elétrica que abastece o laboratório de eletroquímica possuía muitos picos de corrente com consequente introdução de ruído na célula eletroquímica. Assim sendo, alterou-se o formato da construção do biossensor eliminando-se etapas com forte dependência da corrente elétrica tal como a etapa de condicionamento e de eletrodeposição. Deste modo passou-se a usar como material baseado no ADN, cadeias

de ADN simples constituídas por 20 adeninas (dA₂₀). A adsorção deste material foi efetuada por colocação de um volume muito reduzido de uma solução de dA₂₀ na superfície do EPC com posterior secagem com uma corrente suave de azoto.

Tabela 3.5: Estudo da influência do tipo de solução tampão na *i_pD* da adenina-EPC.

Solução tampão pH 7,4	Tempo de incubação (s)	<i>i_pD</i> médio (μ A)	Desvio padrão (μ A)
PBS	0	4,85	0,21
	5	1,57	0,12
	30	0,13	2,99
	60	1,10	1,50
TRIS-HCl	0	8,00	0,07
	5	0,57	0,47
	30	0,62	0,77
	60	2,96	2,72
SSPE 2X	0	18,90	0,10
	5	6,74	4,38
	30	0,80	0,68
	60	0,55	0,33

3.1.5. Otimização das condições experimentais da imobilização do dA₂₀

A Figura 3.22 mostra um VOQ representativo do comportamento eletroquímico do dA₂₀ adsorvido ao EPC. De acordo com o voltamograma é possível verificar que o dA₂₀ apresenta um pico de oxidação ao potencial de + 1,28 V quando se usa como eletrólito o PBS pH 7,4. O E_p da oxidação da adenina (+1,0 V) e o E_p de oxidação do dA₂₀ diferem entre si. Tal facto pode ser justificado devido ao dA₂₀ consistir numa cadeia simples de 20 adeninas ligadas ao grupo fosfato e ao açúcar, que o torna diferente da adenina. Este facto aliado à forma diferente de imobilização efetuada para a adenina (eletroimobilização) e para o dA₂₀ (adsorção física) é responsável pela diferença de intensidade do pico observada entre estes, mesmo estando à mesma concentração.

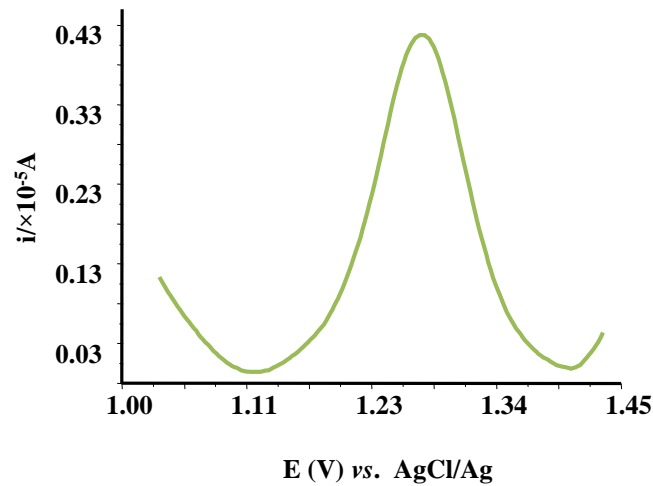


Figura 3.20: VOQ em PBS pH7,4 do dA₂₀-EPC.

De forma a otimizar e maximizar a i_pB do dA₂₀-EPC estudou-se o efeito da concentração de dA₂₀ adsorvida no EPC na i_pB do dA₂₀. A gama de concentrações estudada variou entre 10 a 600 mg/L de dA₂₀. Conforme se pode visualizar na Tabela 3.6 e na Figura 3.23 à medida que se aumentou a concentração de dA₂₀ a i_pB do dA₂₀ também aumentou. De modo a não saturar a superfície do EPC a concentração escolhida de dA₂₀ foi de 200 mg/L. Neste estudo o erro relativo oscilou entre 3,95 % e 9,49 % considerando-se assim que o sistema apresentou precisão e reprodutibilidade.

Tabela 3.6: Valores de i_pB e respetivos desvios padrão e erros relativos obtidos na otimização da concentração de dA₂₀-EPC.

dA ₂₀ (mg/L)	i_pB médio (μA)	Desvio Padrão (μA)	Erro Relativo (%)
10	1,52	0,06	3,95
20	1,71	0,06	3,51
50	2,21	0,14	6,33
100	3,90	0,37	9,49
200	4,35	0,33	7,59
300	5,18	0,37	7,14
600	6,11	0,28	4,58

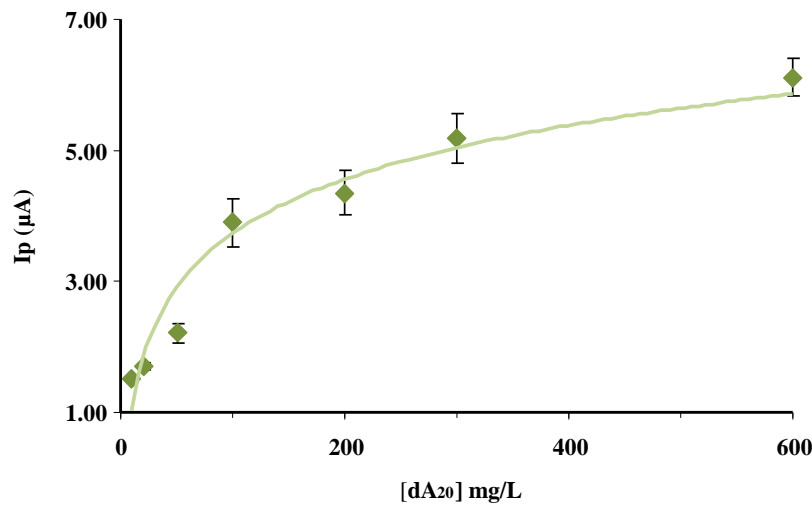


Figura 3.21: Representação gráfica da influência da concentração de dA₂₀ adsorvida ao EPC na i_pB .

O tempo de incubação escolhido para a realização dos ensaios seguintes foi de 30 s. A escolha deste tempo de incubação deveu-se ao facto de ser necessário a existência de um compromisso entre a existência de dano oxidativo no dA₂₀ mas sem dano total do dA₂₀ ($i_{pD} = 0$ A). Este compromisso é necessário pois quanto maior for o nível de dano oxidativo mais difícil se torna de realizar uma proteção do dano oxidativo, promovida por antioxidantes, no dA₂₀.

Após a realização do estudo do dano oxidativo induzido por radicais no dA₂₀-EPC fez-se o estudo da proteção ao dano oxidativo, promovido por antioxidantes, no dA₂₀-EPC.

3.1.6. Estudo do efeito protetor, ao dano oxidativo, no dA₂₀-EPC promovido por antioxidantes

Os antioxidantes utilizados para a realização deste estudo foram o AG, AA, Acu e Aca. Neste caso, o dA₂₀-EPC foi colocado num reator contendo solução tampão 0,2mol/L a pH 7,4, antioxidante e o radical hidroxilo em simultâneo.

Antioxidante: Ácido Gálico

O AG é um ácido fenólico, que existe em muitos produtos naturais tais como frutos, chás e vegetais. O AG é conhecido por ter atividade antioxidante nomeadamente

na neutralização e eliminação de radicais livres existentes na amostra (Chirinos *et al.*, 2010).

Na Tabela 3.7 estão apresentados os resultados obtidos quando se utilizou como antioxidante o AG. Neste estudo utilizaram-se concentrações crescentes de AG que variou entre 5,0 e 20,0 mg/L. Conforme se pode verificar (Tabela 3.7) à medida que se aumentou a concentração do AG também aumentou a i_pP do dA_{20} -EPC. No entanto, o efeito protetor promovido pelo AG só se começa a evidenciar a partir da concentração de AG de 8,0 mg/L confirmado pelo aumento da i_pP do dA_{20} -EPC. Para concentrações inferiores a 8,0 mg/L não existe efeito protetor visto que a i_pP ser semelhante à i_pD obtida no ensaio do dano oxidativo. Neste caso a quantidade existente de AG não é suficiente para anular ou reduzir os efeitos colaterais produzidos pelo radical no dA_{20} -EPC.

Tabela 3.7: Dados obtidos quando se utilizou como antioxidante o AG.

[AG] (mg/L)	i_pP médio (μA)	Desvio padrão (μA)	Erro relativo (%)
0,0	0,31	0,006	2,07
5,0	0,34	0,010	2,94
8,0	0,70	0,040	5,71
15,0	1,16	0,010	0,86
20,0	1,76	0,020	1,14

A Figura 3.24 mostra os VOQ obtidos neste estudo e a Figura 3.25 a relação linear entre o aumento da concentração de AG e o aumento da i_pP do dA_{20} -EPC.

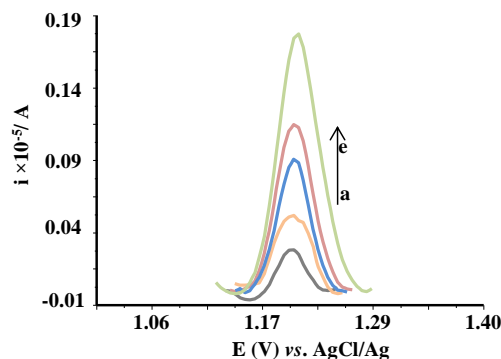


Figura 3.22: VOQ do efeito protetor conferido pelo AG. Neste VOQ é possível observar-se um aumento da i_p da dA_{20} com o aumento da concentração de AG. De (a) a (e) estão representadas as diferentes concentrações de AG. Assim, (a) 5mg/L, (b) 8mg/L, (c) 10mg/L, (d) 15mg/L e (e) 20mg/L.

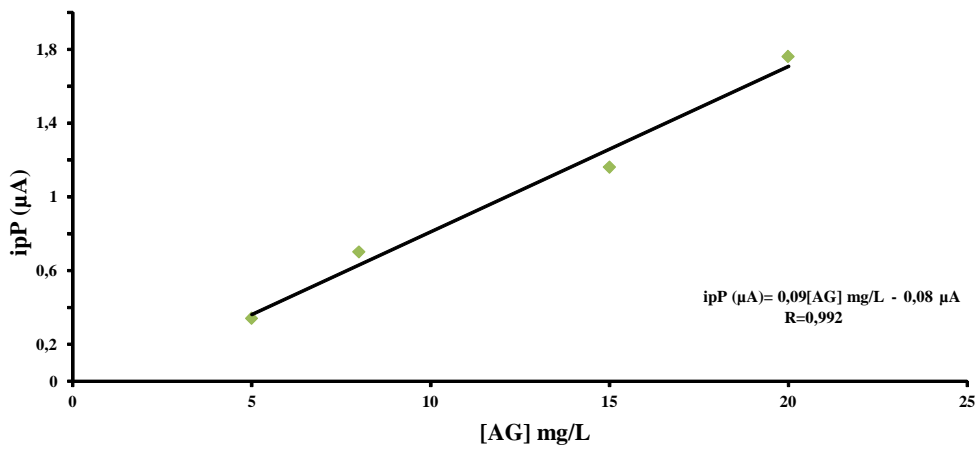


Figura 3.23: Curva de calibração do AG.

A Figura 3.26 mostra, a título de exemplo, VOQ obtido após se colocar o dA₂₀ em contacto com o radical hidroxilo e após se colocar o dA₂₀ em contacto simultâneo com o AG e radical hidroxilo. Conforme se pode visualizar, efetivamente ocorreu dano oxidativo no dA₂₀, que se comprova pela existência de diminuição da *i_pD* do dA₂₀, quando comparado com a *i_pB* do sinal do dA₂₀ intacto. Nesta figura também é possível visualizar-se a proteção conferida pelo AG, representada pela curva (b) da Figura 3.26, curva intermédia, que demonstra que na presença do AG a intensidade do pico é superior a visualizada na sua ausência, embora menor que a *i_pB* do sinal do dA₂₀. Daí pode-se concluir a capacidade antioxidante do AG.

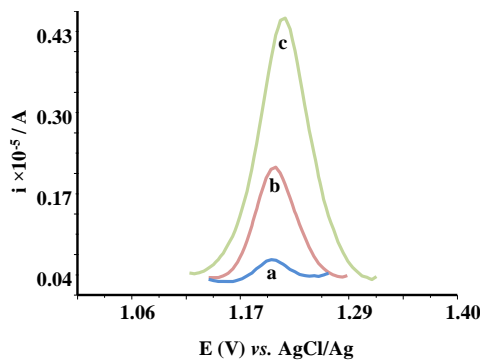


Figura 3.24: VOQ representativo do dano oxidativo e respetiva proteção conferida pelo AG. Neste VOQ é possível observar-se a *i_pB* da dA₂₀ intacta (c), *i_p* da dA₂₀ após o dano oxidativo (a) e *i_p* da dA₂₀ após proteção conferida pelo AG.

Antioxidante: Ácido Ascórbico

O AA ou vitamina C existe em fruta e legumes. O AA é considerado um antioxidante muito forte com capacidade de evitar o dano oxidativo das biomoléculas (Du *et al.*, 2012).

Na Tabela 3.8 estão indicados os resultados obtidos aquando da utilização do AA, em presença do radical hidroxilo, como promotor da proteção do dA₂₀-EPC ao dano oxidativo. O estudo foi efetuado para concentrações a AA a variar entre 1,0 e 8,0 mg/L. Analisando a Tabela verifica-se que o aumento da concentração de AA origina um aumento da i_pP e como consequência o aumento e a eficácia do efeito protetor.

Contudo, o efeito protetor promovido pelo AA só se começa a evidenciar a partir da concentração de AA de 4,0 mg/L confirmado pelo aumento da i_pP do dA₂₀-EPC. A concentração mais baixa de AA estudada, 1mg/L não revelou efeitos protetores, pois a i_pP foi igual à obtida no dano oxidativo.

Tabela 3.8: Dados obtidos quando se utilizou como antioxidante o AA.

[AA] (mg/L)	i _p P médio (x10 ⁻⁷ A)	Desvio Padrão (µA)	Erro Relativo (%)
0,0	2,7	----	----
1,0	2,7	0,01	5,24
4,0	5,46	0,03	5,44
6,0	6,76	0,03	2,09
8,0	8,65	0,04	4,83

Na Figura 3.27 mostram-se os VOQ obtidos para o dA₂₀-EPC quando se utilizaram concentrações crescentes de AA. A Figura 3.28 representa a relação linear obtida entre i_pP do dA₂₀-EPC e a concentração de AA.

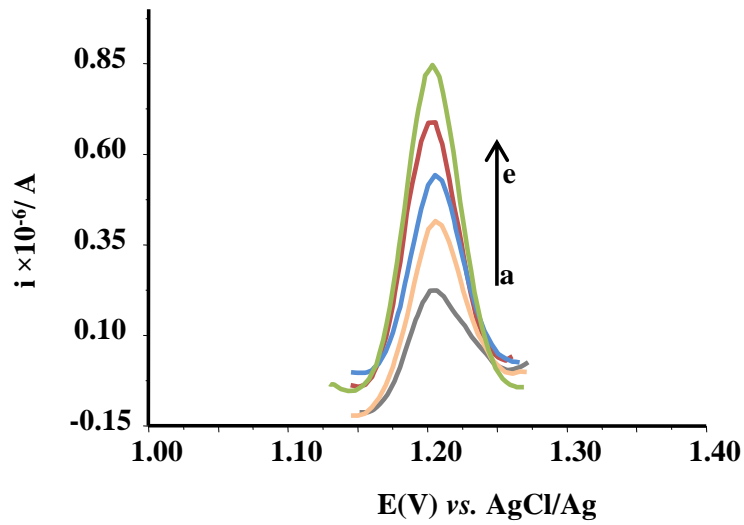


Figura 3.25: VOQ do efeito protetor conferido pelo AA Neste VOQ é possível observar-se um aumento da i_p da dA_{20} com o aumento da concentração de AG. De (a) a (e) estão representadas as diferentes concentrações de AA. Assim, (a) 1mg/L, (b) 2mg/L, (c) 4mg/L, (d) 6mg/L e (e) 8mg/L.

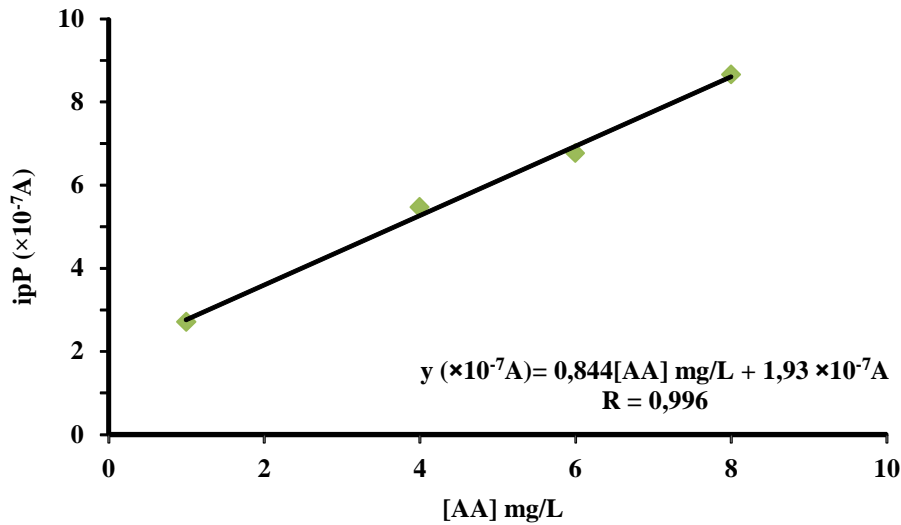


Figura 3.26: Curva de Calibração do AA.

Na figura 3.29 é apresentado um VOQ, representativo do efeito protetor conferido pelo AA na presença do radical hidroxilo. Este VOQ comprova a proteção conferida por este ácido ao dA_{20} , pois a i_{pD} do dA_{20} (a) é inferior a i_p após proteção conferida pelo AA (b).

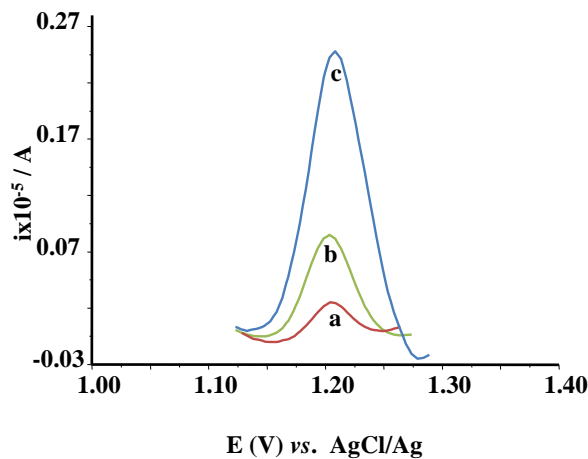


Figura 3.27: VOQ representativo do dano oxidativo e respetiva proteção conferida pelo AA. Neste VOQ é possível observar-se a i_{pB} do dA_{20} intacto (c), i_p da dA_{20} após o dano oxidativo (a) e i_p da dA_{20} após proteção conferida pelo AA.

Antioxidante: Ácido Cafeico

O Aca é um derivado dos compostos fenólicos, pertencente à família dos ácidos hidrocínâmicos, presente como composto natural em diversos produtos tais como café, vinho e alguns frutos (Gulcin, 2006).

Os resultados obtidos neste estudo encontram-se na Tabela 3.9. Conforme se pode observar na Figura 3.30 existe uma relação linear entre a concentração de Aca (entre 0,10 e 0,90 mg/L) e a i_{pP} do dA_{20} -EPC. Para concentrações inferiores a 0,60 mg/L de Aca, este antioxidante não possuiu força suficiente para evitar o dano oxidativo e promover proteção às lesões do dA_{20} . A partir da concentração de 0,60 mg/L de Aca começou-se a observar um aumento da i_{pP} do dA_{20} -EPC, iniciando-se assim o processo da proteção do material baseado no ADN. A Figura 3.31 apresenta os voltamogramas obtidos neste estudo.

Tabela 3.9: Resultados obtidos quando se utilizou como antioxidante o Aca.

[Aca] (mg/L)	i_{pP} médio ($\times 10^{-7}$ A)	Desvio padrão (μA)	Erro relativo (%)
0,00	3,07	----	----
0,10	3,07	0,22	7,17
0,60	6,93	0,08	1,15
0,80	8,08	0,01	0,12
0,90	8,62	0,05	0,58

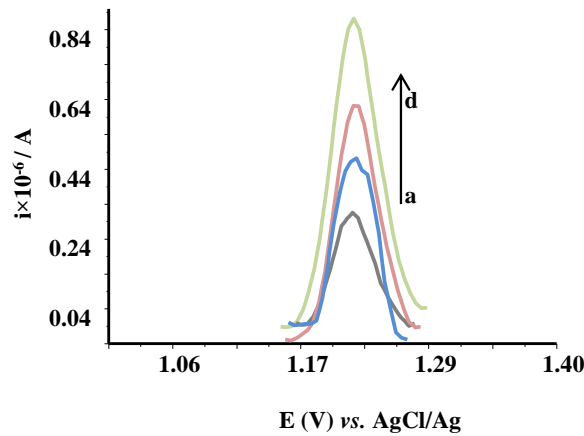


Figura 3.28: VOQ do efeito protetor conferido pelo Aca Neste VOQ é possível observar-se um aumento da i_p da dA_{20} com o aumento da concentração de Aca. De (a) a (d) estão representadas as diferentes concentrações de Aca. Assim, (a) 0,1mg/L, (b) 0,6mg/L, (c) 0,8mg/L, e (d) 0,9mg/L.

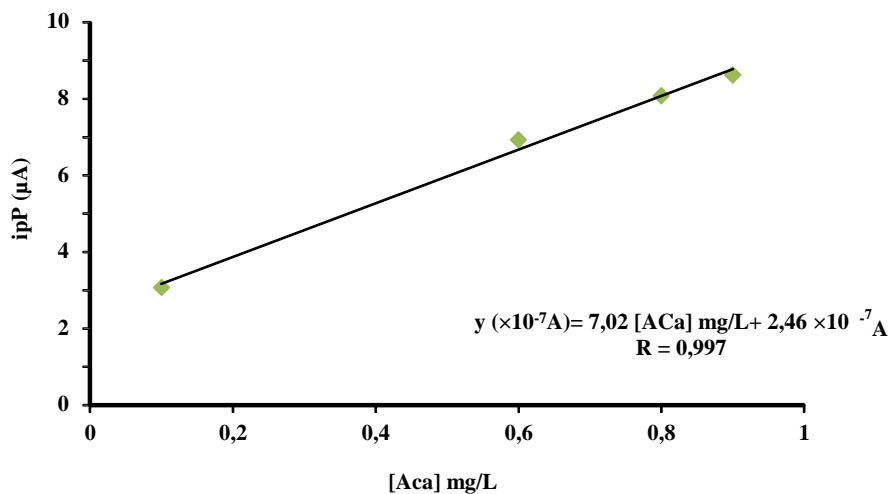


Figura 3.29: Curva de calibração do Aca.

O VOQ apresentado na Figura 3.32 representa os resultados experimentais obtidos quando se colocou o dA_{20} em contacto com o radical hidroxilo e quando se colocou o dA_{20} em contacto com o Aca e o radical hidroxilo. Neste VOQ é possível verificar que o Aca apresenta propriedades antioxidantes, pois a i_pD do dA_{20} (a) é inferior a i_p após proteção conferida pelo Aca (b).

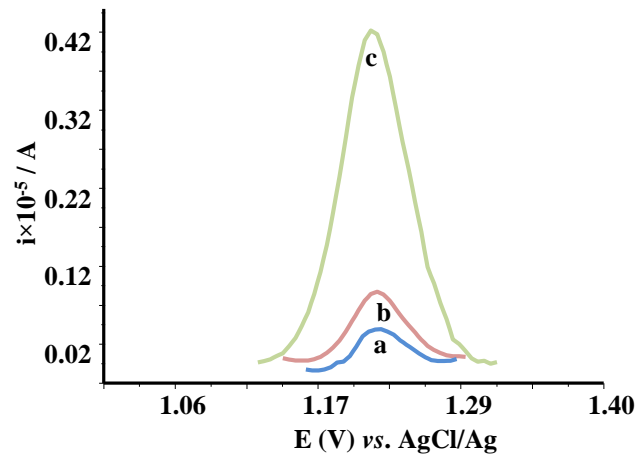


Figura 3.30: VOQ representativo do dano oxidativo e respetiva proteção conferida pelo Aca. Neste VOQ é possível observar-se a i_pB da dA_{20} intacta (c), i_p da dA_{20} após o dano oxidativo (a) e i_p da dA_{20} após proteção conferida pelo Aca.

Antioxidante: Ácido Cumárico

O Acu, tal como Aca, pertence à família dos ácidos hidrocínâmicos e pode ser encontrado em fruta (Terpinc *et al.*, 2011).

A influência que a presença de Acu no meio reacional apresenta na proteção do dA_{20} -EPC encontra-se descrita na Tabela 3.10. O efeito protetor promovido pelo Acu começou-se a sentir a partir da concentração de 0,40 mg/L de Acu, apresentando capacidade de proteção máxima quando se usou uma concentração de 1,00 mg/L de Acu.

Tabela 3.10: Dados obtidos quando se utilizou como antioxidante o Acu.

[Acu] (mg/L)	i_pP médio (μA)	Desvio padrão (μA)	Erro relativo (%)
0,00	0,28	----	----
0,20	0,28	0,01	3,57
0,40	0,55	0,01	1,81
0,50	0,85	0,11	1,17
0,80	1,18	0,05	9,32
1,00	1,47	0,12	8,16

A Figura 3.33 apresenta os voltamogramas deste estudo, estando a curva de calibração apresentada na Figura 3.34.

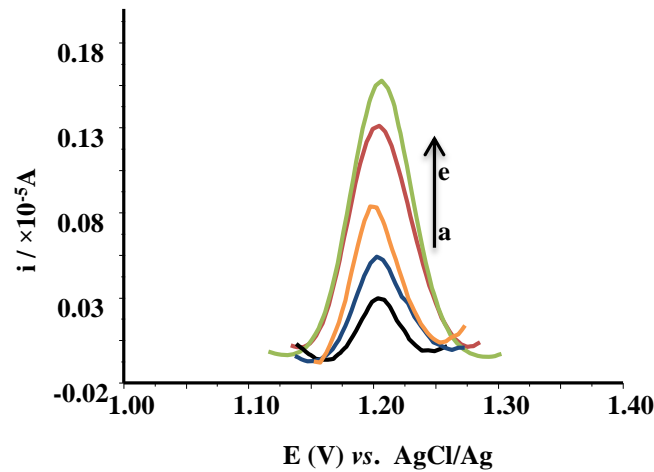


Figura 3.31: VOQ do efeito protetor conferido pelo Acu. Neste VOQ é possível observar-se um aumento da i_p da dA_{20} com o aumento da concentração de Acu. De (a) a (e) estão representadas as diferentes concentrações de Acu. Assim, (a) 0,2mg/L, (b) 0,4mg/L, (c) 0,5mg/L, (d) 0,8mg/L (e) 1mg/L.

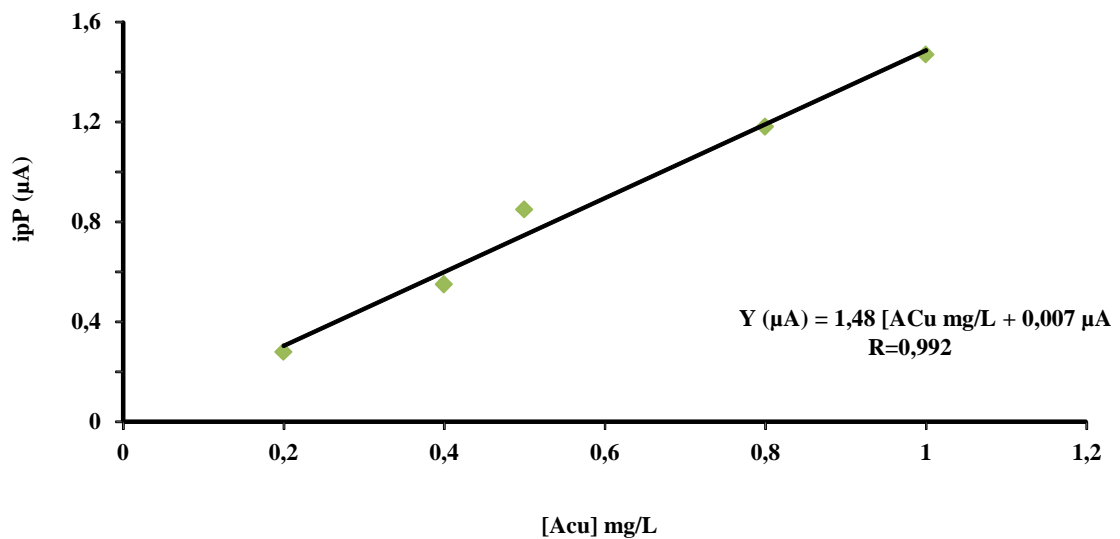


Figura 3.32: Curva de calibração do ácido cumárico.

O efeito protetor do Acu está evidenciado na Figura 3.35. Nesta figura é possível identificar-se três curvas com i_p diferentes, (a), (b) e (c), que correspondem a i_{pD} do dA_{20} , i_p da dA_{20} após proteção conferida pelo Acu e a i_{pB} . A i_p da dA_{20} após proteção conferida pelo Acu representa a curva intermédia, o que significa que é superior a i_{pD} mas inferior a i_{pB} , logo este ácido apresenta propriedades antioxidantes.

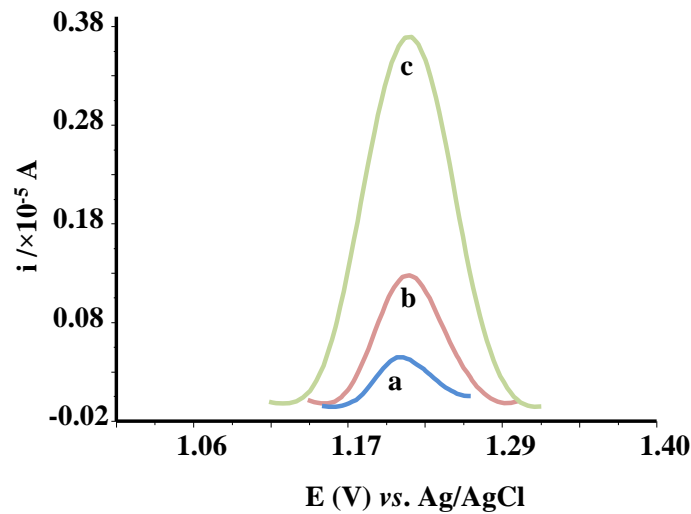


Figura 3.33: VOQ representativo do dano oxidativo e respetiva proteção conferida pelo Acu. Neste VOQ é possível observar-se a i_p da DA_{20} intacta (c), i_p da DA_{20} após o dano oxidativo (a) e i_p da DA_{20} após proteção conferida pelo Acu.

3.1.7. Atividade da Enzima

A enzima lacase (EC-1.10.3.2) é uma oxidase que contém átomos de cobre. Esta enzima pode ser encontrada em plantas, fungos e microrganismos. A lacase cataliza uma grande variedade de substratos orgânicos e inorgânicos, tais como os mono- di- e polifenóis, aminofenóis, aminas aromáticas e o ascorbato. Nesta catálise o oxigénio é convertido em água ocorrendo a libertação de 4 eletrões (Figura 3.36) (Fernández e Sanroman, 2012).

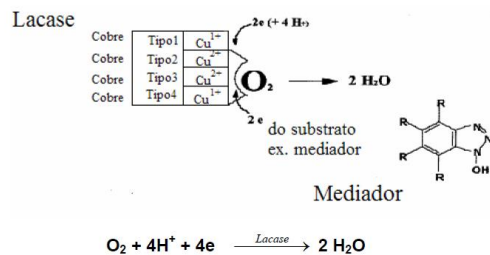


Figura 3.34: Esquema de reação da lacase com um substrato (Adaptado de Call e Muck, 1997).

Os resultados experimentais da atividade da lacase estão demonstrados na Figura 3.37. Através da análise desta figura é possível verificar que a enzima apresenta atividade enzimática.

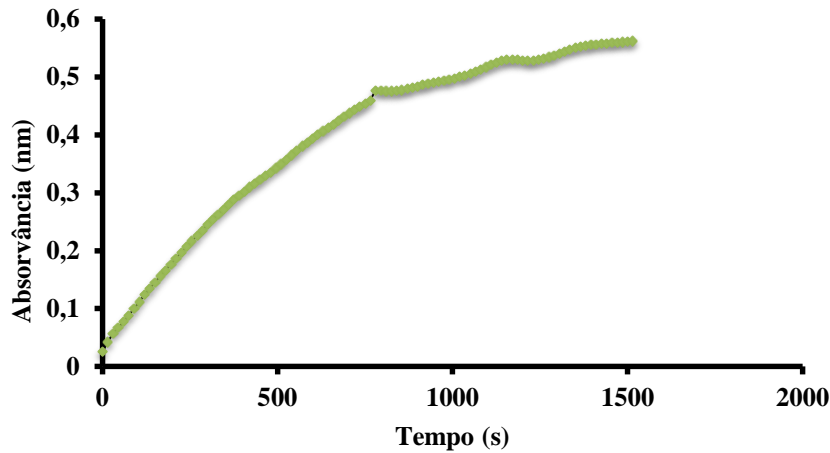


Figura 3.35: Absorvância (nm).

3.1.8. Comportamento do AG na presença da lacase

Na Tabela 3.11 estão apresentados os resultados obtidos quando se utilizou como antioxidante o AG e a enzima lacase. Neste estudo utilizaram-se concentrações crescentes de AG que variou entre 5,0 e 20,0 mg/L e uma concentração fixa da enzima lacase de $1,6 \times 10^{-5}$ mg/mL. Conforme se pode verificar (Tabela 3.11) à medida que se aumentou a concentração do AG na presença da enzima também aumentou a i_p do dA_{20} -EPC.

Tabela 3.11: Resultados experimentais do comportamento do AG na presença da lacase.

[AG] mg/L	i_p médio ($\times 10^{-7}$ A)	Desvio Padrão (μ A)	Erro Relativo (%)
5	3,40	0,01	3,15
8	4,00	0,002	0,55
10	5,00	0,04	8,62
15	6,70	0,02	2,63
20	8,70	0,04	4,13

Pela análise dos resultados experimentais obtidos (Tabela 3.11) e comparando as intensidades de corrente com os resultados obtidos quando se usou somente o AG (ausência de lacase) verifica-se que quando existe lacase no sistema reacional ocorre uma diminuição da i_p da dA_{20} . Tal facto pode ser explicado devido a esta enzima ter a capacidade de catalisar/oxidar compostos fenólicos e o AG neste caso corresponder ao substrato desta enzima. O que está demonstrado é que há uma competição entre a enzima e o AG, verificando-se uma ligeira diminuição do efeito protetor conferido pelo ácido gálico na presença desta enzima.

Na Figura 3.38 encontra-se representada a relação linear entre o aumento da concentração de AG e o aumento da i_p do dA_{20} .

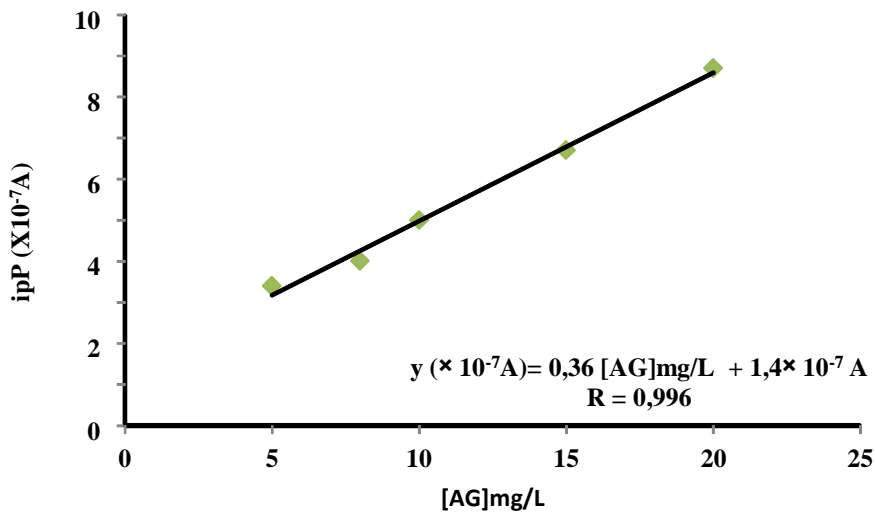


Figura 3.36: Curva de calibração do AG na presença da lacase.

Na Figura 3.39 é possível visualizar-se um VOQ da oxidação dA_{20} após imersão do dA_{20} -EPC num reator contendo concentrações crescentes de AG, enzima lacase e radical hidroxilo.

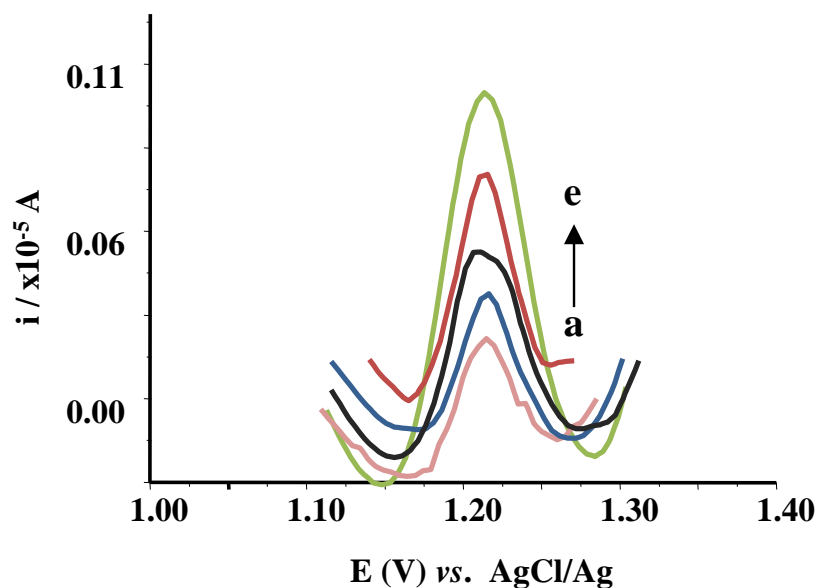


Figura 3.37: VOQ do dA₂₀-EPC após ensaio de proteção ao dano oxidativo na presença de lacase e concentrações crescentes de AG: (a) 5mg/L, (b) 8mg/L, (c) 10mg/L (d) 15mg/L e (e) 20mg/L.

3.1.9. Comportamento eletroquímico-Amostra real na presença do AG

Os resultados dos diversos testes efetuados com a amostra alimentar encontram-se presentes na Tabela 3.12 e na Figura 3.40.

Tabela 3.12:Ensaio Experimentais (Amostra real-AG): Concentração da enzima $1,6 \times 10^{-5}$ mg/mL, tempo de incubação 30 s, Concentração do AG de 5 mg/L, proporção Fe²⁺, EDTA e H₂O₂ de 1:2:40.

Ensaio Experimentais	Média $i_{pP} (\times 10^{-7} A)$	Desvio Padrão (μA)	Erro relativo (%)
Amostra real (bebida) + radical HO•	6,07	0,05	8,39
Amostra+ [AG] + radical HO•	7,09	0,07	9,57
Amostra + Lacase	4,43	0,03	7,19
Amostra + Lacase +[AG]	7,43	0,02	2,57
Amostra + Lacase + radical HO•	10,5	0,06	5,39
Amostra +Lacase+ [AG] + radical HO•	1,58	0,01	4,04

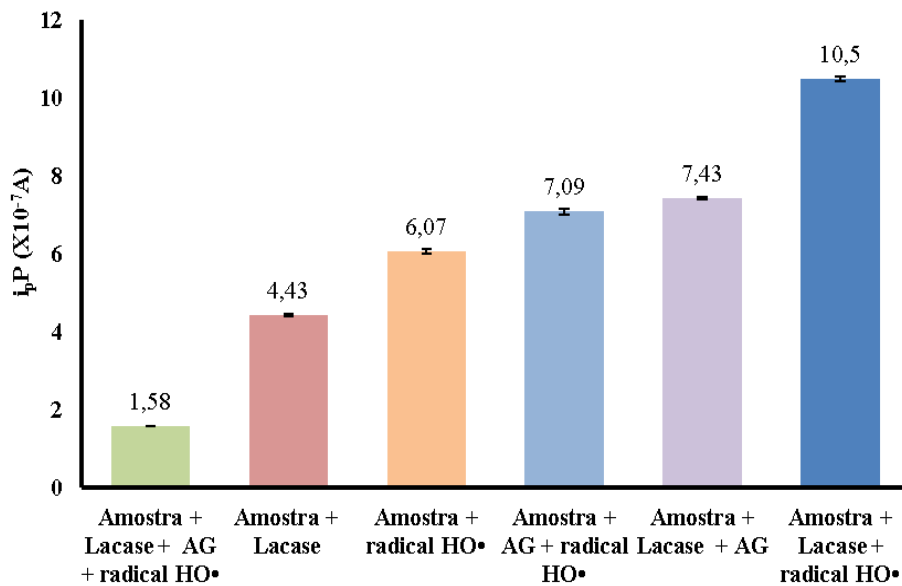


Figura 3.38: Resultados dos Ensaio Experimentais (Amostra real-AG): Concentração da enzima $1,6 \times 10^{-5}$ mg/mL, tempo de incubação 30s, Concentração do AG de 5mg/L, proporção Fe^{2+} , EDTA e H_2O_2 de 1:2:40.

A lacase oxida substratos através da remoção de elétrons durante um determinado período de tempo e dá origem a radicais livres que podem ser polimerizados. Num estudo realizado por Francisco Guillén et.,al, em 2000 foi comprovado que as reações catalisadas pela lacase podem dar origem à formação do radical hidroxilo. Como é possível concluir pela análise da Tabela 3.12 e pela Figura 3.40, esta enzima oxida compostos fenólicos e o AG é um composto fenólico, logo quando a enzima se encontra presente, este sofre oxidação, deixando de ocorrer o efeito protetor conferido por este ácido e ainda ocorre uma intensificação do dano oxidativo na dA_{20} .

Quanto a presença da amostra de água comercial de sabor a laranja é possível afirmar que esta também é rica em compostos fenólicos e neste caso este efeito é demonstrado neste trabalho, pois quando esta está presente e a lacase está presente a intensidade de pico é inferior à intensidade de pico obtida aquando a presença da amostra e do radical hidroxilo, concluindo-se assim que a lacase em contacto com a água aromatizada de sabor a laranja origina radicais livres.

Na ausência desta enzima é verificado um efeito protetor superior quando o AG e a amostra estão presentes em comparação com o efeito protetor verificado apenas na presença da amostra e do radical hidroxilo, pois quer a água aromatizada quer o AG

possuem propriedades antioxidantes. Quando a amostra, a lacase e o radical hidroxilo estão presentes observa-se um efeito protetor elevado.

3.1.10. Comportamento eletroquímico-Amostra real na presença do AA

Os resultados dos diversos testes efetuados com a amostra real na presença do AA encontram-se presentes na Tabela 3.13.

Tabela 3.13: Ensaios Experimentais (Amostra real-AA): Concentração da enzima $1,6 \times 10^{-5}$ mg/mL, tempo de incubação 30s, Concentração do AA de 1 mg/L, proporção Fe^{2+} : EDTA e H_2O_2 de 1:2:40.

Ensaios Experimentais	Média i_{pP} ($\times 10^{-7}A$)	Desvio padrão (μA)	Erro relativo (%)
Amostra real (bebida) + radical HO^{\bullet}	4,00	0,02	6,19
Amostra+ AA + radical HO^{\bullet}	5,02	0,01	2,25
Amostra + Lacase	4,43	0,03	7,19
Amostra + Lacase + AA	4,92	0,02	4,02
Amostra + Lacase + radical HO^{\bullet}	7,27	0,03	3,7
Amostra +Lacase+ AA + radical HO^{\bullet}	3,83	0,03	8,32

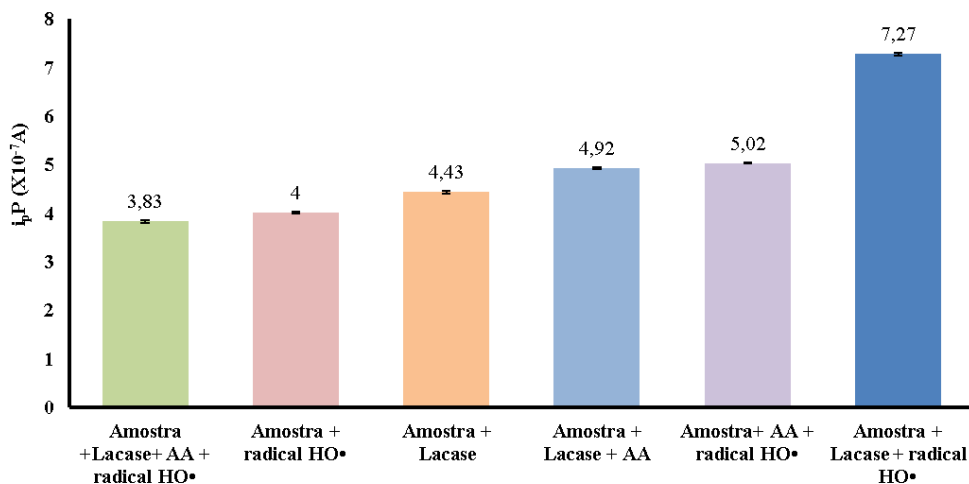


Figura 3.39: Resultados dos ensaios experimentais (Amostra real-AA): Concentração da enzima $1,6 \times 10^{-5}$ mg/mL, tempo de incubação 30 s, Concentração do AA de 1 mg/L, proporção Fe^{2+} , EDTA e H_2O_2 de 1:2:40.

Através da Figura 3.41 e da Tabela 3.13 é possível observar-se o comportamento da amostra real em diversos ensaios experimentais. Neste caso, é possível concluir que na presença da amostra, da lacase, do AA e do radical hidroxilo já se verifica uma ligeira proteção conferida à dA_{20} pois a i_p da dA_{20} é superior à i_p desta quando estava em contato apenas com o AA ($2,7 \times 10^{-7}A$). É de salientar que com a concentração de AA de 1mg/L não se verificava proteção conferida por este ácido, no entanto, com a mesma concentração de AA mas na presença da lacase e do radical hidroxilo já se identifica uma ligeira proteção ($3,83 \times 10^{-7}A$). Neste caso, como o AA não é um ácido fenólico, a lacase já não possui capacidade de o oxidar e neste caso é responsável pelo aumento da proteção conferida.

Quanto aos estudos realizados na presença da amostra real e do radical hidroxilo é verificado que a amostra real por si só têm propriedades antioxidantes pois protege o dA_{20} dos danos oxidativos causados pelo radical hidroxilo.

Quando o radical hidroxilo, responsável pelo dano oxidativo e a água aromatizada estão presentes os resultados experimentais comprovaram a forte capacidade antioxidante da amostra real na presença do radical livre. Este poder antioxidante é ainda reforçado quando estão presentes em simultâneo a amostra real e o AA que possui também capacidades antioxidantes, como já vem sendo demonstrado ao longo deste trabalho.

3.1.11. Capacidade antioxidante total

A CAT da amostra real pode ser expressa em concentração (mg/L) do antioxidante em estudo. Assim sendo, como é possível visualizar-se na figura 3.42, a CAT da amostra pode ser expressa em 7,63mg/L de AG; em 4,96mg/L de AA, em 0,51mg/L de Aca e em 0,40mg/L de Acu. Estas concentrações encontram-se na gama de concentrações estudada para cada um dos ácidos.

Quanto aos estudos da amostra e da enzima, apenas foi realizada uma curva de calibração para o AG, sendo que a CAT deste na presença da lacase é de 8,6mg/L. Esta concentração encontra-se na gama de concentrações estudadas para o AG, que variou entre 5 e 20 mg/L.

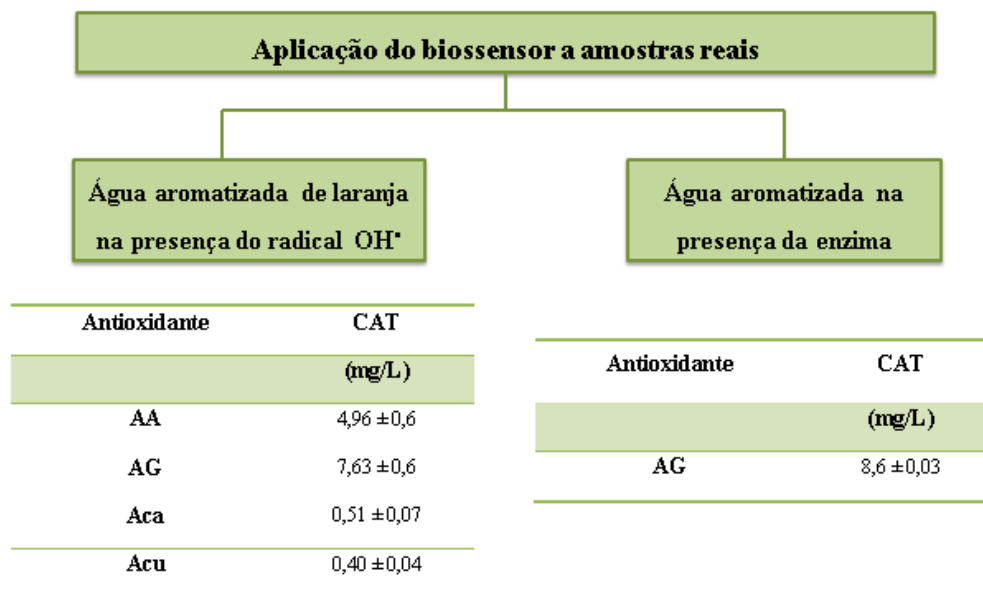


Figura 3.40: Capacidade antioxidante total.

CONCLUSÃO

Neste trabalho pretendeu-se desenvolver biossensores para a determinação da capacidade antioxidante total de bebidas, com o objetivo de se testar a possibilidade de se utilizar biossensores para monitorizar a capacidade antioxidante total de bebidas.

Assim, ao longo do trabalho foram realizados diversos testes com o objetivo de otimizar as condições experimentais para que a construção do biossensor fosse possível.

A etapa de eletroimobilização da adenina e adsorção física da dA_{20} no EPC revelou ser uma etapa fundamental para a realização deste trabalho, pois uma incorreta imobilização corresponde à não deteção da intensidade de pico máxima de adenina/ dA_{20} e compromete todos os procedimentos experimentais a serem realizados.

Especificamente neste trabalho foi possível verificar resultados mais uniformes quando se utiliza a dA_{20} pois são eliminadas duas etapas (condicionamento e eletrodeposição) que podiam estar na origem da irreprodutibilidade apresentada pela adenina. Quer com a adenina, quer com o dA_{20} é possível comprovar-se a existência de um pico de oxidação bem definido da adenina.

Para o estudo do dano oxidativo depois de efetuados diversos testes, variando o tempo de incubação e a concentração de Fe (II) a utilizar, concluiu-se que a concentração de Fe (II) a utilizar seria de $1\mu\text{mol/L}$ e o tempo de incubação seria de 30s. Este tempo de incubação foi escolhido tendo em conta o compromisso entre a existência de dano oxidativo sem dano total do dA_{20} . O dano oxidativo foi demonstrado através de uma redução de intensidade de pico da adenina/ dA_{20} quando comparado com a intensidade de pico máxima verificada na ausência de dano oxidativo.

Os restantes estudos de proteção conferidos pelos ácidos fenólicos e pela amostra biológica foram testados apenas como o dA_{20} em que foi possível demonstrar o efeito protetor conferido pelos antioxidantes. Para tal foram estudados quatro ácidos com propriedades antioxidantes, o AA, o AG, o Acu e o Aca que conferiram proteção ao dA_{20} .

Quanto aos estudos realizados com a lacase, verificou-se um efeito competitivo entre a lacase e o AG, pelo que esta não traz grandes vantagens a este biossensor. A amostra biológica, água do Luso com sabor a Laranja, foi estudada no sentido de se avaliar a capacidade antioxidante total. Pode-se concluir que esta apresenta uma elevada capacidade antioxidante, conseguindo proteger a dA_{20} dos efeitos negativos do radical hidroxilo. Este facto é provado através da comparação da intensidade do pico quando

ocorre o dano oxidativo, que é menor do que a intensidade de pico detetada na presença do radical hidroxilo e da amostra real. Foram realizados estudos em que se encontrava presente a amostra real, o radical hidroxilo e o AA /AG. Estes estudos revelam que a proteção é ainda mais intensificada.

BIBLIOGRAFIA

Abbaspour A, Mehrgardi MA, Kia R. Electrocatalytic oxidation of guanine and ss-DNA at a cobalt (II) phthalocyanine modified carbon paste electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2004; 568: p. 261-266.

Alvarez PdIS, Castanon MJL, Ordieres AJM, Blanco PT. Current strategies for electrochemical detection of DNA with Solid electrodes. 2004..

Alvarez PdIS, Castanon MJL, Ordieres AJM. Electrochemistry of nucleic acids as solid electrodes and its applications. 2004..

Andreasen MF, Landbo AK, Christensen LP, Å. H, Meyer AS. Antioxidant effects of phenolic rye (*Secale cereale* L.) extracts, monomeric hydroxycinnamates, and ferulic acid dehydrodimers on human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001; 49, n°8: p. 4090-4096.

Araya SK, Datta M, Malhotra BD. Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2008; 23: p. 1083-1100.

Aruoma OI. Free Radicals, Oxidative Stress, and Antioxidants in Human Health and Disease. *JAOCS*. 1998; 75: p. 199-212.

Balasundram N, Sundram K, Samman S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 2006; 99: p. 191-203.

Bard AJ, Faulkner LR. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*. In. New York: John Wiley & Sons, INC; 2001.

Barroso MF, Alvarez NdIS, Matos CD, Oliveira MBPP. Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation: Electrochemical (bio)sensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2011; 30: p. 1-12.

Barroso MF, Matos CD, M.B.P.P O. Electrochemical evaluation of total antioxidant capacity of beverages using a purine-biosensor. *Food Chemistry*. 2012; 131: p. 1055-1062.

Barroso MF, Matos CD, Oliveira MBPP. Evaluation of the total antioxidant capacity of flavored water and electrochemical purine damage by sulfate radicals using a purine-based sensor. *Electrochimica Acta* 56 (2011) 8954– 8961. 2011; 56: p. 8954-8961.

Barroso MFea. DNA-based biosensor for the electrocatalytic determination of antioxidant capacity in beverages. *Biosensors and bioelectronics*. 2011a; 26: p. 2396-2401.

Bianchi MdLP, Antunes LMG. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. *Rev. Nutr., Campinas*. 1999; 12(2): p. 123-130.

Brett AMO, Diculescu V, Piedade JAP. Electrochemical oxidation mechanism of guanine and adenine using a glassy carbon microelectrode. 2002..

Brum EB. Antioxidante Natural de Marcela (*Achyrocline Satureioides*) e de Erva Mate (*Ilex Paraguariensis*) na Elaboração de Lingüiça Toscana. 2009. Dissertação.

Cadogan JIG. Principles of Free Radicals Chemistry. *Chemical Society Reviews*. 1973.

Caetano ACS. Potencial Antioxidante de Extratos de Resíduos de Acerolas (*Malpighia Emarginata* D.C) em diferentes Sistemas e Modelos e na estabilidade oxidativa do Óleo de Soja. 2009. Dissertação.

Calil SS, Silva PR. Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. 2011..

Call HP, Mucke I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (*Lignozym*®-process). *Journal of Biotechnology*. 1997; 53: p. 163-202.

Chambers JP, et al.. Biosensor Recognition Elements. *Curr.Issues Mol.Biol*. 2008; 10: p. 1-12.

Chirinos R, Galarza JP, Indira B, Pedreschi R, Campos D. Antioxidant Compounds and antioxidant capacity of Peruvian camu camu (*Myrciaria duvia* (H.B.K) McVaugh) fruit at different maturity stages. *Food Chemistry*. 2010; 120: p. 1019-1024.

Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates: nature, occurrence and dietary burden. 1999; 79: p. 362-372.

Cohn CA, Fisher SC, J BB, Schoonen MA. Adenine oxidation by pyrite-generated hydroxyl radicals. *Geochemical Transactions*. 2010; 11:2.

Crick , Watson. Discovery of DNA Structure and Function: Watson and Crick. Nature Education. 2008; 1(1).

Crick FHC, Watson JD. Molecular Structure of nucleic acids:A structure for deoxiribose nucleic acid. 1953..

D'Archivio M, C F, R DB, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. Ann Ist Super Sanita. 2007; 43: p. 61-348.

Davies K. Oxidative stress: the paradox aerobic life. Biochem Soc symposium. 1994; 61: p. 1-31.

Desimoni E, Brunetti B, Cosoio MS. Determination of patent blue V (E131) at a Nafion-modified glassy carbon electrode. Electroanalysis. 2006; 18: p. 231.

Dryhurst G, Elving PJ. Electrochemical Oxidation of Adenine: Reaction Products and Mechanisms. J. Electrochem. Soc. 1968; 115: p. 1014-1020.

Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. Biochimica et Biophysica Acta. 2012; 1826: p. 443-457.

Ferk F, Chakraborty A, Jager W, Kundi M, Bilcher J, Misík M, et al. Potent protection of gallic acid against DNA oxidatio: Results of human and animal experiments. Mutation Research. 2011; 715: p. 61-71.

Fernández MF, Sanromán MÁ, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase. Biotechnology Advances. 2012.

Ferreira I, Abreu RMV. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. Bioanálise / Ano IV N°2. 2007a Julho/Dezembro.

Fojta M. Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. 2002..

Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? Ann N Y Acad Sci. 1999; 893: p. 13-18.

Girousi S, Skeva E. A study of the antioxidative behavior of phenolic acids, in aqueous herb extracts, usind a dsDNA biosensor. Central European Journal of Chemistry. 2012; 10: p. 1280-1289.

Gomberg M. An incidence of Trivalent Carbon Trimethyl-phenyl. J.Am.Chem. 1900; 22: p. 757-771.

Gonçalves LM, McAuley CB, Barros AA, Compton RG. Electrochemical Oxidation of Adenine: A Mixed Adsorption and Diffusion Response on an Edge-Plane Pyrolytic Graphite Electrode. *J. Phys. Chem. C.* 2010; 114: p. 14213–14219.

Gulaboski R, Pereira CM. Electroanalytical Techniques and Instrumentation in Food Analysis. In Vamoudavally.; 2008.

Gulcin I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). *Toxicology.* 2006; 217: p. 213-220.

Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS LETTERS.* 1991 Abril 9; 281: p. 9-19.

Halliwell B, Gutteridge JMC. "Free Radicals in Biology and Medicine". 4th ed. New York,USA; 2007.

Hamid AA, Aiyelaagbe OO, Usman LA, Ameen OM, Lawal A. Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *Afr. J. Pure Appl. Chem.* 2010 Agosto; Vol. 4(8): p. 142-151.

Herrmann K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Crit.Rev. Food Sci.Nutr.* 1989; 28: p. 315-347.

Hey DH, W.A. W. Waters, Some Organic Reactions Involving the Occurrence of Free Radicals in Solution. *Chem.Rev.* 1973; 21: p. 169-208.

Hocebar SB, Ogorevc. Preparation and characterization of carbon paste micro-electrode based on carbon nano-particles. *Talanta.* 2007; 74: p. 405-411.

Kamel AH, Moreira FTC, Matos CD, Sales MGF. Electrochemical determination of antioxidant capacities in flavored waters by guanine and adenine biosensors. *Biosensors and Bioelectronics.* 2008 ; 24: p. 591–599.

Kuralay F, Erdem A, Serdar A, Haluk Ö. Electrochemical characterization of redox polymer modified electrode developed for monitoring of adenine. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2013; 105: p. 1-6.

Lee JO, et al.. Aptamersas Molecular Recognition Elements for Electrical Nanobiosensors. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 390: p. 1023-1032.

Lee TMH. Over-the Counter Biosensors: Past, Present and Future. *Sensors*. 2008a Setembro; 8: p. 5535-5559.

Litescu SC, AV S, Diaconu E, Tache A, Radu GLR. Biosensors Applications on Assessment of Reactive Oxygen Species and Antioxidants. *Environmental Biosensors*. 2011.

Luque M, Perez E, Rios A, Valcárcel M. Supported liquid membranes for the determination of vanillin in food samples with amperometric detection. *Anal.Chim Acta*. 2000 Abril; 410: p. 127-134.

Machlin LJ, A. B. Free radicals tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *FASEB*. 1987; 1: p. 441.

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jiménez L. Polyphenols: food Sources and bioavailability. *Am.J Clin Nutr*. 2004; 79 (5): p. 47-727.

Mehrvar M, Abdi M. Recent Developments, Characterisitcs, and Potencial Applications of Electrochemical Biosensors. *Analytical Sciences*. 2004 Agosto; 20: p. 1113-1126.

Mehrvar M, et al.. Fiber-Optic Biosensors-Trends and Advances. *Analytical Sciences*. 2000 Julho; 16: p. 677-692.

Mello LD, Hernandez S, Marraza G, Marco M, Kubota LT. Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 2006; 21: p. 1374-1382.

Mello LD, Kubota LT. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. *Talanta*. 2007; 72: p. 335-348.

Mo Y. Anovel theory: biologic process mostly involved two types of mediators, namely general and specific mediators. Endogenous small radicals such as superoxid and nitric oxide may play a role of general mediators in biological process. *J Org Chem*. 2005; 70: p. 5103-5110.

Monošík R, Stred'anský M, t Šturdík E. Biosensors — classification, characterization. *Acta Chimica Slovaca*. 2012; 5,nº1: p. 109-120.

Nossol E, Zarbin AJG. Carbon paste electrodes made from novel carbonaceous materials: Preparation and electrochemical characterization. *Electrochimica Acta*. 2008; 54: p. 582-589.

Palecek E. Past,present and future of nucleic acids electrochemistry. 2002 Abril 1..

Pathak P, Katiyar VK, Giri S. Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. *AZojono Journal of Nanotechnology online*. 2007 Setembro 3; 3.

Perron NR, Brumaghim JL. A Review of the Antioxidant Mechanisms of Polyphenol. *Cell Biochem Biophys*. 2009; 53: p. 75-100.

Pierce BA. DNA: A Natureza Química do Gene. In Pierce BA. GENÉTICA - UM ENFOQUE CONCEITUAL. 1st ed.: GUANABARA KOOGAN (PROFISSIONAIS); 2004. p. 260-276.

Pisoschi AM, Negulescu GP. Methods for Total Antioxidant Activity Determination: A Review. *Biochem & Anal Biochem*. 2011; 1, Issue 1.

Qiong L, et al.. Determination of trace aluminium in foods by stripping voltammetry. *Food chem*. 2006;; p. 97-176.

Ravera M, Bagni G, Mascini M, Osella D. DNA-Metallodrugs Interations Signaled by Eletrochemical Biosensors:An Overview. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 2007 Setembro 19; 2007.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996; 21.

Rover Junior L, Hoehr NF, Vellasco AP. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do stress oxidativo. *Química Nova*. 2001; 24: p. 112-119.

Salgado AM. Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa,etanol e substrato por modelo. 2001..

Sanchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J.Sci. Food Agric*. 1998; 76: p. 270-276.

Serban S, Murr NE. Synergetic effect for NADH oxidation of ferrocene and zeolite in modified carbon paste electrodes New approach for dehydrogenase based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*. 2004; 20: p. 161-166.

Silva DCF, Nascimento MA, Moreira AVB. Verificação da presença de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes em amostras de café. *Braz. Soc. Food Nutr*. 2007; 32,nº1: p. 48-58.

Silva JG. DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODOS VOLTAMÉTRICOS DE ANÁLISE PARA A DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM AMOSTRAS DE SOJA. 2012. Tese de douturamento.

Simón BP, M. C, M. C, Blanchard CC. Review: Electrochemical biosensors as a tool for antioxidant capacity assessment. *Sensors and Actuators B*. 2008; 129: p. 459-466.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principios de Análise Instrumental*. In Bookmann. 7th ed. Porto Alegre; 2009.

Song S, Xu H, Fan C. Potencial Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions. *International Journal of Nanomedicine*. 2006; 1,nº4: p. 433-440.

Song YZZJFZFXYYXJM. Study on the oxidation form of adenine in phosphate buffer solution. 2010..

Sousa CM, Silva HR, Vieira-JR MV, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante em cinco plantas medicinais. *Química Nova*. 2007; 30,nº2: p. 351-355.

Souza D, Codognoto L, Malagutti AR, Toledo RA, Pedrosa VA, Oliveira RTS. VOLTAMETRIA DE ONDA QUADRADA. SEGUNDA PARTE: APLICAÇÕES. *Química Nova*. 2004; 27, Nº5: p. 790-797.

Souza D, Machado SAS, Avaca LA. Voltametria de Onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. *Química nova*. 2003; 26, nº1: p. 81-89.

Sroka Z, Cisowski W. Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids. *Food Chemistry Toxicology*. 2003; 41: p. 753-758.

Sucupira NR, Silva AB, Pereira G, Costa JN. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde. 2012; 14 (4): p. 9-263.

Terpinc P, Polak T, Šegatin N, Hanzlowsky A, Ulrich NP, Abramovic H. Antioxidant properties of 4-vinyl derivatives of hydroxycinnamic acids. Food Chemistry. 2011; 128: p. 62-69.

Thévenot DR, al. e. Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification. Biosensors & Bioelectronics. 2001; 16: p. 121-131.

Tomschik M, Jelen F, Tmkova HL, Nielsen PE, Palecek E. Reduction and oxidation of peptide nucleic acid and DNA at mercury and carbon electrodes. J.Electroanal.Chem. 1999; 476: p. 71-80.

ValKo M, Leibfritz D, Cronin MT, Mazur M. Free radicals and antioxidants in normal physiological funtions and human disease. Biochem Cell Biol. 2007; 39: p. 44-84.

Verma S, Singh A, Mishara A. Gallic acid: Molecular rival of cancer. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2013; 35: p. 473-485.

Wang G, et al.. A living Cell Quartz Crystal Microbalance Biosensor for Continuous Monitoring of Cytotoxic Responses of Macrophages to Single-Walled Carbon Nanotubes. Particle and Fibre Toxicology. 2011; 8,nº4.

Wang Y, et al.. Electrochemical Sensors for Clinic Analysis. Sensors. 2008 Março; 8: p. 2043-2081.

Weiss J. Investigations of the Radical HO₂ in solution. Trans.Faraday Soc. 1935; 31: p. 668-681.

Yantasee W, et al.. Electrochemical Sensors for Detection of Lead and Other Toxic Heavy Metals: The Next Generation of Personal Expure. Biomonitor. Environmental Health Perspectives. 2007 Dezembro; 115: p. 1683-1690.

