



Estudo eletroquímico do dano oxidativo promovido por RNS e PAH e o efeito protetor de antioxidantes no ADN

DIANA ISABEL CARVALHO DA CRUZ

Outubro de 2013

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DO PORTO

Estudo eletroquímico do dano oxidativo promovido por RNS e PAH e o efeito protetor de antioxidantes no ADN

RAMO DE TECNOLOGIAS DE PROTEÇÃO AMBIENTAL

Diana Cruz

25 de Outubro de 2013

ORIENTAÇÃO:

Doutor Abel Duarte

Doutora Fátima Barroso

Doutora Maria João Ramalhosa

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores. Ao Professor Doutor Abel Duarte, por me lembrar alguns conceitos esquecidos, à Doutora Fátima Barroso pelos novos conhecimentos que me transmitiu numa área que aprendi a gostar pela sua vontade de ensinar e me fez querer explorar muito mais e à Professora Doutora Maria João Ramalhosa pela sua palavra no momento certo e por não me deixar desanimar nas alturas menos boas.

À Professora Doutora Cristina Delerue-Matos, pelo voto de confiança e pelas simples palavras de encorajamento.

À Begoña pelos infundáveis conhecimentos, pela disponibilidade e simpatia mas, acima de tudo, por me ter acolhido como sua aluna de uma forma que eu nunca conseguirei agradecer.

À Doutora Rita Alves, pelas conversas e gargalhadas mas, essencialmente, pelos seus conhecimentos, pelo seu apoio quando necessitei e, também, pela sua amizade.

Ao Hélder da Silva, que me ajudou desde o primeiro momento e se tornou um bom e grande amigo.

Aos meus pais e família, pela força que sempre me deram para seguir as minhas ambições mas, principalmente ao meu irmão Zé, por acreditar mais em mim do que qualquer outra pessoa e pelas suas palavras de alento que me fizeram sempre querer alcançar mais e melhor.

Aos meus amigos pelos momentos que guardo de todos estes anos, pelo apoio e pela paciência.

Ao meu “irmão” Marco Eira, que certa altura me disse “E digam aos rapazes da cidade que por cima dos telhados dos cinemas existem estrelas a brilhar no céu” e me fez acreditar, nestes últimos meses, que sou capaz de fazer mais do que aquilo a que estou destinada, pelos desabafos e pela amizade que nunca vacilou em 8 anos.

E, ao ISEP, que em certos momentos foi a minha primeira casa.

RESUMO

No dia-a-dia, os organismos vivos estão sujeitos a vários tipos de agressões de origem endógena e exógena. A produção endógena exagerada de contaminantes que ocorre nos processos metabólicos dos seres vivos está intimamente associada ao aparecimento e desenvolvimento de várias patologias. Por outro lado, e devido às atividades antropogênicas, muitos contaminantes de origem ambiental e alimentar entram por via exógena no organismo dos seres vivos provocando igualmente danos a nível celular. De modo a protegerem-se dos efeitos pejorativos provocados por estes compostos, os organismos vivos desenvolveram mecanismos complexos de defesa antioxidante.

Este trabalho consistiu no estudo eletroquímico do dano oxidativo induzido por contaminantes (PAH (hidrocarbonetos aromáticos policíclicos), H_2O_2 , NO^* e $HClO$) e do efeito protetor, ao dano oxidativo, promovido por antioxidantes no material baseado no ADN recorrendo à utilização de um biossensor de bases púricas, adenina-EPC (elétrodo pasta de carbono) e dA_{20} -EPC, utilizando a voltametria de onda quadrada (VOQ) como técnica de deteção.

A aplicação da eletroquímica apresenta várias vantagens para a quantificação da capacidade antioxidante total (CAT) pois, permite a redução da quantidade de reagentes e amostra em análise, elimina a etapa de remoção de cor (a cor é um interferente nos métodos óticos) e não requer equipamentos dispendiosos.

Foram seguidas diferentes abordagens para a construção dos biossensores. A primeira consistiu na construção de um adenina-EPC em três etapas: i) condicionamento do EPC, ii) eletrodeposição da adenina no EPC e iii) leitura do sinal eletroquímico. Assim, foram otimizados diversos parâmetros: concentração de adenina (150,0 mg/L), potencial de condicionamento (E_c) (+ 1,80 V), potencial de deposição (E_d) (+ 0,40 V), tempo de condicionamento (t_c) (180 s) e tempo de deposição (t_d) (240 s).

Foi aplicado o adenina-EPC no estudo do dano oxidativo provocado por PAH (benzo (g,h,i) perileno) e constatou-se que era necessário transformar o benzo (g,h,i) perileno num radical para se possível observar danos oxidativos induzidos no biossensor.

A nova estratégia consistiu na construção de um dA₂₀-EPC, através da adsorção física de uma gota de dA₂₀ na superfície do EPC, com posterior secagem e leitura do sinal eletroquímico. Neste procedimento foi otimizada a concentração de dA₂₀ (100,0 mg/L).

O dano oxidativo provocado pelo H₂O₂, NO[•] e HClO foi estudado sobre o dA₂₀-EPC e verificou-se que os três contaminantes induziam dano oxidativo no dA₂₀-EPC.

Confirmou-se a capacidade do ácido ascórbico (AA) em proteger o dA₂₀-EPC do dano oxidativo induzido por H₂O₂ e NO[•].

O biossensor desenvolvido (dA₂₀-EPC) foi aplicado na avaliação da CAT de diferentes amostras reais (café, sumo de laranja e água aromatizada de laranja) usando-se como contaminantes o H₂O₂ e NO[•]. Todas as amostras analisadas apresentaram ter capacidade antioxidante.

Quando se usou o dA₂₀-EPC na presença de H₂O₂, verificou-se que as amostras de café apresentam valores mais elevados de CAT (1130-1488 mg AAE/L) do que as amostras de bebidas (110 mg AAE/L em água aromatizada e 775 mg AAE/L em sumo).

Os valores de CAT obtidos para amostras de sumo e água aromatizada na presença de NO[•] indicam que a amostra de sumo possui maior teor de CAT (526 mg AAE/L) conforme era esperado, do que a amostra de água aromatizada (172 mg AAE/L).

Palavras-Chave: Contaminantes, antioxidantes, dano oxidativo, CAT, biossensor, bases púricas, ADN.

Abstract

Living beings are exposed to several kinds of endogenous/exogenous aggressions throughout its life. The exaggerated endogenous production of contaminants that occur at metabolic processes of living beings it is deeply related with the development of various pathologies. On the other hand, because anthropogenic actions many of environmental and food contaminants find their way by exogenous processes to get in the living beings causing cellular damages.

This work consists in the electrochemical study of the effect of contaminants (PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons), H_2O_2 , NO^\bullet and HClO) and the protective effect, to the oxidative damage, caused by antioxidants in the material based on DNA through the use of a biosensor purine bases, adenine-CPE (carbon paste electrode) and dA_{20} -CPE, using square wave voltammetry (SWV) as a detection technique.

Using electrochemistry as quantitative method analysis is an advantage to the quantification of total antioxidant capacity (TAC). The consumption of samples/reagents is reduced, eliminates the step of removing the color and doesn't require expensive equipment.

Different approaches were followed for the construction of the biosensors. The first consisted in the construction of an adenine-CPE in three steps: i) conditioning of the CPE, ii) deposition of adenine in CPE and iii) measurement of the electrochemical signal. Thus, various parameters were optimized: concentration of adenine (150.0 mg/L) conditioning potential (E_c) (+ 1.80 V) deposition potential (E_d) (+ 0.40 V) conditioning time (t_c) (180 s) and deposition time (t_d) (240 s).

Adenine-CPE was applied in oxidative damage study induced by PAH (benzo (g,h,i) perylene). To induce oxidative damage in the biosensor it was necessary to convert benzo (g,h,i) perylene into a radical.

The new strategy was based in the assembly of a dA_{20} -CPE by a dA_{20} drop adsorption at the surface of CPE with further drying and electrochemical signal measurement. In this procedure was optimized the concentration of dA_{20} (100.0 mg / L).

Oxidative damage caused by H_2O_2 , NO^\bullet and HOCl was studied on the dA_{20} -CPE and it appeared that all three pollutants induced oxidative damage in dA_{20} -CPE.

It was confirmed the capacity of ascorbic acid (AA) on protecting the dA_{20} -CPE oxidative damage induced by H_2O_2 and NO^\bullet .

With the application of dA_{20} -CPE in the evaluation of TAC in various real samples (coffee, orange juice and orange flavored water) using as contaminants the H_2O_2 and NO^\bullet . All the samples analyzed have antioxidant capacity.

When dA_{20} -CPE was used in the presence of H_2O_2 , it was found that the coffee samples have higher levels of TAC (1130-1488 mg AAE / L) than the beverage samples (110 mg AAE/L on flavored water and 775 mg AAE/L juice).

TAC values obtained for samples of juice and flavored water in the presence of NO^\bullet indicate that the sample of juice has a higher content of TAC (526 mg AAE/L) as was expected, than the sample of flavored water (172 mg AAE/L).

Keywords: Contaminants, antioxidants, oxidative damage, TAC, biosensor, purine bases, DNA.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. Introdução..... | 1 |
| 1.1. Contaminantes endógenos..... | 2 |
| 1.1.1. ROS – Espécies reativas de oxigénio..... | 2 |
| 1.1.2. RNS – Espécies reativas de azoto | 3 |
| 1.2. Contaminantes exógenos..... | 4 |
| 1.3. Sistema de defesa antioxidante | 6 |
| 1.4. ADN | 8 |
| 1.4.1. Estrutura do ADN | 8 |
| 1.5. Metodologias analíticas..... | 10 |
| 1.5.1. Quantificação por cromatografia..... | 10 |
| 1.5.2. Quantificação da CAT | 12 |
| 1.5.2.1. Metodologias convencionais | 12 |
| 1.5.2.2. Métodos eletroquímicos | 14 |
| 1.5.2.2.1. Biossensor de bases púricas..... | 15 |
| 2. Parte experimental..... | 19 |
| 2.1. Material e equipamento..... | 19 |
| 2.2. Reagentes e preparação de soluções | 20 |
| 2.3. Construção do EPC..... | 20 |
| 2.4. Preparação de amostras | 21 |
| 2.4.1. Amostras de café..... | 21 |
| 2.4.2. Amostra de sumo e água aromatizada | 22 |
| 2.5. Procedimento experimental..... | 23 |
| 2.5.1. Imobilização da adenina e do dA ₂₀ ao EPC | 23 |
| 2.5.2. Dano oxidativo no material baseado no ADN | 25 |
| 2.5.2.1. Dano oxidativo provocado por PAH na adenina..... | 25 |
| 2.5.2.2. Dano oxidativo provocado por H ₂ O ₂ , NO [•] e HClO no dA ₂₀ | 26 |
| 2.5.3. Efeito protetor promovido por antioxidantes..... | 28 |
| 2.5.4. Amostras reais | 29 |
| 2.5.4.1. Amostras de café | 30 |

| | | |
|----------|---|----|
| 2.5.4.2. | Amostra de sumo e água aromatizada..... | 30 |
| 3. | Resultados e discussão | 33 |
| 3.1. | Construção do adenina-EPC..... | 33 |
| 3.1.1. | Comportamento eletroquímico do adenina-EPC..... | 33 |
| 3.1.2. | Otimização da concentração de adenina..... | 34 |
| 3.1.3. | Otimização da etapa de condicionamento e da etapa de deposição | 35 |
| 3.1.4. | Dano oxidativo induzido por PAH | 36 |
| 3.2. | Construção do dA ₂₀ -EPC..... | 38 |
| 3.2.1. | Otimização da concentração de dA ₂₀ | 38 |
| 3.2.2. | Dano oxidativo induzido pelo H ₂ O ₂ e efeito protetor promovido pelo AA..... | 40 |
| 3.2.2.1. | Aplicação do biossensor a amostras reais | 44 |
| 3.2.3. | Dano oxidativo induzido pelo NO [•] e efeito protetor promovido pelo AA | 46 |
| 3.2.3.1. | Aplicação do biossensor a amostras reais | 50 |
| 3.2.4. | Dano oxidativo induzido pelo HClO | 50 |
| 4. | Conclusões | 53 |
| 4.1. | Trabalhos futuros | 54 |
| | Bibliografia | 55 |
| | Anexos | 59 |
| A. | Fichas de segurança | 59 |
| B. | Parâmetros Eletroquímicos | 64 |
| C. | Registos experimentais | 64 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1: Diferentes origens de contaminantes (symmetrydirectbuy, 2013)..... | 1 |
| Figura 1.2: Sistema de defesa antioxidante (Barroso, et al., 2011b)..... | 7 |
| Figura 1.3: Estrutura de dupla hélice do ADN (Sinden, 1994)..... | 8 |
| Figura 1.4: Estruturas moleculares das bases de ADN e ARN. | 9 |
| Figura 1.5: Ligações glicosídicas estabelecidas entre os componentes individuais do ADN, açúcares, bases e grupos fosfato (Infoescola, 2013)..... | 9 |
| Figura 1.6: Reação ocorrida no teste do poder redutor do antioxidante (Prior, et al., 2005). | 13 |
| Figura 1.7: Reação ocorrida no método antirradicalar DPPH (Molyneux, 2004). | 13 |
| Figura 1.8: Estrutura química da adenina (Barroso, et al., 2011d)..... | 16 |
| Figura 1.9: Eletrodeposição da adenina sobre o EPC (Barroso, et al., 2011d). | 17 |
| Figura 1.10: i_p obtidos a partir da VOQ: a) leitura direta de adenina; b) exposição a um contaminante; c) efeito protetor promovido por um antioxidante (Barroso, et al., 2011d)..... | 18 |
| Figura 2.1: Construção do EPC..... | 21 |
| Figura 2.2: Esquema representativo de uma cadeia simples de adeninas..... | 24 |
| Figura 2.3: Esquema experimental de produção de NO^{\cdot} | 27 |
| Figura 3.1: Voltamograma típico obtido para o adenina-EPC em solução tampão PBS pH 7,4. 34 | |
| Figura 3.2: Variação da i_p em função da concentração de adenina-EPC. Os resultados são uma média de três ensaios independentes. | 34 |
| Figura 3.3: Otimização do potencial da etapa de condicionamento para as concentrações de adenina 150,0 mg/L e 200,0 mg/L. Os resultados são uma média de três ensaios independentes..... | 35 |
| Figura 3.4: Voltamograma típico obtido em solução tampão PBS pH 7,4: a) imobilização da adenina (i_p máxima), b) imersão do adenina-EPC numa solução de benzo (g,h,i) perileno 0,1 μ g/L durante 60 segundos..... | 37 |
| Figura 3.5: Variação da i_p de dA_{20} em função da concentração de dA_{20} . Os resultados são uma média de três ensaios independentes. | 39 |
| Figura 3.6: Voltamograma típico obtido para o dA_{20} -EPC em solução tampão PBS pH 7,4..... | 40 |
| Figura 3.7: Voltamograma típico obtido em solução tampão PBS pH 7,4: a) dA_{20} -EPC (i_p máxima), b) H_2O_2 25 μ M, c) H_2O_2 50 μ M e d) H_2O_2 75 μ M. | 41 |
| Figura 3.8: Voltamograma típico a) dA_{20} -EPC (i_p máxima), b) 5 s, c) 30 s e d) 60 s..... | 42 |
| Figura 3.9: Influência do tempo de incubação, a diferentes concentrações de H_2O_2 , na i_p do dA_{20} -EPC. Os resultados são uma média de três ensaios independentes..... | 42 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.10: Voltamograma típico obtido após imersão do dA ₂₀ -EPC em H ₂ O ₂ contendo uma solução de AA de concentração: a)1,0; b)5,0; c)10,0; d)15,0; e)20,0 mg/L..... | 43 |
| Figura 3.11: Curva de calibração para o AA. | 44 |
| Figura 3.12: Voltamograma típico a) dA ₂₀ -EPC (i _p máxima), b) 5 s, c) 30 s e d) 60 s..... | 47 |
| Figura 3.13: Influência do tempo de incubação de NO [•] , a diferentes concentrações, na i _p de dA ₂₀ -EPC. Os resultados são uma média de três ensaios independentes..... | 48 |
| Figura 3.14: Voltamograma típico obtido após imersão do dA ₂₀ -EPC em NO [•] contendo uma solução de AA de concentração: a)1,0; b)5,0; c)10,0; d)15,0; e)20,0 mg/L..... | 49 |
| Figura 3.15: Curva de calibração do AA. | 49 |
| Figura 3.16: Voltamograma a) dA ₂₀ -EPC (i _p máxima), b) 5 s, c) 30 s e d) 60 s. | 51 |
| Figura 3.17: Influência do tempo de incubação para diferentes concentrações de HClO na i _p do dA ₂₀ -EPC. Os resultados são uma média de três ensaios independentes..... | 52 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1.1: 16 PAH classificados como poluentes prioritários pela APA (Ramalhosa, et al., 2011a)..... | 5 |
| Tabela 2.1: Composições e formas de preparação das quatro amostras de café..... | 22 |
| Tabela 2.2: Tipo e composição da amostra de sumo e água aromatizada. | 22 |
| Tabela 2.3: Plano de experiência para o contaminante do benzo (g,h,i) perileno. | 25 |
| Tabela 2.4: Plano de experiências para os contaminantes, H ₂ O ₂ , NO [•] e HClO..... | 26 |
| Tabela 2.5: Plano experimental do efeito protetor promovido pelo AA na presença de H ₂ O ₂ e NO [•] | 29 |
| Tabela 2.6: Volume de café adicionado na presença de H ₂ O ₂ para cada uma das amostras. | 30 |
| Tabela 2.7: Volume de cada amostra adicionada na presença de H ₂ O ₂ e NO [•] | 31 |
| Tabela 3.1: Condições experimentais: concentração de adenina, E _c , E _p , t _c e t _d | 36 |
| Tabela 3.2: i _p obtidas para o dano oxidativo induzido pelo benzo (g,h,i) perileno. | 37 |
| Tabela 3.3: Percentagens de dA ₂₀ não danificadas na presença de diferentes concentrações de H ₂ O ₂ | 41 |
| Tabela 3.4: Valores de CAT obtidos para amostras de café..... | 44 |
| Tabela 3.5: Valores de CAT obtidos para amostras de sumo e água aromatizada..... | 45 |
| Tabela 3.6: Percentagens de dA ₂₀ não danificadas na presença de diferentes concentrações de NO [•] | 46 |
| Tabela 3.7: Valores de CAT obtidos para amostras de sumo e água aromatizada..... | 50 |
| Tabela 3.8: Percentagens de dA ₂₀ não danificada na presença de diferentes percentagens de HClO. | 51 |
| Tabela B.1: Parâmetros eletroquímicos utilizados em VOQ. | 64 |
| Tabela C.1: i _p do AA na presença de H ₂ O ₂ para elaboração das curvas de calibração. | 65 |
| Tabela C.2: i _p do AA na presença de NO [•] para elaboração das curvas de calibração. | 66 |
| Tabela C.3: Características analíticas da curva de calibração do AA na presença de H ₂ O ₂ | 66 |
| Tabela C.4: Características analíticas da curva de calibração do AA na presença de NO [•] | 67 |

LISTA DE ABREVIATURAS

A^{*} - Radical

AA – Ácido ascórbico

ADN – Ácido desoxirribonucleico

AEPA – Agência Europeia de Proteção Alimentar

APA – Agência de Proteção Ambiental

ARN – Ácido ribonucleico

CAI – Capacidade antioxidante individual

CAT – Capacidade antioxidante total

dA₂₀ - Oligonucleótido composto por 20 bases de adenina

E_c – Potencial de condicionamento

E_d – Potencial de deposição

E_p – Potencial de pico

EPC – Eléctrodo de pasta de carbono

GC-MS – Cromatografia gasosa-espetrometria de massa

GPES (*General Purpose Electrochemical System*)

HAT (*Hydrogen Atom Transfer*) – Transferência do átomo de hidrogénio

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) – Cromatografia líquida de alta eficiência

i_p – Intensidade de pico

MAE (*Microwave Assisted Extraction*) – Extração assistida por micro-ondas

MPO (*Myeloperoxidase*) – Enzima mieloperoxidase

PAH (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbon*) – Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

PBS (*Phosphate buffered saline*) – Solução tampão salina de fosfato

RNS (*Reactive Nitrogen Species*) – Espécies reativas de azoto

ROS (*Reactive Oxygen Species*) – Espécies reativas de oxigénio

SET (*Single Electron Transfer*) – Transferência do eletrão único

SFE (*Supercritical Fluid Extraction*) – Extração com fluído supercrítico

SPE (*Solid Phase Extraction*) – Extração em fase sólida

SSPE - Solução salina de fosfato de sódio

s – Segundos

t_c – Tempo de condicionamento

t_d – Tempo de deposição

VOQ – Voltametria/voltamograma de onda quadrada

XOD – Xantina oxidase

1. INTRODUÇÃO

Os contaminantes podem ter diferentes origens, endógenas ou exógenas. Os contaminantes endógenos são formados a partir de processos metabólicos, como a respiração ou processos inflamatórios. Os contaminantes exógenos podem apresentar várias origens que passam pela radiação, por exemplo, poluição atmosférica, tabaco e alimentação. A Figura 1.1 ilustra as diferentes origens de contaminantes.

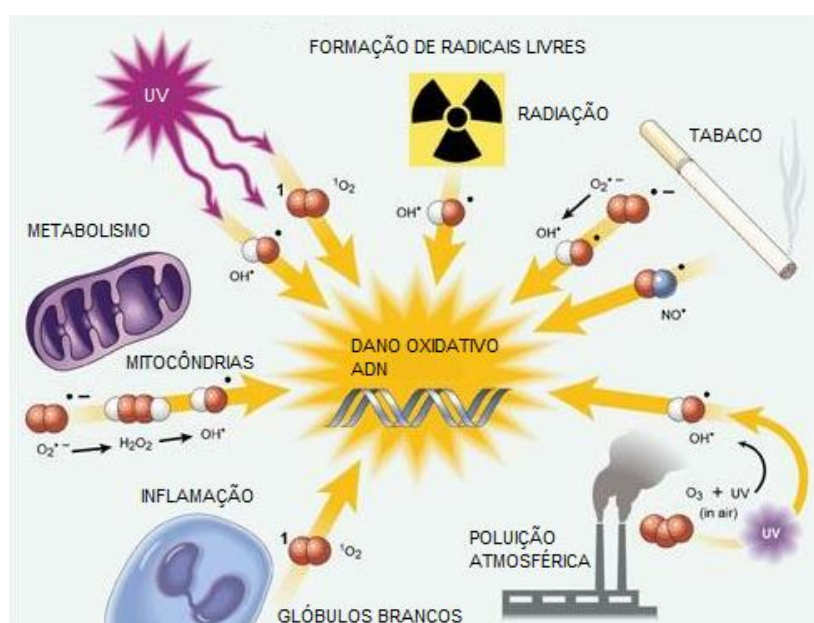


Figura 1.1: Diferentes origens de contaminantes (symmetrydirectbuy, 2013).

Os radicais livres são moléculas, orgânicas ou inorgânicas, que possuem um ou mais elétrons de valência desemparelhados que tendem a reagir com outras moléculas de modo a alcançarem a estabilidade. Esta configuração torna os radicais livres altamente instáveis, quimicamente reativos, com um tempo de vida bastante curto e com capacidade de existirem de forma independente (Sanchez-Moreno, 2002).

Nos organismos vivos, a formação de radicais livres constitui uma etapa normal do metabolismo celular contribuindo para a manutenção do equilíbrio bioquímico das células. Os radicais livres podem ser gerados em vários locais da célula, como citoplasma ou membrana celular, oxidando

as biomoléculas, tais como, o ácido desoxirribonucleico (ADN), lípidos, proteínas e estruturas celulares (Zwart, et al., 1998).

A formação endógena destes compostos ocorre, também, pela exposição a agentes exógenos como, medicamentos, cigarro, radiação, entre outros (Valko, et al., 2006). A radiação ionizante provoca alterações no ADN através da formação de radicais livres que afetam a sua estrutura e funcionalidade (Agnihotri & Mishra, 2011).

1.1. CONTAMINANTES ENDÓGENOS

Os radicais livres são conhecidos por apresentarem um papel duplo nos sistemas biológicos uma vez que podem ser maléficos ou benéficos, daí a sua presença ser crítica para a manutenção normal dos sistemas biológicos (Valko, et al., 2006). São conhecidos por promoverem danos oxidativos no material genético causando, conseqüentemente, diversas perturbações no organismo humano se existirem em desequilíbrio com espécies antioxidantes.

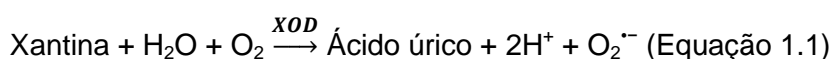
A concentração de radicais livres pode aumentar devido à sua elevada formação através dos sistemas biológicos ou pela fraca ação dos antioxidantes. É necessário haver equilíbrio entre as espécies antioxidantes e os radicais livres de modo a não ocorrer dano oxidativo, que pode estar relacionado com várias doenças contudo, é bastante custoso e difícil comprovar cientificamente esta situação devido ao curto tempo de vida dos radicais livres (Zwart, et al., 1998). Danos oxidativos promovidos por radicais livres encontram-se frequentemente associados ao envelhecimento, doenças cardiovasculares e neuro-degenerativas, inflamações, entre outros. Para além disso, danos no ADN causados por radicais desempenham um papel fundamental em processos de mutagénese e carcinogénese (Barroso, et al., 2011a); (Barroso, et al., 2011b).

As espécies reativas de oxigénio e de azoto (ROS e RNS, respetivamente) são as duas principais formas de radicais livres. Os radicais: superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo (HO^{\cdot}), peróxido (ROO^{\cdot}), óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o dióxido de azoto (NO_2^{\cdot}), entre outros, causam dano oxidativo ao ADN.

1.1.1. ROS – ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÉNIO

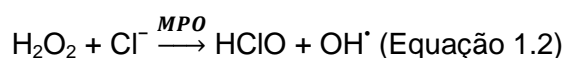
As reações mais relevantes a nível celular de radicais livres envolvem o oxigénio molecular e os seus derivados (Valko, et al., 2006). Entre as várias ROS formadas, o radical $O_2^{\cdot-}$ é o radical livre mais abundante em sistemas biológicos como resultado da redução do oxigénio molecular

utilizado na respiração. Através da catálise da hipoxantina e da xantina pela enzima xantina oxidase (XOD) é gerado o radical $O_2^{\cdot-}$, como se pode verificar na equação 1.1 (Barroso, et al., 2011c):



Contudo, existem outros derivados do oxigénio molecular que não são considerados radicais, como é o caso do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e do ácido hipocloroso (HClO), gerados nos sistemas biológicos e em alimentos, que são capazes de atravessar a membrana nuclear e provocar danos na molécula de ADN (Sanchez-Moreno, 2002).

O H_2O_2 é gerado em quantidades significativas nas mitocôndrias e desempenha um papel fundamental na morte de bactérias e fungos pois pode ser produzido pelos fagócitos existentes na corrente sanguínea. A reação química entre o H_2O_2 e os iões cloreto na presença da enzima mieloperoxidase (MPO) conduz à produção de HClO e do radical OH^{\cdot} (equação 1.2) (Valko, et al., 2006); (Kohen & Nyska, 2002).



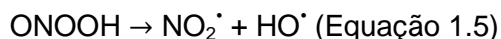
Esta reação contribui, por um lado, para a morte de bactérias mas, por outro lado, contribui para o dano oxidativo de tecidos celulares (Sanchez-Moreno, 2002).

1.1.2. RNS – ESPÉCIES REATIVAS DE AZOTO

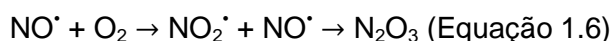
As RNS não só possuem a capacidade de danificar o ADN e participar em processos de mutagénese mas, também, possuem um papel fundamental em processos de carcinogénese uma vez que contribuem para a inibição de enzimas essenciais na reparação do ADN e alteram a estrutura e funções de proteínas conduzindo ao crescimento de células anormais em direção à malignidade (Ohshima, 2002).

O radical óxido nítrico (NO^{\cdot}) é a espécie reativa de azoto mais abundante e resulta de interações biológicas estando associado a um determinado número de doenças. O radical NO^{\cdot} ao reagir com o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ forma um anião muito reativo capaz de causar fragmentação do ADN, o radical peroxinitrito (ONOO^-) (Equação 1.3). O seu ácido conjugado (ONOOH) decompõe-se produzindo NO_2^{\cdot} e HO^{\cdot} , conforme verificado nas equações químicas 1.4 e 1.5 (Valko, et al., 2006); (Agnihotri & Mishra, 2011); (Ohshima, 2002).





Na presença de oxigênio molecular o radical NO^* pode ser transformado em N_2O_3 (equação 1.6), que é capaz de remover o grupo amina de várias bases de ADN provocando inflamações e infeções em organismos vivos (Ohshima, 2002).



O radical NO^* é um radical fundamental em diversos processos fisiológicos como a neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa, entre outros, mas terá que se encontrar em equilíbrio no organismo de modo a não provocar danos ao nível do material genético (Valko, et al., 2006).

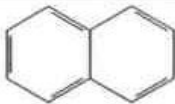
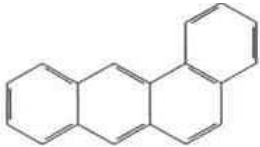
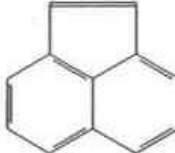
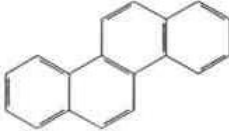
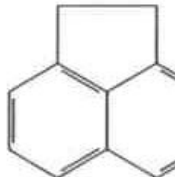
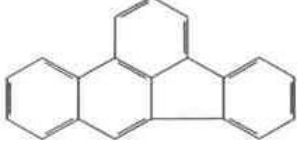
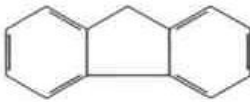
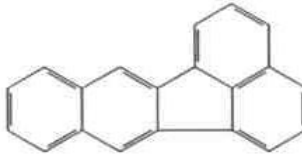

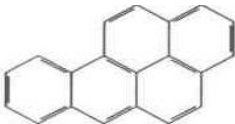
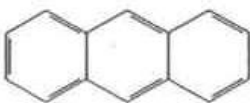
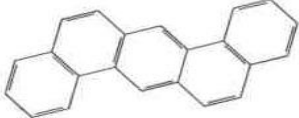

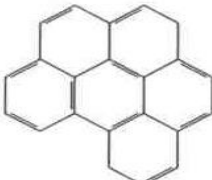
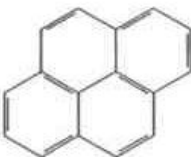
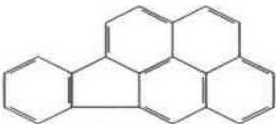
1.2. CONTAMINANTES EXÓGENOS

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) são contaminantes formados exclusivamente por átomos de carbono e hidrogênio contendo dois ou mais anéis aromáticos com a configuração linear, angular ou agrupada, e possuem grande persistência ambiental.

Os PAH que contêm dois anéis aromáticos são mais solúveis em água e mais voláteis que PAH com três ou mais anéis aromáticos. Contudo, quanto maior o número de anéis aromáticos mais tóxico e lipofílico se torna o PAH (Ramalhosa, et al., 2011a).

Atualmente, foram identificados mais de 500 PAH mas, devido à preocupação constante que rodeia os efeitos adversos que estes compostos podem provocar nos seres humanos, a APA (Agência de Proteção Ambiental) classificou 16 PAH (Tabela 1.1) como sendo poluentes prioritários (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, criseno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(g,h,i)perileno e dibenzo(a,h)antraceno (Ramalhosa, et al., 2011a) (Ramalhosa, et al., 2011c). Muitos são capazes de reagir após transformações metabólicas, com o ADN tornando-se carcinogénicos e potenciais mutagénicos.

Tabela 1.1: 16 PAH classificados como poluentes prioritários pela APA (Ramalhosa, et al., 2011a).

| COMPOSTO | ESTRUTURA | COMPOSTO | ESTRUTURA |
|--------------|---|------------------------|---|
| Naftaleno |  | Benzo(a)antraceno |  |
| Acenaftileno |  | Criseno |  |
| Acenafteno |  | Benzo(b)fluoranteno |  |
| Fluoreno |  | Benzo(k)fluoranteno |  |
| Fenantreno |  | Benzo(a)pireno |  |
| Antraceno |  | Dibenzo(a,h)antraceno |  |
| Fluoranteno |  | Benzo(g,h,i)perileno |  |
| Pireno |  | Indeno(1,2,3-cd)pireno |  |

O benzo(a)pireno é considerado o melhor marcador para medir o nível de risco e a exposição às misturas de PAH uma vez que é altamente carcinogénico mas, uma avaliação única e exclusiva deste composto provavelmente menospreza os efeitos carcinogénicos de uma mistura

de PAH (Ramalhosa, et al., 2011a). Assim sendo, através de avaliações contínuas foi sugerido pela AEPA (Agência Europeia de Proteção Alimentar) que para além do benzo(a)pireno outros sete PAH (benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno) incluídos nos 16 PAH prioritários, fossem também considerados marcadores para medir o nível de risco e exposição (Ramalhosa, et al., 2011b) .

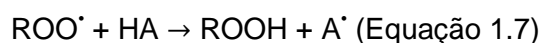
Existem duas fontes emissoras de PAH: as naturais e as antropogénicas. As maiores fontes naturais destes poluentes vão desde as erupções vulcânicas a processos geotérmicos enquanto as origens antropogénicas abrangem a queima de combustíveis, a produção de benzeno e tolueno, refinação de petróleo, entre outros.

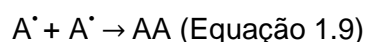
A maioria da população é exposta a PAH através do tipo de dieta selecionada e pelo modo como os alimentos são cozinhados. Os alimentos podem ser contaminados a partir de várias origens (ar, solo ou água) e, também, através de certas práticas culinárias como o assar, fritar ou churrasco, desde que envolvam temperaturas muito elevadas.

1.3. SISTEMA DE DEFESA ANTIOXIDANTES

A formação contínua de radicais livres conduziu ao desenvolvimento de sistemas de defesa antioxidante. Estes sistemas consistem em compostos antioxidantes responsáveis por contrariar e prevenir os efeitos adversos de contaminantes nos organismos vivos.

Um antioxidante é “uma substância que, quando se encontra presente em baixas concentrações quando comparado com um substrato oxidável, protege esse substrato da oxidação e em última análise protege o organismo de efeitos prejudiciais provocados pelo dano oxidativo” (Barroso, et al., 2011b). Assim sendo, um antioxidante tem a capacidade de eliminar ou reduzir os efeitos prejudiciais dos radicais livres. Genericamente, e conforme se pode visualizar nas equações químicas 1.7, 1.8 e 1.9, um antioxidante (HA) ao reagir com um radical, por exemplo o radical peróxilo (ROO[•]), origina um composto estável (ROOH) e um radical (A[•]) que não é prejudicial ao organismo vivo. Este radical do antioxidante pode reagir novamente com o radical peróxilo gerando um peróxido estável ou reagir com outro radical do antioxidante formando um dímero (Barroso, et al., 2011d):





Estes compostos antioxidantes que protegem as células das consequências dos radicais livres podem ser classificados como antioxidantes endógenos, compostos produzidos por organismos vivos, e antioxidantes exógenos, compostos provenientes da alimentação (Figura 1.2).

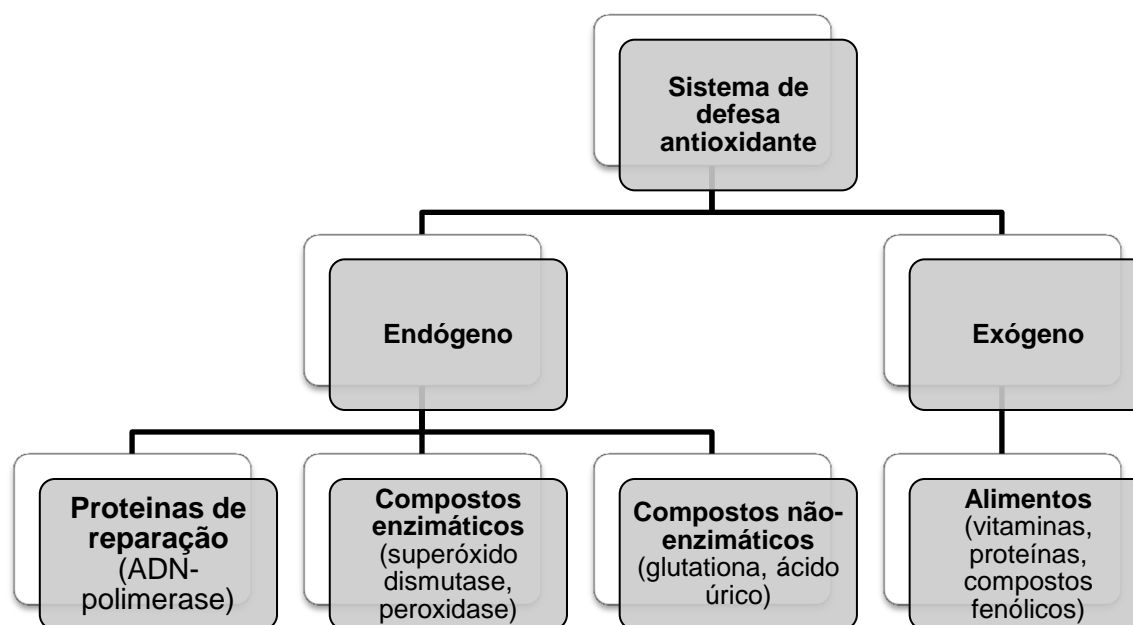


Figura 1.2: Sistema de defesa antioxidante (Barroso, et al., 2011b).

Alguns alimentos como vegetais, fruta, cereais e determinadas bebidas são grandes fontes de antioxidantes exógenos como por exemplo vitaminas (vitamina A, AA, vitamina E), compostos fenólicos (ácido cafeico, ácido ferúlico) ou minerais (como o selênio ou o zinco). Apesar de serem necessários estudos mais aprofundados na determinação da relação entre os níveis de dano oxidativo nas células e o consumo de antioxidantes exógenos, pode-se afirmar que uma dieta rica em antioxidantes auxilia na manutenção de um equilíbrio saudável do organismo (Barroso, et al., 2011d); (Barroso, et al., 2011e).

O sistema de defesa antioxidante endógeno inclui proteínas de reparação que possuem a capacidade de promover uma reparação eficiente de danos oxidativos provocados por contaminantes na molécula de ADN. Para além destes, estão incluídos nesse sistema outros compostos enzimáticos e não-enzimáticos, como por exemplo a enzima superóxido dismutase e o ácido úrico respetivamente, que formam um mecanismo de prevenção, assim como os antioxidantes exógenos. O mecanismo de prevenção passa por estabilizar e/ou inibir a

formação de radicais livres ou interromper reações de radicais em cadeia (Barroso, et al., 2011b).

O primeiro mecanismo de defesa antioxidante a atuar é o mecanismo de prevenção contudo, se ocorrer dano oxidativo que coloque em causa a integridade do material genético o mecanismo de reparação, conduzido por determinadas enzimas, entra em ação (Barroso, et al., 2011b).

1.4. ADN

Para o presente estudo torna-se necessário a compreensão da estrutura da molécula de ADN. Durante vários anos foi admitida a ideia de que o ADN era, estruturalmente, uma molécula bastante simples. Contudo, a importância do ADN, como material genético que codifica toda a informação necessária para o desenvolvimento dos seres vivos, conduziu ao estudo mais aprofundado desta molécula revelando a sua estrutura em dupla hélice.

1.4.1. ESTRUTURA DO ADN

A estrutura básica do ADN consiste numa estrutura de dupla hélice (Figura 1.3) que permite a proteção das bases do ADN (bases púricas e bases pirimídicas), que se encontram no interior da estrutura, de qualquer tipo de modificação.

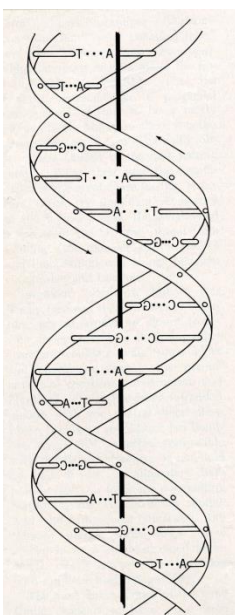


Figura 1.3: Estrutura de dupla hélice do ADN (Sinden, 1994).

Para uma melhor compreensão da estrutura de dupla hélice é necessário conhecer os seus componentes individuais. Portanto, o ADN é constituído por bases, açúcares e grupos fosfato.

Existem quatro tipos diferentes de bases no ADN, adenina e guanina (bases púricas), timina e citosina (bases pirimídicas) representadas, normalmente, por A, G, T e C, respetivamente. A timina é substituída pelo uracilo (U) no ARN (ácido ribonucleico). Estas bases podem ser divididas em púricas ou pirimídicas, dependendo da molécula-mãe. A Figura 1.4 mostra as estruturas moleculares do ADN (Sinden, 1994).

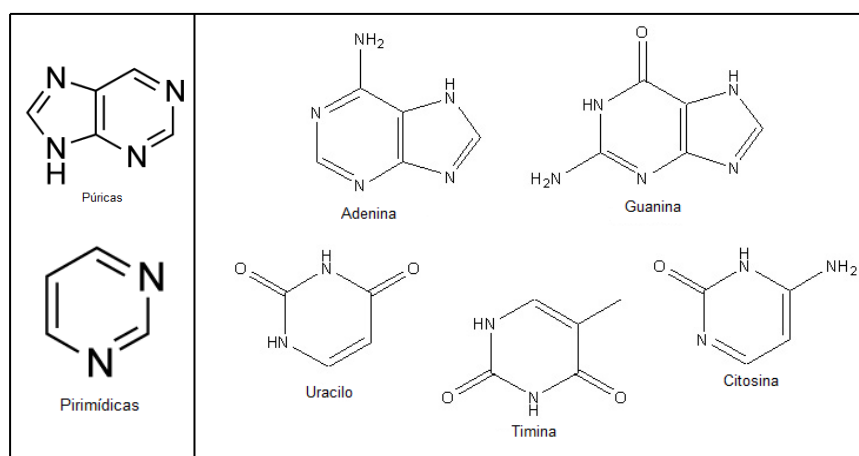


Figura 1.4: Estruturas moleculares das bases de ADN e ARN.

O açúcar presente no ADN é o desoxirribose, a sua estrutura é uma pentose e apresenta uma ligação glicosídica com as bases, conforme se pode verificar na Figura 1.5.

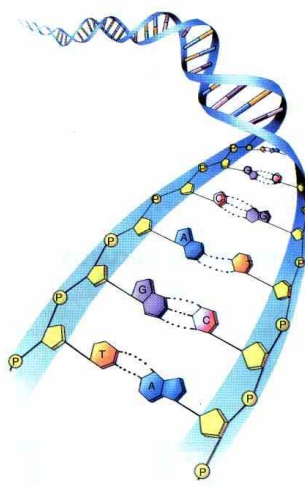


Figura 1.5: Ligações glicosídicas estabelecidas entre os componentes individuais do ADN, açúcares, bases e grupos fosfato (Infoescola, 2013).

1.5. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

A avaliação da capacidade antioxidante não é uma tarefa fácil, sendo necessário desenvolver métodos analíticos de modo a quantificar antioxidantes de forma simples e eficaz. Nesse sentido diversos métodos analíticos têm vindo a ser desenvolvidos de modo a quantificar a capacidade total ou individual de antioxidantes exógenos ou endógenos como a espectrofotometria, a cromatografia e a eletroquímica (Barroso, et al., 2011d); (Barroso, et al., 2011e). Tendo em conta as interações sinérgicas entre antioxidantes numa amostra e a complexidade de amostras é preferível a avaliação da CAT em relação à capacidade antioxidante individual (CAI).

A quantificação da CAT e da CAI pode ser efetuada recorrendo a diferentes metodologias analíticas. A quantificação da CAI presentes numa amostra pode ser realizada por meio da cromatografia recorrendo, eventualmente, a várias técnicas de extração como a extração em fase sólida (SPE), extração com fluídos supercríticos (SFE) e extração assistida por micro-ondas (MAE), se a amostra a analisar o exigir. A quantificação da CAT pode ser efetuada recorrendo a métodos óticos e eletroquímicos baseados em dois mecanismos apoiados no tipo de reação envolvida: transferência do átomo de hidrogénio (HAT) e a transferência do eletrão único (SET) (Barroso, et al., 2011b).

1.5.1. QUANTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA

A cromatografia permite a separação de componentes muito semelhantes de matrizes muito complexas. Em todas as amostras cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Esta fase móvel é forçada através de uma fase estacionária imiscível presente na coluna cromatográfica. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre a fase móvel e estacionária em vários graus, dependendo da afinidade dos componentes com as duas fases. Assim, é possível realizar uma análise qualitativa e/ou quantitativa dos componentes da amostra.

Conforme referido anteriormente, os alimentos têm na sua composição vários tipos de antioxidantes e a sua análise individual é possível recorrendo, por exemplo, à cromatografia. A quantificação da CAI apresenta determinadas dificuldades devido à complexidade das matrizes a analisar, à dificuldade em separar individualmente cada antioxidante e às possíveis interações

sinérgicas entre antioxidantes. Estas interações podem potenciar o efeito protetor de um antioxidante quando este se encontra na presença de outro (Barroso, et al., 2011b).

Quando são efetuadas análises por cromatografia a etapa fundamental é o pré-tratamento da amostra. Esta etapa é usada de modo a eliminar todos os interferentes e a proteger a coluna do cromatógrafo. Uma das técnicas mais utilizadas no pré-tratamento é a SPE contudo, deverá que ser utilizada de forma cuidadosa para não contaminar a amostra em análise (Barroso, et al., 2011b); (Porgali & Buyultuncel, 2011).

A SPE tem um leque bastante amplo de aplicações que vão desde a sua utilização em amostras ambientais e farmacêuticas até ao seu uso em análises bioquímicas e alimentos. A SPE consiste na remoção de interferentes presentes numa matriz complexa e no isolamento seletivo do composto de interesse. Esta extração apresenta três fins principais, a concentração do analito, a remoção de substâncias interferentes e a mudança de matriz do analito de modo a ser utilizado em análises subsequentes (Macherey-Nagel, 1998).

Portanto, a análise e quantificação de antioxidantes individualmente através da utilização da cromatografia torna-se um processo bastante moroso devido à obrigatoriedade de um pré-tratamento.

As bases oxidadas de ADN podem ser identificadas e quantificadas recorrendo a diversos métodos, entre os quais se destaca a cromatografia gasosa aliada à espectroscopia de massa (GC-MS), bastante utilizada para detetar compostos como aminoácidos, ácidos nucleicos, ácidos carboxílicos e hidrocarbonetos aromáticos. Contudo, este método obriga todas as amostras a serem sujeitas a um pré-tratamento, a serem hidrolisadas e derivatizadas antes da análise, o que conduz a um aumento de oxidação dos produtos (Galvin, et al., 2005); (Aust & Eveleigh, 1999).

Foram desenvolvidos outros métodos mais rápidos e sensíveis de deteção de bases oxidadas de ADN como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) associada à eletroquímica. Este método apresenta determinadas desvantagens, a amostra necessita de ser hidrolisada e apenas possibilita a quantificação da amostra e não a sua identificação (Aust & Eveleigh, 1999).

Recentemente, o HPLC associado à espectroscopia de massa tem vindo a ser utilizado para a medição quantitativa e qualitativa de antioxidantes. Este método quando comparado com o GC-

MS apresenta uma vantagem fundamental pois a amostra pode ser analisada logo após a reação sem ser necessária a sua hidrolisação (Aust & Eveleigh, 1999).

1.5.2. QUANTIFICAÇÃO DA CAT

Conforme referido, a quantificação da CAT é executada recorrendo a métodos que se baseiam em dois mecanismos baseados no tipo de reação envolvida: HAT e SET.

O método baseado n HAT consiste na capacidade de um antioxidante estabilizar um radical através da doação de hidrogénio (equação 1.10) enquanto o método baseado n SET consiste na capacidade de um antioxidante reduzir um radical através da transferência de um eletrão (equação 1.11) (Barroso, et al., 2011b); (Prior, et al., 2005).



Por vezes estes dois mecanismos complementam-se nos métodos analíticos, dependendo da estrutura e do pH do antioxidante (Prior, et al., 2005).

1.5.2.1. METODOLOGIAS CONVENCIONAIS

- PODER REDUTOR

Inicialmente este método analítico foi desenvolvido para avaliar o poder redutor de uma amostra de plasma mas, posteriormente, foi adaptado para determinar o poder redutor de antioxidantes. Este teste é totalmente baseado no mecanismo SET, em que o antioxidante é capaz de reduzir um radical através da transferência de eletrões (Prior, et al., 2005). Assim sendo, é possível afirmar que a capacidade de redução de um composto é um indicador significativo da sua atividade antioxidante (Karawita, et al., 2004).

A medição do poder redutor consiste na redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} promovida pela presença de antioxidantes no meio reacional (Equação 1.12 e Figura 1.6) (Prior, et al., 2005):



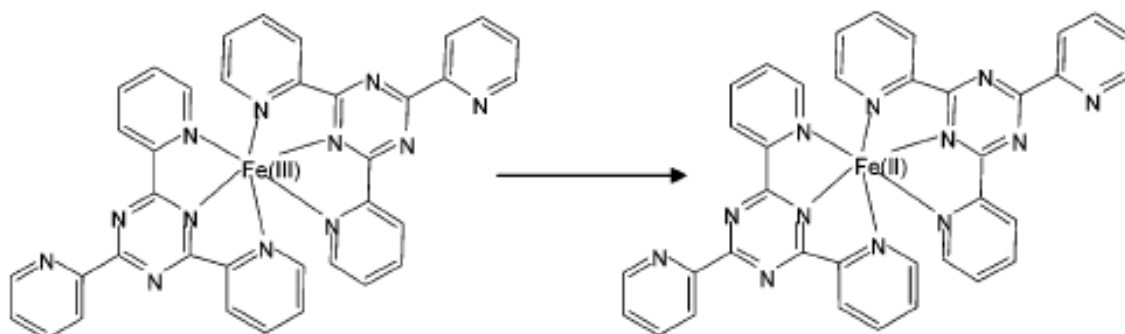


Figura 1.6: Reação ocorrida no teste do poder redutor do antioxidante (Prior, et al., 2005).

Recorrendo à espectrofotometria molecular é possível determinar a capacidade do antioxidante uma vez, que a redução de Fe^{3+} para Fe^{2+} é acompanhada por uma mudança de cor, sendo que um aumento da absorvância representa um aumento do poder redutor e, conseqüentemente, uma maior CAT (Karawita, et al., 2004).

- [MÉTODOS ANTIRRADICALAR DPPH](#)

O método antirradicalar DPPH consiste na capacidade que um antioxidante tem em reduzir o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH \cdot) (Figura 1.7). Este radical é um dos poucos radicais orgânicos de azoto estáveis e que apresenta uma coloração roxa escura (Prior, et al., 2005).

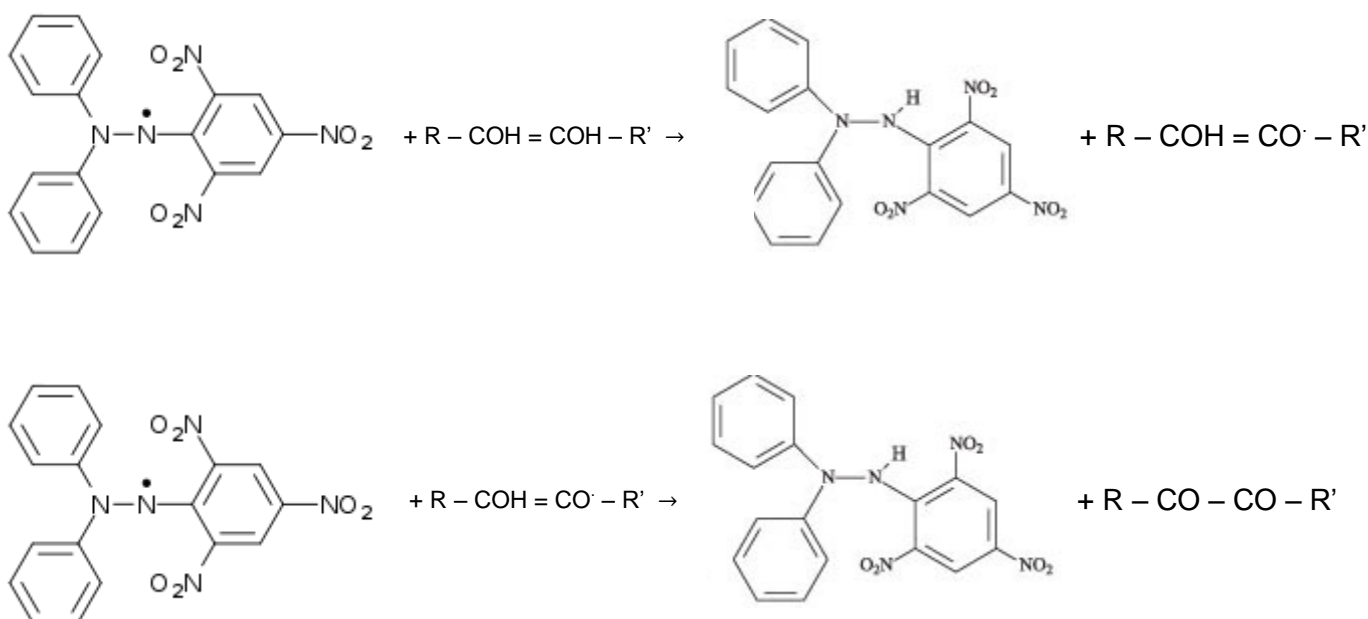


Figura 1.7: Reação ocorrida no método antirradicalar DPPH (Molyneux, 2004).

A avaliação da atividade antioxidante é baseada na diminuição da cor (roxa para amarelo) do radical DPPH[•] a 515 nm, após reação com o antioxidante e, conseqüentemente, ocorre diminuição da absorvância. Esta reação é monitorizada através da espectrofotometria molecular. Este método é bastante simples e rápido, apenas necessita de um espectrofotômetro UV-vis (Prior, et al., 2005).

Normalmente, o método antirradicalar DPPH é associado ao mecanismo SET mas, o radical DPPH[•] pode ser estabilizado tanto por SET como por HAT (Prior, et al., 2005).

- **TEOR FENÓLICO TOTAL**

Os compostos fenólicos, que são maioritariamente de origem vegetal, apresentam atividade antioxidante. O teor destes compostos é determinado recorrendo à espectrofotometria UV/vis associada a uma diversidade de técnicas mas, habitualmente é utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu.

O método consiste na oxidação de compostos fenólicos pelo reagente de Folin-Ciocalteu gerando um complexo azulado de acordo com as equações 1.13 e 1.14 ($\lambda_{\text{máx}}=750$ nm) (Prior, et al., 2005).



O reagente de Folin-Ciocalteu consiste na mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungústico que em presença de antioxidantes, como os compostos fenólicos, vão-se formar complexos de molibdénio e tungsténio que apresentam ambos a coloração azul.

1.5.2.2. MÉTODOS ELETROQUÍMICOS

A aplicação da eletroquímica é considerado um método adequado para a quantificação da CAT uma vez que, não requer equipamentos dispendiosos e sofisticados, permite a redução da quantidade de reagentes e amostra em análise, é bastante sensível e não são necessários pré-tratamentos. A eletroquímica permite avaliar a capacidade antioxidante através de deteções diretas sobre a superfície do elétrodo ou em elétrodos com a sua superfície modificada (quimicamente e biologicamente).

Os biossensores eletroquímicos permitem a combinação entre a perfeita deteção eletroquímica e a alta seletividade de elementos biológicos como enzimas, proteínas, ácidos nucleicos, entre

outros. É devido a esta excelente combinação que o conceito de biossensor é sinónimo de inovação na quantificação da CAT.

A voltametria estabelece uma relação entre a intensidade de corrente e o potencial de uma célula eletroquímica, o que em condições controladas é possível obter a concentração do analito. A célula eletroquímica é constituída por três elétrodos, o elétrodo de trabalho, cujo potencial é controlado e no qual ocorre o processo de oxidação/redução, o elétrodo de referência (Ag/AgCl) e o elétrodo auxiliar. A diferença de potencial é medida entre o elétrodo de trabalho e o elétrodo de referência e a intensidade de corrente é medida entre o elétrodo de trabalho e o elétrodo auxiliar. A VOQ é a técnica utilizada neste estudo, pois tem a vantagem de se obter picos bem definidos em ensaios executados a altas velocidades de varrimento melhorando, conseqüentemente, a sensibilidade da técnica.

1.5.2.2.1. BIOSSENSOR DE BASES PÚRICAS

O presente estudo consiste no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para a avaliação da capacidade de determinados antioxidantes em proteger o ADN. O conceito de biossensor vem revolucionar a quantificação da CAT através da microanálise, o que implica redução de reagentes e amostra e, conseqüentemente, diminuição de custos, melhoria de condições experimentais e rapidez de ensaios. A CAT pode ser avaliada facilmente através da eletroquímica uma vez que, alguns ensaios são baseados na transferência de elétrões e os antioxidantes exibem eletro-atividade considerável que facilmente é detetada eletroquimicamente (Barroso, et al., 2011b).

A eletroquímica permite avaliar a capacidade antioxidante por deteções diretas sobre a superfície do elétrodo ou em elétrodos com a sua superfície modificada química ou biologicamente. São considerados biossensores os elétrodos modificados que empregam, por exemplo enzimas, proteínas ou ácidos nucleicos.

A capacidade de um antioxidante é avaliada pela sua capacidade em promover proteção aos danos oxidativos induzidos por contaminantes ao ADN. Para tal, as bases de ADN, púricas ou pirimídicas, são imobilizadas no EPC. Qualquer uma destas bases de ADN pode ser utilizada em estudos eletroquímicos contudo, as bases púricas são mais sensíveis (apresentam potenciais de oxidação mais baixos) e apresentam picos melhor definidos que as bases pirimídicas (Barroso, et al., 2011c).

De forma a atingir o objetivo do presente estudo, foi desenvolvido um biossensor de base púrica (Figura 1.8), no sentido de se estudar i) o dano oxidativo induzido por contaminantes no biossensor e ii) o efeito protetor promovido por antioxidantes na monitorização da integridade do biossensor (Barroso, et al., 2011b); (Barroso, et al., 2011c).

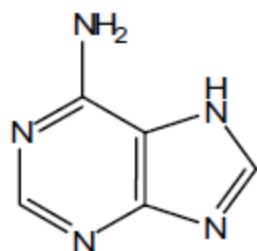


Figura 1.8: Estrutura química da adenina (Barroso, et al., 2011d).

O desenvolvimento deste biossensor foi testado através de duas abordagens. Enquanto na primeira estratégia, existe uma etapa de condicionamento do eletrodo (aplicação de um potencial positivo durante um determinado período de tempo) e deposição da base púrica (imobilização da base à superfície do eletrodo) (Figura 1.9). A segunda abordagem consiste na imobilização, por adsorção física, de uma cadeia simples de ADN no EPC, pela colocação direta de uma gota de um oligonucleótido composto por 20 bases de adenina (dA₂₀) no eletrodo.

O dano oxidativo provocado por contaminantes na adenina foi realizado por imersão do biossensor em soluções dos contaminantes de diferentes concentrações, durante um determinado período de tempo (Barroso, et al., 2011b); (Barroso, et al., 2011c); (Barroso, et al., 2011d).

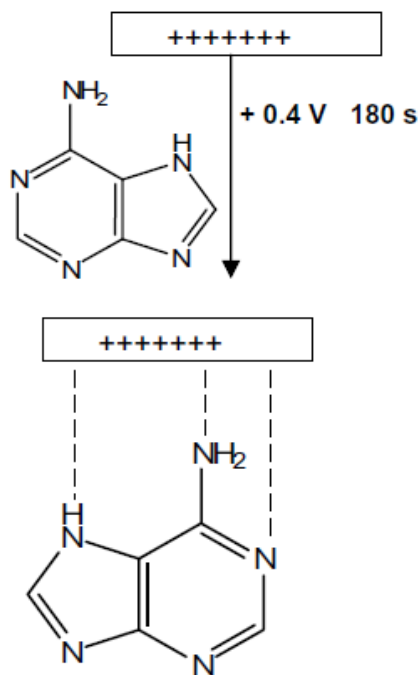


Figura 1.9: Eletrodeposição da adenina sobre o EPC (Barroso, et al., 2011d).

De modo a estudar os danos oxidativos provocados por contaminantes no ADN ou no material baseado no ADN e o efeito protetor promovido pelos antioxidantes no mesmo recorreu-se, como já mencionado, à eletroquímica que engloba, entre outras, a VOQ.

O dano oxidativo promovido pelos contaminantes no biossensor produz uma diminuição significativa do sinal voltamétrico quando comparada com a intensidade de corrente obtida numa leitura direta da adenina intacta (Figura 1.10). Porém quando é adicionado um antioxidante à solução de contaminantes verifica-se um pequeno aumento do sinal voltamétrico que é atribuído à capacidade que o antioxidante tem em eliminar as espécies oxidantes pela sua redução (Barroso, et al., 2011b); (Barroso, et al., 2011c). Este aumento ou diminuição de sinal em relação à leitura direta da adenina intacta, conforme a adição de antioxidante ou contaminante, respetivamente, pode ser verificada na Figura 1.10.

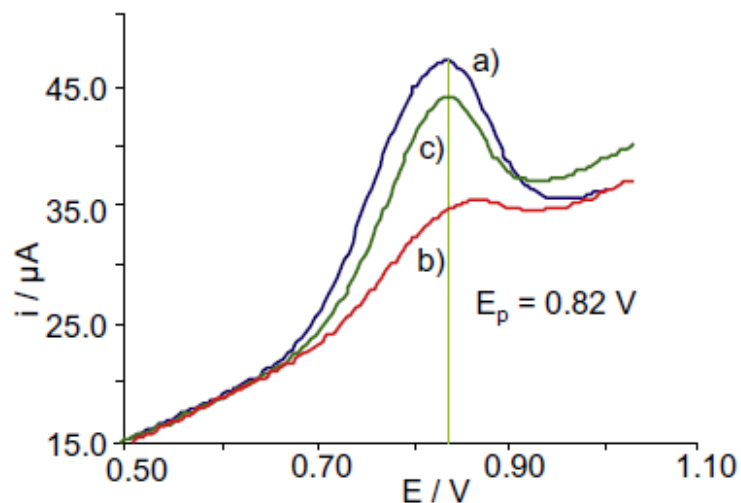


Figura 1.10: i_p obtidos a partir da VOQ: a) leitura direta de adenina; b) exposição a um contaminante; c) efeito protetor promovido por um antioxidante (Barroso, et al., 2011d).

Portanto, este trabalho consistiu no estudo eletroquímico do dano oxidativo provocado por contaminantes (PAH, H_2O_2 , NO^* e HClO) e do efeito protetor, ao dano oxidativo, promovido por antioxidantes no material baseado no ADN recorrendo à utilização de um biossensor de bases púricas, adenina-EPC e dA_{20} -EPC utilizando a VOQ como técnica de detecção.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento do adenina-EPC ou do dA₂₀-EPC utilizado no estudo eletroquímico do dano oxidativo provocado por contaminantes e do efeito protetor promovido pelos antioxidantes no ADN foi necessário o estudo de vários parâmetros e procedimentos. De referir, a construção do EPC, as condições voltamétricas, a otimização da concentração de adenina e dA₂₀, assim como, o estudo do efeito protetor promovido pelos antioxidantes, respetivas curvas de calibração e aplicação a amostras reais.

2.1. MATERIAL E EQUIPAMENTO

No sentido de avaliar o dano oxidativo provocado no biossensor e o efeito protetor promovido por antioxidantes no mesmo, recorreu-se à VOQ, capaz de monitorizar a integridade da base púrica. Para tal, foi utilizado um potencióstato (Autolab Metrohm) com um software de aquisição e tratamento de dados GPES (General Purpose Electrochemical System) versão 4,9, ECOCHEMIE. Através deste software foi possível a obtenção de voltamogramas que relacionam a intensidade de pico (i_p), em Amperes, com o potencial de pico (E_p), em Volts. Na medida voltamétrica foi utilizado um elétrodo de referência de Ag/AgCl, um elétrodo auxiliar de platina e um elétrodo de trabalho de pasta de carbono.

A balança analítica, New Classic da METTLER com precisão de 0,00001 g, foi utilizada em grande parte no trabalho prático, desde a pesagem de Na₂HPO₄ e NaH₂PO₄ para a preparação de soluções tampão salinas de fosfato (PBS) de pH 7,4 e 4,6 e a pesagem de adenina para a preparação da solução de adenina, até à medição de nitrito de sódio para a produção de NO[•] e a pesagem de AA para a etapa de ensaios com antioxidantes. De referir, também, a pesagem de amostras de café para a etapa de ensaios com amostras reais.

Para a preparação de ambos os tampões, PBS pH 7,4 e PBS pH 4,6, para além da balança analítica foi utilizado um medidor de pH da CRISON para ajuste de pH e um ultrassom da BANDELIN para facilitar a dissolução dos compostos sólidos.

Recorreu-se a uma placa de agitação da NAHITA para promover a imobilização da adenina e do dA₂₀ no EPC e para garantir a homogeneidade nos ensaios do dano oxidativo.

Foi utilizado um equipamento da SYSADVANCE para a utilização de azoto na secagem da gota de dA₂₀ no EPC e para a desoxigenação do sistema de produção de NO[•].

2.2. REAGENTES E PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES

Todo o trabalho experimental foi realizado à temperatura ambiente, variando entre os 15°C e os 18°C mas, determinados reagentes foram armazenados em locais apropriados, conforme as especificações, de modo a preservá-los.

Os reagentes não sofreram qualquer tipo de purificação ao longo do trabalho experimental, de referir: adenina (SIGMA – guardado à temperatura ambiente e em local escuro), peróxido de hidrogénio 30% (PANREAC – guardado no frigorífico), hipoclorito de sódio, solução salina de fosfato de sódio (SSPE 20x) (SIGMA), AA (MERCK – guardado em local seco), nitrito de sódio (MERCK), ácido sulfúrico 96% (PANREAC), fosfato di-sódio di-hidratado (MERCK), fosfato monossódico hidratado (MERCK), parafina (MERCK), grafite (ULTRA “F” PURITY CARBONE LORRAINE), etanol (PANREAC), azoto (SYSADVANCE) e dA₂₀ (SIGMA – guardado em alíquotas no congelador a 4°C).

A maioria das soluções foi preparada com água ultrapura obtida através de um sistema de ultrapurificação de água (Milipore Simplicity 185).

No presente estudo foram preparadas soluções tampão de PBS de pH 4,6 e pH 7,4, soluções aquosas de adenina, soluções do PAH benzo (g,h,i) perileno, soluções de dA₂₀, soluções de peróxido de hidrogénio, soluções de óxido nítrico, soluções de HClO e soluções de AA.

Foram preparados tampões PBS de pH 4,6 e pH 7,4, de concentração de 0,1 mol/L, a partir de soluções aquosas de Na₂HPO₄ e NaH₂PO₄ e o pH foi ajustado com HCl de 0,1 mol/L. Estes tampões eram preparados sempre que era necessário. Soluções para diferentes concentrações de adenina (10,0-200,0 mg/L) foram preparadas a partir do sólido, o qual foi dissolvido em solução tampão de PBS de pH 4,6. No caso do dA₂₀ todas as soluções (25,0-300,0 mg/L) foram preparadas a partir de uma solução-mãe de 620,0 mg/L em solução tampão SSPE 2x. Tanto as soluções de adenina como as soluções de dA₂₀ foram preparadas diariamente.

2.3. CONSTRUÇÃO DO EPC

No sentido de alcançar os objetivos do presente estudo, recorreu-se à construção de um EPC modificado com uma base púrica ou com dA₂₀, adenina-EPC e dA₂₀-EPC, respetivamente.

A pasta de carbono consiste numa mistura de 1,8 g de parafina, que atua como um ligante, e 5 g grafite (carbono) (Barroso, et al., 2011a). De modo a obter o aspeto desejado, foi necessário

misturar e triturar os dois componentes até se adquirir uma aparência brilhante, homogênea e sem quaisquer pontos negros. A pasta de carbono foi feita, sensivelmente, de duas em duas semanas e guardada num exsicador para evitar a degradação pela humidade.

O elétrodo de trabalho onde é inserida a pasta de carbono possui uma configuração semelhante a um tubo e no interior contém um pistão de aço inoxidável. Na Figura 2.1 é possível visualizar a construção do EPC.

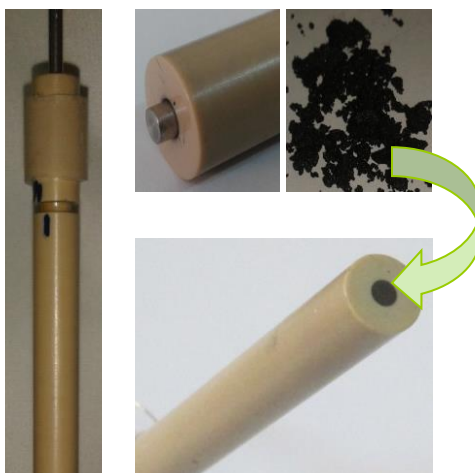


Figura 2.1: Construção do EPC.

Para a construção do EPC recorreu-se a uma microespátula e colocou-se a pasta de carbono no orifício do elétrodo, conforme a Figura 2.1. De forma a não existirem resistências e/ou interferências foi necessário polir a superfície do EPC até conseguir uma área homogênea e sem espaços entre o interior do elétrodo e a pasta de carbono.

Após cada ensaio, a superfície do EPC terá que ser renovada.

2.4. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

Foram analisadas diferentes amostras reais para os seguintes contaminantes, H_2O_2 e NO^{\cdot} . A CAT foi determinada para as seguintes amostras: café, sumo de laranja e água aromatizada de laranja.

2.4.1. AMOSTRAS DE CAFÉ

Foram analisados quatro tipos de café comerciais com diferentes composições e diferentes formas de preparação, como mostra a Tabela 2.1.

Tabela 2.1: Composições e formas de preparação das quatro amostras de café.

| Amostra | Tipo | Composição | | Tipo de bebida | Café / Água |
|---------|--------------|------------|---------|--------------------------|-----------------|
| | | Arábica | Robusta | | |
| 1 | Normal | √ | √ | Café expresso (cápsulas) | 7 g / 50,0 mL |
| 2 | Normal | √ | √ | | |
| 3 | Descafeinado | √ | √ | | |
| 4 | Normal | √ | - | Café de cafeteira | 32 g / 150,0 mL |

Para as amostras de café 1, 2 e 3 foi feita uma amostra de 50,0 mL a partir de uma máquina de café comum que funciona à base de cápsulas de 7 g de café revestidas a plástico. A partir de cada uma das amostras foram realizados ensaios sem qualquer tipo de diluição prévia.

A amostra 4 como era vendida ao público em grão possuía uma forma de preparação diferente, aproximadamente 32 g de café, já em pó, e 150,0 mL de água da torneira foram preparados em cafeteira. Esta amostra também não sofreu diluição.

As amostras 1, 2 e 3 eram misturas de café arábica e café robusta, exceto a amostra 4 que era composta por 100 % de café arábica. Cada uma das amostras foi preparada e analisada de imediato.

2.4.2. AMOSTRA DE SUMO E ÁGUA AROMATIZADA

Foram analisadas dois tipos de bebidas comerciais, adquiridas em supermercados, uma das amostras consistiu num sumo concentrado de laranja, enquanto a outra amostra consistiu numa água aromatizada com sabor a laranja, como mostra a Tabela 2.2.

Tabela 2.2: Tipo e composição da amostra de sumo e água aromatizada.

| Amostra | Tipo de bebida | Sabor | Composição | Antioxidante |
|---------|------------------|---------|--|---------------|
| 1 | Sumo | | Sumo e polpa de laranja | AA |
| 2 | Água aromatizada | Laranja | Água mineral natural do luso (80,7%) sumos de fruta concentrados(12%) | Ácido cítrico |

A partir da amostra 1 foi feita uma solução-mãe de 1:10 em água enquanto a amostra de água aromatizada foi analisada diretamente, sem necessitar de qualquer diluição prévia. Cada amostra foi guardada no frigorífico e analisada no dia da sua compra.

2.5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Foram desenvolvidos procedimentos experimentais de acordo com as diferentes etapas, nomeadamente, otimização da solução de adenina e dA_{20} , imobilizada no EPC, estudo dos danos oxidativos provocados pelos diferentes contaminantes, estudo do efeito protetor promovido por antioxidantes e aplicação dos procedimentos otimizados para a quantificação da CAT das amostras reais

2.5.1. IMOBILIZAÇÃO DA ADENINA E DO dA_{20} AO EPC

No presente trabalho foram utilizadas diferentes abordagens de imobilização do material baseado no ADN. Uma das abordagens consistiu na utilização de três etapas i) condicionamento do EPC, ii) deposição da adenina e iii) leitura da i_p de oxidação da adenina. Na outra abordagem as etapas de condicionamento e deposição foram eliminadas sendo que a deposição do dA_{20} foi feita pela colocação direta de uma gota de dA_{20} no EPC seguida da sua secagem com uma corrente suave de azoto.

ADENINA

A imobilização da adenina no EPC consistiu em três etapas: condicionamento do EPC, deposição da adenina e leitura da i_p de oxidação da adenina. Para tal, tornou-se necessário a preparação diária da solução de adenina em solução tampão PBS de pH 4,6.

Foram preparadas três células eletroquímicas distintas: uma com 10,0 mL de solução tampão PBS de pH 4,6, outra com 10,0 mL de solução de adenina e a terceira com 10,0 mL de solução tampão PBS de pH 7,4.

Após a construção do EPC, a primeira etapa foi o condicionamento do elétrodo que consistiu em mergulhar o EPC na célula contendo a solução tampão de PBS de pH 4,6 e na aplicação de um potencial de + 1,80 V durante 180 s. De seguida, a etapa de deposição consistiu em mergulhar o EPC na solução de adenina com agitação constante, durante 240 s a um potencial de + 0,40 V. Finalmente, o EPC foi mergulhado na solução tampão PBS de pH 7,4 de modo a realizar a leitura por VOQ fazendo-se um varrimento de + 0,40 V a + 1,30 V (anexo B).

dA₂₀

O dA₂₀ é uma cadeia de ADN simples que contém grupos açúcar, grupos fosfato mas as suas bases são apenas adeninas e as ligações estabelecidas são glicosídicas (Figura 2.2).

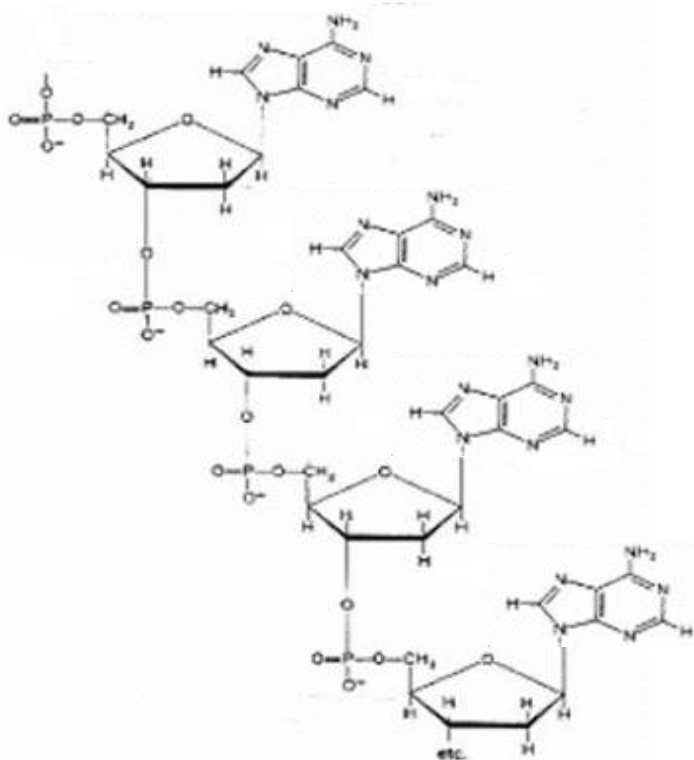


Figura 2.2: Esquema representativo de uma cadeia simples de adeninas.

A imobilização do dA₂₀ no EPC difere em algumas etapas da imobilização da adenina. Neste caso uma gota de 4,0 μ L de dA₂₀ foi colocada na superfície do EPC e posteriormente foi utilizada uma corrente suave de azoto para a secagem desta gota de modo a garantir que fique uniformemente adsorvida na superfície do EPC.

A leitura da i_p da oxidação do dA₂₀-EPC foi efetuada por varrimento em VOQ entre + 0,70 V e + 1,50 V, mergulhando o EPC em 10,0 mL de solução tampão de PBS de pH 7,4 (Anexo B).

Nota: As células foram mergulhadas em ácido nítrico 10% de um dia para o outro e no dia dos ensaios foram lavadas por água ultrapura e devidamente secas.

2.5.2. DANO OXIDATIVO NO MATERIAL BASEADO NO ADN

O estudo do dano oxidativo induzido por contaminantes na adenina e no dA₂₀ foi estudado na presença de vários contaminantes tais como PAH, H₂O₂, NO[•] e HClO.

O dano oxidativo provocado pelo PAH foi estudado recorrendo-se ao adenina-EPC enquanto o estudo do dano provocado pelo H₂O₂, NO[•] e HClO foi realizado sobre o dA₂₀-EPC.

2.5.2.1. DANO OXIDATIVO PROVOCADO POR PAH NA ADENINA

Neste estudo, foi utilizado uma solução PAH benzo (g,h,i) perileno de 21,0 mg/L, a partir da qual era preparada diariamente uma solução-mãe de 0,01 mg/L em água. Elaborou-se um plano de experiências para o contaminante benzo (g,h,i) perileno que consistiu em variar a concentração deste contaminante durante determinados períodos de tempo, conforme verificado na Tabela 2.3.

Tabela 2.3: Plano de experiência para o contaminante do benzo (g,h,i) perileno.

| [benzo (g,h,i) perileno] (x10 ⁻³ mg/L) | Tempo (s) |
|--|-----------|
| 0,1 | 5 |
| 1,0 | 60 |
| 0,1 | 60 |
| 1,0 | 5 |

As concentrações de benzo (g,h,i) perileno apresentadas na Tabela 2.3 foram preparadas a partir da solução-mãe de 0,01 mg/L em solução tampão de PBS de pH 7,4 para um volume total de 10,0 mL.

De modo a garantir a integridade da solução de benzo (g,h,i) perileno, esta solução foi guardada no frigorífico e devidamente selada.

Após a etapa de condicionamento (potencial + 1,80 V durante 180 s em solução tampão PBS pH 4,6) e a etapa de deposição (potencial +0,40 V durante 240 s), o EPC foi imerso num reator (volume total de solução 10,0 mL) contendo a solução de PAH durante o tempo estipulado com agitação regular.

A leitura da i_p após o dano oxidativo causado foi feita por VOQ, usando como eletrólito o tampão de PBS de pH 7,4 num intervalo de potencial de + 0,40 V a + 1,30 V (Anexo B).

2.5.2.2. DANO OXIDATIVO PROVOCADO POR H_2O_2 , NO^* E $HClO$ NO dA_{20}

Tal como se procedeu para o benzo (g,h,i) perileno, foi elaborado um plano de experiências para cada um dos contaminantes: H_2O_2 , NO^* e $HClO$ (Tabela 2.4).

Tabela 2.4: Plano de experiências para os contaminantes, H_2O_2 , NO^* e $HClO$.

| Concentração H_2O_2 ($\times 10^{-6}$ mol/L) | Concentração NO^* (mol/L) | FATORES DE DILUIÇÃO $HClO$ | Tempo (s) |
|--|--------------------------------|-------------------------------|-----------|
| 25 | $1,80 \times 10^{-3}$ | Concentrado | 5 |
| | | | 30 |
| | | | 60 |
| 50 | $1,80 \times 10^{-4}$ | 10x | 5 |
| | | | 30 |
| | | | 60 |
| 75 | $1,80 \times 10^{-5}$ | 100x | 5 |
| | | | 30 |
| | | | 60 |
| 100 | $1,80 \times 10^{-6}$ | 1000x | 5 |
| | | | 30 |
| | | | 60 |
| - | $1,80 \times 10^{-7}$ | - | 5 |
| | | | 30 |
| | | | 60 |

CONTAMINANTE H_2O_2

O primeiro contaminante estudado foi o H_2O_2 que foi preparado a partir da solução-mãe a 30% que corresponde a 9,0 mol/L.

As concentrações de H_2O_2 usadas no plano de trabalho (Tabela 2.4) foram preparadas a partir da solução de H_2O_2 de 0,009 mol/L (preparada diariamente) em solução tampão de PBS de pH 7,4.

PRODUÇÃO DO CONTAMINANTE NO[•]

Em relação ao contaminante NO[•] foi necessário criar um sistema experimental para a sua produção, conforme mostra a Figura 2.3. A produção de NO[•] foi efetuada diariamente e guardada no frigorífico, devidamente selada para evitar a reação com O₂ (g) do meio ambiente.

A Figura 2.3 apresenta o esquema de montagem para a produção de NO[•].

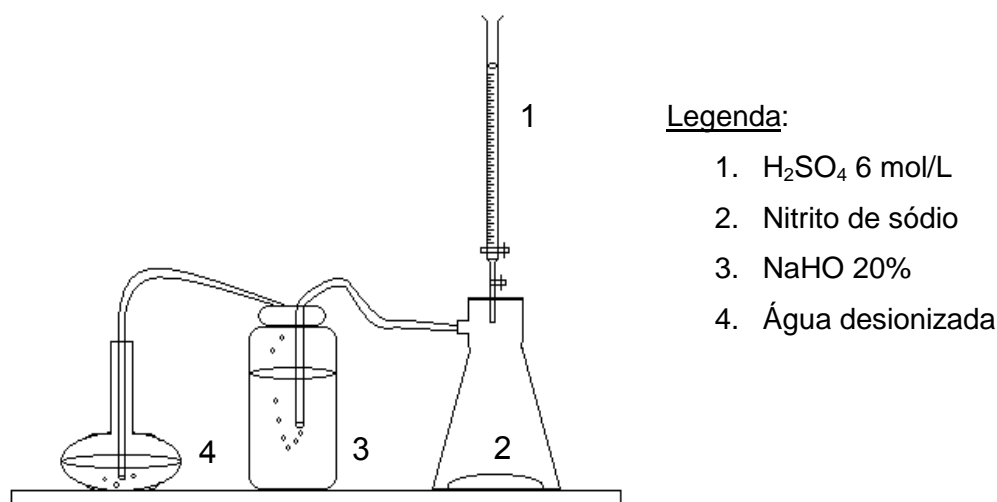


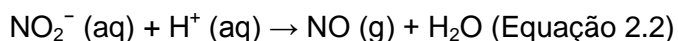
Figura 2.3: Esquema experimental de produção de NO[•].

A produção de NO[•] realizou-se na hotte, tendo-se colocado cerca de 22 g de nitrito de sódio sólido num kitasato, adicionando-se um pouco de água desionizada de forma a humedecer o sólido e tornar a reação menos violenta.

Antes da produção, propriamente dita de NO[•], foi necessário proceder à desoxigenação do sistema com uma corrente de azoto durante 1 hora. Esta etapa é necessária para minimizar a produção de NO_x a partir do ponto 3 (Figura 2.3) por reação do NO (g) com O₂ (g) presente no sistema (Equação 2.1).



Passada essa hora adicionou-se uma solução de ácido sulfúrico 6 mol/L da bureta para que o ácido caísse sobre a solução de nitrito de sódio a uma taxa de 7/8 gotas por minuto, formando NO (g) (Equação 2.2).



Para garantir uma solução saturada de NO^{\bullet} ($1,8 \times 10^{-3}$ mol/L) foi borbulhado NO (g) em, aproximadamente, 50,0 mL de água desionizada durante 1 hora. A corrente de NO (g) é purificada por borbulhamento num frasco com 20% de NaHO de forma a reter as outras espécies de NO_x formadas no sistema (Wang, 2006).

As concentrações de NO^{\bullet} utilizadas no estudo do dano oxidativo (Tabela 2.4) foram preparadas a partir da solução-mãe produzida de $1,8 \times 10^{-3}$ mol/L em solução tampão de PBS de pH 7,4.

CONTAMINANTE HClO

De acordo com a bibliografia (Sanchez-Moreno, 2002), o HClO pode ser produzido a partir de hipoclorito de sódio. Neste caso, o pH do hipoclorito de sódio foi ajustado com HCl a pH 5, de modo a converter o anião hipoclorito em ácido hipocloroso.

Neste caso, trabalhou-se com fatores de diluição. As diluições de HClO (Tabela 2.4) foram preparadas em solução tampão de PBS de pH 7,4.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DO ESTUDO DO DANO OXIDATIVO

Após a adsorção física de dA_{20} no EPC e da sua secagem com uma corrente suave de azoto, o dA_{20} -EPC foi imerso num reator (volume total de solução 10,0 mL) contendo o contaminante em estudo (H_2O_2 , NO^{\bullet} ou HClO) durante o tempo estipulado com agitação regular. No estudo do dano oxidativo provocado pelo NO^{\bullet} não foi utilizada agitação para não promover reação do NO^{\bullet} com o O_2 (g).

A leitura da i_p após o dano oxidativo causado por cada um dos contaminantes foi efetuada por VOQ em solução tampão de pH 7,4 por varrimento eletroquímico entre os potenciais de + 0,70 V e + 1,50 V (Anexo B).

2.5.3. EFEITO PROTETOR PROMOVIDO POR ANTIOXIDANTES

Para o estudo do efeito protetor promovido por antioxidantes no adenina-EPC e no dA_{20} -EPC recorreu-se ao AA. Foi elaborado um plano experimental para estudar o efeito protetor promovido pelo AA na presença de H_2O_2 e NO^{\bullet} (Tabela 2.5).

Tabela 2.5: Plano experimental do efeito protetor promovido pelo AA na presença de H₂O₂ e NO[•].

| [Contaminante] | [AA] (mg/L) | Tempo de incubação (s) |
|--|-------------|------------------------|
| H ₂ O ₂ (25x10 ⁻⁶ mol/L) | 1,0 | 30 |
| | 5,0 | |
| | 10,0 | |
| | 15,0 | |
| | 20,0 | |
| | 22,0 | |
| NO [•] (1,8x10 ⁻⁶ mol/L) | 1,0 | 30 |
| | 5,0 | |
| | 10,0 | |
| | 15,0 | |
| | 20,0 | |

Diariamente foram preparadas soluções-mãe de AA 100,0 mg/L, a partir da qual foram efetuadas diluições conforme consta na Tabela 2.5. Em relação às soluções dos contaminantes, estas foram preparadas conforme referido no ponto 2.5.2.2.

Após a construção do dA₂₀-EPC, este biossensor foi imerso num reator com volume total de solução de 10,0 mL durante o tempo estipulado. Neste reator as soluções foram colocadas com uma determinada ordem: primeiro foi colocada a solução tampão de SSPE 2x, seguido da solução de AA e finalmente, solução de contaminante (H₂O₂ ou NO[•]).

Passado o tempo de incubação estipulado, foi efetuada a leitura da *i_p* por VOQ em solução tampão de PBS de pH 7,4 num intervalo de potencial de + 0,70 V a + 1,50 V (Anexo B).

2.5.4. AMOSTRAS REAIS

Os métodos desenvolvidos foram aplicados na análise de amostras reais. Foram utilizadas diferentes amostras para os seguintes contaminantes H₂O₂ e NO[•]. Foi estudado o efeito protetor promovido pelos antioxidantes presentes em bebidas na presença do H₂O₂ e de NO[•].

2.5.4.1. AMOSTRAS DE CAFÉ

A aplicação do dA_{20} -EPC na análise de amostras reais na presença de H_2O_2 foi feita com amostras de café com diferentes formas de preparação. A Tabela 2.6 mostra o volume de café utilizado nos ensaios.

Tabela 2.6: Volume de café adicionado na presença de H_2O_2 para cada uma das amostras.

| Amostra | Tipo | Composição | | Tipo de bebida | Volume de café (μ L) | Tempo de incubação (s) | Concentração de H_2O_2 ($\times 10^{-06}$ mol/L) |
|---------|--------------|------------|---------|--------------------------|---------------------------|------------------------|---|
| | | Arábica | Robusta | | | | |
| 1 | Normal | x | x | | 50 | | |
| 2 | Normal | x | x | Café expresso (cápsulas) | 50 | 30 | 25 |
| 3 | Descafeinado | x | x | | 35 | | |
| 4 | Normal | x | - | Café de cafeteira | 50 | | |

Todas as amostras de café foram preparadas no momento de análise. Após a construção do dA_{20} -EPC, este foi imerso num reator com volume total de solução de 10,0 mL durante o tempo de incubação estipulado. Neste reator as soluções foram colocadas com uma determinada ordem: primeiro foi colocada a solução tampão de SSPE 2x, seguido da amostra de café e, finalmente, solução de H_2O_2 . Passado o tempo de incubação estipulado, foi feita a leitura da i_p em solução tampão de PBS de pH 7,4 num intervalo de potencial de + 0,70 V a + 1,50 V (Anexo B).

2.5.4.2. AMOSTRA DE SUMO E ÁGUA AROMATIZADA

A aplicação do dA_{20} -EPC na análise de amostras reais na presença de H_2O_2 e NO^* foi feita com uma amostra de sumo de laranja e uma amostra de água aromatizada de laranja com diferentes formas de preparação. A Tabela 2.7 mostra o volume de cada amostra utilizado nos ensaios para cada contaminante.

Tabela 2.7: Volume de cada amostra adicionada na presença de H_2O_2 e NO^{\cdot} .

| Amostra | Tipo de bebida | H_2O_2 | | NO^{\cdot} | | Tempo de incubação (s) |
|---------|------------------|--|-------------------|--|-------------------|------------------------|
| | | Concentração ($\times 10^{-6}$ mol/L) | Volume (μ L) | Concentração ($\times 10^{-6}$ mol/L) | Volume (μ L) | |
| 1 | Sumo | 25 | 750 | 1,8 | 500 | 30 |
| 2 | Água aromatizada | | 500 | | | |

O procedimento experimental foi semelhante ao descrito no ponto 2.5.4.1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentam-se os principais resultados obtidos no desenvolvimento de sensores baseados no ADN. A construção destes bioelétrodos baseou-se na imobilização de adenina ou de dA₂₀ na superfície de EPC. Os biossensores desenvolvidos foram aplicados na avaliação da CAT de matrizes alimentares.

3.1. CONSTRUÇÃO DO ADENINA-EPC

Conforme referido, numa primeira fase, foi utilizada uma solução de adenina para a construção do adenina-EPC. Foi necessário efetuar o condicionamento do EPC, deposição da adenina no EPC e posterior leitura eletroquímica do pico de oxidação da adenina.

Foi necessário a otimização de diferentes parâmetros como a concentração de adenina, E_c , E_d , t_c e t_d .

3.1.1. COMPORTAMENTO ELETROQUIMICO DO ADENINA-EPC

O estudo do comportamento eletroquímico da adenina imobilizada no EPC foi estudado por VOQ utilizando-se como eletrólito o PBS a pH 7,4. Conforme se pode visualizar na Figura 3.1 a adenina apresenta um processo oxidativo ao E_p de + 0,95 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 eletrólito utilizado e da sua força iónica e do tipo de transdutor utilizado (Barroso, et al., 2011c).

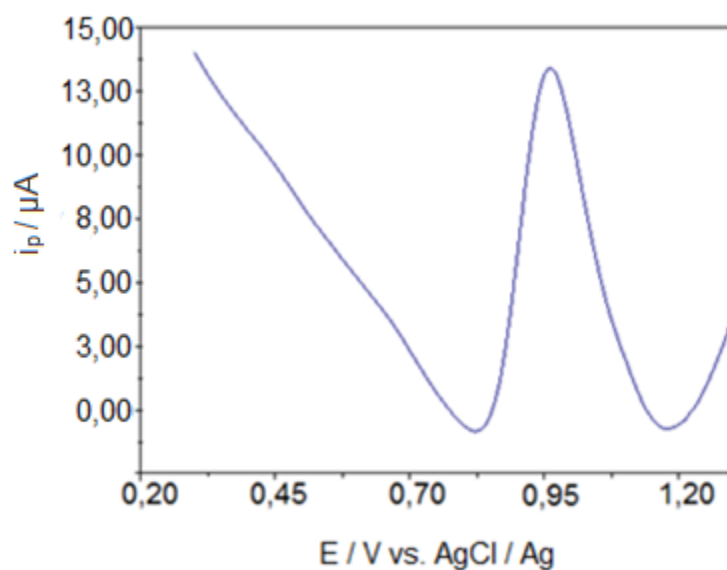


Figura 3.1: Voltamograma típico obtido para o adenina-EPC em solução tampão PBS pH 7,4.

3.1.2. OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ADENINA

De modo a otimizar e maximizar o sinal eletroquímico da oxidação da adenina foram efetuados vários ensaios para diferentes concentrações de adenina a variar entre 10,0 e 200,0 mg/L, tendo-se obtido os resultados apresentados na Figura 3.2.

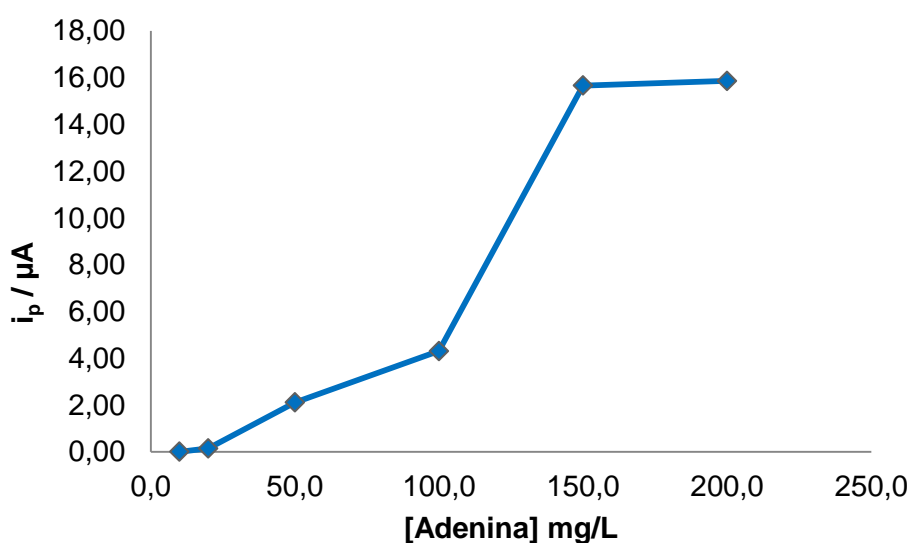


Figura 3.2: Variação da i_p em função da concentração de adenina-EPC. Os resultados são uma média de três ensaios independentes.

Verificou-se pelo gráfico da Figura 15 que a concentração ótima a utilizar de adenina foi de 150,0 mg/L uma vez que é possível observar que a partir desta concentração existe uma saturação no sinal eletroquímico medido.

3.1.3. OTIMIZAÇÃO DA ETAPA DE CONDICIONAMENTO E DA ETAPA DE DEPOSIÇÃO

A etapa de condicionamento é realizada de modo a tornar a superfície do EPC positiva, para que, na etapa da deposição da adenina, esta seja mais facilmente eletroimobilizada à superfície do EPC. Neste trabalho, o E_c foi estudado entre os potenciais de + 1,60 V e + 1,80 V usando-se concentrações de adenina de 150,0 e 200,0 mg/L.

De acordo com a Figura 3.3, as i_p medidas para os E_c aplicados e para as concentrações de adenina usadas, apresentam grandes diferenças nos sinais voltamétricos. Para um E_c de + 1,80 V as i_p obtidas são mais elevadas do que para as i_p obtidas quando se usou um E_c de + 1,60 V.

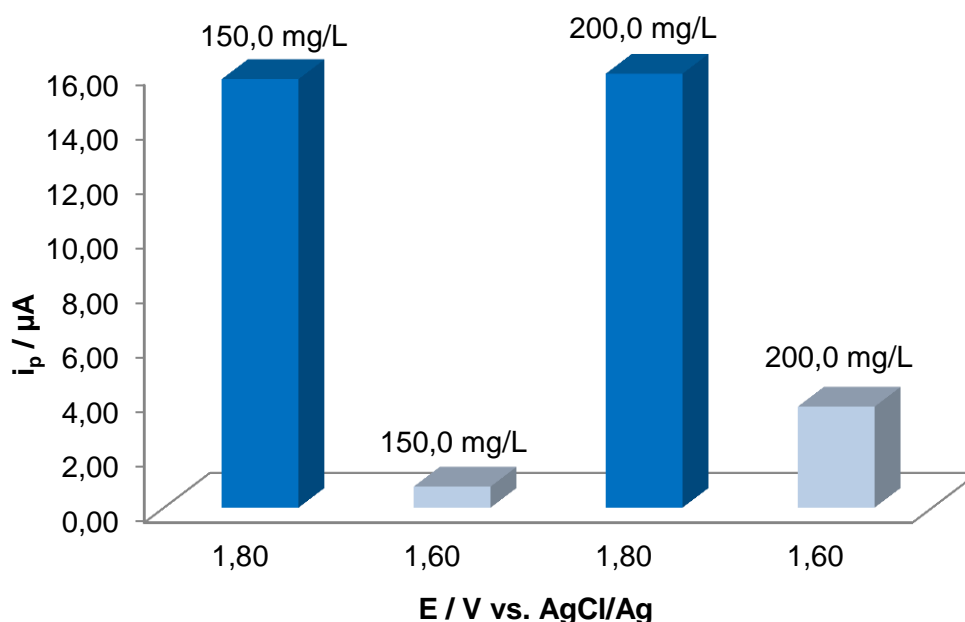


Figura 3.3: Otimização do potencial da etapa de condicionamento para as concentrações de adenina 150,0 mg/L e 200,0 mg/L. Os resultados são uma média de três ensaios independentes.

Assim sendo, foi utilizado, nos trabalhos seguintes, o E_c de + 1,80 V aplicado durante 180 s e usando-se como eletrólito o tampão PBS pH 4,6.

Na bibliografia encontra-se indicado a aplicação de um potencial de + 1,70 V durante 30 s (Barroso, et al., 2011e) mas, há que considerar que como os elétrodos de trabalho são diferentes, elétrodo de carbono vítreo e EPC, as condições experimentais também são diferentes.

Segundo a bibliografia, na etapa de deposição das bases púricas ao elétrodo de trabalho é aplicado um potencial de + 0,40 V durante 180 s para um elétrodo de carbono vítreo (Barroso, et al., 2011e). Mas, uma vez que no presente trabalho foi utilizado um EPC decidiu-se aumentar o tempo de deposição de 180 segundos para 240 s para o mesmo potencial de + 0,40 V.

As condições experimentais utilizadas durante os ensaios (concentração de adenina, E_c e E_d e t_c e t_d) estão descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Condições experimentais: concentração de adenina, E_c , E_p , t_c e t_d .

| [Adenina] = 150,0 mg/L | | | |
|-------------------------------|------------------------|------------------|------------------------------|
| Etapa | Condicionamento | Deposição | Leitura eletroquímica |
| Potencial (V) | 1,8 | 0,4 | + 0,40 a + 1,30 |
| Tempo (s) | 180 | 240 | - |

3.1.4. DANO OXIDATIVO INDUZIDO POR PAH

Com a otimização concluída, a próxima fase consistiu no estudo eletroquímico do dano oxidativo provocado por PAH (benzo (g,h,i) perileno) no adenina-EPC.

Com as condições de operação otimizadas (concentração de adenina, E_c , E_p , t_c e t_d .) fez-se um estudo muito preliminar do dano oxidativo que os PAH poderiam provocar na adenina através da variação da concentração do benzo (g,h,i) perileno com diferentes tempos de incubação.

Verificou-se que realmente existe dano oxidativo por parte do benzo (g,h,i) perileno, evidenciado pela diminuição da i_p do adenina-EPC, conforme mostra a Figura 3.4.

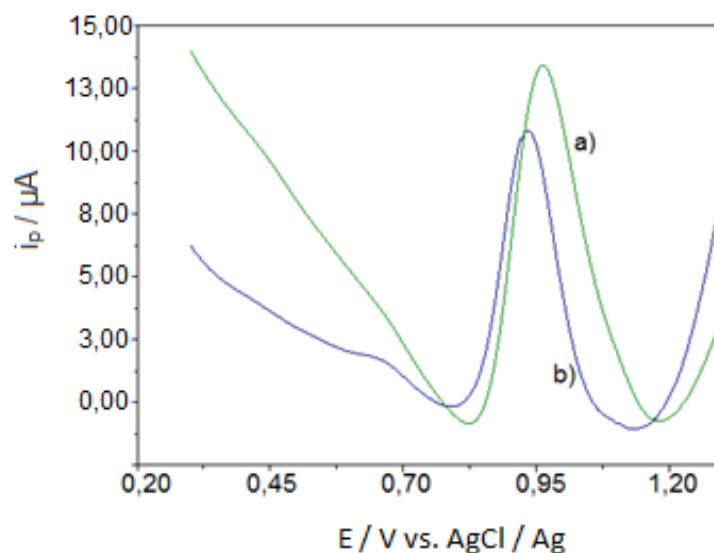


Figura 3.4: Voltamograma típico obtido em solução tampão PBS pH 7,4: a) imobilização da adenina (i_p máxima), b) imersão do adenina-EPC numa solução de benzo (g,h,i) perileno 0,1 $\mu\text{g/L}$ durante 60 segundos.

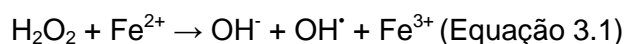
Esta diminuição foi sempre da mesma ordem de grandeza independentemente da concentração do benzo (g,h,i) perileno e do seu tempo de exposição como mostra a Tabela 3.2.

Tabela 3.2: i_p obtidas para o dano oxidativo induzido pelo benzo (g,h,i) perileno.

| [PAH] ($\mu\text{g/L}$) | Tempo (s) | $i_p \times 10^{-6}$ (A) |
|---------------------------|-----------|--------------------------|
| 0,1 | 5 | 1,51 |
| 1,0 | 60 | 1,75 |
| 0,1 | 60 | 1,82 |
| 1,0 | 5 | 1,97 |

Após a realização de vários ensaios não se conseguiu verificar que danos oxidativos eram provocados pelo benzo (g,h,i) perileno no adenina-EPC, tendo-se constatado haver necessidade de converter o benzo (g,h,i) perileno num radical por intermédio de uma reação prévia. Na literatura é referido que para obter este radical é necessário promover uma reação entre o PAH com o radical HO^\bullet gerado na reação de Fenton (Beltran, et al., 1998); (Jonsson, et al., 2007).

A reação de Fenton utiliza o peróxido de hidrogénio como oxidante, que é decomposto em radical hidroxilo, na presença de uma solução de ferro II (equação 3.1):



O radical hidroxilo é uma espécie altamente reativa que possui a capacidade de reagir de modo não seletivo com vários compostos orgânicos e inorgânicos, podendo reagir com o PAH em estudo de forma a convertê-lo num radical ou modificar a sua estrutura de alguma forma que seja a ideal para o presente trabalho (Beltran, et al., 1998); (Jonsson, et al., 2007).

Devido à necessidade de mais informação relativamente ao dano oxidativo promovido pelo benzo (g,h,i) perileno no adenina-EPC não foram efetuados estudos sobre o efeito protetor promovido por antioxidantes nem a aplicação sobre amostras reais.

A otimização da solução de adenina e o estudo do dano oxidativo causado pelo benzo (g,h,i) perileno indicaram que os valores obtidos de i_p não eram reprodutíveis o que conduziu à realização de testes adicionais.

Estes testes consistiram na realização de vinte ensaios consecutivos de imobilização de adenina e respetivas leituras das i_p .

Verificou-se que nesses vinte ensaios os resultados não eram de todo reprodutíveis e, para além disso, foram obtidos valores de i_p de diferentes ordens de grandeza. Suspeitou-se que existia perda de solução de adenina imobilizada para a solução tampão PBS de pH 7,4 aquando da leitura da i_p para além de existir oscilação da corrente elétrica que abastece o laboratório condicionando por isso a construção do bioelétrodo.

3.2. CONSTRUÇÃO DO dA₂₀-EPC

De modo a obter sinal eletroquímico mais reprodutível foi necessário seguir uma nova abordagem que consistiu na adsorção física de dA₂₀ na superfície do EPC, com posterior secagem com uma corrente suave de azoto e leitura da sua i_p em solução tampão PBS pH 7,4.

Nesta fase do estudo foi apenas otimizada a concentração de dA₂₀ a imobilizar no EPC.

3.2.1. OTIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE dA₂₀

Foram efetuados vários ensaios para diferentes concentrações de dA₂₀ a variar entre 25,0 e 620,0 mg/L tendo-se obtido os resultados apresentados na Figura 3.5.

Analisando a Figura 3.5, verificou-se que as i_p máximas foram obtidas para concentrações de dA₂₀ superiores a 300,0 mg/L.

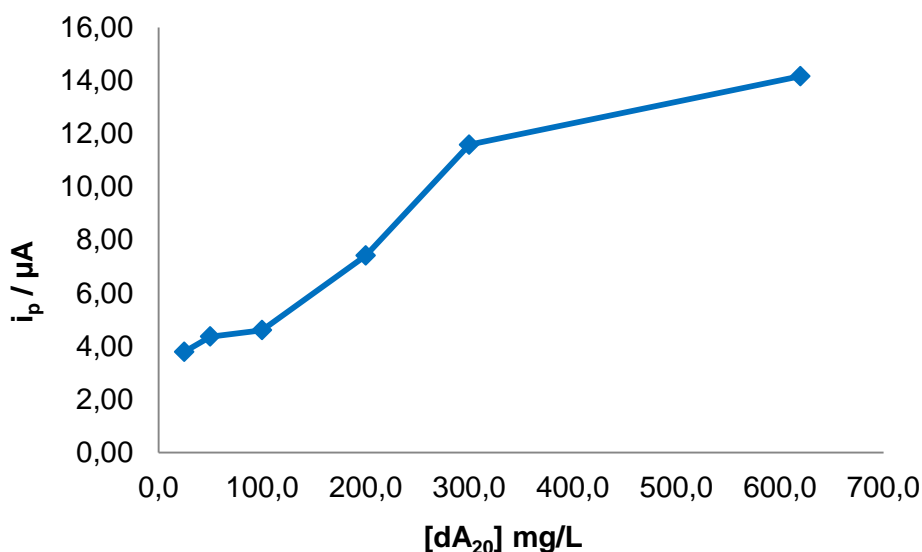


Figura 3.5: Variação da i_p de dA_{20} em função da concentração de dA_{20} . Os resultados são uma média de três ensaios independentes.

No entanto, foi escolhida uma concentração de dA_{20} de 100,0 mg/L uma vez que, não havia dA_{20} suficiente para a realização de todo o trabalho experimental. A colocação de uma gota de apenas 4 μ L na superfície do EPC foi, também, uma forma de economizar a solução de dA_{20} mas, que permite revestir completamente a superfície

O VOQ, apresentado na Figura 3.6, efetuado entre os potenciais de + 0,70 V e + 1,50 V em solução tampão de PBS de pH 7,4 indica que o E_p do dA_{20} -EPC rondava os + 1,2 V. Existe uma diferença entre o E_p do adenina-EPC e o E_p do dA_{20} -EPC. Essa diferença deve-se ao facto de no dA_{20} , a adenina estar ligada a um grupo fosfato e a um grupo açúcar (que faz aumentar o E_p) enquanto na solução de adenina está presente apenas adenina.

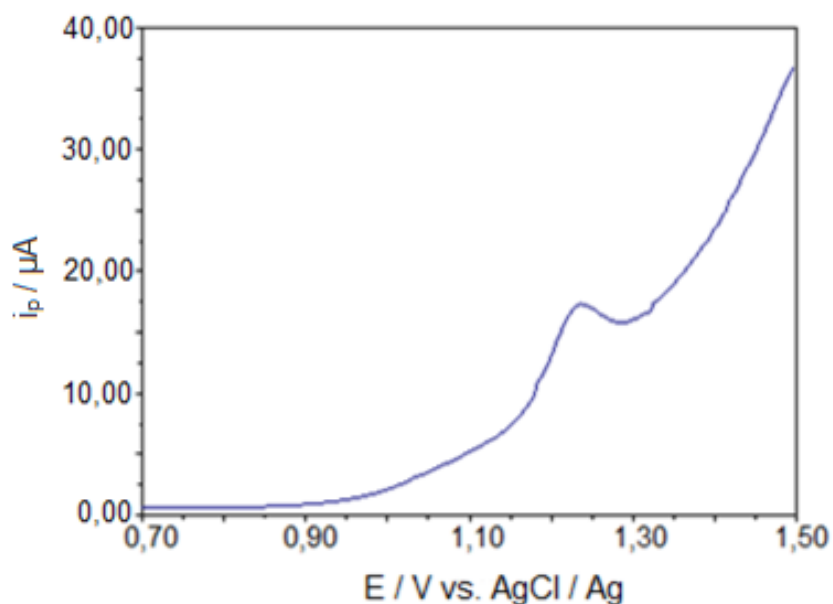


Figura 3.6: Voltamograma típico obtido para o dA₂₀-EPC em solução tampão PBS pH 7,4.

3.2.2. DANO OXIDATIVO INDUZIDO PELO H₂O₂ E EFEITO PROTETOR PROMOVIDO PELO AA

Este estudo baseia-se na aplicação do dA₂₀-EPC na avaliação da CAT de amostras reais na presença de H₂O₂. Para tal, foi estudado o dano oxidativo induzido no dA₂₀-EPC pelo H₂O₂ e o efeito protetor promovido pelo AA, na presença do H₂O₂, no dA₂₀-EPC.

Depois de construído o dA₂₀-EPC, foram induzidos danos oxidativos no biossensor. Electroquimicamente este fenómeno foi observado pela diminuição da i_p de oxidação do dA₂₀.

Foram estudadas várias concentrações de H₂O₂ (25-100 μM) em tempos de incubação (5, 30 e 60 s). Com o aumento da concentração de H₂O₂, a integridade do dA₂₀ diminui, confirmada pela diminuição da i_p . Na Tabela 3.3 são apresentadas as percentagens de dA₂₀ não danificadas obtidas neste estudo.

Tabela 3.3: Percentagens de dA₂₀ não danificadas na presença de diferentes concentrações de H₂O₂.

| Tempo de exposição (s) | % dA ₂₀ não danificada | | | |
|------------------------|---|-------|-------|-------|
| | [H ₂ O ₂]x10 ⁻⁶ mol/L | | | |
| | 25 | 50 | 75 | 100 |
| 0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| 5 | 52,84 | 44,82 | 40,75 | 28,07 |
| 30 | 46,16 | 29,21 | 16,71 | 11,99 |
| 60 | 33,04 | 9,6 | 8,76 | 5,04 |

Conforme se pode observar a percentagem de dano oxidativo (100% - % dA₂₀ não danificado) aumenta com o aumento do tempo de exposição e com o aumento de concentração de contaminante.

Na Figura 3.7, é possível visualizar voltamogramas do dA₂₀-EPC obtidos para concentrações de H₂O₂ crescentes e tempo de exposição de 30 s.

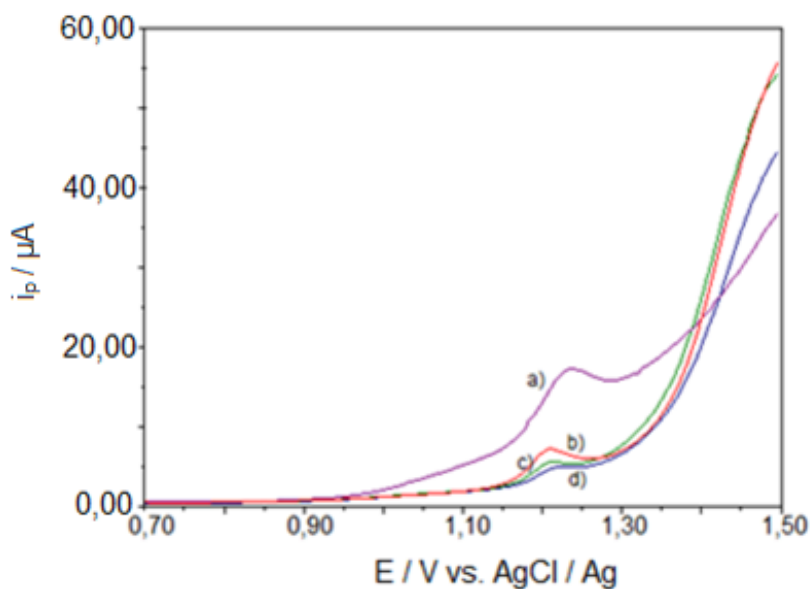


Figura 3.7: Voltamograma típico obtido em solução tampão PBS pH 7,4: a) dA₂₀-EPC (*i_p* máxima), b) H₂O₂ 25 µM, c) H₂O₂ 50 µM e d) H₂O₂ 75 µM.

Se analisarmos o tempo de exposição para cada uma das concentrações de H₂O₂ também se confirma a existência de dano oxidativo. Para uma mesma concentração é possível observar a

diminuição da i_p do dA_{20} -EPC com o aumento do tempo de incubação do H_2O_2 ao biossensor, Figura 3.8.

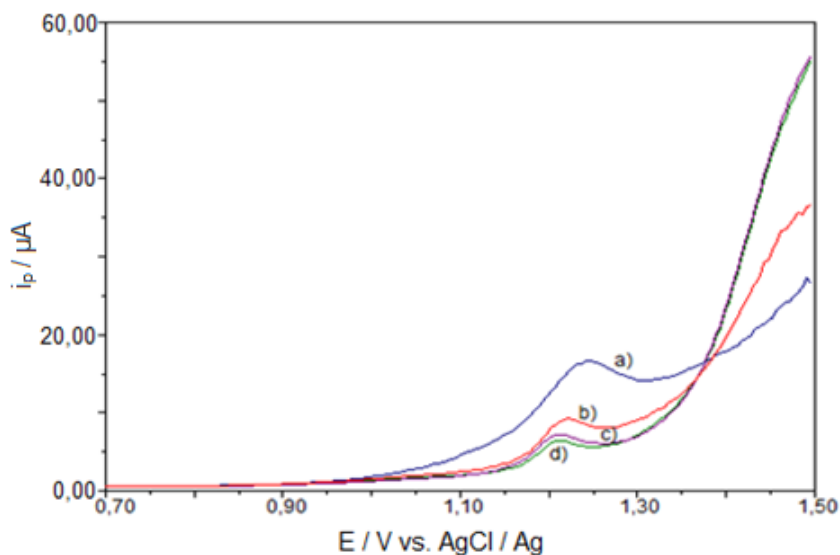


Figura 3.8: Voltamograma típico a) dA_{20} -EPC (i_p máxima), b) 5 s, c) 30 s e d) 60 s.

A Figura 3.9 mostra a variação da i_p do dA_{20} -EPC com os tempos de incubação para cada uma das concentrações de H_2O_2 utilizadas.

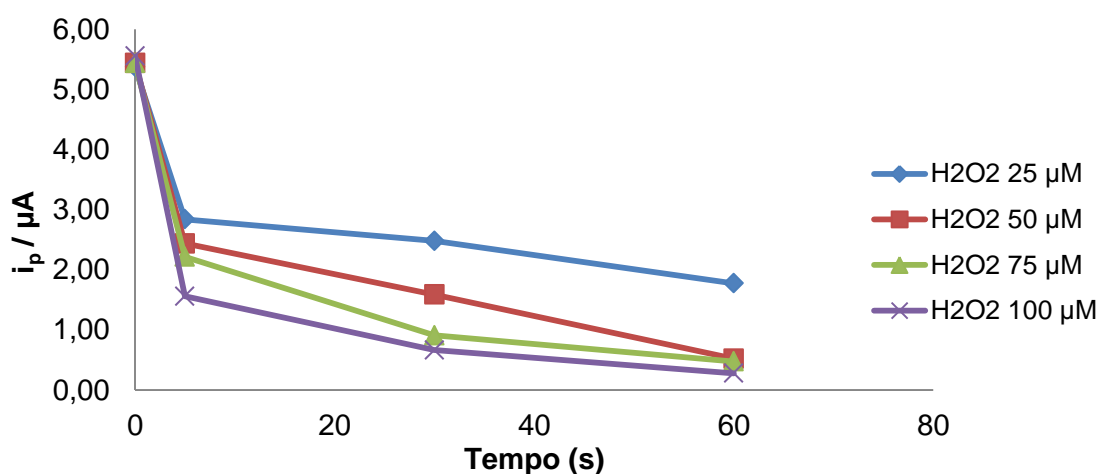


Figura 3.9: Influência do tempo de incubação, a diferentes concentrações de H_2O_2 , na i_p do dA_{20} -EPC. Os resultados são uma média de três ensaios independentes.

Para a realização do estudo do efeito protetor promovido pelo AA na presença do H_2O_2 foi escolhida a concentração de H_2O_2 de 25 μM e um tempo de incubação de 30 s. Esta escolha baseou-se na análise e comparação das i_p obtidas neste estudo. O tempo de 5 s é demasiado

curto para se conseguir controlar devidamente o ensaio experimental enquanto para 60 s o dano oxidativo foi quase total pois as i_p são demasiado baixas. Assim sendo, optou-se pelo tempo de incubação, de 30 s.

Em relação à concentração de H_2O_2 , foi escolhida a concentração 25 μM , pois a i_p obtida permite efetuar estudos de proteção ao dano oxidativo, conforme se pode verificar na Figura 3.9.

Para realizar o estudo de proteção ao dano oxidativo, é necessário ter uma boa amplitude de intensidade de corrente entre o sinal da imobilização de dA_{20} e a i_p do dano oxidativo para que seja possível verificar, mais tarde, o aumento da i_p obtida do dA_{20} por efeito protetor promovido pelo AA quando na presença de H_2O_2 .

O estudo do efeito protetor promovido pelo AA na presença de H_2O_2 foi realizado usando concentrações a variar entre 1,0 e 22,0 mg/L de AA na presença de H_2O_2 25 μM durante 30 s. A Figura 3.10 mostra os voltamogramas obtidos quando se usaram concentrações crescentes de AA.

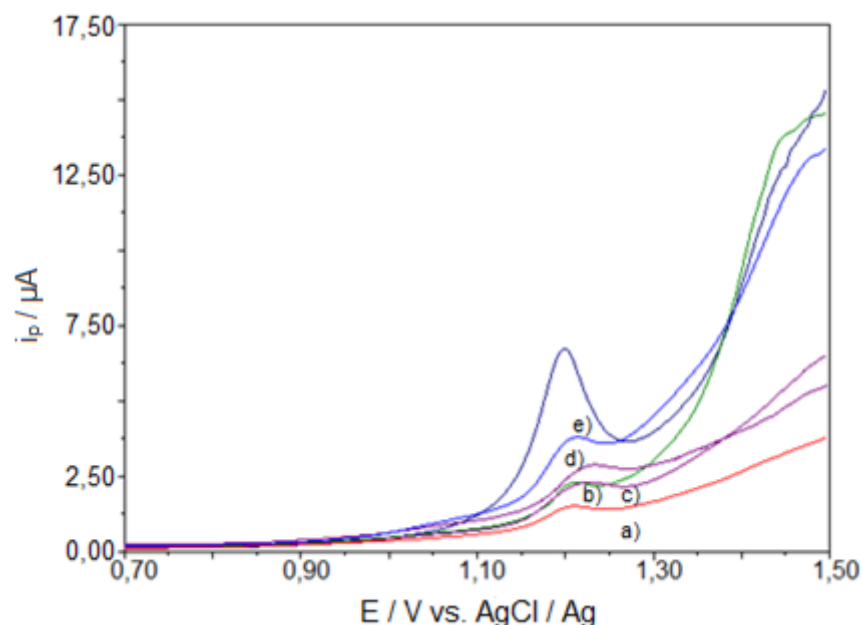


Figura 3.10: Voltamograma típico obtido após imersão do dA_{20} -EPC em H_2O_2 contendo uma solução de AA de concentração: a)1,0; b)5,0; c)10,0; d)15,0; e)20,0 mg/L.

Para o estudo do efeito protetor promovido pelo AA no dA_{20} -EPC foram construídas três curvas de calibração de modo a avaliar a reprodutibilidade do método (Anexo C, Tabela C.1).

Conforme esperado, a i_p aumenta com o aumento da concentração de AA, como mostra a Figura 3.11, tendo-se obtido um coeficiente de determinação $r^2 = 0,9937$.

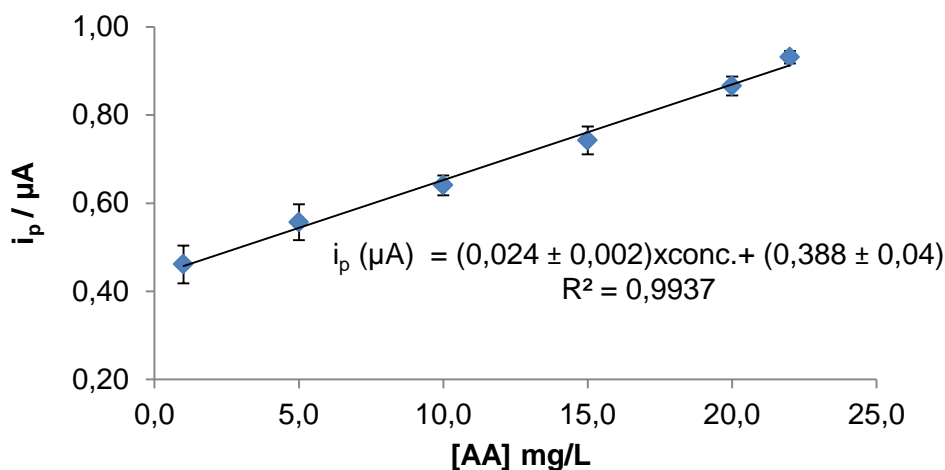


Figura 3.11: Curva de calibração para o AA.

3.2.2.1. APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR A AMOSTRAS REAIS

A metodologia desenvolvida foi aplicada para avaliar a CAT de amostras de café, sumo e água aromatizada.

A CAT obtida para as diferentes amostras de café analisadas variou entre 5,3 e 10,6 mg AA/g café (Tabela 3.4). Os valores mais elevados pertencem a cafés expresso (amostras 1, 2 e 3). Estas amostras eram compostas por misturas de café arábica e robusta. Quanto à amostra 4 verificou-se que possuía a CAT mais baixa o que provavelmente se devia à sua constituição, 100% arábica.

Tabela 3.4: Valores de CAT obtidos para amostras de café.

| Amostra | CAT | |
|---------|-----------------|------------|
| | (mg AAE/g café) | (mg AAE/L) |
| n° | | |
| 1 | 9.6 ± 1.5 | 1337 ± 206 |
| 2 | 8.2 ± 1.5 | 1150 ± 212 |
| 3 | 10.6 ± 0.4 | 1488 ± 51 |
| 4 | 5.3 ± 1.1 | 1130 ± 230 |

As diferenças obtidas nos resultados apresentados na Tabela 3.4 podem ser explicadas pela presença de compostos antioxidantes bastante conhecidos no café robusta. Este contém grandes quantidades de compostos fenólicos totais e o dobro da cafeína do café arábica (Alves, et al., 2009).

Contudo, as formas de preparação das amostras têm que ser levadas em conta. Conforme referido, as amostras 1, 2 e 3 são amostras de café expresso e a amostra 4 é uma amostra de café de cafeteira. Na preparação de um café expresso, a extração dos compostos presentes na matriz do café é incompleta devido ao contato relativamente curto entre a água e a cápsula do café, enquanto na preparação do café de cafeteira, a extração dos compostos do café é mais extensa conduzindo a uma amostra mais concentrada e representativa. Analisando a CAT expressa em mg AA/L verifica-se que não existem diferenças significativas entre todas as amostras.

Com este estudo confirmou-se que os antioxidantes existentes em amostras de café têm efeito protetor, ao dano oxidativo, no dA_{20} -EPC.

A CAT obtida para a amostra de sumo de laranja (amostra 1) e para a amostra de água aromatizada de laranja (amostra 2) é apresentada na Tabela 3.5.

Tabela 3.5: Valores de CAT obtidos para amostras de sumo e água aromatizada.

| Amostra | CAT |
|----------------|-------------------|
| nº | (mg AAE/L) |
| 1 | 775 ± 130 |
| 2 | 110 ± 13 |

O valor mais elevado de CAT pertence à amostra 1 (sumo concentrado de laranja), conforme era de esperar, pois a amostra 2 é comercialmente mais diluída do que a amostra 1.

Analisando as Tabelas 3.4 e 3.5 verifica-se que o café e as amostras de bebidas apresentam CAT, podendo contribuir para reforçar o sistema de defesa antioxidante exógeno.

Comparando os teores de CAT obtidos para o café (Tabela 3.4) e para as bebidas (Tabela 3.5) verifica-se que as amostras de café apresentam valores mais altos de CAT (1130-1488 mg AAE/L) do que as amostras de bebidas (110 mg AAE/L em água aromatizada e 775 mg AAE/L

em sumo). Esta diferença de valores é devido ao facto do café ter uma composição (qualitativa e quantitativa) em antioxidantes diferente às bebidas.

3.2.3. DANO OXIDATIVO INDUZIDO PELO NO[•] E EFEITO PROTETOR PROMOVIDO PELO AA

Nesta parte do trabalho, utilizou-se o biossensor desenvolvido para estudar que tipo de danos oxidativos são induzidos pelo radical livre NO[•] no dA₂₀. Posteriormente foi estudado o efeito do AA na proteção do dA₂₀ ao dano oxidativo. O método desenvolvido foi aplicado na avaliação da CAT em amostras de sumo e água aromatizada.

O dano oxidativo foi estudado para várias concentrações de NO[•] ($1,8 \times 10^{-3}$, $1,8 \times 10^{-4}$, $1,8 \times 10^{-5}$, $1,8 \times 10^{-6}$ e $1,8 \times 10^{-7}$ mol/L) durante vários tempos de exposição (5, 30 e 60 s). Na Tabela 3.6 são apresentadas as percentagens de dA₂₀ não danificadas de acordo com a concentração de NO[•] em estudo e o respetivo tempo de incubação.

Tabela 3.6: Percentagens de dA₂₀ não danificadas na presença de diferentes concentrações de NO[•].

| Tempo de exposição (s) | % dA ₂₀ não danificada | | | | |
|------------------------|-----------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | [NO [•]] mol/L | | | | |
| | $1,8 \times 10^{-3}$ | $1,8 \times 10^{-4}$ | $1,8 \times 10^{-5}$ | $1,8 \times 10^{-6}$ | $1,8 \times 10^{-7}$ |
| 0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |
| 5 | 37,21 | 21,43 | 63,29 | 78,94 | 51,2 |
| 30 | 64,19 | 8,37 | 25,82 | 53,26 | 36,12 |
| 60 | 81,86 | 2,49 | 7,58 | 18,32 | 31,01 |

Analisando a Tabela 3.6 é possível observar a percentagem de dano oxidativo (100% - % dA₂₀ não danificado). Excetuando a concentração de $1,8 \times 10^{-3}$ mol/L em NO[•], é possível observar a diminuição da percentagem de dA₂₀ não danificado com o aumento do tempo de incubação, isto é, para a mesma concentração de NO[•] à medida que o tempo de exposição do NO[•] aumenta, o dano oxidativo aumenta e, portanto, a *i_p* diminui. À medida que a concentração de NO[•] aumenta, a percentagem de dano oxidativo aumenta como seria de esperar, exceto para a concentração $1,8 \times 10^{-7}$ mol/L para os tempos de incubação de 5 e 30 s (51,20% e 36,12%, respetivamente).

Em relação à concentração $1,8 \times 10^{-3}$ mol/L, observou-se o oposto do esperado, isto é, com o aumento do tempo de incubação a percentagem de dA_{20} não danificado aumenta. Estes ensaios foram repetidos várias vezes para confirmar se efetivamente o sistema tinha esse comportamento. Com a repetição chegou-se à conclusão que a concentração de NO^{\bullet} é tão elevada que torna o sistema irreprodutível.

Para uma mesma concentração é possível observar a diminuição da i_p do dA_{20} -EPC com o aumento do tempo de incubação do NO^{\bullet} ao biossensor, Figura 3.12.

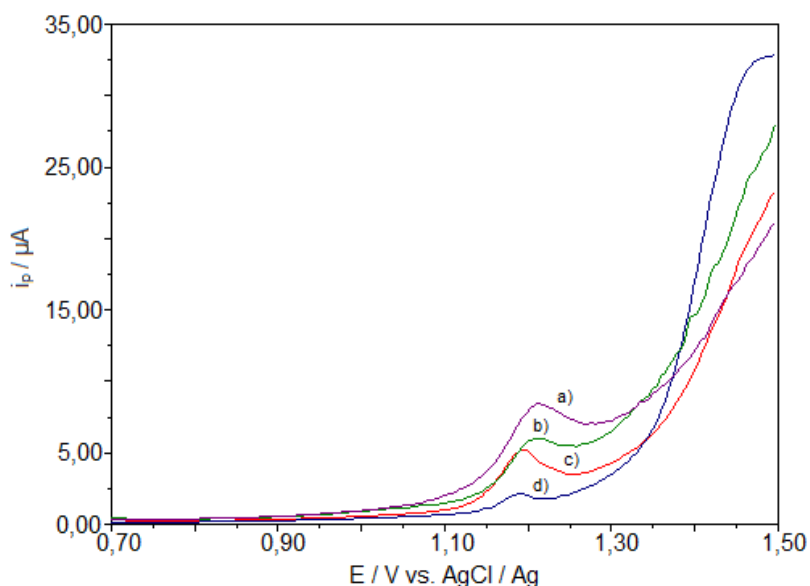


Figura 3.12: Voltamograma típico a) dA_{20} -EPC (i_p máxima), b) 5 s, c) 30 s e d) 60 s.

Na Figura 3.13, é possível observar a diminuição da i_p do dA_{20} com o aumento do tempo de incubação e de concentração de NO^{\bullet} .

Para efetuar o estudo do efeito protetor promovido pelo AA na presença do NO^{\bullet} , foi escolhida a concentração de NO^{\bullet} de $1,8 \times 10^{-6}$ mol/L durante 30 s.

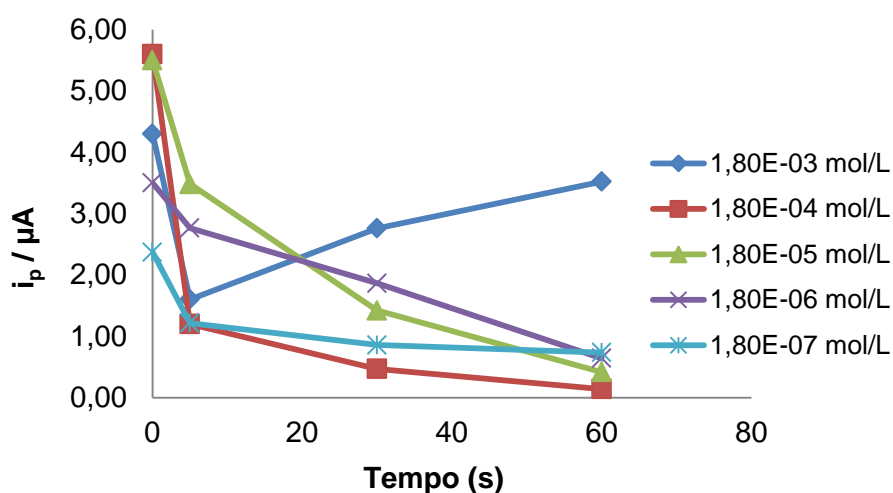


Figura 3.13: Influência do tempo de incubação de NO^\bullet , a diferentes concentrações, na i_p de dA_{20} -EPC. Os resultados são uma média de três ensaios independentes.

De modo semelhante ao que aconteceu ao H_2O_2 , o tempo de 5 s não é o ideal por ser demasiado curto para ser devidamente controlado enquanto os 60 s são demasiado longos e provoca um dano oxidativo quase total, tendo-se por isso optado por um tempo de incubação de 30 s.

Quanto à escolha da concentração de NO^\bullet , decidiu-se pela concentração de $1,8 \times 10^{-6}$ mol/L pois apresentou uma boa amplitude de trabalho entre a i_p da imobilização de dA_{20} e a i_p obtida após o dano oxidativo promovido pelo NO^\bullet .

Com as condições experimentais do dano oxidativo escolhidas, passou-se para o estudo do efeito protetor promovido pelo AA na presença de NO^\bullet . Foram utilizadas as concentrações de AA de 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 mg/L na presença de $1,8 \times 10^{-6}$ mol/L de NO^\bullet durante 30 s (Figura 3.14).

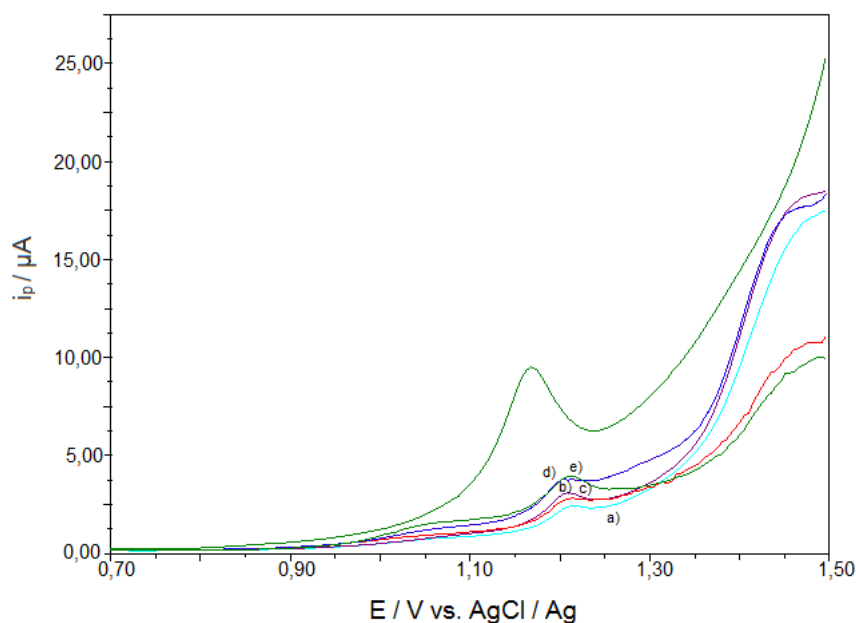


Figura 3.14: Voltamograma típico obtido após imersão do dA₂₀-EPC em NO³⁻ contendo uma solução de AA de concentração: a)1,0; b)5,0; c)10,0; d)15,0; e)20,0 mg/L.

Foram construídas três curvas de calibração de i_p obtida em função da concentração de AA de forma a avaliar a reprodutibilidade para cada uma das concentrações de antioxidante na presença de NO[•] (Anexo C, Tabela C.2).

Conforme esperado, a i_p aumenta com o aumento da concentração de AA, como mostra a Figura 3.15. Para além disso, foi obtido um coeficiente de determinação $r^2 = 0,9881$.

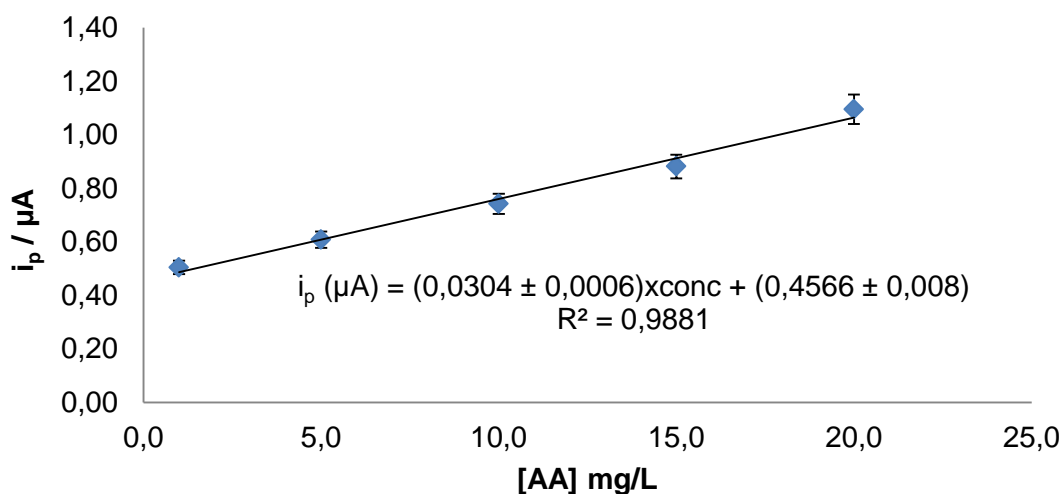


Figura 3.15: Curva de calibração do AA.

3.2.3.1. APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR A AMOSTRAS REAIS

Este método foi aplicado na avaliação da CAT de amostras reais (sumo e água aromatizada).

A CAT obtida para a amostra de sumo (amostra 1) e para a amostra de água aromatizada (amostra 2) é apresentada na Tabela 3.7.

Tabela 3.7: Valores de CAT obtidos para amostras de sumo e água aromatizada.

| Amostra | CAT |
|----------------|------------------|
| nº | (mg AA/L) |
| 1 | 526 ± 310 |
| 2 | 172 ± 10 |

O valor mais elevado de CAT (526 mg AA/L) pertence à amostra 1, conforme era de esperar, pois sendo a amostra 1 um sumo concentrado apresenta um teor de antioxidantes mais elevado.

3.2.4. DANO OXIDATIVO INDUZIDO PELO HClO

Este estudo baseia-se na aplicação do dA₂₀-EPC na avaliação do dano oxidativo induzido pelo HClO.

Depois de construído o dA₂₀-EPC, foram induzidos danos oxidativos no biossensor. Electroquimicamente este fenómeno foi observado pela diminuição da *i_p* de oxidação do dA₂₀.

Foram estudados diferentes fatores de diluição (10x, 100x e 1000x) em tempos de incubação (5, 30 e 60 s) e foram confirmadas as alterações esperadas. Com a diminuição do fator de diluição, a integridade do dA₂₀ diminui, confirmada pela diminuição da *i_p*. Foram, também, efetuados ensaios sem qualquer diluição. Na Tabela 3.8 são apresentadas as percentagens de dA₂₀-EPC não danificadas obtidas neste estudo.

Tabela 3.8: Percentagens de dA₂₀ não danificada na presença de diferentes percentagens de HClO.

| Tempo de exposição (s) | % dA ₂₀ não danificada | |
|------------------------|-----------------------------------|-------|
| | Fator diluição HClO 100x | 1000x |
| 0 | 100,0 | 100,0 |
| 5 | 48,12 | 50,00 |
| 30 | 19,84 | 31,12 |
| 60 | 7,30 | 15,23 |

Através da Tabela???, observa-se que a percentagem de dano oxidativo (100% - % dA₂₀ não danificado) aumenta com o aumento do tempo de exposição e com o aumento de concentração de contaminante.

Em relação aos ensaios com HClO concentrado e com fator de diluição de 10x, obtiveram-se voltamogramas sem sinal eletroquímico. Esta situação deve-se ao facto das concentrações de HClO serem tão elevadas que conduzem a um dano oxidativo total.

Para uma mesma concentração é possível observar a diminuição da i_p do dA₂₀-EPC com o aumento do tempo de incubação do biossensor ao contaminante HClO (Figura 3.16).

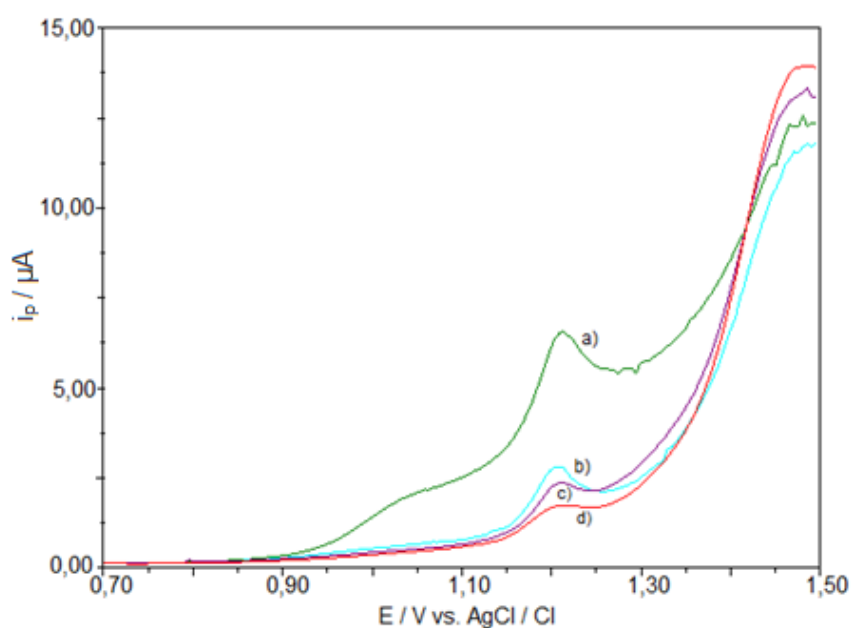


Figura 3.16: Voltamograma a) dA₂₀-EPC (i_p máxima), b) 5 s, c) 30 s e d) 60 s.

A Figura 3.17 mostra a variação da i_p do dA_{20} -EPC com os tempos de incubação para cada uma das concentrações de HClO utilizadas.

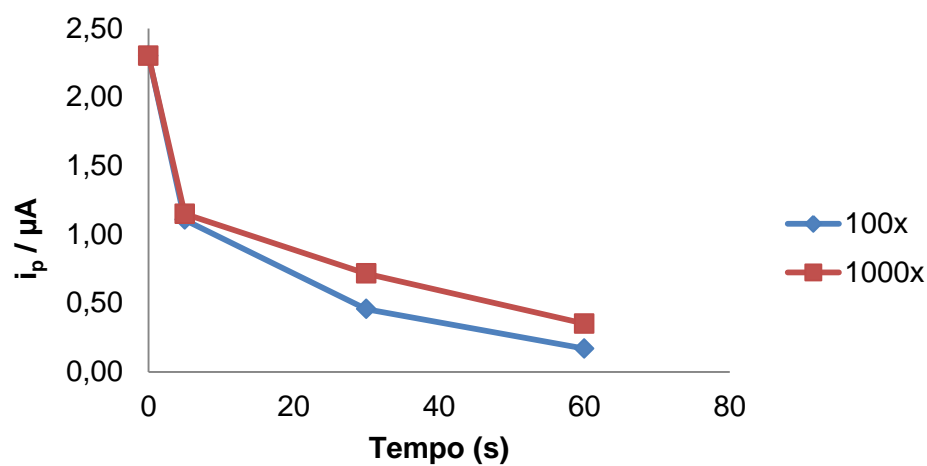


Figura 3.17: Influência do tempo de incubação para diferentes concentrações de HClO na i_p do dA_{20} -EPC. Os resultados são uma média de três ensaios independentes.

4. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo o estudo eletroquímico do dano oxidativo induzido por contaminantes (PAH, H_2O_2 , NO^\bullet e $HClO$) e o efeito protetor, ao dano oxidativo, promovido por antioxidantes no material baseado no ADN recorrendo à utilização de um biossensor de bases púricas, adenina-EPC e dA_{20} -EPC, utilizando a VOQ como técnica de deteção.

Inicialmente, foi utilizada uma abordagem que consistiu na utilização de uma solução de adenina e abrangia três etapas: i) condicionamento do EPC, ii) deposição da adenina no EPC e iii) leitura de sinal eletroquímico. Para tal, foram otimizados vários parâmetros, concentração de adenina, E_c , E_d , t_c e t_d . Estes parâmetros foram otimizados de modo a serem obtidas i_p maximizadas. Assim, constatou-se que as condições ótimas foram as seguintes: concentração de adenina 150,0 mg/L, $E_c + 1,80$ V, $E_d + 0,40$ V, t_c de 180 s e t_d de 240 s.

O dano oxidativo provocado pelo PAH benzo (g,h,i) perileno foi estudado sobre o adenina-EPC. Segundo a bibliografia, constatou-se que era necessário converter o benzo (g,h,i) perileno num radical por intermédio da reação química entre o PAH e o radical HO^\bullet gerado na reação de Fenton para se conseguir observar danos oxidativos induzidos no adenina-EPC.

Uma nova abordagem de construção do biossensor consistiu na imobilização de uma gota de dA_{20} na superfície do EPC, seguida da sua secagem e leitura da i_p . Foi necessário efetuar a otimização da concentração de dA_{20} . De modo semelhante à otimização da concentração de adenina, verificou-se que as i_p eram elevadas para concentrações superiores a 300,0 mg/L contudo, foi utilizada a concentração de dA_{20} de 100,0 mg/L para economizar solução para a realização de todo o trabalho experimental.

Após a construção do dA_{20} -EPC, este foi aplicado no estudo do dano oxidativo provocado pelo H_2O_2 , NO^\bullet e $HClO$ no material baseado no ADN. Constatou-se que estes três contaminantes induziam dano oxidativo no dA_{20} -EPC.

O estudo do efeito protetor promovido por antioxidantes no dA_{20} -EPC foi efetuado recorrendo ao AA e confirmou-se que este tem a capacidade de proteger o material baseado em ADN do dano oxidativo induzido por H_2O_2 e NO^\bullet .

O dA_{20} -EPC foi aplicado na avaliação da CAT em várias amostras reais na presença de H_2O_2 e de NO^\bullet .

Compararam-se valores de CAT obtidos para diferentes amostras reais (café, sumo de laranja e água aromatizada de laranja) na presença de H_2O_2 e constatou-se que as amostras de café apresentam valores mais elevados de CAT (1130-1488 mg AAE/L) do que as amostras de bebidas (110 mg AAE/L em água aromatizada e 775 mg AAE/L em sumo).

Valores de CAT obtidos para amostras de sumo e água aromatizada na presença de NO^{\bullet} indicam que a amostra de sumo possui maior teor de CAT (526 mg AAE/L) conforme era esperado, do que a amostra de água aromatizada (172 mg AAE/L).

4.1. TRABALHOS FUTUROS

Futuramente, o dano oxidativo provocado pelo PAH (benzo (g,h,i) perileno) no dA_{20} -EPC deverá ser estudado após a sua reação com o radical HO^{\bullet} gerado na reação de Fenton, deverão ser efetuados estudos sobre o efeito protetor promovido por antioxidantes e a aplicação sobre amostras reais.

Deverão ser analisados mais antioxidantes, para além do AA, na presença dos diferentes contaminantes (PAH, H_2O_2 , NO^{\bullet} e HClO) de modo a ser possível a comparação entre as CAT de cada antioxidante.

A aplicação do biossensor na avaliação de CAT deverá ser efetuada numa maior variedade de amostras reais na presença dos diferentes contaminantes.

BIBLIOGRAFIA

Agnihotri, N. & Mishra, P. C., 2011. Reactivities of radicals of adenine and guanine towards reactive oxygen species and reactive nitrogen oxide species: OH. and NO₂.. *Chemical Physics Letters*, pp. 503(2011): 305-309.

Alves, R., Casa, S. & Oliveira, B., 2009. Health benefits of coffee: myth or reality?. *Quimica Nova*, pp. 2169-2180.

Aust, A. & Eveleigh, J., 1999. Mechanisms of DNA oxidation. *Society for Experimental Biology and Medicine*, p. 222(1999).

Barroso, M., Delereu-Matos, C. & Oliveira, M., 2011d. Electrochemical evaluation of total antioxidant capacity of beverages using a purine-biosensor.. *Food Chemistry*, pp. 132(2012): 1055-1062.

Barroso, M. F., Delereu-Matos, C. & Oliveira, M. B., 2011c. Electrochemical DNA-sensor for evaluation of total antioxidant capacity of flavours and flavoured waters using superoxide radical damage. *Biosensors and Bioelectronics*, pp. 26(2011): 3748-3754.

Barroso, M. F., Delereu-Matos, C. & Oliveira, M. B., 2011e. Evaluation of the total antioxidant capacity of flavored water and electrochemical purine damage by sulfate radicals using a purine-bases sensor.. *Electrochimica Acta*, pp. 56(2011): 8954-8961.

Barroso, M. F., de-los-Santos-Álvarez, N., Delereu-Matos, C. & Oliveira, M. B., 2011b. Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation: Electrochemical (bio)sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, pp. 30(2011): 1-12.

Barroso, M. F. et al., 2011a. Electrocatalytic evaluation of DNA damage by superoxide radical for antioxidant capacity assessment. *Electroanalytical Chemistry*, pp. 659(2011): 43-49.

Beltran, F., Gonzalez, M., Rivas, F. & Alvarez, P., 1998. Fenton reagent advanced oxidation of polynuclear aromatic hydrocarbons in water. *Water, Air and Soil Pollution*, pp. 105: 685-700.

Galvin, D. P. et al., 2005. Sublimation extraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry: a new technique for future in situ analyses of purines and pyrimidines on mars.. *Planetary and Space Science*.

Infoescola, 2013. *Infoescola.com*. [Online]

Available at: <http://www.infoescola.com/biologia/dna/>

[Acedido em 26 Setembro 2013].

Jonsson, S. et al., 2007. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils by fenton reagent: a multivariate evaluation of the importance of soil characteristics and PAH properties.. *Journal of Hazardous Materials*, pp. 149(2007): 86-96.

Karawita, R., Siriwardhana, N. & Lee, K., 2004. Reactive oxygen species scavenging metal chelation, reducing power and lipid peroxidation inhibition properties of different solvent fractions from *Hizikia fusiformis*. *Eur Food Res Technol*, pp. 220(2005): 363-371.

Kohen, R. & Nyska, A., 2002. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicology Pathology*, p. (2002) 30:620.

Macherey-Nagel, c., 1998. *Solid phase extraction*. s.l.:Sigma Aldrich.

Molyneux, P., 2004. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, pp. 26(2004): 211-219.

Ohshima, H., 2002. Genetic and epigenetic damage induced by reactive nitrogen species: implications in carcinogenesis.. *Toxicology Letters*, pp. 140-141 (2003): 99-104.

Porgali, E. & Buyultuncel, E., 2011. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometric methods. *Food Research International*, pp. 45(2012): 145-154.

Prior, R., Wu, X. & Schaich, K., 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolic in foods and dietary supplements.. *J. Agric. Food Chem*, pp. 53(2005): 4290-4302.

Ramalhosa, M. J., Morais, S., Delereu-Matos, C. & Oliveira, M. B., 2011a. *Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons and seafood safety*.. Porto: Jaroslava Scarc-Gajjiae.

Ramalhosa, M. J. et al., 2011b. Polycyclic aromatic hydrocarbons levels in three pelagic fish species from atlantic ocean: inter specific and inter-season comparisons and assessment of potential public health risks. *Food and chemical toxicology*, pp. 50(2012): 162-167.

Ramalhosa, M. J. et al., 2011c. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish: optimisation and validation of microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, pp. 135(2012): 234-242.

Sanchez-Moreno, C., 2002. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Tech Int*, pp. 8(3): 121-137.

Sinden, R., 1994. *DNA structure and function*. San Diego, California: Academic Press.

symmetrydirectbuy, 2013. *symmetrydirectbuy.com*. [Online]
[Acedido em 4 Março 2013].

Valko, M. et al., 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer.. *Chemico-Biological Interactions*, pp. 160(2006): 1-40.

Wang, Y., 2006. A novel nitric oxide biosensor based on electropolymerization poly(toluidine blue) film electrode and its application to nitric oxide released in liver homogenate. *Biosensors and bioelectronics*, pp. 22(2006): 10-17.

Zwart, L., Meerman, J., Commandeur, J. & Vermeulen, N., 1998. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans.. *Free radical biology and medicine*, pp. 26(1999): 202-206.

ANEXOS

A. FICHAS DE SEGURANÇA

Ácido ascórbico

Fórmula molecular: $C_6H_8O_6$

Massa Molar: 176,13 g/mol

Nº CAS: 50-81-7

Identificação dos perigos: A substância não está classificada como perigosa de acordo com 67/548/CEE.

Primeiros socorros: Em caso de dúvida ou existência de sintomas, consultar o médico. Em caso de inconsciência, colocar a vítima em posição lateral estável e consultar o médico. Nunca administrar nada pela boca a uma pessoa inconsciente ou a uma pessoa com espasmos. Mudar o vestuário sujo e contaminado. Não deixar as pessoas atingidas sem vigilância. Em caso de inalação: posição lateral estável e consultar o médico. Nunca administrar nada pela boca a uma pessoa inconsciente ou a uma pessoa com espasmos. Mudar o vestuário sujo e contaminado. Não deixar as pessoas atingidas sem vigilância. Em caso de contato com a pele: posição lateral estável e consultar o médico. Nunca administrar nada pela boca a uma pessoa inconsciente ou a uma pessoa com espasmos. Mudar o vestuário sujo e contaminado. Não deixar as pessoas atingidas sem vigilância. Após o contato com os olhos: Em caso de contacto com os olhos, lavar de imediato com bastante água corrente mantendo as pálpebras abertas e consultar um oftalmologista. Proteger o olho não atingido. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar.

Armazenagem: Conservar em recipiente bem fechado em lugar fresco e bem ventilado. Temperatura de armazenagem: 15-25°C.

Principais propriedades físicas:

- Sólido branco;
- Densidade relativa: 1,694 g/cm³ (20°C)

- Solubilidade na água: 330 g/L (25°C)

Ácido sulfúrico

Fórmula molecular: H₂SO₄

Massa Molar: 98,08 g/mol

Nº CAS: 7664-93-9

Primeiros socorros: Após inalação: Exposição ao ar fresco. Consultar um médico. Após contacto com a pele: Lavar abundantemente com água. Limpar com algodão embebido em polietilenoglicol 400. Tirar imediatamente a roupa contaminada. Após contacto com os olhos: Enxaguar abundantemente com água, mantendo a pálpebra aberta (durante pelo menos 10 minutos). Consultar imediatamente um oftalmologista. Depois de engolir: Fazer beber muita água (eventualmente vários litros), evitar o vômito (perigo de perfuração). Consultar imediatamente um médico. Não tentar neutralizar a substância tóxica.

Armazenagem: Hermeticamente fechado. Em local seco. Temperatura de armazenamento: sem limitações.

Identificação dos perigos: Provoca queimaduras graves.

Símbolo de risco: Corrosivo

Frases R: 35

Frases S: 26-30-45

Principais propriedades físicas:

- Líquido incolor e inodoro
- Densidade: 1,84 g/cm³ (20°C)

Benzo (g,h,i) perileno

Fórmula molecular: C₂₂H₁₂

Massa Molar: 276,34 g/mol

Nº CAS: 108-88-3

Primeiros socorros: Em caso de inalação: Remover o paciente do local da exposição e transferi-lo imediatamente para local ventilado. Caso não esteja respirando, utilizar respiração artificial. Em caso de dificuldade de respiração, fornecer oxigênio. Procurar o médico. Em caso de contato com os olhos: Lavar os olhos com quantidade abundante de água durante no mínimo 15 minutos, levantando ocasionalmente as pálpebras superiores e inferiores. Procurar o médico. Em caso de contato com a pele: Remover imediatamente roupas e sapatos contaminados. Lavar a pele com quantidade abundante de água e sabão durante no mínimo 15 minutos. Procurar o médico. Em caso de ingestão: Lavar a boca com água e bicarbonato e provocar o vômito. Procurar assistência médica imediatamente.

Armazenagem: Temperatura para armazenamento: 4 °C. Armazenar em local limpo, seco, protegido contra a incidência de luz solar. Manter o recipiente bem fechado, armazenar em local fresco, seco, bem ventilado e na área de armazenamento de líquidos inflamáveis.

Símbolo de risco: Irritante, nocivo, tóxico, inflamável, perigoso para o meio ambiente.

Principais propriedades físicas:

- Líquido incolor

Hipoclorito de sódio

Fórmula molecular: NaClO

Massa Molar: 74,44 g/mol

Nº CAS: 7632-00-0

Primeiros socorros: Em caso de inalação: Retirar o paciente para um local arejado. Deitar a vítima e coloca-la na posição de descanso, mantê-la quente cobrindo-a com roupa. Chamar imediatamente um médico. Após contato com os olhos: Lavar imediatamente com bastante água, inclusive debaixo das pálpebras durante 15 minutos pelo menos. Após contato com a pele: Despir imediatamente a roupa e os sapatos contaminados. Lavar imediatamente com

muita água. Chamar imediatamente um médico ou contatar o centro anti-venenos. Após ingestão: Não provocar o vômito. Respiração artificial e/ou oxigênio pode ser necessária. Chamar imediatamente um médico e transportar imediatamente para um hospital.

Armazenagem: Armazenar em local bem ventilado, em local fresco, ao abrigo da luz. Conservar em ambiente fresco. Não congelar.

Símbolo de risco: Comburente, tóxico e muito tóxico para organismos aquáticos.

Frases R: 34-31

Frases S: 45-61

Principais propriedades físicas:

- Líquido amarelo claro fracamente clorado
- Densidade relativa: 1,25 g/cm³ (20°C)
- Solubilidade em água: completamente miscível

Nitrito de sódio

Fórmula molecular: NaNO₂

Massa Molar: 69 g/mol

Nº CAS: 7632-00-0

Primeiros socorros: Em caso de inalação: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Remover a pessoa afetada para o ar livre e mantê-la quente e calma. Em caso de dificuldade respiratória ou paragem respiratória, iniciar respiração artificial. Em caso de contato com a pele: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Remover a pessoa afetada para o ar livre e mantê-la quente e calma. Em caso de dificuldade respiratória ou paragem respiratória, iniciar respiração artificial. Após o contato com os olhos: Em caso de contacto com os olhos, lavar de imediato com bastante água corrente mantendo as pálpebras abertas e consultar um

oftalmologista. Proteger o olho não atingido. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continue a enxaguar. Em caso de ingestão: Contacte imediatamente um CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTIVENENOS ou um médico. Não provocar o vômito. Lavar a boca com muita água. Não dar nada a comer ou a beber.

Armazenagem: Conservar em lugar fresco, bem ventilado. Temperatura de armazenagem: 15-25°C.

Símbolo de risco: Comburente, tóxico e muito tóxico para organismos aquáticos.

Frases R: 8-25-50

Frases S: 45-61

Principais propriedades físicas:

- Sólido amarelo claro.
- Densidade relativa: 2,168 g/cm³ (20°C)
- Solubilidade em água: 820 g/L (20°C)

Peróxido de hidrogénio

Fórmula molecular: H₂O₂

Massa Molar: 34,01 g/mol

Nº CAS: 7722-84-1

Primeiros socorros: Após inalação: exposição ao ar fresco. Após contato com a pele: Lavar abundantemente com água. Tirar roupa contaminada. Após contato com os olhos: Enxaguar abundantemente com água. Consultar imediatamente um oftalmologista. Após ingestão: fazer a vítima beber imediatamente água (dois copos no máximo). Consultar imediatamente um médico.

Armazenagem: Hermeticamente fechado, ao abrigo da luz. Não armazenar perto de substâncias combustíveis. Temperatura de armazenagem: 5-30°C.

Símbolo de risco: nocivo

Frases R: 22-41

Frases S: 26-39

Principais propriedades físicas:

- Líquido incolor com odor suave
- Densidade relativa: 1,11 g/cm³ (20°C)

B. PARÂMETROS ELETROQUÍMICOS

Na tabela ??? são apresentados os parâmetros eletroquímicos utilizados na VOQ, frequência, amplitude, step, intervalo de potencial e solução tampão utilizada durante o presente estudo.

Tabela B.1: Parâmetros eletroquímicos utilizados em VOQ.

| Parâmetros eletroquímicos | Adenina-EPC | dA ₂₀ -EPC |
|----------------------------|-----------------|-----------------------|
| Frequência (Hz) | 25 | 25 |
| Step (mV) | 5,1 | 5,1 |
| Amplitude (V) | 0,02 | 0,02 |
| Intervalo de potencial (V) | + 0,40 a + 1,30 | + 0,70 a + 1,50 |
| Eletrólito | PBS pH 7,4 | PBS pH 7,4 |

C. REGISTOS EXPERIMENTAIS

Neste capítulo são apresentados os valores experimentais que serviram de apoio aos resultados e discussão do presente estudo.

Nas Tabelas C.1 e C.2 registaram-se os valores para a elaboração das curvas de calibração do AA na presença dos diferentes contaminantes.

Estudo eletroquímico do dano oxidativo promovido por RNS e PAH e o efeito protetor de antioxidantes no ADN

Tabela C.1: i_p do AA na presença de H_2O_2 para elaboração das curvas de calibração.

| Concentração AA (mg/L) | $i_p \times 10^{-7}$ (A) (1ª CURVA) | Média $i_p \times 10^{-7}$ (A) | $i_p \times 10^{-7}$ (A) (2ª CURVA) | Média $i_p \times 10^{-7}$ (A) | $i_p \times 10^{-7}$ (A) (3ª CURVA) | Média $i_p \times 10^{-7}$ (A) |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 3,11 | 3,43 | 3,44 | 3,41 | 4,83 | 4,61 |
| | 3,47 | | 3,54 | | 4,12 | |
| | 3,70 | | 3,26 | | 4,89 | |
| 5 | 5,64 | 5,52 | 5,24 | 5,15 | 5,96 | 5,57 |
| | 5,38 | | 5,12 | | 5,15 | |
| | 5,52 | | 5,08 | | 5,59 | |
| 10 | 6,51 | 6,57 | 6,67 | 6,37 | 6,66 | 6,40 |
| | 6,63 | | 6,13 | | 6,30 | |
| | 6,55 | | 6,31 | | 6,25 | |
| 15 | 7,59 | 7,42 | 7,17 | 7,42 | 7,52 | 7,42 |
| | 7,24 | | 7,78 | | 7,67 | |
| | - | | 7,30 | | 7,07 | |
| 20 | 8,84 | 8,37 | 8,77 | 8,67 | 8,42 | 8,66 |
| | 8,02 | | 8,79 | | 8,72 | |
| | 8,25 | | 8,45 | | 8,83 | |
| 22 | 9,27 | 9,18 | 9,22 | 9,26 | 9,38 | 9,31 |
| | 9,09 | | 9,37 | | 9,15 | |
| | - | | 9,18 | | 9,41 | |

Estudo eletroquímico do dano oxidativo promovido por RNS e PAH e o efeito protetor de antioxidantes no ADN

Tabela C.2: i_p do AA na presença de NO^* para elaboração das curvas de calibração.

| Concentração AA (mg/L) | $i_p \times 10^{-7}$ (A) (1ª CURVA) | Média $i_p \times 10^{-7}$ (A) | $i_p \times 10^{-7}$ (A) (2ª CURVA) | Média $i_p \times 10^{-7}$ (A) | $i_p \times 10^{-7}$ (A) (3ª CURVA) | Média $i_p \times 10^{-7}$ (A) |
|------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 4,75 | 4,9 | 4,94 | 5,05 | 4,4 | 4,71 |
| | 4,89 | | 5,08 | | 5,02 | |
| | 5,07 | | 5,12 | | - | |
| 5 | 6,27 | 6,44 | 5,95 | 6,08 | 6,41 | 6,33 |
| | 6,61 | | 6,16 | | 6,25 | |
| | 6,43 | | 6,14 | | - | |
| 10 | 7,9 | 7,72 | 7,07 | 7,42 | 7,61 | 7,36 |
| | 7,51 | | 7,8 | | 7,10 | |
| | 7,75 | | 7,39 | | - | |
| 15 | 8,87 | 8,88 | 8,52 | 8,81 | 8,61 | 8,60 |
| | 9,03 | | 8,94 | | 8,58 | |
| | 8,73 | | 8,98 | | - | |
| 20 | 1,04 | 1,12 | 1,07 | 1,10 | 1,08 | 1,09 |
| | 1,20 | | 1,12 | | 1,09 | |

Com a construção das curvas de calibração do AA na presença dos diferentes contaminantes foram obtidas diferentes características analíticas. Nas tabelas C.3 e C.4 são apresentadas essas características analíticas.

Tabela C.3: Características analíticas da curva de calibração do AA na presença de H_2O_2 .

| Antioxidante | AA |
|--------------------------------|-------------------|
| Potencial da dA_{20} (V) | 1,20 |
| Intervalo linear (mg/L) | 1,0 - 22,0 |
| Declive ($\mu\text{A L/mg}$) | $0,024 \pm 0,002$ |
| Interceção (μA) | $0,39 \pm 0,04$ |
| Coefficiente de determinação | 0,9937 |
| LD (mg/L) | 1,0 |

Tabela C.4: Características analíticas da curva de calibração do AA na presença de NO[•].

| Antioxidante | AA |
|---|-----------------|
| Potencial da dA₂₀ (V) | 1,20 |
| Intervalo linear (mg/L) | 1,0 - 20,0 |
| Declive (µA L/mg) | 0,0306 ± 0,0006 |
| Interceção (µA) | 0,456 ± 0,008 |
| Coefficiente de determinação | 0,9881 |
| LD (mg/L) | 1,0 |

