

UNICAMP

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES
ELETROQUÍMICOS COMO FERRAMENTA PARA
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE
DE EXTRATOS VEGETAIS**

TESE DE DOUTORADO

Lucilene Dornelles Mello Martins

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Campinas - SP
Fevereiro de 2005.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CAMPINAS - SP

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	ITUNICAMP
	Madeira
V	EX
TOMBO BC/	6408L
PROC.	16-P-00086-05
	C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00
DATA	01/06/05
Nº CPD	

Bibid 351052

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP

M366d

Martins, Lucilene Dornelles Mello.

Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos como ferramenta para avaliação da capacidade antioxidante de extratos naturais / Lucilene Dornelles Mello Martins. -- Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Biossensores. 2. Antioxidantes. 3. HRP. 4. DNA. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

Agradecimentos

Ao meu orientador *Prof. Lauro Tatsuo Kubota* pela oportunidade e incentivo para desenvolver este trabalho e, pelos exemplos de paciência, competência, profissionalismo e amizade demonstrados ao longo deste período de convivência.

A todos os ex e atuais colegas e amigos do Leeds com quem compartilhei bons momentos, Adriano, Alaécio, Altair, Antônio, Arnaldo, César, Danilo, Emerson, Flávio, Ilza, Karen, Larissa, Marcelo, Percy, Rafaela, Renata, Renato, Rita, Rodrigo, Rosângela e Tânia.

Às doutoras Simone Soares Rosatto e Maria Del Pilar Taboada Sotomayor pela amizade e ajuda no início do trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Química pela manutenção da infra-estrutura de laboratórios e biblioteca e aos funcionários da CPG pela atenção dada aos alunos.

Ao *Prof. Marco Mascini* e a *Prof. Giovanna Marrazza* pela carinhosa recepção durante o meu estágio.

As amigas que fiz na Itália; Mércia Ferreira de Sousa, Sônia Centi e Sílvia Raquel Hernandez.

A FAPESP, CNPq e UNIFI (Università Degli Studi di Firenze) pela bolsa e auxílios concedidos.

A *Geomar* pela ajuda técnica e pela amizade que restou ...

A minha família, aos meus irmãos *Claudio Jr.* e *José Valter* e as minhas cunhadas (*Valéria* e *Silvani*) pelo incentivo e apoio.

Por fim agradeço, principalmente aos meus pais *Cláudio (in memoriam)* e *Lucia*, meus primeiros educadores, pelo bem maior que me deixaram, *o estudo*.

"A vida tem o sentido que dermos a ela. São as escolhas sábias, que constroem a nossa vida".

Agradeço, sobretudo a Deus por me dar condições de realizar este trabalho ...

CURRICULUM VITAE

LUCILENE DORNELLES MELLO MARTINS

Data e local de nascimento: 28\12\1973 - Cruz Alta (RS)

I. FORMAÇÃO ACADÊMICA

- I.1.** Pós-Graduação em Química - Nível Mestrado (Ano de conclusão: 1999)
Universidade Federal de Santa Maria (UFSM - Santa Maria / RS)
Orientador: Prof. Dr. Reinaldo Simões Gonçalves
- I.2.** Graduação - Curso: Química Industrial (Ano de conclusão: 1995)
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM - Santa Maria / RS)

II. ATIVIDADES PROFISSIONAIS - Estágios Acadêmicos

- II.1.** Instituição: Università Degli Studi di Firenze (Florença / Itália)
Período: Janeiro à Junho de 2004.
- II.2.** Empresa: Indústria de produtos cárneos - Aurora; (CCOC) (Chapecó / SC)
Período: Janeiro à Maio de 1996
- II.3.** Empresa: Usina Escola de Laticínios Ltda. (Santa Maria / RS)
Período: Julho à Outubro de 1995
- II.4.** Empresa: Fábrica Cyrilla de Bebidas Ltda. (Santa Maria / RS)
Período: Outubro à Dezembro de 1994.

III. ATIVIDADES DOCENTES e TÉCNICO-ADMINISTRATIVA

III.1. Atividades de Ensino

III.1.1. Docência em curso de graduação

Área: Tecnologia de Alimentos (CH = 40 horas semanais)
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Órgão: Depto. de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA)
Período: Março de 1999 a Março de 2000

III.1.2. Docência em curso de graduação

Área: Tecnologia de Alimentos (CH = 40 horas semanais)
Instituição: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Órgão: Depto. de Tecnologia e Ciência dos Alimentos (DTCA)
Período: Junho de 1996 a Março de 1997

III.1.3. Monitoria na disciplina de análise instrumental

Instituição: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)
Atividade: Elaboração da apostila didática, preparação e auxílio de aulas práticas, teste de aulas práticas.
Período: Setembro à Dezembro de 1995.

IV. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

IV.1. Iniciação Científica:

IV.1.1. Projeto: Determinação de cromo e tanino em efluente de curtume
UFSM - Departamento de Química - Período: Março a Dezembro de 1993.

IV.1.2. Projeto: Determinação de colesterol em produtos cárneos
UFSM - Depto. de Ciências e Tecnologia de Alimentos - Período: Março a Setembro de 1992.

IV.2. Trabalhos Publicados:

IV.2.1. Mello, L.D.; Hernandez, S.; Marrazza, G.; Kubota, L.T. and Mascini, M. 2004. Investigations of the antioxidant properties of plant extracts using a DNA-electrochemical biosensor. Submetido a Biosensors & Bioelectronics.

IV.2.2. Mello, L.D.; Alves, A.A.; Macedo, D.V. and Kubota, L.T. 2004. Peroxidase-based biosensor as a tool for a fast evaluation of antioxidant capacity of tea. Food Chemistry, no prelo.

IV.2.3. Mello, L.D.; Sotomayor, M.D.P. and Kubota, L.T. 2003. HRP - based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract. Sensors And Actuators B 96 (3), 636-645.

IV.2.4. Freire, R.S.; Pessoa, C.A.; Mello, L.D. and Kubota, L.T. 2003. Direct electron transfer: an approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. Journal of Brazilian Chemical Society 14 (2), 230-243.

IV.2.5. Mello, L.D. and Kubota, L.T. 2002. Review of the use of biosensor as analytical tools in the food and drink industries. Food Chemistry 77 (2), 237-256.

IV.2.6. Gonçalves, R.S. and Mello, L.D. 2001. Electrochemical investigation of ascorbic acid adsorption on low-carbon steel in 0.50M Na₂SO₄ solutions. Corrosion Science 43 (3), 457-470.

IV.3. Participação em Eventos Técnico-Científicos

IV.3.1. Título do trabalho: HRP-based amperometric biosensor for fast evaluation of antioxidant capacity of vegetables extract. Book of Abstracts - 55th annual meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE) - Thessaloniki (Greece).

IV.3.2. Título do trabalho: Development of a screening methodology based on electrochemical DNA biosensor to evaluate the antioxidant activity of natural extracts. Book of Abstracts - 2nd IOCD - São Pedro (Brazil).

IV.3.3. Título do trabalho: Electrochemical DNA-based biosensor as a screening tool to detection the antioxidant activity of the natural extracts. Book of Abstracts - 15th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis - Florence (Italy).

IV.3.4. Título do trabalho: Determinação de compostos fenólicos em extratos vegetais utilizando biossensor a base de HRP. Anais da XXVI Reunião da SBQ - Poços de Caldas (MG - Brasil).

IV.3.5. Título do trabalho: Aspectos da participação da luz de diferentes comprimentos de onda no comportamento eletroquímico do aço-carbono ABNT 1005. Anais da XXII Reunião Anual da SBQ - Poços de Caldas (MG - Brasil).

IV.3.6. Título do trabalho: Estudos eletroquímicos da ação inibidora do ácido ascórbico sobre os processos eletroquímicos do aço-carbono ABNT 1005 em sulfato de sódio 0.5M. Anais do XI SIBEE Abril de 1999 - Maragogi (Al - Brasil).

IV.3.7. Título do trabalho: Estudos eletroquímicos da atuação do ácido ascórbico como inibidor de corrosão do aço-carbono ABNT 1005. Anais da VI SBQ - Sul - Maringá (PR - Brasil).

IV.3.8. Título do trabalho: Aspectos eletroquímicos da atuação do ácido ascórbico como inibidor de corrosão do aço-carbono ABNT 1005. Anais da XXI Reunião Anual da SBQ - Poços de Caldas (MG - Brasil).

IV.3.9. Título do trabalho: Evidências eletroquímicas da ação inibidora do ácido ascórbico como inibidor de corrosão do aço-carbono ABNT 1005. Anais do V SBQ - Sul - Porto - Alegre (RS - Brasil).

IV.3.10. Título do trabalho: Extração líquido-líquido do complexo cromodifenilcarbazida. Anais da III Jornada de Pesquisa da UFSM - Santa Maria (RS - Brasil)

V. PATENTE CONCEDIDA - "**Biossensor baseado em HRP para avaliação rápida da capacidade antioxidante de extratos vegetais**".

Registro no INPI: número PIO303792 - 4.

VI. PRÊMIO CONCEDIDO

Prêmio concedido pelo Conselho Federal de Química (CFQ), com o seguinte trabalho apresentado em congresso (XI SIBEE - Maragogi - Al);

Título do trabalho: **Estudos eletroquímicos da ação inibidora do ácido ascórbico sobre os processos eletroquímicos do aço-carbono ABNT 1005 em sulfato de sódio 0,50M.**

"Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos como ferramenta para avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais"

AUTORA: Lucilene Dornelles Mello Martins

ORIENTADOR: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Palavras-chave: Biossensores, Antioxidante, HRP, DNA.

RESUMO:

Este trabalho refere-se ao desenvolvimento e aplicação de dois biossensores eletroquímicos na avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais.

O primeiro biossensor desenvolvido consistiu em um eletrodo de pasta de carbono modificado com horseradish peroxidase imobilizada sobre sílica gel modificada com óxido de titânio. As melhores condições para resposta eletroquímica de fenóis totais, em relação a ácido clorogênico (ACG) foram obtidas em $0,25 \text{ mol l}^{-1}$ de tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$, apresentando uma faixa linear de trabalho entre 1 e $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ e sensibilidade de $181 \text{ nA l } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$. Valores de recuperação indicaram uma resposta satisfatória sem interferência significativa da matriz, quando o biossensor foi aplicado em amostras de chá e café, $99 \pm 4 \%$ e $98 \pm 2 \%$; respectivamente. A atividade antioxidante total (AAT) foi avaliada pela correlação entre o conteúdo de polifenóis totais quantificados pelo biossensor e a capacidade antioxidante de extratos de chá, este último parâmetro determinado pelo método de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). AAT foi obtida a partir das relações: AAT (*Camellia sinensis*) = $39 (\pm 3)$ [fenol total] + $2,5 (\pm 0,3)$ ($r = 0,989$); AAT (*Ilex paraguariensis* tipo chá) = $0,8 (\pm 0,1)$ [fenol total] + $2,83 (\pm 0,60)$ ($r = 0,986$); AAT (*Ilex paraguariensis* tipo erva mate) = $0,3 (\pm 0,1)$ [fenol total] - $0,4 (\pm 0,6)$ ($r = 0,973$). A medida obtida com o biossensor foi representativa em termos da capacidade antioxidante dos extratos testados.

O segundo biossensor consistiu em dsDNA (*Calf thymus*) imobilizado na superfície de um eletrodo impresso (SPE). O biossensor foi empregado para verificar a eficiência de extratos de plantas na proteção sobre o DNA exposto a radicais livres, no caso radicais hidroxila ($^{\circ}\text{OH}$) formados via um sistema do tipo Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA} / \text{H}_2\text{O}_2$). Os extratos de plantas apresentaram a seguinte ordem em relação à atividade antioxidante: *Baccharis genstelloides* > *Peumus boldus* > *Foeniculum vulgare* > *Cymbopogon citratus* > *Camellia sinensis* > *Mentha piperita*. A reprodutibilidade do biossensor foi boa, apresentando um desvio padrão médio relativo de 16% ($n = 6$). A performance do biossensor quando comparada com o método de DPPH, mostrou ser um método eficiente para screening da atividade antioxidante real e de forma direta de qualquer amostra, de maneira prática, rápida, com grande confiabilidade e de baixo custo.

"Development of electrochemical biosensors as a tool for evaluation of the antioxidant capacity of vegetables extracts"

AUTHOR: Lucilene Dornelles Mello Martins

SUPERVISOR: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Keywords: Biosensor, Antioxidant, HRP, DNA.

ABSTRACT:

This work describes the development of two kind of electrochemical biosensors to evaluate the antioxidant capacity of vegetables extracts.

The first biosensor developed was based on horseradish peroxidase immobilized on silica coated with titanium oxide and this material was employed to modify the carbon paste. In the optimized conditions, the biosensor response for total phenol content, was linear from 1 up to $50\mu\text{mol l}^{-1}$ in relation to the chlorogenic acid (CGA), with a sensitivity of $181\mu\text{mol l}^{-1}\text{ l nA cm}^{-2}$ in 0.25 mol l^{-1} phosphate buffer, pH 7.0. On the basis of the obtained recovery results, the biosensor showed to be suitable for the determination of polyphenols in tea and coffee ($99 \pm 4\%$ e $98 \pm 2\%$, respectively), because no significant influence of the matrix was observed. Total antioxidant activity (TAA) was obtained by the relationship between antioxidant activity and total phenol content, this parameter evaluated by using the biosensor. Antioxidant activities of the samples were investigated by the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging method. TAA of the tea extracts was obtained from relationships: TAA (*Camellia sinensis*) = $39 (\pm 3)$ [total phenol] + $2.5 (\pm 0.3)$ ($r = 0.989$); TAA (tea-type *Ilex paraguariensis*) = $0.8 (\pm 0.1)$ [total phenol] + $2.83 (\pm 0.60)$ ($r = 0.986$); TAA (herb-type *Ilex paraguariensis*) = $0.3 (\pm 0.1)$ [total phenol] - $0.4 (\pm 0.6)$ ($r = 0.973$). The measurements obtained by the biosensor was significant in terms of the total antioxidant activity (TAA).

Another developed biosensor was based on a dsDNA (*Calf thymus*) layer immobilized on a screen-printed electrode (SPE). The biosensor was employed to verify the protection effect of tea extracts against DNA damage promoted by $^{\circ}\text{OH}$ radicals generated via Fenton-type reaction. The antioxidant activity was arranged in the order *Baccharis genstelloides* > *Peumus boldus* > *Foeniculum vulgare* > *Cymbopogon citratus* > *Camellia sinensis* > *Mentha piperita*. A good repeatability for the biosensor was demonstrated using the relative standard deviation (R.S.D.) of the measurements recorded (in triplicate) for all samples, the R.S.D. was 16 % ($n = 6$). The results demonstrated that the DNA-based biosensor is suitable as a rapid screening test for evaluation of the antioxidant properties of samples in a direct way, easy and low-cost.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xix
LISTA DE TABELAS	xxiii
LISTA DE FIGURAS	xxv
CAPÍTULO I – APRESENTAÇÃO E OBJETIVOS	1
I.1. APRESENTAÇÃO	3
I.2. OBJETIVOS	5
II – CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO GERAL	7
II.1. INTRODUÇÃO	9
II.1.2. Radical hidroxila	10
II.2. ANTIOXIDANTES	15
II.2.1. Compostos fenólicos	15
II.2.1.a. Ácido clorogênico	19
II.2.2. Métodos para avaliação da capacidade antioxidante	24
II.2.2.a. Método do DPPH	25
CAPÍTULO III – BIOSSENSORES	27
III.1. BIOSSENSORES PARA COMPOSTOS FENÓLICOS	29
III.1.1. Biossensores a base de peroxidase	29
III.1.1.a. Ciclo catalítico das peroxidases	31
III.1.1.b. Peroxidase imobilizada na superfície de eletrodos	32
III.2. BIOSSENSORES A BASE DE DNA	33
III.2.1. Ácido desoxirribonucléico (DNA)	34
III.2.1.a. Interação de espécies eletroativas com o DNA	37
III.2.1.b. Comportamento eletroquímico do DNA	37
III.3. MATERIAIS DE ELETRODO	42
III.3.1. Eletrodos de pasta de carbono	42
III.3.2. Eletrodos impressos (SPE)	43
CAPÍTULO IV – EXPERIMENTAL	47
IV.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL SEGUIDO NO ESTUDO DO BIOSSENSOR A BASE DE HRP	49
IV.1.1. Reagentes e materiais	49
IV.1.2. Síntese da matriz sílica-titânio (Si - Ti)	51
IV.1.3. Caracterização da matriz sílica-titânio (Si - Ti)	52
IV.1.4. Imobilização da enzima	52
IV.1.5. Preparação do eletrodo de pasta de carbono – construção do biossensor	52
IV.1.6. Célula eletroquímica e instrumentação	53
IV.1.7. Aplicação em amostras vegetais	54
IV.1.8. Determinação de fenóis pelo método de Folin-Ciocalteu	55
IV.1.9. Determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH ^o	55

IV.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL SEGUIDO NO ESTUDO DO BIOSENSOR A BASE DE DNA	57
IV.2.1. Reagentes e materiais	57
IV.2.2. Eletrodos impressos (SPE)	57
IV.2.3. Preparação do biossensor a base de DNA	58
IV.2.4. Medidas eletroquímicas	59
IV.2.5. Aplicação em amostras	59
IV.2.6. Efeito do dano ao DNA e efeito da presença de antioxidantes	60
CAPÍTULO V – RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
V.1. BIOSENSOR A BASE DE HRP - CARACTERIZAÇÃO DA SÍLICA-TITÂNIO (Si - Ti) E IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA HRP	65
V.2. MECANISMO DE RESPOSTA DO BIOSENSOR A BASE DE HRP	66
V.3. AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO BIOSENSOR A BASE DE HRP	70
V. 3.1. Efeito da quantidade de HRP na preparação do biossensor	70
V.3.2. Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio	71
V.3.3. Influência do tipo e da concentração da solução tampão	72
V.3.4. Influência do pH da solução tampão	74
V.3.5. Efeito do potencial na resposta do biossensor	75
V.4. CARACTERÍSTICAS DO SENSOR	76
V.4.1. Curva analítica e tempo de resposta para ácido clorogênico	76
V.4.2. Estudo da estabilidade do biossensor	78
V.4.3. Resposta do biossensor na presença de diferentes substratos fenólicos	81
V.5. APLICAÇÃO DO BIOSENSOR A BASE DE HRP EM AMOSTRAS	83
V.5.1. Estudo de compostos interferentes	83
V.5.2. Determinação de compostos fenólicos nos extratos vegetais	85
V.5.3. Estudos de recuperação	86
V.6. APLICAÇÃO DO BIOSENSOR A BASE DE HRP PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS	89
V.6.1. Avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais	89
V.6.2. Correlação entre a atividade antioxidante total e o conteúdo de fenóis totais	90
V.7. CONCLUSÕES PARCIAIS – BIOSENSOR A BASE DE HRP	93
V.8. BIOSENSOR A BASE DE DNA	95
V.8.1. Considerações no preparo do sistema	95
V.8.2. Perfil de resposta do biossensor	97
V.8.3. Aplicação do biossensor na avaliação das propriedades antioxidantes de extratos vegetais	99
V.9. CONCLUSÕES PARCIAIS – BIOSENSOR A BASE DE DNA	105
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES GERAIS	107
CAPÍTULO VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
CAPÍTULO VIII – PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	123

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A, T, C e G – Bases do DNA adenina, timina, citosina e guanina, respectivamente

AAPH – Radical 2,2'- azobis - 2-amidinopropano dihidrocloro do inglês "2,2'-azobis – 2-amidinopropane-dihydrochloride"

AAT - Atividade antioxidante total

ABAP – Radical 2,2'- azobis - 2-amidopropano do inglês "2,2'-azobis – 2-amidopropane dihydrochloride"

Abs - Absorbância

ABTS⁺ - Radical cátion do ácido 2,2'-azinobis-3-etil-benzotiazolino-6-sulfônico do inglês "2,2'- azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid"

ACQ – Ácido cafeoilquínico

ACFQ – Ácido cafeoilferuloilquínico

ACG – Ácido clorogênico

diACQ – Ácido dicafeoilquínico

AFQ – Ácido feruloilquínico

***p*-ACoQ** – Ácido *p*-coumaroilquínico

Ag – Elemento químico prata do latim "argentum"

AH – Molécula de antioxidante

Au – Elemento químico ouro do latim "aurum"

DNA – Ácido desoxirribonucleico do inglês "desoxyribonucleic acid"

DPPH – Radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil do inglês "1,1-diphenyl-2-picrilhydrazyl"

EC – Comissão de enzimas do inglês "enzyme commission"

ECS – Eletrodo de calomelano saturado

EDTA – Ácido etilenodiamino tetracético do inglês "ethylene diamine tetraacetic acid"

EQM – Eletrodos quimicamente modificados

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FAPy-G – 2,6-Diamina-5-formamida-4-hidroxi-pirimidina do inglês "2,6-diamino-formamidino-4-hydroxypyrimidine"

Hepes – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano sulfônico do inglês “4-(2-hydroxyethyl) - 1-piperazineethanesulfonic acid”

HRP – Enzima Horseradish peroxidase

LDL – Lipoproteína de baixa densidade do inglês “Low-density lipoprotein”

8-oxodG – 7,8-Dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina do inglês “7,8-dihydro-8-oxo-desoxyguanosine”

Pd – Elemento químico paládio

Pipes – Ácido 1,4-piperazina-dietano sulfônico do inglês “1,4-Piperazinediethanesulfonic acid”

Pt – Elemento químico platina

PVC – Cloreto de polivinila do inglês “polyvinyl chloride”

R.S.D. – Desvio padrão relativo do inglês “relative standard deviation”

SPE – Eletrodos impressos do inglês “screen-printed electrode”

Tris – Tris-hidroximetil-aminometano

Trolox – 6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-ácido carboxílico do inglês “6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethyl-chroman-2-carboxylic acid”

U mg – Unidades de enzima por mg de pasta de carbono

LISTA DE TABELAS

Tabela II.1. Potenciais de oxidação para alguns oxidantes	10
Tabela II.2. Propriedades fisico-químicas do ácido 5-cafeolquínico	22
Tabela IV.1. Reagentes utilizados no estudo do biossensor a base de HRP	50
Tabela IV.2. Reagentes utilizados no estudo de interferentes, no método de Folin-Ciocalteu e no estudo de antioxidantes	51
Tabela IV.3. Reagentes utilizados no estudo do biossensor a base de DNA	57
Tabela V.1. Influência do potencial aplicado sobre a sensibilidade da resposta do biossensor para ácido clorogênico	75
Tabela V.2. Parâmetros otimizados para o biossensor a base de HRP	81
Tabela V.3. Resposta relativa do biossensor-HRP para diferentes substratos fenólicos e seus respectivos potenciais de oxidação	82
Tabela V.4. Valores de resposta relativa (%) obtidos com o biossensor para ácido clorogênico na presença de compostos interferentes em diferentes razões molares	83
Tabela V.5. Concentração estimada de polifenóis determinada em extratos vegetais pelo método proposto e pelo método de Folin-Ciocalteu	86
Tabela V.6. Estudos de recuperação em extratos vegetais determinados pelo método de Folin-Ciocalteu utilizando ácido clorogênico como composto de referência	87
Tabela V.7. Estudos de recuperação em extratos vegetais determinados com o biossensor utilizando ácido clorogênico como composto de referência	87

LISTA DE FIGURAS

Figura II.1. Mecanismo de formação dos produtos da guanina a partir do aduto no C8	13
Figura II.2. Mecanismo de ruptura da fita de DNA produzido pelo ataque dos radicais $^{\circ}\text{OH}$, conduzindo ao 3'-DNA-fosfoglicolato	14
Figura II.3. Estruturas da quercitina (a) e do ácido benzóico (b)	17
Figura II.4. Esquema da captura/seqüestro de EROs pelos compostos fenólicos	18
Figura II.5. Estruturas dos compostos fenólicos	20
Figura II.6. Reação entre DPPH radical e uma substância antioxidante	26
Figura III.1. Estrutura da molécula protoporfirina de ferro	30
Figura III.2. Estrutura do DNA e pareamento de bases de Watson-Crick	36
Figura III.3. Mecanismos de redução para citosina e adenina em eletrodo de mercúrio	41
Figura III.4. Mecanismos de oxidação para adenina e guanina em eletrodo de grafite pirolítico	41
Figura III.5. Modelo de máquina utilizada na fabricação de eletrodos screen-printed e uma série de eletrodos impressos	44
Figura IV.1. Esquema do eletrodo de trabalho modificado com Si - Ti / HRP/DNA	53
Figura IV.2. Esquema da célula eletroquímica de trabalho	54
Figura IV.3. Conector usado para o contato elétrico dos eletrodos SPE com o aparelho	58
Figura IV.4. Palm Sens [®] interfaceado a um PC de bolso para controle e aquisição de dados	59
Figura V.1. Ligação cruzada envolvendo a reação entre o glutaraldeído e os grupos amina residuais livres da enzima	67
Figura V.2. Reações envolvidas no mecanismo de resposta do biossensor a base de HRP para compostos fenólicos	68
Figura V.3. Voltamogramas cíclicos comparativos do biossensor a base de HRP	69
Figura V.4. Efeito da quantidade de enzima HRP na resposta do biossensor para ácido clorogênico	70
Figura V.5. Influência da concentração de H_2O_2 sobre a resposta do biossensor para ácido clorogênico	71

Figura V.6. Efeito da solução tampão sobre a resposta do biossensor em termos de sensibilidade para ácido clorogênico	73
Figura V.7. Influência da concentração da solução tampão na resposta do biossensor	73
Figura V.8. Resposta do biossensor para ácido clorogênico em função do pH da solução tampão fosfato	74
Figura V.9. Curva de calibração obtida com o biossensor Si - Ti / HRP com DNA para ácido clorogênico	76
Figura V.10. Resposta em função do tempo apresentado para o biossensor em solução tampão fosfato	77
Figura V.11. Perfil da estabilidade do biossensor em função do número de determinações	79
Figura V.12. Curvas analíticas para ácido clorogênico obtidas com o biossensor no dia da preparação da pasta e após 30 dias de preparação estocada sob refrigeração	80
Figura V.13. Correlação entre a atividade antioxidante total (AAT) e o conteúdo de fenóis totais em amostras de chá preto	91
Figura V.14. Correlação entre a atividade antioxidante total (AAT) e o conteúdo de fenóis totais em amostras de chá mate e erva mate	91
Figura V.15. Influência da concentração de DNA sobre a resposta do biossensor	96
Figura V.16. Voltamogramas do biossensor a base de DNA antes e após a sua interação com a solução de Fenton e na presença/ ausência de antioxidantes	98
Figura V.17. Efeito da presença de antioxidantes no sistema reacional, no sinal do dsDNA imobilizado	100
Figura V.18. Efeito antioxidante contra os radicais hidroxilas mostrados pelos extratos com o uso do biossensor a base de DNA	101
Figura V.19. Efeito antioxidante mostrados pelos extratos vegetais no ensaio do radical DPPH [•]	102

Capítulo I

Apresentação

e

Objetivos

I.1. APRESENTAÇÃO

O crescente uso de plantas para fins medicinais é justificado pelos estudos científicos que comprovam a eficácia destas plantas em vários modelos experimentais. Isto tem contribuído de forma relevante para a divulgação das propriedades terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pela eficácia no tratamento de doenças.

Das inúmeras plantas usadas *in natura* ou em preparações fitoterápicas, muitas delas só foram investigadas parcialmente, ou seja, muitos compostos secundários como flavonóides e taninos já foram isolados e identificados, porém ainda não foram estudados quanto a suas atividades biológicas.

Diversos ensaios "*in vitro*" e "*in vivo*" vêm comprovando e determinando a ampla variedade das atividades biológicas de extratos brutos, frações ou substâncias isoladas. O estudo da capacidade antioxidante, muitas vezes, constitui na propriedade mais elucidada dentro da pesquisa fitoquímica. A avaliação da atividade antioxidante é importante por qualificar espécies vegetais como fontes naturais em potencial de substâncias antioxidantes.

Muitas substâncias que possuem característica antioxidante sofrem restrições de ordem técnica, legal, organoléptica ou toxicológica e, como consequência apenas algumas são efetivamente usadas pela indústria cosmética, alimentícia ou farmacêutica. No caso do Brasil, essas substâncias são geralmente importadas e a produção de antioxidantes extraídos de fontes naturais pode ser uma opção para o problema que se apresenta.

Estima-se que das 500.000 espécies de plantas conhecidas no mundo, 16% encontram-se na Região Amazônica Brasileira (www.biotecnologia.com.br), muitas das quais com propriedades medicinais e aromáticas que poderiam ser pesquisadas como fontes de antioxidantes naturais.

I. 2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento e avaliação do desempenho de biossensores para aplicação na determinação da capacidade antioxidante de extratos vegetais. Para isso o trabalho foi dividido nas seguintes etapas:

- ✓ Desenvolver um biossensor a base de pasta de carbono utilizando a enzima horseradish peroxidase (HRP) imobilizada na matriz sílica modificada com óxido de titânio;
 - ✓ Aplicação do biossensor-HRP para determinação de compostos fenólicos em matrizes vegetais;
 - ✓ Desenvolver um biossensor a base de DNA utilizando um eletrodo impresso (SPE) contendo uma camada de dsDNA imobilizado;
 - ✓ Aplicação do biossensor-DNA para verificar a eficiência de extratos de plantas na proteção sobre o dsDNA exposto a radicais livres, no caso radicais hidroxila ($^{\circ}\text{OH}$) formados via um sistema do tipo Fenton ($\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA} / \text{H}_2\text{O}_2$);
 - ✓ Relacionar os resultados obtidos com os biossensores na avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais.
-

Capítulo II

Introdução

Geral

II.1. INTRODUÇÃO

O estudo de radicais livres e a pesquisa de novos e eficientes compostos antioxidantes são temas de intensos estudos nos últimos anos, tanto em seus aspectos básicos quanto nas aplicações clínicas e em alimentos.

Radical livre é toda espécie química com um ou mais elétrons desemparelhados. O elétron livre que caracteriza o radical livre pode estar centrado em um átomo de hidrogênio, nitrogênio, carbono, enxofre ou átomos de metais de transição. Na natureza existem duas importantes substâncias que podem gerar radicais livres, o oxigênio no estado fundamental (O_2) e o óxido nítrico (NO), que ocorre como poluente atmosférico, mas que também é sintetizado em diversas células (Vertuani *et al.*, 2004).

A ocorrência mais comum de radicais livres refere-se às ditas espécies reativas de oxigênio (EROs) e baseiam-se no fato do oxigênio gerar tais espécies seja por absorção de energia ou por transferência de elétrons. No organismo, a via mais comum de formação destes radicais livres ocorre durante o processo de respiração. Nesta etapa, ocorre a redução do oxigênio a água, na qual a entrada de 4 elétrons na molécula de oxigênio promove o aparecimento do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e do radical hidroxila (OH^{\cdot}) que são oxidantes de grande importância biológica. Estes intermediários são gerados pela redução parcial do oxigênio molecular conforme a reação: $O_2 \rightarrow O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow \cdot OH + HO^- \rightarrow H_2O$ (Aruoma *et al.*, 2003).

Estas espécies ao serem geradas no curso do metabolismo normal, participam de processos bioquímicos como a produção de energia, fagocitoses, regulação no crescimento celular e sinais intercelulares bem como, em síntese de importantes compostos biológicos. Contudo a produção intensa destes radicais livres durante os processos fisiopatológicos ou devido a fatores ambientais

(Dizdaroglu *et al.*, 2002). A base do DNA mais suscetível é a guanina e o seu produto de oxidação imediato, a 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) é considerado um marcador na iniciação de lesões mutagênicas (ESCODD, 2000).

Em um modo simplificado a adição do radical hidroxila à guanina (Figura II.1.) é por meio da formação de três intermediários principais: adutos nos carbonos C4, C5 e C8. Os adutos C4 e C5 são reversíveis, podendo ser convertidos a forma inicial por ganho de um elétron do meio celular. O aduto C8 conduz a duas formas de lesões do DNA, o produto oxidado 7,8-dihidro-8-oxo-2'-desoxiguanosina (8-oxodG) e um outro composto como resultado da abertura do anel imidazólico, o 2,6-diamina-5-formamida-4-hidroxipirimidina (FAPy-G) (Box *et al.*, 2001; Burrows & Muller, 1998; Dizdaroglu *et al.*, 2002; Steenken, 1989).

Outra importante lesão do DNA observada na presença dos radicais $^{\circ}\text{OH}$ é a ruptura da fita. Um dos mecanismos sugeridos é mostrado na Figura II.2. O ataque do $^{\circ}\text{OH}$ ao carbono C4 da molécula de desoxirribose conduz na abstração do hidrogênio com a formação de um radical centrado neste carbono. A etapa seguinte é a formação do radical peroxila como consequência da adição de uma molécula de oxigênio. Após rearranjos sucessivos ocorre a clivagem da molécula de açúcar conduzindo a formação de dois produtos, o DNA-5'-fosfato e um marcador da clivagem oxidativa do DNA, a terminação DNA-3'-fosfoglicolato (Burrows & Muller, 1998; Meneghini, 1997).

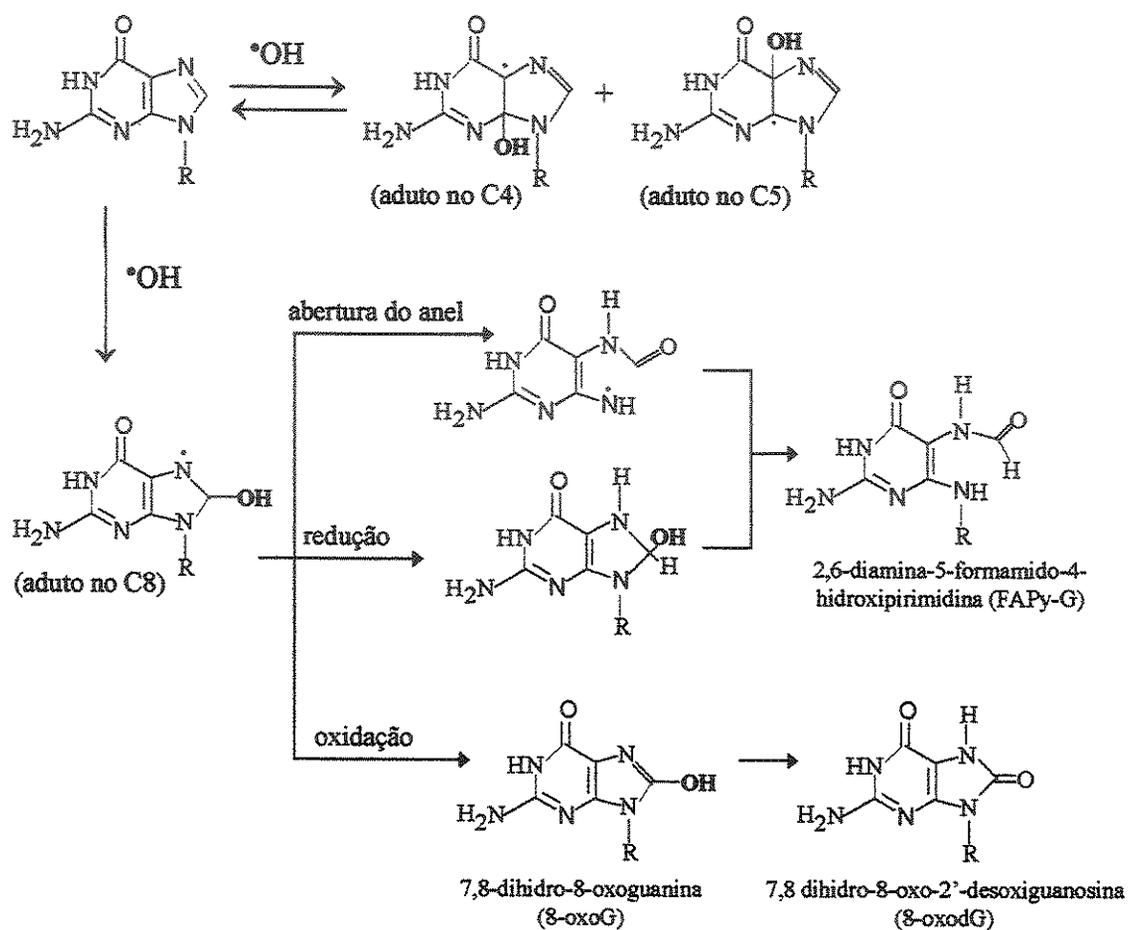


Figura II.1. Mecanismo de formação dos produtos da guanina a partir do aduto no C8 (aduto C8-OH) (adaptado de Burrows & Miller, 1998; Dizdaroglu *et al.*, 2002).

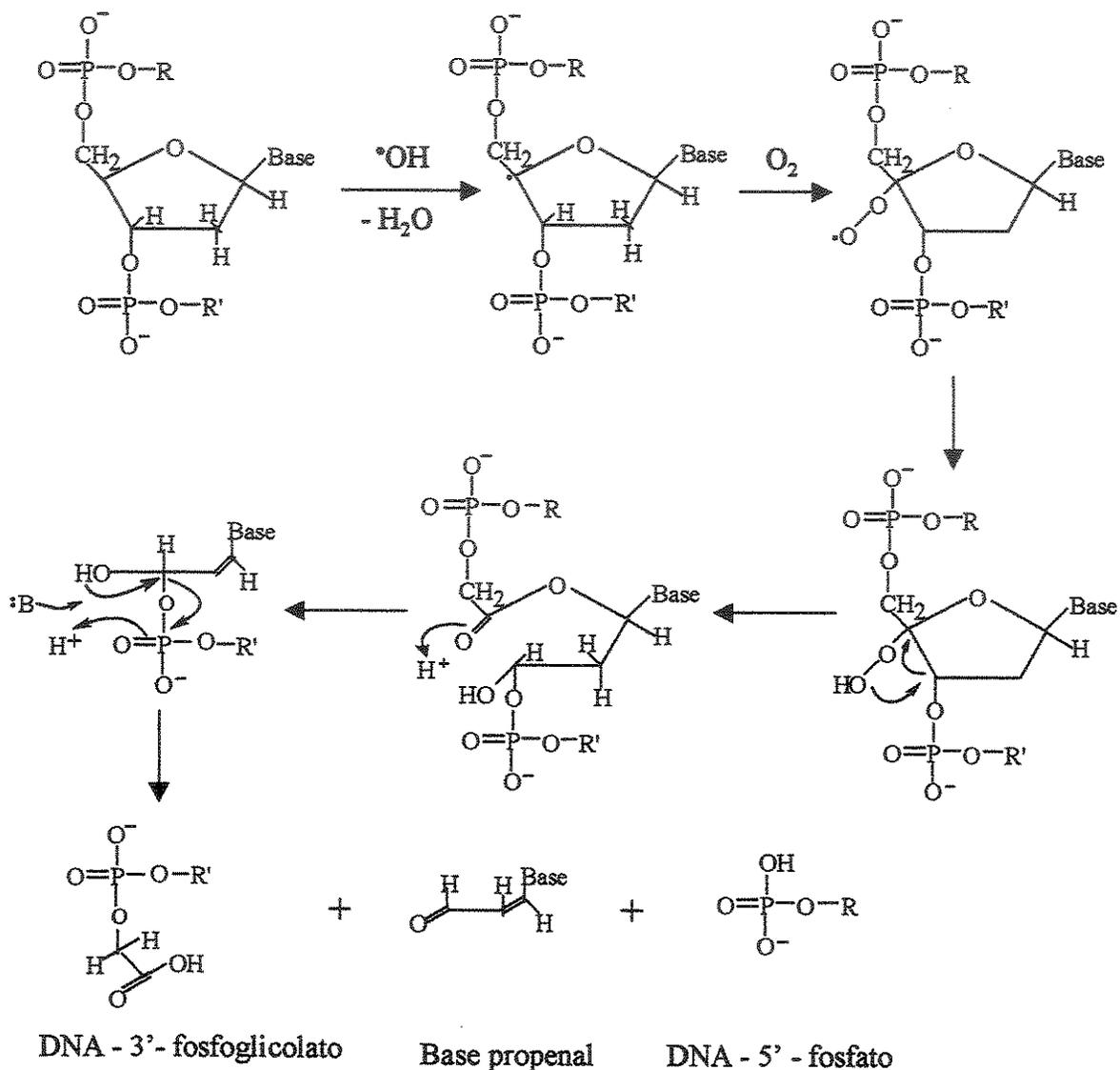


Figura II.2. Mecanismo de ruptura da fita de DNA produzida pelo ataque dos radicais $^{\bullet}\text{OH}$, conduzindo ao DNA - 3'- fosfatoglicolato (Base = Base do DNA) (adaptado de Meneghini, 1997).

II.2. ANTIOXIDANTES

Frente à ação potencial lesiva das EROs, tem-se a atividade preventiva, interceptora ou reparadora de várias substâncias antioxidantes que doam um elétron para os radicais livres estabilizando-os. No organismo os antioxidantes realizam quatro tipos de defesa. A primeira ocorre dentro das células, com as enzimas como glutathione peroxidase, superóxido dismutase, catalase e outras. A segunda inclui as defesas não enzimáticas como glutathione, peptina-histidina, proteínas de ligação cobre-transferina e ferritina, ácido di-hidrolipóico, ubiquinona, melatonina, urato e tióis proteicos do plasma. Há ainda os antioxidantes reparadores, que conseguem por vezes, reparar danos por meio da presença de proteases, lipases, transferases e outras. Um outro mecanismo de defesa antioxidante consiste nos antioxidantes presentes em vegetais. Dentre os constituintes dos vegetais, a fração mais significativa com propriedades antioxidantes são os compostos fenólicos. Estes compostos ricos em duplas ligações conjugadas atuam na "neutralização" destes radicais livres (Kaur & Kapoor, 2001).

II.2.1. COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos são compostos largamente distribuídos na natureza, podendo ser provenientes da composição de lignina, de proteínas e do metabolismo secundário de plantas. Estão presentes na forma de três grandes grupos; ácidos fenólicos (incluem derivados dos ácidos hidroxibenzóico e hidroxicinâmico); flavonóides (incluem as isoflavonas, flavonas, flavononas, flavonóis, antocianinas e chalconas) e taninos (incluem os taninos hidrolisáveis e taninos condensados) (Escarpa & Gonzalez, 2001).

Compostos fenólicos estão associados à adstringência (Escarpa & Gonzalez, 2001), ação anticancerígena, antiinflamatória (Tapiero *et al.*, 2002) e principalmente a ação antioxidante de inúmeros extratos vegetais (Miliauskas *et al.*, 2004). Estes compostos também são responsáveis por fatores de qualidade de alimentos como aparência, textura, composição do sabor, aroma e conservação (Lattanzio, 2003), seja presente naturalmente na composição do produto ou adicionados como aditivos naturais.

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende basicamente de algumas de suas propriedades intrínsecas, tais como; o potencial de redução, a propriedade em quelar metais e da possibilidade de captar/seqüestrar os radicais livres. Os compostos fenólicos inibem também, enzimas responsáveis pela formação de EROs, como a xantina oxidase, proteína quinase C, ciclooxigenase, monooxigenase microsomal e succinoxidase mitocondrial (Rice-Evans, 2001).

Numerosos derivados fenólicos, como os flavonóides, complexam eficazmente íons metálicos, particularmente ferro e cobre, que são conhecidos por induzirem stress oxidativo em sistemas biológicos, atuando como catalisadores das reações causadas por EROs. A reação química que ilustra este fato é conhecida pela reação de Fenton, que origina radicais hidroxila altamente reativos ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} (\text{Cu}^+) \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{}^-\text{OH} + \text{Fe}^{3+} (\text{Cu}^{2+})$) (Rice-Evans, 2001). Os pontos de ligações dos derivados fenólicos com os metais são por meio dos grupamentos OH livres, como mostrado na Figura II.3. No caso dos flavonóides (Figura II.3a) as ligações podem ocorrer nas posições C3 e C4 do anel B e grupos 4-oxo do anel C e 5-hidroxila do anel A ou via função oxo e grupo OH do carbono 3 do anel C.

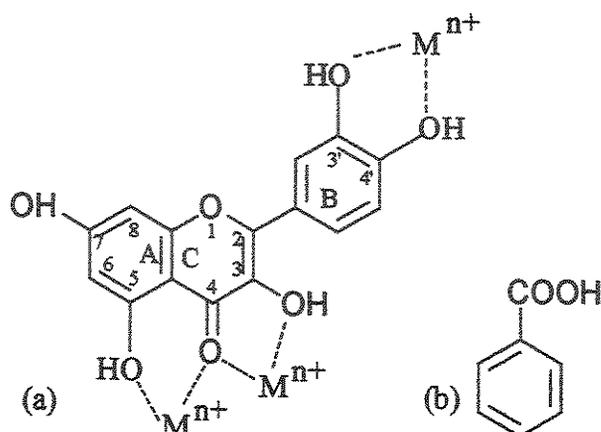


Figura II.3. (a) Pontos de ligação dos fenóis com metais de transição, exemplificado pela estrutura da quercitina. (b) estrutura do ácido benzóico.

Compostos fenólicos na sua maioria, possuem baixo potencial padrão ($0,23 < E < 0,75V$ vs ENH) o que os tornam termodinamicamente capazes para reduzir as EROs por doação de um átomo de hidrogênio (Figura II.4.). Na reação ocorre a formação de um radical livre fenólico, o radical aroxila, que reage com um segundo radical resultando em uma estrutura estável, a quinona (Rice-Evans & Miller, 1996).

Um outro mecanismo proposto para a formação da quinona é por meio da formação de dois radicais aroxila, originando a quinona e o catecol como produtos finais. O radical aroxila pode interagir com oxigênio, gerando quinonas e íons superóxidos antes de terminar a reação em cadeia. Esta última pode ocorrer na presença de um elevado nível de íons metálicos de transição, resultando em um efeito pró-oxidante indesejável. A capacidade dos fenóis de atuarem como antioxidantes depende não só do potencial redox do par Fenol- O^{\bullet} /

Fenol-OH, mas também dos possíveis pontos de ligação dos radicais aroxila (Rice-Evans & Miller, 1996).

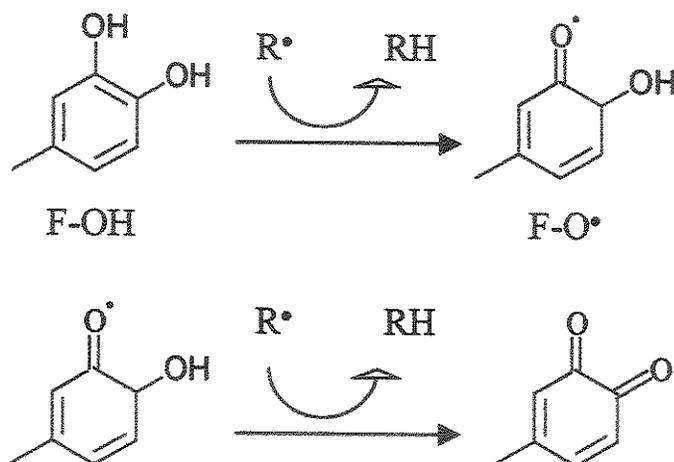


Figura II.4. Esquema da captura/seqüestro de EROs pelos compostos fenólicos.

No grupo dos flavonóides (Figura II.3.a), a capacidade efetiva de captar/seqüestrar radicais livres é devido a três fatores determinantes, a) a presença do grupo *orto*-dihidroxila no anel B na qual participa da deslocalização eletrônica e confere grande estabilidade ao radical fenóxi resultante; b) a presença da dupla ligação nos C2 e C3 em proximidade com a função oxo do C4 do anel C é responsável pela deslocalização eletrônica do grupo catecol no anel B e c) a presença de grupos OH no C3 e C5 no anel A e C, assim como a função oxo no C4 no anel C são requisitos para o máximo potencial captador/seqüestrador de radicais livres (Pietta, 2000).

A quercitina, por exemplo, satisfaz todos os requisitos e a sua atividade antioxidante é mais efetiva que a da catequina, a qual é ausente de aspectos estruturais favoráveis que são presentes na quercitina, satisfazendo pelo aspecto citado no item a. A habilidade para captar radicais depende da estrutura e dos

substituintes presentes no anel heterocíclico e no anel B conforme comentado anteriormente. Mais especificamente depende da presença do grupo catecol no anel B, o qual é bom doador de elétrons e, a presença da dupla ligação 2,3 conjugada com o grupo 4-oxo (anel C), o qual é responsável pela deslocalização eletrônica. Também a presença do grupos OH neste anel, aumenta a atividade de captar radicais, enquanto que a adição de grupos OH especificamente nas posições 5,7 do anel A parece contribuir menos para a atividade antioxidante (Pietta, 2000).

No caso do grupo dos ácidos fenólicos, a capacidade antioxidante destes compostos e de seus ésteres depende do número e da posição dos grupos hidroxilas presentes na molécula. Por exemplo, o ácido hidroxibenzóico (Figura II.3.b) com o grupo OH em posições *orto* ou *para* não demonstram atividade antioxidante em termos de capacidade de doação de hidrogênio, porém a posição *meta* já demonstra atividade. O potencial do grupo carboxila em atrair elétrons, afeta as posições *orto* e *para*. Para os derivados do mesmo ácido, contendo dois grupos OH, as respostas antioxidantes dependem da proximidade do grupo CO₂H relativo aos substituintes orto-difenólico o que, aparentemente influencia a habilidade de doar átomos de hidrogênio. As hidroxilas em posição *orto* e *meta* em relação ao grupo carboxila do ácido di-hidroxibenzóico revelam uma maior atividade antioxidante para as substituições 2,3 em relação às substituições 3,4 e, menor atividade é verificada para as substituições 2,5 (Rice-Evans & Miller, 1996).

II.2.1.a. Ácido clorogênico (ACG)

Os estudos realizados com o objetivo de otimizar o biossensor a base de HRP para determinação de polifenóis, foram feitos utilizando o ácido

clorogênico como composto de referência. Este composto tem grande relevância (em quantidade e em importância) nas amostras testadas.

O grupo o qual pertence o ácido clorogênico representa os compostos fenólicos não flavonóides presentes em maior quantidade em vegetais como café, chá, batata, maçã, pêra e outros. Constituem a principal classe de substrato fenólico, envolvida no escurecimento enzimático de superfícies internas expostas ao ar ou tecidos danificados (Kroon & Williamson, 1999).

Ácido clorogênico

O termo ácido clorogênico foi introduzido por Payen (Clifford, 1979) para designar um constituinte do grão de café e que posteriormente foi caracterizado como ácido 3-cafeoilquínico (atualmente conhecido como 5-cafeoilquínico) (Clifford, 1999).

Atualmente o termo ACG é usado para designar uma mistura de ésteres presentes em vegetais formados pela esterificação de um ou mais derivados do ácido trans-cinâmico (Figura II.5a) com o ácido quínico (ácido 1L-1(OH), 3,4,5-tetra-hidroxi-ciclohexanóico); (Figura II.5b).

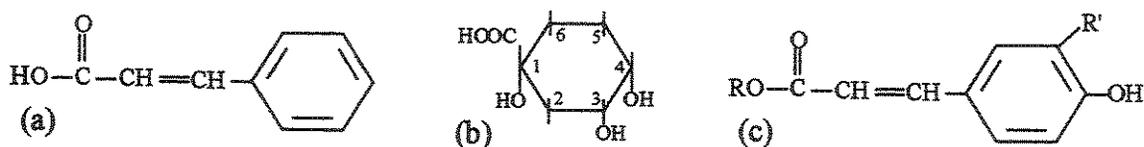


Figura II.5. Estruturas dos compostos fenólicos (a) ácido cinâmico; (b) ácido quínico; Derivados do ácido cinâmico: (c) R = H, R' = OH ácido cafeico; R = ácido quínico, R' = OH ácido clorogênico (ácido 5-o-cafeoilquínico); R = H, R' = OCH₃ ácido ferúlico.

Os isômeros cis dos derivados do ácido cinâmico já foram detectados em produtos processados, porém não têm sido detectados naqueles *in natura*. Estes compostos fenólicos podem ser classificados pela identidade do derivado do ácido cinâmico, número e posição dos resíduos acila. Este grupo inclui os isômeros subdivididos em 5 grupos principais (Clifford *et al.*, 1987).

→ ácidos cafeoilquínicos (ACQ); ésteres de ácido cafeico com ácido quínico; isômeros 3-, 4- e 5-.

→ ácidos dicafeoilquínicos (diACQ); ésteres envolvendo dois resíduos do ácido cafeico ligados no mesmo resíduo do ácido quínico; isômeros; 3,4-, 3,5- e 4,5-.

→ ácidos feruloilquínicos (AFQ); ésteres de ácido ferúlico com ácido quínico, são os monometil éteres do ACQ; isômeros; 3-, 4- e 5-.

→ ácidos p-coumaroilquínicos (*p*-ACoQ); ésteres de ácido p-coumárico e ácido quínico; isômeros; 3-, 4- e 5-.

→ ácidos cafeoilferuloilquínicos (ACFQ); são pouco estudados e são ésteres consistindo de um resíduo de ácido cafeico e um resíduo de ácido ferúlico ligados no mesmo resíduo de ácido quínico, geralmente denominados de monometil éteres dos diACQ.

O ácido clorogênico mais simples e o único disponível comercialmente do seu grupo é denominado pela IUPAC de ácido 5-cafeoilquínico (5-ACQ) (IUPAC, 1976), anteriormente identificado como ácido 3-cafeoilquínico, podendo também ser denominado de ácido isoclorogênico ou neoclorogênico. Para fins analíticos, muitas vezes este isômero é designado somente de ácido clorogênico, um termo geral que considera a mistura de todos os isômeros dos grupos ACQ, diACQ e AFQ presente em uma matriz.

Estes ácidos possuem uma solubilidade em água que é dependente do tipo de isômero. O ácido 5-cafeoilquínico puro é incolor, inodoro, com sabor

fenólicos (como por exemplo, ácido cafêico), tem sido considerado um marcador para determinação do impacto real da prática de torrefação. O ácido clorogênico é drasticamente reduzido durante este processo, com a conseqüente liberação de ácido cafêico e ácido quínico (Clifford & Wight, 1976). Por isso, a correlação inversa entre a sua presença com a qualidade desta bebida, tem sido sugerida (Trugo & Macrae, 1984a). Outras associações são feitas entre a concentração do composto e o nível de escurecimento do café durante processamento (Trugo & Macrae, 1984b). Alguns trabalhos ainda sugerem para avaliação do processo, o monitoramento da relação ácido clorogênico: cafeína (Purdon & McCamey, 1987).

Em adição, estes compostos particularmente o 5-ACQ, têm sido associados a vários efeitos protetores e deletérios sobre células de espécies do reino animal. Alguns autores mostraram que o 5-ACQ foi um agente indutor de alterações no DNA de mamíferos (Borish *et al.*, 1985). Porém, outros estudos (Shibata *et al.*, 1999) demonstraram o seu efeito antioxidante contra a clivagem oxidativa do DNA. Também em outros trabalhos (Ohnishi *et al.*, 1994), demonstraram o efeito protetor do ACG na redução da hemólise e da peroxidação de hemácias de ratos, induzida por H₂O₂. Essa ação antioxidante é devida à presença de um grupamento orto-di-hidroxila do anel aromático do ácido cafêico que atuaria como um acceptor de radicais livres (Ky *et al.*, 2001). De fato, a oxidação *in vivo* de LDL (lipoproteína de baixa densidade) humana foi retardada na presença de ácido cafeico (Nardini *et al.*, 1995). Em outro estudo, foi relatado que o 5-ACQ inibiu as enzimas α -amilase, tripsina e lisozima, por meio da formação de ligação covalente com resíduos de triptofano e cisteína (Rohn *et al.*, 2002). Por outro lado, este isômero mostrou propriedades antiinflamatórias devido a sua capacidade de inibição do processo inflamatório

mediado por citosinas (Krakauer, 2002). Já o consumo de altas doses de 5-ACQ, presentes na bebida de café, aumentou os níveis de homocisteína no plasma humano (Olthof *et al.*, 2001). Esse aminoácido não protéico é um dos fatores de risco para o surgimento de doenças cardiovasculares. Essa variedade de efeitos benéficos e maléficos atribuídas ao ACG, preponderantemente ao 5-ACQ, tem encorajado muitos pesquisadores a trabalhar com essa família de compostos fenólicos.

II.2.2. MÉTODOS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Várias metodologias têm sido descritas para uma avaliação rápida da capacidade e eficácia antioxidante de compostos químicos ou extratos vegetais. Muitos destes métodos são baseados em testes de inibição conhecidos como "ensaios armadilha" (*Trap assays*) (Aruoma, 2003). Os diversos testes propostos na literatura variam quanto ao tipo de radicais livres gerados, quanto ao indicador de oxidação escolhido e quanto ao método usado para a sua detecção e quantificação.

Muitos testes recorrem a formação de radicais livres instáveis, pela decomposição térmica de azo iniciadores, tais como ABAP (Miguel *et al.*, 2004), ABTS⁺ (Arts *et al.*, 2004), AAPH (Madhujith *et al.*, 2004), os quais reagem rapidamente com o oxigênio originando radicais peroxilas.

Alguns autores propõem um outro tipo de testes que não recorrem à oxidação de substratos, mas à redução de radicais livres estáveis gerados *in vitro*, como resultado da atividade antioxidante de compostos. Entre estes, o método original de Blois (Blois, 1958) adaptado por vários autores (Sanchez-Moreno, 2002), utiliza o reagente DPPH[•] (1,1'-difeníl-2-picrilhidrazil). Este método é um dos mais usados pela estabilidade química do radical, pela rapidez do teste e por

não envolver condições drásticas de temperatura e oxigenação (Molyneux, 2004).

II.2.2.a. Método do radical DPPH[•]

Este método avalia a propriedade de um antioxidante em estabilizar (reduzir) o radical livre estável DPPH[•] (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), formado em solução. A molécula de DPPH[•] apresenta um máximo de absorção a 517-520nm e, após ser reduzida a sua correspondente hidrazina, por uma substância doadora de elétrons, como um antioxidante, observa-se uma diminuição da absorbância (Figura II.6.). Esta medida permite calcular, após o estabelecimento do equilíbrio da reação, o parâmetro IC₅₀. Este parâmetro foi introduzido para a interpretação dos resultados em termos de concentração eficiente de um antioxidante em teste, e é definido como a quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH[•] (Molyneux, 2004).

As variações nas condições iniciais do ensaio, como mostrado por diferentes autores, que usam diferentes concentrações iniciais de DPPH[•], combinados com diferentes tempos de reação, não resultam em mudanças na interpretação do resultado. Porém a interação de um antioxidante em potencial com o DPPH[•] depende de sua conformação estrutural. Este método não é adequado para avaliar a atividade de plasma, por exemplo, porque a proteína é precipitada na solução alcoólica usada para diluir o reagente DPPH[•] (Kaur & Kapoor, 2001). Com poucas exceções, o ensaio tem sido aplicado em vários tipos de amostras, incluindo extratos vegetais (Miliauskas *et al.*, 2004), óleos essenciais (De Souza *et al.*, 2004), óleos vegetais (Valovanidis *et al.*, 2004), e alimentos processados (Sánchez-Moreno, 2002). Em termos analíticos, o método do DPPH[•] é recomendado para avaliar a atividade antioxidante de extratos

vegetais e produtos, por fornecer resultados reprodutíveis e confiáveis de forma rápida e fácil.

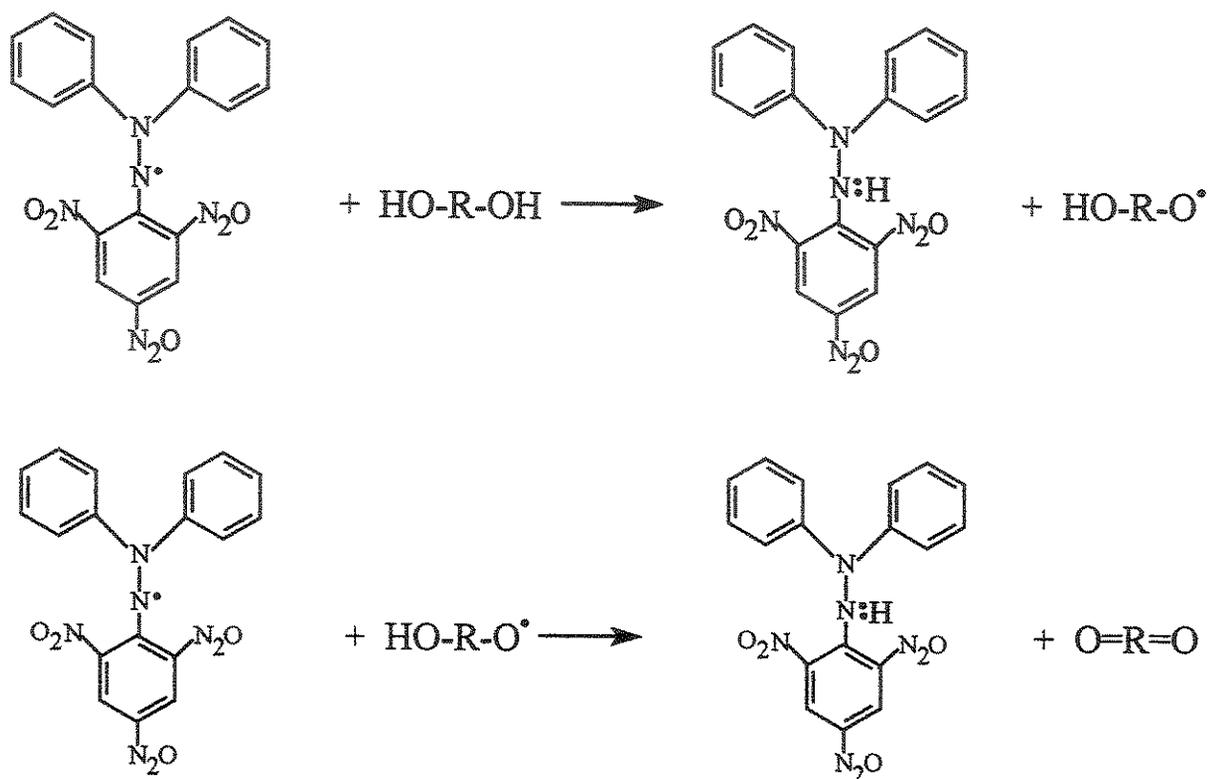


Figura II.6. Reação entre DPPH[•] radical e uma substância antioxidante.

Capítulo III

Biossensores

III.1. BIOSSENSORES PARA COMPOSTOS FENÓLICOS

Compostos fenólicos podem ser determinados eletroquimicamente por meio de uma oxidação direta, porém este procedimento é dificultado pela necessidade de aplicação de um alto sobrepotencial. O alto sobrepotencial aplicado provoca uma grande corrente de fundo e, conseqüentemente um alto nível de ruído. Além disso, nas oxidações diretas de compostos fenólicos podem ocorrer reações paralelas conduzindo a formação de sub-produtos poliméricos que passam a superfície do eletrodo (Blasco *et al.*, 2004).

O uso de eletrodos quimicamente modificados (EQM), como os biossensores, minimiza consideravelmente esse sobrepotencial. A principal vantagem no desenvolvimento de biossensores amperométricos para a determinação de compostos fenólicos é a possibilidade de medir a corrente gerada pela reação biocatalisada de oxidação ou redução das espécies eletroativas na superfície do eletrodo, em potenciais ao redor de 0 mV vs ECS. Neste potencial, o efeito de interferentes ocasionado pela oxidação ou redução de outras espécies presentes no meio é minimizado (Jarosz-Wilkolazka *et al.*, 2004).

Os trabalhos utilizando biossensores amperométricos para a determinação de compostos fenólicos são baseados no uso de enzimas óxi-redutases, pois elas catalisam uma reação redox, envolvendo uma etapa de transferência de elétrons no ciclo natural da enzima. Os três grupos de óxi-redutases mais usados na construção de biossensores são as oxidases, desidrogenases e peroxidases (Mello & Kubota, 2002).

III.1.1. BIOSSENSORES A BASE DE PEROXIDASE

Peroxidases são enzimas da classe EC 1.11 definidas como oxiredutases. Catalisam a oxidação de vários compostos orgânicos e inorgânicos na presença

de peróxido de hidrogênio ou peróxidos orgânicos de cadeia pequena. Muitas peroxidases como peroxidases de plantas, citocromo c peroxidase, cloroperoxidase e outras, são hemeproteínas (sítio ativo: Fe^{+3} protoporfirínico) (Figura III.1) com um ciclo catalítico comum (Banci, 1997).

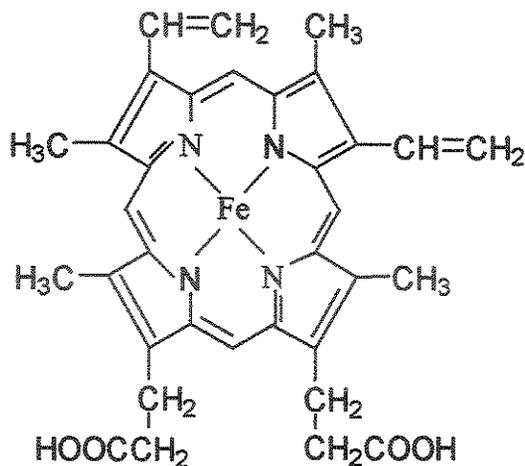


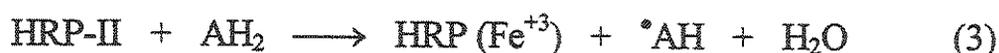
Figura III.1. Estrutura da molécula protoporfirina de ferro que é o sítio ativo de muitas peroxidases.

A peroxidase de "horseradish root", HRP tem sido bastante estudada para a elucidação do mecanismo da peroxidase. É a mais usada em química analítica por ser estável por longos períodos de tempo à temperatura ambiente e em amplo intervalo de pH, além de ser disponível comercialmente em diferentes graus de pureza (Dunford, 1991).

A enzima horseradish peroxidase (HRP) é uma glicoproteína e consiste de 308 resíduos de aminoácidos, dois Ca^{2+} e uma porção ferriprotoporfirina IX (grupo heme) (Figura III.1), não covalentemente ligada à cadeia polipeptídica que forma o sítio ativo da enzima. O conteúdo de carboidrato é aproximadamente 18% da massa molar, 42-45KDa da HRP (Dunford, 1991).

III.1.1.a. Ciclo catalítico das peroxidases

As enzimas peroxidases catalisam a redução de peróxidos oxidando o grupo heme do sítio ativo da enzima (grupo prostético). O ciclo catalítico destas enzimas pode ser representado, de forma simplificada, utilizando a enzima Horseradish peroxidase (HRP).



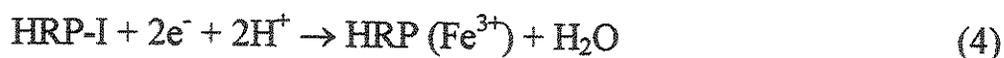
Na primeira etapa ocorre a redução do peróxido de hidrogênio com a formação de um composto intermediário oxidado da enzima, denominado de composto I (HRP-I). Esta reação envolve a transferência de dois elétrons do grupo prostético heme da peroxidase; um elétron é fornecido pelo ferro (III) e o outro vem da porfirina, produzindo um cátion radical porfirínico. A regeneração da proteína à sua forma nativa, ocorre em duas etapas monoelétrônicas posteriores. O composto I oxida uma molécula de um segundo substrato (AH₂) formando um substrato radicalar ([°]AH) e um segundo composto intermediário da enzima (composto HRP-II), que é reduzido ao estado inicial HRP (Fe⁺³), por uma segunda molécula deste segundo substrato (Ruzgas *et al.*, 1996).

Os intermediários da HRP já foram isolados e estudados, tanto espectroscopicamente como cineticamente. O composto HRP-I constitui numa espécie verde ($\lambda_{\text{max}} = 410\text{nm}$ e 655nm), onde o íon metálico encontra-se com uma carga formal Fe (V). A estrutura mais aceita, na literatura, sugere a formação de um cátion radical porfirínico, contendo Fe (IV). O composto HRP-II é vermelho, apresentando $\lambda_{\text{max}} = 420, 527$ e 555 nm (Aasa *et al.*, 1975; Folkes & Candeias, 1997; Roberts *et al.*, 1981).

III.1.1.b. Peroxidase imobilizada na superfície de eletrodos

Quando a peroxidase é imobilizada sobre uma superfície de um eletrodo, a forma oxidada da enzima que é formada na reação com peróxido, pode ser regenerada à sua forma inicial por uma transferência de elétrons heterogênea diretamente do material de eletrodo ou por meio de mediadores redox.

A peroxidase oxidada pode ser reduzida por elétrons fornecidos pelo eletrodo, conforme a reação:



Este processo é referido como transferência de elétrons direta (TED), ou seja, quando um eletrodo substitui o substrato doador de elétrons no ciclo de reação da peroxidase.

As peroxidases apresentam lenta transferência de elétrons quando imobilizadas na superfície de eletrodos (Ferapontova, 2004; Sun *et al.*, 2004) e configurações de eletrodos modificados com peroxidases, têm sido construídos utilizando mediadores que são moléculas redox com elevada velocidade de transferência de elétrons. (Ruzgas *et al.*, 1996). Aminas aromáticas e compostos fenólicos são as moléculas mais utilizadas para reagir com peroxidases.

Quando um doador de elétrons (AH_2) está presente em um sistema peroxidase-eletrodo, os processos direto e mediado podem ocorrer simultaneamente e o doador oxidado ($^{\circ}\text{AH}$) é reduzido eletroquimicamente pelo eletrodo segundo a reação:



As seqüências de reações 1, 2, 3 e esta última correspondem ao processo de transferência de elétrons mediado, que é usualmente mais eficiente comparado ao processo de transferência de elétrons direta.

III.2. BIOSSENSORES A BASE DE DNA

As diversas possibilidades de aplicações de eletrodos modificados com DNA são devidas essencialmente as características da biomolécula. O DNA possui propriedades estruturais vantajosas no desenvolvimento e aplicação de biossensores, tais como, a possibilidade de imobilização na superfície de eletrodos na forma de simples, dupla ou tripla hélice, capacidade dos ácidos nucléicos de formarem pares complementares com precisão, apresentam propriedade condutora e alta especificidade de interação com moléculas de baixa massa molecular (Erdem & Ozsoz, 2002; Santos-Alvarez *et al.*, 2004).

Biossensores a base de DNA têm sido desenvolvidos para a análise e detecção de seqüências de bases em ácidos nucléicos humanos, virais e bacterianos com o objetivo de diagnóstico de doenças. Estes biossensores, genericamente denominados de genosensores, têm sido freqüentemente empregados na análise e seqüenciamento de bases por técnicas de hibridização. No processo de hibridização, o eletrodo modificado com ssDNA, de seqüência de base conhecida, identifica a seqüência de bases complementar por meio da formação de dupla hélice híbrida. Esta identificação é eficaz e específica na presença de outras seqüências, não complementares (Lucarelli *et al.*, 2004).

Outra aplicação comum dos eletrodos modificados com DNA é a detecção de pequenas lesões presentes na biomolécula. O princípio baseia-se no monitoramento das mudanças da eletroatividade das bases constituintes do DNA, freqüentemente a guanina, como consequência da clivagem da fita ou a liberação de bases devido à interação do DNA com diversos agentes físicos ou químicos e/ou espécies (eletrofilicas, nucleofilicas ou eletroativas) (Fojta, 2002). Efetua-se a lesão por meio da imersão do eletrodo modificado com DNA intacto, na solução contendo o agente de clivagem ou substâncias que interagem com a

molécula imobilizada. Após a interação, observam-se mudanças nos sinais eletroquímicos do DNA devido à formação de adutos, complexos ou de moléculas indicadoras. Dependendo da natureza da interação, a detecção envolve um aumento ou diminuição da intensidade dos picos, bem como um deslocamento dos potenciais de pico (Fojta, 2002).

III.2.1. ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO (DNA)

O ácido desoxirribonucléico é o material da maioria dos organismos vivos, onde é o maior constituinte dos cromossomos do núcleo celular e exerce um papel central na determinação das características hereditárias por meio do controle da síntese protéica nas células (Nelson & Cox, 2002).

É composto por duas longas cadeias poliméricas formadas por milhões de nucleotídeos ligados uns aos outros. Individualmente, nucleotídeos são compostos por uma molécula de açúcar (pentose), um grupo fosfato e de uma das quatro bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina e timina). O formato de dupla hélice conhecido é devido a duas interações do tipo, pontes de hidrogênio formadas por bases complementares, por interações hidrofóbicas, que direcionam as bases a estarem orientadas para dentro da dupla hélice (Figura II.2). Este rearranjo constitui no pareamento de uma base purina (adenina ou guanina) com uma base pirimidínica (timina ou citosina). O pareamento de bases proposta por Watson-Crick é explicado por:

I) Pelo fato de que adenina deve obrigatoriamente parear com timina, a quantidade destas duas bases nitrogenadas em uma dada molécula de DNA será sempre a mesma. De forma similar, a quantidade de guanina será igual à de citosina.

II) Sugere um mecanismo geral para a replicação do DNA. Se as bases formam pares específicos, a informação contida em uma fita é complementar a outra;

III) Dita a combinação de pares de bases, mas não coloca restrição na seqüência linear de nucleotídeos ao longo da fita de DNA. A seqüência de bases pode ser altamente variável, o que torna adequada para codificar a informação genética;

IV) Embora as pontes de hidrogênio entre as bases são ligações fracas, coletivamente elas estabilizam a molécula de DNA. As forças de Van der Waals, entre o pilhamento de base também ajuda a estabilizar a dupla fita de DNA;

O grupo fosfato e o açúcar constituem a parte hidrofílica da estrutura da dupla hélice e estão localizados na parte externa da molécula. (Nelson & Cox, 2002).

O DNA possui duas funções biológicas: direcionar a sua própria replicação durante a divisão celular e direcionar a transcrição de moléculas complementares de RNA (Nelson & Cox, 2002).

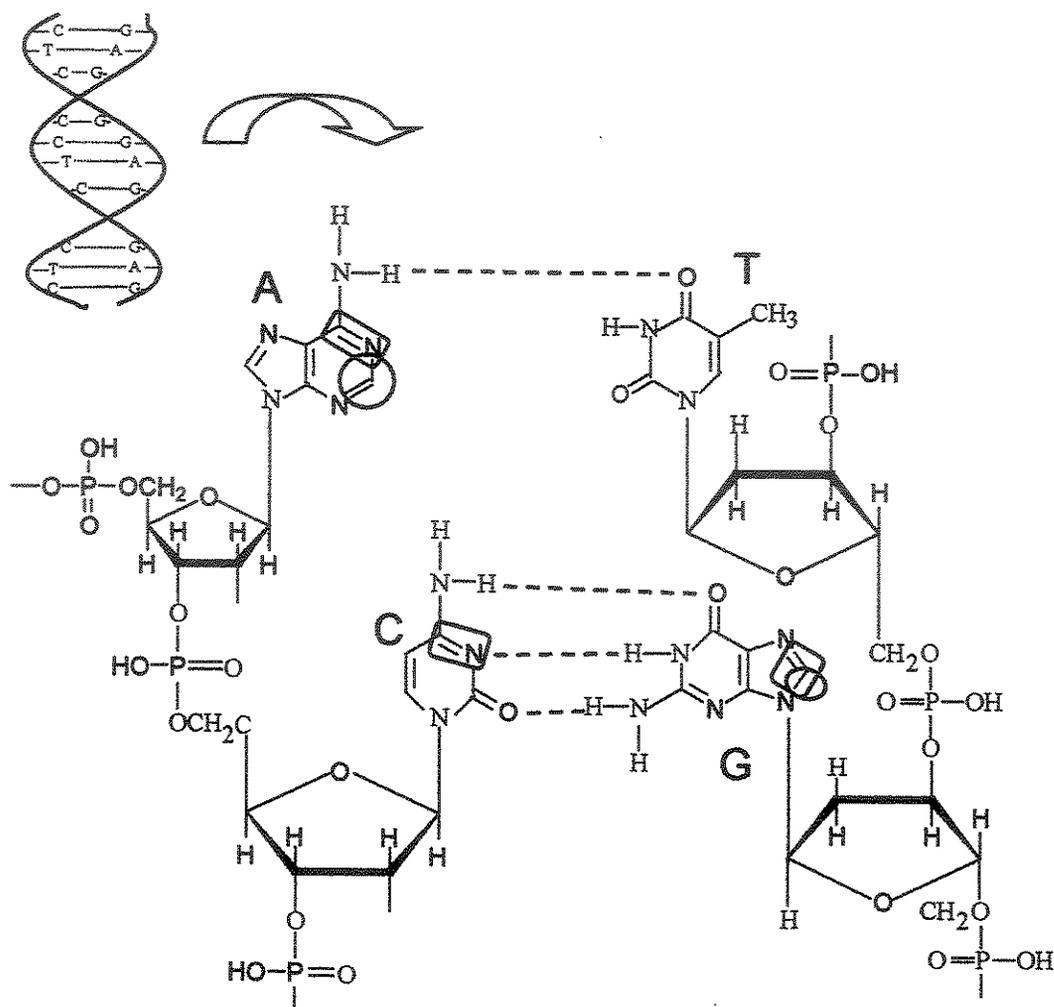


Figura III.2. Estrutura da dupla hélice do DNA (no alto). Pareamento de bases de Watson-Crick e os respectivos sítios de oxidação e redução do DNA (marcadores O correspondem dos sítios de oxidação de adenina e guanina e marcadores □ correspondem aos sítios de redução de adenina, citosina e guanina) (Palanti *et al.*, 1996).

III.2.1.a. Interação de espécies eletroativas com o DNA

A grande variedade de características estruturais e grupos funcionais químicos encontrados no DNA possibilita-o interagir com diferentes tipos de espécies eletroativas (água, íons metálicos e seus complexos, moléculas orgânicas). Os ácidos desoxirribonucléicos podem interagir de três diferentes formas com estas espécies (Palecek & Fojta, 2001):

✓ Interações geralmente não específicas e de origem eletrostática do ligante (geralmente água, íons metálicos ou seus complexos) com grupos fosfatos carregados negativamente situados ao longo da parte exterior da hélice - Interação eletrostática externa;

✓ Interações do ligante (geralmente moléculas aromáticas com atividade biológicas) com pares de bases A-T (adenina-timina) situados nos sulcos maiores ou menores dos ácidos desoxirribonucléicos - Interação por meio do sulco;

✓ Interações do ligante (geralmente moléculas planares ou aromáticas com atividade biológica) com pares de bases C-G (citosina-guanina) situados na parte interior hidrofóbica da hélice - Intercalação.

Os dois primeiros tipos de interação não requerem uma mudança conformacional do DNA, porém em muitos casos induzem transições estruturais com a formação do complexo. A intercalação requer mudanças nos ângulos torcionais da cadeia açúcar-fosfato para separação dos pares de base adjacentes de uma distância suficiente para permitir a inserção de um sistema de anéis (Palecek & Fojta, 2001).

III.2.1.b. Comportamento eletroquímico do DNA

O comportamento eletroquímico do DNA e os efeitos de sua adsorção sobre diversos tipos de eletrodos vêm sendo pesquisados desde o final da década

de 60. A maioria destes estudos está relacionada à análise e identificação estrutural de ácidos nucleicos e a relação entre o comportamento polarográfico do DNA e sua conformação em solução, mostrando as diferenças de resposta eletroquímica existentes entre o DNA nativo (*double-strand*, dsDNA), desnaturado (*single-strand*, ssDNA) e degradado (Palecek, 2002).

Os fenômenos de adsorção de ácidos nucleicos naturais e biossintéticos foram estudados, predominantemente, por polarografia de corrente alternada (A.C.) (Palecek, 1996). Em soluções neutras, levemente alcalinas e moderada força iônica, ambos DNAs nativo e desnaturado, podem ser adsorvidos na faixa de potencial entre 0 e -1,0V. Nesta faixa de potencial todos os constituintes do DNA como resíduos de base, desoxirribose e grupo fosfato podem estar envolvidos no processo de adsorção. Um pico em um potencial aproximadamente -1,2V de natureza não faradaica, produzida tanto pelo DNA nativo quanto pelo desnaturado, corresponde a dessorção ou reorientação segmentada de regiões helicoidais adsorvida por meio do esqueleto açúcar-fosfato. Em determinadas condições o dsDNA produz um outro pico correspondente a abertura das regiões da dupla-fita. O ssDNA produz um pico próximo ao potencial -1,6V que é devido ao processo de dessorção de segmentos adsorvidos, preferencialmente, através das bases (Brabec & Palecek, 1972; Brabec, 1981; Gherghi *et al.*, 2004). O contato prolongado do DNA nativo com a superfície de eletrodos pode provocar desnaturação da molécula motivada pela força de repulsão entre a superfície do eletrodo e os grupos fosfato negativamente carregados. Quanto mais negativo o valor de potencial mais facilmente ocorrerá abertura da dupla hélice (Palecek, 1996).

Dentre os componentes dos ácidos desoxirribonucleicos (bases, pentoses e grupos fosfatos), as bases nitrogenadas heterocíclicas são as únicas espécies

químicas eletroativas, ou seja, as que sofrem redução/oxidação na superfície do eletrodo de trabalho. Os pontos de redução na estrutura do DNA, que são os resíduos de adenina, citosina e guanina são mostrados na Figura III.2 (Palanti *et al.*, 1996). Os sítios de redução, que fazem parte das ligações de hidrogênio, têm como condição primária a protonação de ambas as bases adenina e citosina, seguida da transferência de carga (Smith & Elving, 1962a; Smith & Elving, 1962b). Os mecanismos de redução para adenina e citosina são apresentados na Figura III.3.

A desoxirribose ligada em um nucleotídeo, bem como os grupos fosfatos não sofrem redução em um eletrodo gotejante de mercúrio. As pentoses, ou as pentoses ligadas a grupos fosfatos podem, no entanto, influenciar a densidade de elétrons, o coeficiente de difusão e a adsorção de um nucleotídeo ou como consequência provocar uma mudança em seus comportamento polarográfico (deslocamento do $E_{1/2}$) (Palanti *et al.*, 1996).

A oxidação dos ácidos nucléicos tem sido amplamente estudada em diferentes eletrodos sólidos utilizando a técnica de pulso diferencial. A eletrooxidação do DNA, em meio ácido, relaciona-se à oxidação dos resíduos das bases purínicas, sendo as bases pirimidínicas eletroativas nessas condições. Os pontos de oxidação na estrutura do DNA, que são os resíduos de adenina e guanina são mostrados na Figura III.2. Brabec estudou a eletrooxidação do DNA em eletrodo de grafite pirolítico, em pH 6,4 utilizando a voltametria de pulso diferencial (Brabec, 1980). Nesses estudos, verificou-se que o DNA desnaturado produz dois picos bem definidos correspondentes à oxidação dos resíduos de guanina (+0,88V vs ECS) e adenina (+1,15V vs ECS). Os resultados mostraram ainda que os potenciais de oxidação são deslocados linearmente no sentido negativo de potencial com aumento de pH. Brett e colaboradores utilizando um

eletrodo de carbono vítreo em pH 5,3 confirmaram os dois picos de oxidação do DNA desnaturado, os quais foram atribuídos à oxidação da guanina (+0,87V vs ECS) e adenina (+1,12V vs ECS) (Brett *et al.*, 1994). A oxidação da guanina e da adenina (Figura III.4.) compreende duas etapas ocorrendo a perda de quatro elétrons e quatro prótons, para ambos os casos a primeira etapa é determinante para a velocidade da reação (Brett *et al.*, 1994).

O dsDNA sempre apresenta menores correntes de eletrooxidação quando comparado ao ssDNA desnaturado termicamente. A desnaturação envolve a ruptura das ligações de hidrogênio e desestabilização da estrutura da dupla hélice, que pode ser acompanhado pela completa separação das duas fitas do DNA sob determinadas condições como valores extremos de pH, temperatura elevada e na presença de solventes apróticos. O rompimento de ligações covalentes não está envolvido na desnaturação do DNA (Palecek, 1996; Palecek & Fojta, 2001).

A diferença de correntes de oxidação entre o DNA nativo e desnaturado não ocorre apenas pelo fato dos sítios de oxidação do dsDNA estarem protegidos por participarem das ligações de hidrogênio da dupla hélice, mas também por sua menor flexibilidade e maior dificuldade de adsorção na superfície de eletrodos (Brabec, 1981; Palecek & Fojta, 2001).

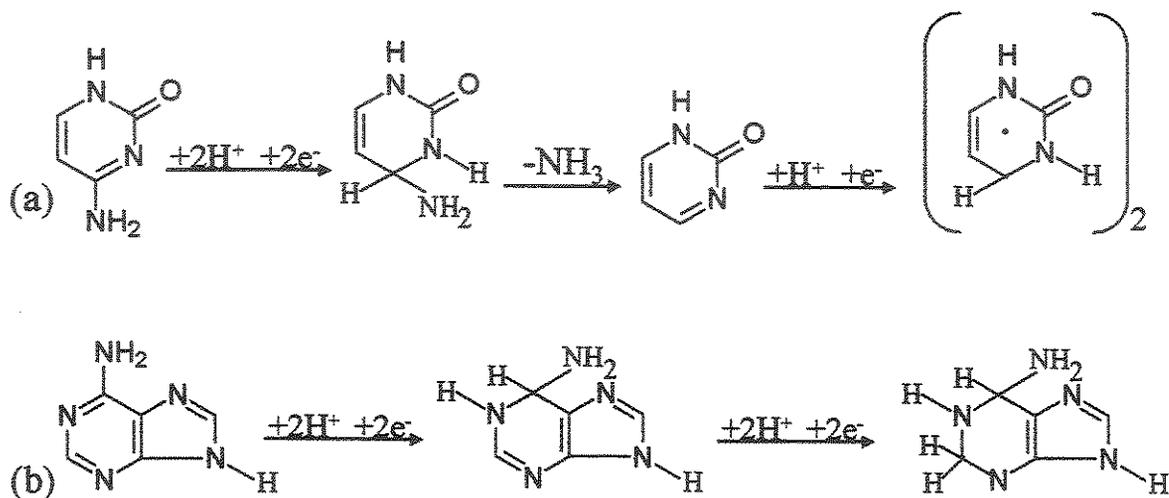


Figura III.3. Mecanismos de redução para citosina (a) e adenina (b) em eletrodo de mercúrio (Palanti *et al.*, 1996; Smith & Elving, 1962a; Smith & Elving, 1962b).

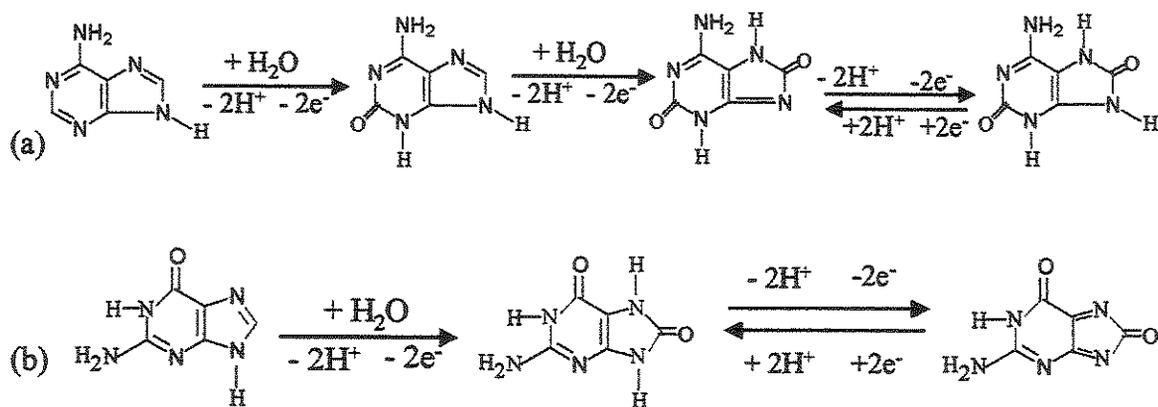


Figura III.4. Mecanismos de oxidação para adenina (a) e guanina (b) em eletrodo de grafite pirolítico (Palanti *et al.*, 1996; Smith & Elving, 1962a; Smith & Elving, 1962b).

III.3. MATERIAIS DE ELETRODOS

Em princípio, materiais de eletrodos tais como ouro, platina e materiais carbonáceos, etc., podem ser usados para a construção de biossensores amperométricos. Porém, eletrodos a base de carbono tem tido extenso uso devido às suas características vantajosas tais como, versatilidade, baixo custo, correntes residuais e resistência elétrica baixas e, uma ampla faixa de potencial de trabalho (Svancara *et al.*, 2001). O carbono é morfologicamente diverso existindo em várias formas apropriadas para aplicações eletroquímicas, como fibras de carbono, carbono vítreo, pasta de carbono, compósito e eletrodos impressos.

III.3.1. ELETRODOS DE PASTA DE CARBONO

Dentre todas as formas de material carbonáceo para construção de eletrodos, a pasta de carbono é umas das mais utilizadas por apresentar características como baixo custo, facilidade de renovação da superfície e possibilidade de miniaturização. Outra grande propriedade deste material é a versatilidade de configurações de eletrodos. O uso da pasta de carbono possibilita a modificação interna do material eletródico, diferentemente do que ocorre com eletrodos sólidos convencionais onde a modificação ocorre apenas na superfície. Isto significa que é possível a co-imobilização de enzimas, cofatores, mediadores, estabilizadores na pasta tornando uma configuração de eletrodo sem a necessidade de adição de reagentes durante a determinação (Svancara *et al.*, 2001).

A pasta de carbono é uma mistura de grafite em pó e um líquido orgânico que é imiscível em contato com soluções aquosas. A superfície dos eletrodos de pasta de carbono é muito complexa com muitas possibilidades de interações. O líquido orgânico, aglutinante, serve para dar uma forma ao eletrodo e preencher

as cavidades entre as partículas de grafite, unindo-as. Devido à forma de construção, estes eletrodos, muitas vezes podem apresentar baixa reprodutibilidade. A grafite e o aglutinante quando misturados manualmente fornecem em alguns casos, um material não homogêneo, podendo ser difícil reproduzir as pastas. Tem sido verificado que pequenas diferenças no tempo usado para a secagem, temperatura, tipo de tampão e polimento da superfície, podem ser cruciais para o resultado final (Gorton, 1995).

III.3.2. ELETRODOS IMPRESSOS (SCREEN-PRINTED ELECTRODE - SPE)

As muitas possibilidades de modificações de eletrodos sólidos permitem inúmeras configurações de sensores para atender a crescente demanda, principalmente nas áreas médicas, industriais e ambientais. Porém, a regeneração da superfície após o uso é o maior problema para o desenvolvimento de eletrodos sólidos comerciais. Tratamentos físicos, químicos ou eletroquímicos nem sempre são apropriados para regenerar eficazmente a superfície do eletrodo. Uma solução para este problema é o desenvolvimento de eletrodos descartáveis, eliminando a necessidade de regeneração da superfície.

A tecnologia de "screen-printing" (ou "silk-screening") é bem estabelecida para produção em massa de componentes eletrônicos como capacitores, resistores e condutores em circuitos impressos e, tem sido empregada com grande sucesso na fabricação dos eletrodos conhecidos como descartáveis. Esta tecnologia possibilita a produção destes eletrodos a um custo extremamente baixo (Nascimento & Angnes, 1998). Equipamentos modernos automáticos e semi-automáticos disponíveis no mercado podem ser empregados, com pequenas adaptações, na preparação de eletrodos impressos. Um bom exemplo são as máquinas de serigrafia, adaptadas eletronicamente e que fazem a função de

impressoras destes eletrodos sobre um suporte adequado, como mostrada na Figura III.5.a (www.chim.unifi.it).

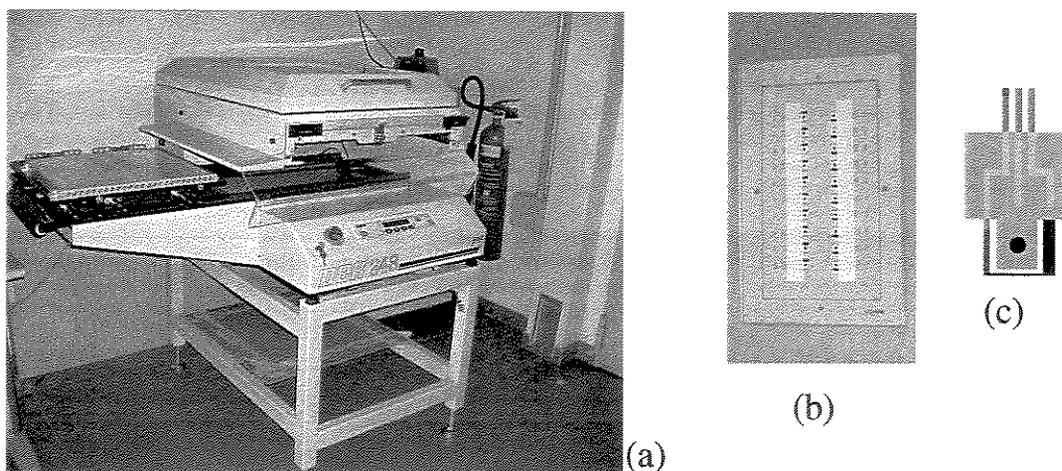


Figura III.5. (a) Modelo de máquina utilizada na fabricação de eletrodos impressos, (b) série de eletrodos impressos em suporte de PVC e (c) configuração de SPE de três eletrodos (Eletrodo de trabalho = carbono; eletrodo de referência = prata e eletrodo auxiliar = carbono).

O eletrodo impresso (EI ou SPE, do inglês "screen printed electrode") é simplesmente um filme depositado sobre um suporte inerte, geralmente de PVC ou cerâmica de alumina. Em geral, este filme é parcialmente coberto por uma segunda camada de um material isolante para definir uma área de contato elétrico numa extremidade e na outra, uma área para ser a superfície do eletrodo (Zhang *et al.*, 2000).

Um dos principais aspectos dos SPE é a simplicidade de elaboração e a possibilidade de total automação na fabricação de um sistema completo contendo os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência, todos impressos no mesmo suporte. As Figuras III.5.b e III.5.c mostram a impressão de uma série de SPE a

base de carbono sobre um suporte de PVC. Também, a modificação de superfícies destes eletrodos pode ser facilmente conduzida, uma vez que os inúmeros artificios utilizados para a modificação dos eletrodos de pasta de carbono também se adaptam aos SPE (Mascini *et al.*, 2001).

As etapas básicas da confecção de um SPE são a preparação ou seleção da tinta, seleção da tela, impressão, secagem e cura. O processo é repetido para camadas sucessivas. A secagem e cura são muitas vezes realizadas numa única etapa em temperaturas que variam desde a temperatura ambiente até 1000°C. Geralmente o material impresso requer aquecimento para a polimerização da tinta antes da camada estar pronta para a próxima etapa de impressão. Camadas metálicas são também freqüentemente utilizadas para imprimir eletrodos de referência e auxiliar conjuntamente com o eletrodo de trabalho para sistemas de três eletrodos (Nascimento & Angnes, 1998).

Tintas condutoras e isolantes comerciais, originalmente desenvolvidas para aplicações na elaboração de circuitos impressos na área de eletrônica, têm se mostradas apropriadas para serem utilizadas como material base na confecção dos SPE. Seus principais componentes são aglutinantes como borossilicatos ou aluminossilicatos, solventes, tais como, etilcelulose e aditivos. Tintas com elevada condutividade, usadas para a produção de contatos elétricos, contém pó de metais tais como Au, Pt, Ag e Pd. As tintas somente a base de carbono também estão disponíveis, pois são largamente empregadas para produção de resistores. Após a impressão da tinta no suporte, o filme é seco e, por meio deste processo forma-se um filme duro e aderente, com espessura de 10-20µm, com propriedades mecânicas e elétricas desejadas. O uso de suportes cerâmicos é bastante adequado quando são necessárias temperaturas altas de cura. Mais recentemente, tintas que requerem temperaturas de cura mais baixas têm sido

desenvolvidas, usando-se polímeros ao invés de vidros como aglutinantes. A composição exata e o processo de fabricação das tintas comerciais fazem parte de patentes e não são inteiramente reveladas (Nascimento & Angnes, 1998). As características de fabricação, bem como as diversas aplicações dos eletrodos screen-printed têm sido revisadas (Hart & Wring, 1997; Nascimento & Angnes, 1998; Hart *et al.*, 2004).

O bom desempenho dos SPE em sistemas analíticos deve-se as suas características únicas como eliminação do problema de passivação da superfície e possibilidade de miniaturização destes eletrodos, tornando-os bastante apropriados para a sua integração a pequenos equipamentos portáteis. Em sistemas envolvendo sensores e biossensores, a utilização destes eletrodos possibilita o desenvolvimento de dispositivos versáteis, práticos e de baixo custo.

Capítulo IV

Parte

Experimental

IV. PARTE EXPERIMENTAL

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico ou de laboratório, sem prévia purificação. Todas as soluções foram preparadas momentos antes dos ensaios com água purificada pelo sistema Milli-Q.

IV.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL SEGUIDO NO ESTUDO DO BIOSSENSOR A BASE DE HRP

IV.1.1. REAGENTES E MATERIAIS

As soluções utilizadas no preparo do biossensor a base de HRP estão descritas a seguir. Os demais reagentes e materiais usados no sistema estão mostrados nas Tabelas IV.1 e IV.2.

- Horseradish peroxidase, HRP (E.C. 1.11.1.7), adquirida da Sigma (EUA), 290 U/mg liofilizada. Uma solução 1mg ml^{-1} foi preparada e estocada sob refrigeração (4°C) por no máximo uma semana.
 - Glutaraldeído 50% (m/v) adquirido da Sigma (EUA), foi utilizado como reagente de imobilização. Uma solução de glutaraldeído 5% (v/v) foi preparada e mantida sob refrigeração (4°C) por no máximo uma semana.
 - Aditivo / estabilizador: DNA (D1626 de testículos de salmão) foi adquirido da Sigma (EUA). Uma alíquota contendo uma quantidade equivalente de 0,1mg de solução de DNA $0,05\text{ mol l}^{-1}$ preparada em tampão acetato ($\text{pH} = 4,7$), foi adicionada na pasta no momento da adição da enzima.
 - Sílica gel com diâmetro médio de poros de 6 nm, área superficial específica de $329\text{ m}^2\text{g}^{-1}$ e tamanho de partícula de 0,040 - 0,063 nm foi usada sem nenhum tratamento prévio.
-

➤ Lâmina de platina 99,9 % com 0,25 mm de espessura e grafite em pó 99,9 %, com granulometria de 1-2 micron foram adquiridos da Aldrich.

Tabela IV.1. Reagentes utilizados no estudo do biossensor a base de HRP.

REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Nujol (óleo mineral)	Schering-Plough Ltda.
<i>Substratos da enzima</i>	
Ácido cafêico	Acros
Ácido clorogênico (99%)	Acros
Ácido gálico	Sigma
Ácido tânico	Merck
Catecol (99%)	Aldrich
(+) - Catequina	Sigma
(-) - Epicatequina	Sigma
(-) - Galato de epicatequina	Sigma
(-) - Galocatequina	Sigma
Peróxido de hidrogênio 30% (v/v)	Merck
Quercitina (99%)	Acros
<i>Tampões</i>	
Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etano sulfônico (Hepes)	Sigma
Ácido 1,4 piperazina-dietano sulfônico (Pipes)	Sigma
Fosfato de sódio dibásico anidro P.A.	Synth
Fosfato de sódio monobásico anidro P.A.	Synth
Tris-hidroximetil-aminometano (Tris)	Sigma

Tabela IV.2. Reagentes utilizados no estudo de interferentes, no método de Folin-Ciocalteu e no estudo de antioxidantes.

REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Ácido ascórbico	Merck
Ácido cítrico	Sigma
Ácido glutâmico	Sigma
Ácido tartárico	Sigma
1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (90%)	Sigma
Cafeína	Vetec
Carbonato de sódio	Synth
Glicose	Vetec
Reagente de Folin-Ciocalteu 2,0 N	Sigma
6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-ácido carboxílico (Trolox)	Acros

IV.1.2. MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DA SÍLICA GEL COM ÓXIDO DE TITÂNIO - SÍNTESE DA MATRIZ SÍLICA-TITÂNIO (Si -Ti)

A superfície da sílica gel foi modificada com óxido de titânio conforme procedimento descrito por Kubota e col. (Kubota *et al.*, 1991). A reação de modificação da superfície da sílica ocorre através de seus grupos silanóis, onde 60g de sílica gel foi previamente ativada à 150°C por quatro horas. Após, este material foi misturado com 10ml de tetracloreto de titânio em 300ml de tetracloreto de carbono e deixados em refluxo por oito horas. Em seguida, a sílica foi filtrada, lavada com tetracloreto de carbono e seca a vácuo. O material seco foi hidrolisado por imersão em água deionizada, depois de lavado até teste negativo para cloreto e seco em estufa à 150°C.

V.1.3. CARACTERIZAÇÃO DA MATRIZ SÍLICA-TITÂNIO (Si - Ti)

Como a caracterização detalhada deste tipo de material já foi realizada (Kubota *et al*, 1991), foram feitos somente a determinação da quantidade de titânio (IV) enxertado na superfície da sílica gel e a determinação da mudança da área superficial do novo material.

O teor de óxido de titânio enxertado na superfície da sílica foi determinado por Fluorescência de Raios-X, os padrões utilizados para a construção da curva de calibração foram preparados a partir da mistura da sílica gel com óxido de titânio previamente triturado. A área superficial foi medida pelo método BET de multipontos (Brunauer, Emmet, Teller).

IV.1.4. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA

O procedimento consistiu em ativar, inicialmente, a superfície da sílica-titânio com glutaraldeído e solução tampão fosfato $0,1\text{mol l}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$ e após a secagem do material adicionou-se a solução de enzima. A enzima Horseradish peroxidase (HRP) foi imobilizada sobre a superfície da sílica modificada por ligação covalente cruzada. Para isto, foram usados 25 mg de Si-Ti, 5 ml de glutaraldeído 5% (v/v) e 100-300 ml de solução de HRP 1mg ml^{-1} o qual corresponde $0,6$ a 2 U mg^{-1} de pasta de carbono. O DNA foi acrescentado à pasta no momento da adição da enzima. O uso do DNA como aditivo geralmente garante melhor desempenho em termos de sensibilidade e estabilidade (Rosatto *et al.*, 2001)

IV.1.5. PREPARAÇÃO DO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO - CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR

Na preparação do eletrodo de pasta de carbono foram misturados 25 mg de grafite em pó e 25 mg de Si-Ti contendo HRP imobilizada, a esta mistura

adicionou-se uma quantidade ($\cong 35 \mu\text{l}$) de óleo mineral e misturou-se até obter uma pasta homogênea.

Esta pasta foi colocada em uma cavidade na extremidade de um tubo de vidro (0,4 mm de diâmetro interno) com uma profundidade de 1mm e pressionada para conseguir uma superfície lisa. O formato do eletrodo é mostrado na Figura IV.1.

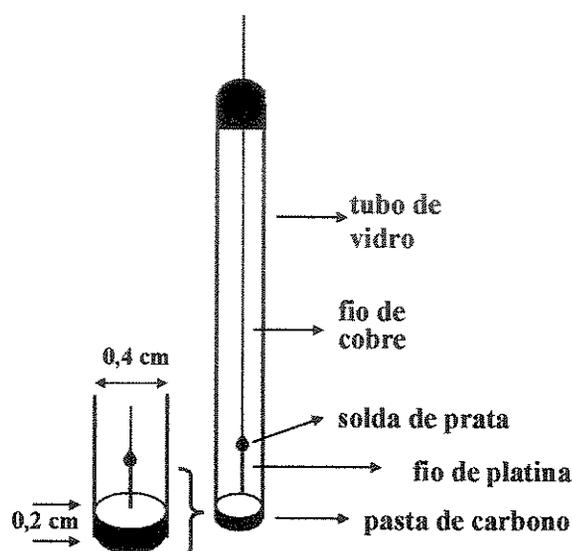


Figura IV.1. Esquema do eletrodo de trabalho modificado com Si-Ti / HRP.

IV.1.6. CÉLULA ELETROQUÍMICA E INSTRUMENTAÇÃO

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato da Autolab[®] modelo PGSTAT 30 (EcoChemie, Holanda) interfaceado a um microcomputador para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados.

Utilizou-se uma célula eletroquímica de três eletrodos (Figura IV.2), usando o biossensor como eletrodo de trabalho, uma espiral de platina como eletrodo auxiliar e eletrodo de prata/cloreto de prata como referência. Também utilizou-se para medidas de pH das soluções, um potenciômetro modelo Corning 350.

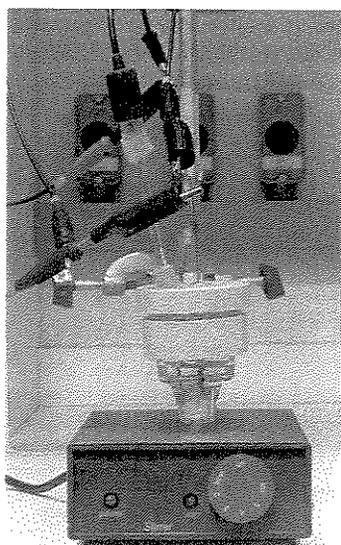


Figura IV.2. Esquema da célula eletroquímica de trabalho.

IV.1.7. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS VEGETAIS

Para avaliar a sua performance, o biossensor foi aplicado em amostras comerciais de chá e café. No caso das amostras de chás antes de preparar os extratos, foi feita uma amostragem que consistiu em misturar em um recipiente, todas as quantidades dos envelopes individuais dos chás contidos em uma embalagem comercial. Após, os extratos em uma concentração de 1% (m/v), foram preparados por extração líquido-sólido em água deionizada (100°C) por 15 min.

A quantidade de fenóis totais foi calculada utilizando curva de calibração em função da concentração de ácido clorogênico. A resposta obtida foi comparada com a obtida pelo método oficial de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). Os dois tipos de amostras não necessitaram de tratamento prévio quando quantificadas pelo método do biossensor. Para o método de referência as amostras de café foram centrifugadas por 10 min. (2500 rpm) e foram diluídas seis vezes em água deionizada. As amostras de chá foram diluídas quatro vezes em água deionizada.

IV.1.8. DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU

A concentração de fenóis totais nos extratos vegetais foi determinada por espectrofotometria conforme procedimento padrão de Folin-Ciocalteu (Singleton *et al.*, 1999). O método baseia-se na reação entre o reagente de Folin-Ciocalteu (uma mistura de heteropoliácidos fosfomolibdico e fosfotungstico) e compostos fenólicos. Os produtos resultantes da oxidação formam um complexo azul com molibdênio e tungstênio.

Neste teste uma alíquota de 30ml de solução da amostra diluída foi misturada com 150ml do reagente Folin-Ciocalteu comercial e 450ml de carbonato de sódio 20 %. O volume final foi ajustado com água destilada. A cor gerada após duas horas de reação à temperatura ambiente foi lida à 735 nm em um espectrofotômetro UV/VIS Pharmacia Biotech[®], modelo Ultrospec 2000, conectado a um PC com software Wavescan[®]. A curva de calibração foi obtida utilizando ácido clorogênico como padrão.

IV.1.9. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO DPPH[•]

A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo ensaio do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH[•]) (Molyneux, 2004). O método baseia-se na reação entre um antioxidante (AH) com uma solução do radical livre relativamente estável DPPH[•], disponível comercialmente.

Neste teste, alíquotas de volumes conhecidos dos extratos vegetais, foram adicionadas a uma solução etanólica 0,1mmol l⁻¹ de DPPH[•]. Na forma radicalar, DPPH[•] apresenta um máximo de absorção a 517nm, porém, sob redução por um

antioxidante a forma estabilizada (não radicalar) do DPPH não apresenta absorção.

O decréscimo da absorbância da solução do radical a 517nm, após 15 min de reação, foi monitorado em um espectrofotômetro UV/VIS Pharmacia Biotech[®], modelo Ultrospec 2000, conectado a um PC com software Wavescan[®]. Todos os testes foram realizados em triplicata e o Trolox foi utilizado como composto de referência antioxidante.

IV.2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL SEGUIDO NO ESTUDO DO BIOSENSOR A BASE DE DNA

IV.2.1. REAGENTES E MATERIAIS

Os reagentes e materiais utilizados no estudo do biossensor a base de DNA estão mostrados na Tabela IV.3.

Tabela IV.3. Reagentes utilizados no estudo do biossensor a base de DNA.

REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Acetato de sódio	Merck
Ácido etilenodiamino tetracético (EDTA)	Merck
Cloreto de sódio	Merck
dsDNA type XV (<i>Calf thymus</i>)	Sigma
Fosfato de sódio dibásico anidro P.A. (Na_2HPO_4)	Merck
Fosfato de sódio monobásico anidro P.A. (NaH_2PO_4)	Merck
Peróxido de hidrogênio (30% v/v)	Merck
Sulfato de ferro	Sigma
6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-croman-2-ácido carboxílico (Trolox) 97%	Sigma

IV.2.2. ELETRODOS IMPRESSOS (SCREEN-PRINTED ELECTRODE- SPE)

O eletrodo impresso foi adquirido comercialmente da empresa SIAP (Florença, Itália). O eletrodo (célula eletroquímica descartável) é constituído de um eletrodo de grafite circular (diâmetro de 3mm) como eletrodo de trabalho, um eletrodo de prata como pseudo-eletrodo de referência e um eletrodo de grafite como auxiliar. O eletrodo foi impresso em um suporte de poliéster

(espessura de 450 micron). A dimensão de cada eletrodo descartável é de 0,8cm x 3cm. Para o contato elétrico com o aparelho foi usado um conector padrão RS conforme pode ser visto em Figura IV.3.

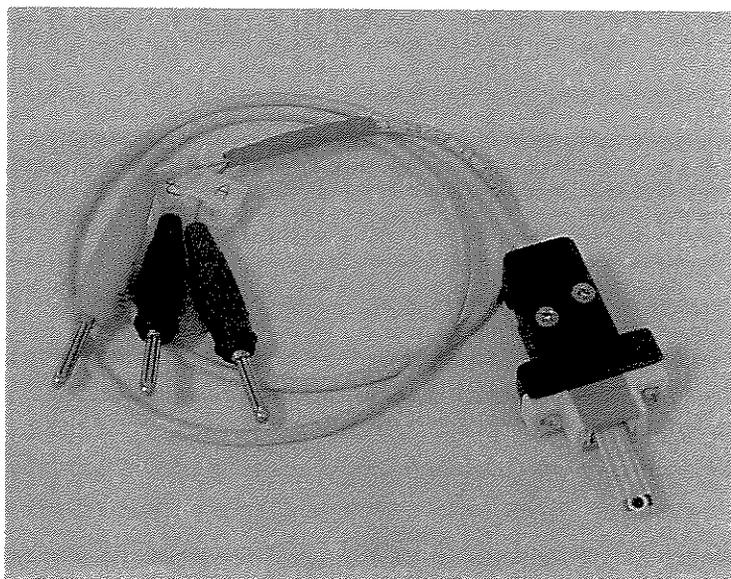


Figura IV.3. Conector usado para o contato elétrico dos eletrodos impressos com o aparelho de medidas eletroquímicas.

IV.2.3. PREPARAÇÃO DO BIOSENSOR A BASE DE DNA

Para preparar o biossensor, inicialmente foi realizado um pré-tratamento eletroquímico no SPE por aplicação de um potencial de +1,6V vs Ag-SPE por 120s e após +1,8V vs Ag-SPE por 60s em tampão acetato 0,25mol l⁻¹ com 10mM KCl sob agitação.

O biossensor foi preparado por imobilização de dsDNA (*Calf thymus*) dissolvido em tampão acetato 0,25M (pH = 4,75), por aplicação de um potencial de +0,5V vs Ag-SPE por 300s, sob agitação.

IV.2.4. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um Palm Sens[®] (Palm Instruments BV, Holanda) interfaceado a um PC de bolso para controle de potencial e aquisição de dados (Figura IV.4).

A técnica eletroquímica utilizada para caracterização do biossensor foi a voltametria de onda quadrada. O eletrodo foi imerso em solução tampão acetato 0,25M (pH = 4,75) contendo 10mM KCl. Os parâmetros do sistema foram: Faixa de potencial: +0,2V a +1,35V, Frequência = 200Hz, $E_{\text{step}} = 15\text{mV}$, $E_{\text{amplitude}} = 40\text{mV}$. Todos os experimentos foram realizados a temperatura ambiente.

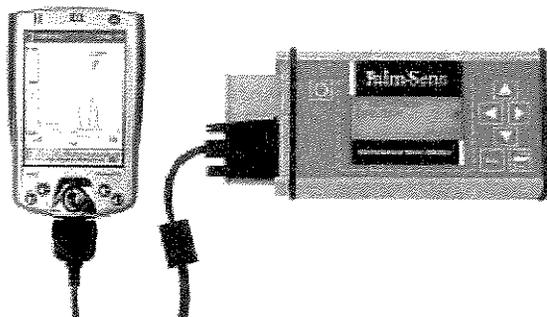


Figura IV.4. Palm Sens[®] interfaceado a um PC de bolso para controle e aquisição dos dados.

IV.2.5. APLICAÇÃO EM AMOSTRAS

Para avaliar a sua performance o biossensor foi aplicado em amostras comerciais de chás. Semelhante como no preparo das amostras para o biossensor a base de HRP, foi feita uma amostragem, antes de preparar os extratos, que consistiu em misturar em um recipiente, todas as quantidades dos envelopes individuais dos chás contidos em uma embalagem comercial. Após, amostras de *Peumus boldus* (boldo), *Baccharis genstelloides* (carqueja), *Cymbopogon citratus* (cidreira), *Foeniculum vulgare* (erva doce), *Mentha piperita* (hortelã) e

Camellia sinensis (verde) em uma concentração de 5% (m / v), foram preparadas por extração líquido-sólido em água deionizada (100°C) por 15 min. Alíquotas das amostras, sem nenhum pré-tratamento, foram adicionadas ao sistema.

IV.2.6. EFEITO DE DANO AO DNA E EFEITO DA PRESENÇA DE ANTIOXIDANTES

Numa primeira etapa o biossensor foi posto em contato em uma solução oxidante (Fenton), com o objetivo de promover danos ao DNA imobilizado. Para isto, o eletrodo foi imerso em uma solução contendo íons $Fe^{2+}/EDTA$ e a formação dos radicais hidroxila ($^{\circ}OH$) foi iniciada pela adição de H_2O_2 no sistema. Após um curto tempo de imersão na solução de Fenton (5s), o eletrodo foi lavado e imerso em solução tampão acetato para registro do sinal.

O efeito da presença de antioxidantes foi avaliado pela adição de alíquotas de chás no sistema. O efeito protetor apresentado pelas amostras foi comparado ao efeito apresentado por uma solução de Trolox.

O efeito da interação dos radicais hidroxila com o DNA imobilizado e o efeito da presença das amostras no sistema, foram avaliados pelas mudanças no pico de oxidação da guanina em um potencial próximo à 1V obtido por voltametria de onda quadrada.

Para minimizar as diferenças entre os eletrodos usados individualmente, as medidas foram feitas obtendo-se os resultados em termos do sinal relativo (normalizado) entre a corrente de pico do eletrodo na ausência/presença de antioxidante (I_p) e a corrente de pico do eletrodo referente ao sinal do dsDNA (I_{pDNA}) para o mesmo eletrodo e obtidos de acordo com as etapas a seguir:

a) Sinal do branco ($I_{p\text{branco}}$) corresponde ao sinal do dsDNA e é expresso como a razão entre a primeira (I_{p1}) e segunda (I_{p2}) medida das correntes de pico, obtidas em tampão acetato;

b) $I_{p\text{DNA}}$ → corresponde somente a medida da corrente de pico do dsDNA em tampão acetato;

c) Efeito da solução de Fenton → É expresso como a razão entre as correntes de pico, para um mesmo biossensor, após a imersão na solução de Fenton, na ausência de antioxidante (I_{pa}) e a corrente de pico do dsDNA ($I_{p\text{DNA}}$), ($I_{pa} / I_{p\text{DNA}}$);

d) Efeito da presença de antioxidantes no sistema → é expresso como a razão entre as correntes de pico, para um mesmo biossensor, após a imersão na solução de Fenton, na presença (I_{pp}) de antioxidantes e a corrente de pico do DNA ($I_{p\text{DNA}}$), ($I_{pp} / I_{p\text{DNA}}$).

Os resultados $I_{pa} / I_{p\text{DNA}}$ foram comparados com $I_{pp} / I_{p\text{DNA}}$ e relacionados com o branco. Para um antioxidante ideal a razão $I_{pp} / I_{p\text{DNA}}$ deve ser igual a razão do branco.

Capítulo V

Resultados e Discussão

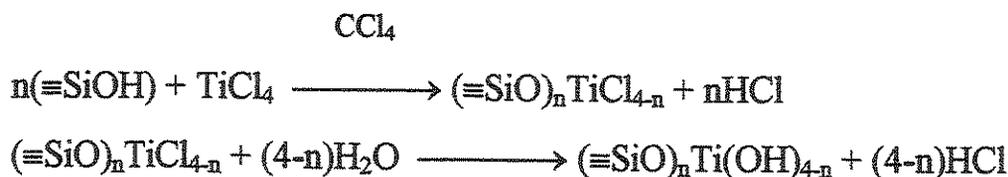
V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

V.1. BIOSSENSOR A BASE DE HRP - Caracterização da matriz sílica-titânio (Si - Ti) e imobilização da enzima HRP

O uso de sílicas quimicamente modificadas possui a vantajosa propriedade de combinar as características intrínsecas da matriz inorgânica à reatividade particular dos modificadores. Para estudos eletroquímicos o uso de sílicas modificadas permite produzir na interface eletrodo-solução uma variedade de funcionalidades orgânicas que estão covalentemente ligadas à matriz condutora, prevenindo o seu desprendimento para a solução, como ocorre muitas vezes, para espécies orgânicas adicionadas diretamente sobre o material de eletrodo.

A sílica modificada com óxido de titânio é um material bem conhecido por sua estabilidade térmica e química em meio neutro e ácido. As características gerais da sílica gel tais como: porosidade, área superficial, tamanho do poro, tamanho da partícula não são afetadas de forma significativa pela imobilização do óxido de titânio. O óxido de titânio oferece uma boa possibilidade para imobilizar enzimas devido a sua afinidade pelos grupos carboxílicos dos resíduos de aminoácidos terminal das moléculas de enzima (Kubota *et al.*, 1991).

A síntese da Si-Ti foi seguida de acordo com o procedimento descrito por Kubota e col. (Kubota *et al.*, 1991). O método de preparação é bastante eficiente e reprodutível. O processo é realizado em duas etapas; a primeira consiste no enxerto do tetracloreto de titânio na superfície da sílica, seguido da hidrólise originando o óxido de titânio, representado pelas equações a seguir:



Como a caracterização desse material já foi investigada (Kubota *et al.*, 1991), foram feitas somente a determinação da quantidade de titânio (IV) enxertado sobre a superfície da sílica-gel por medidas de Fluorescência de Raios-X e a determinação da área superficial pelo método de multipontos BET. O teor de óxido de titânio obtido foi de $0,33 \text{ mmol g}^{-1}$ de sílica enquanto que, a modificação da superfície da sílica com óxido de titânio promoveu uma diminuição da área superficial, que era inicialmente de $329 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ e posteriormente ocorreu uma redução para $294 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Estes resultados estão de acordo com a literatura (Kubota *et al.*, 1991), onde uma diminuição da área superficial pode ser atribuída ao bloqueio dos poros menores da sílica durante o processo de modificação.

A imobilização de HRP sobre ST foi muito simples e provavelmente ocorre através do grupo carboxílico da enzima e o óxido de titânio enxertado sobre a superfície da sílica de maneira similar ao descrito por Kennedy e col. (Kennedy & Kay, 1976; Kennedy & Cabral, 1987). O glutaraldeído foi utilizado para fixar a enzima através de ligações intermoleculares, conforme a Figura V.1. (Scouten *et al.*, 1995), por meio de ligação covalente cruzada. Neste método, ocorre a formação de uma rede polimérica (formação de partículas macroscópicas) em decorrência da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e/ou moléculas do suporte com o reagente de imobilização.

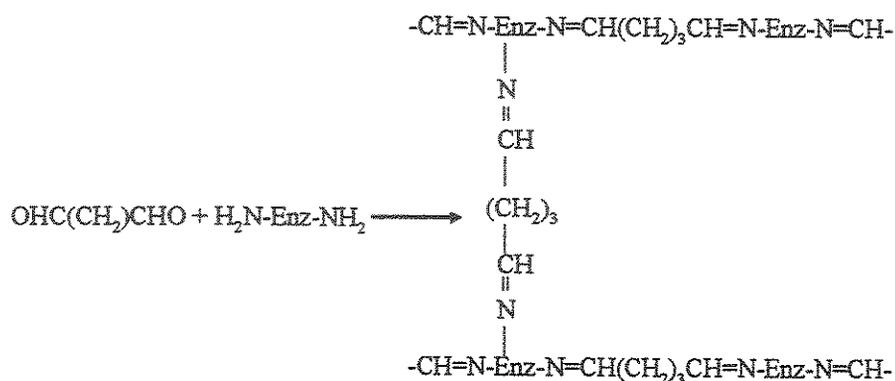


Figura V.1. Ligação cruzada envolvendo a reação entre o glutaraldeído e os grupos amina residuais livres da enzima (Scouten *et al.*, 1995).

V.2. MECANISMO DE RESPOSTA DO BIOSSENSOR A BASE DE HRP

A Figura V.2 representa as reações envolvidas no mecanismo de resposta de eletrodos modificados com HRP para detecção de compostos fenólicos. Os biossensores a base de HRP seguem uma cinética de dupla-troca modificada (pingue-pongue), caracterizada pela interação com dois substratos diferentes, o peróxido de hidrogênio e um composto doador de elétrons como um derivado fenólico (Dunford, 1991). De acordo com este mecanismo, as moléculas de enzima na superfície do eletrodo são oxidadas pelo peróxido de hidrogênio, sendo em seguida reduzidas pelo composto fenólico. Durante esta última reação, as moléculas de composto fenólico são convertidas em quinonas e/ou radicais livres e esses produtos, normalmente eletroativos, podem ser reduzidos em potenciais próximos de 0V vs ECS. A corrente de redução medida é proporcional à concentração do composto fenólico na solução. Os compostos fenólicos geralmente facilitam a transferência eletrônica e são usados como mediadores de elétrons na reação.

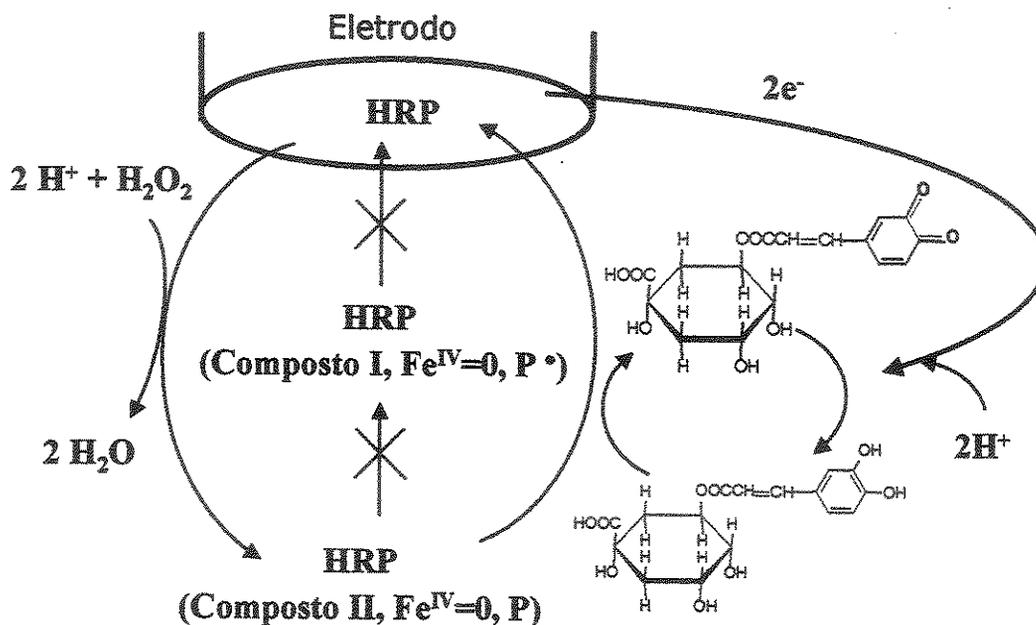


Figura V.2. Reações envolvidas no mecanismo de resposta do biossensor a base de HRP para compostos fenólicos.

A sensibilidade de muitos biossensores a base de HRP é limitada pela alta corrente devido à transferência de elétrons direta entre a enzima e a superfície do eletrodo na presença de peróxido de hidrogênio. A contribuição da transferência direta de elétrons, neste caso, pode ser ignorada como pode ser visualizado na Figura V.3. que mostra os voltamogramas cíclicos do biossensor desenvolvido, obtidos em solução tampão fosfato na presença/ausência de H_2O_2 e ACG. Pode-se observar que na solução contendo somente o H_2O_2 , a corrente electrocatalítica direta foi bloqueada na superfície do eletrodo. A transferência de elétrons direta é bloqueada provavelmente devido ao caráter isolante da matriz onde a enzima está imobilizada (Rosatto *et al.*, 1999).

Quando o ácido clorogênico está presente no sistema, verifica-se uma alta corrente catódica. Isto pode ser associado ao processo catalítico de redução dos radicais fenólicos formados na reação do ácido clorogênico com os compostos intermediários oxidados da HRP.

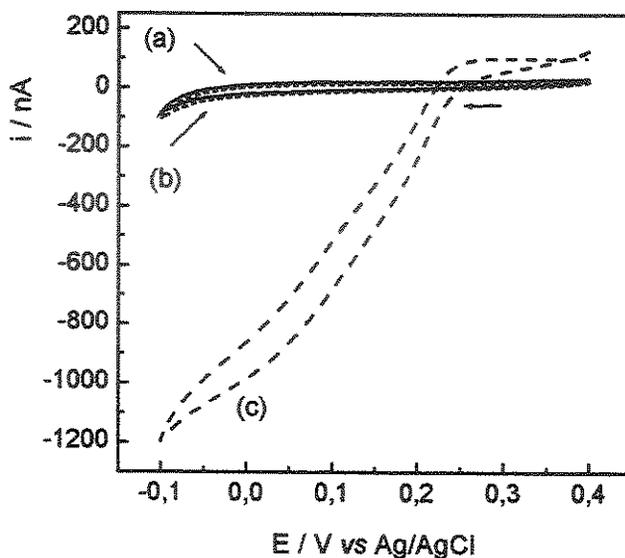


Figura V.3. Voltamogramas cíclicos comparativos do eletrodo de pasta de carbono em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$; em condições estáticas, (a) (—) eletrodo de ST/HRP; (b) (...) eletrodo ST-HRP na presença de $500 \mu\text{mol l}^{-1}$ de H_2O_2 e (c) (---) eletrodo ST-HRP na presença de $500 \mu\text{mol l}^{-1}$ de H_2O_2 e $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ de ACG. $v = 20 \text{ mV/s}$.

V.3.AVALIAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO BIOSENSOR

V.3.1. EFEITO DA QUANTIDADE DE HRP NA PREPARAÇÃO DO BIOSENSOR

A quantidade de enzima utilizada deve ser suficiente para garantir a reação com o substrato. Teoricamente um aumento na concentração de enzima favorece um aumento na velocidade de reação enzimática, porém para concentrações muito altas da proteína, pode causar limitações difusionais, diminuindo a sensibilidade do biossensor. A Figura V.4. mostra o efeito da quantidade de enzima HRP na resposta do biossensor, para 50 mg de pasta preparada, em termos de sensibilidade da curva de calibração para ACG. A resposta aumenta à medida que aumenta a quantidade de enzima e para quantidades maiores que 1,45 U de enzima observou-se uma diminuição da sensibilidade do sensor. Este comportamento pode ser explicado em termos dos comentários feitos acima. Optou-se para preparar o biossensor o uso de 1,16 U mg^{-1} porque não houve variação significativa de sensibilidade entre 1,16 a 1,45 U mg^{-1} .

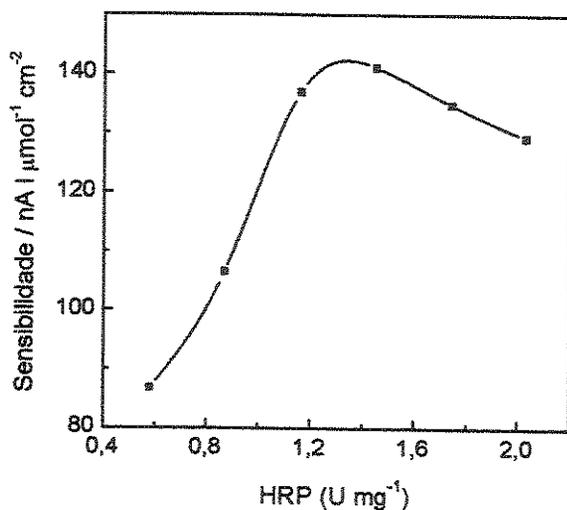


Figura V.4. Efeito da quantidade de enzima HRP na resposta do biossensor para ácido clorogênico, $E_{\text{apl}} = 0\text{mV Ag/AgCl}$, solução tampão fosfato 0,1 mol l^{-1} , pH = 7,0 e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 500 \mu\text{mol l}^{-1}$.

V.3.2. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

A concentração de peróxido de hidrogênio é importante, para conseguir uma boa sensibilidade e impedir a formação de enzima inativa devido a uma alta concentração deste reagente (Adediran & Lambeir, 1989).

A Figura V.5. mostra a dependência da concentração de peróxido de hidrogênio na resposta do eletrodo para uma quantidade fixa de ácido clorogênico. Observa-se um aumento da corrente do eletrodo até uma concentração do reagente igual a $100\mu\text{mol l}^{-1}$. Para concentrações maiores não houve variação significativa. Este resultado indica que uma razão entre peróxido de hidrogênio e ácido clorogênico é em torno de 10, garantindo uma concentração suficiente de substrato oxidante, por isto, optou-se por utilizar uma concentração de $500\mu\text{mol l}^{-1}$ nos demais experimentos.

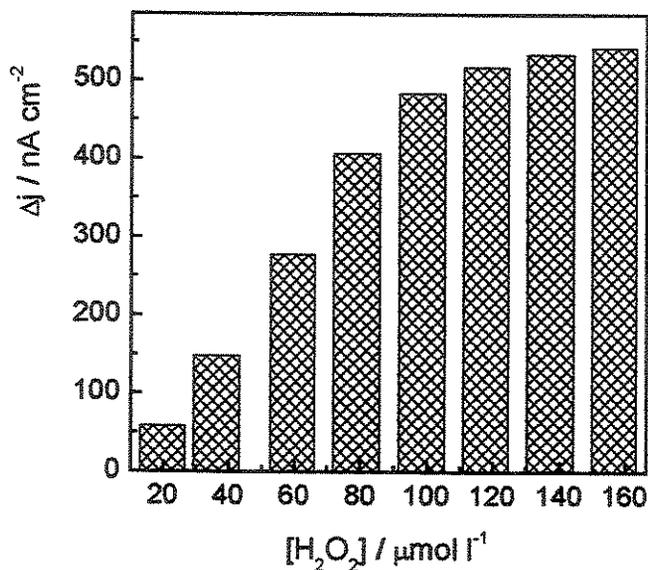


Figura V.5. Influência da concentração de H₂O₂ sobre a resposta do biossensor para ácido clorogênico obtida em solução tampão fosfato $0,1\text{ mol l}^{-1}$, pH = 7,0 contendo $10\mu\text{mol l}^{-1}$ de ácido clorogênico, $E_{\text{ap1}} = 0\text{ mV vs Ag/AgCl}$.

V.3.3. INFLUÊNCIA DO TIPO E DA CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO TAMPÃO

A atividade de um sistema enzimático depende não só do valor de pH, mas também do tipo e concentração usada da solução tampão que pode afetar a atividade da enzima. Por isso a resposta do biossensor foi avaliada na presença de solução tampão Fosfato, Tris, Pipes e Hepes, com o mesmo pH e concentração.

A Figura V.6. mostra as respostas obtidas em termos de sensibilidade da curva de calibração do ácido clorogênico, utilizando diferentes tampões. A melhor resposta foi obtida em solução tampão fosfato. O tampão fosfato é um importante metabólito e é conhecido por inibir a atividade de algumas enzimas como quinases, desidrogenases e ureases (Stevens, 1993). Porém, neste caso o tampão fosfato pode atuar como ativador da enzima, o que justificaria o resultado obtido. Uma outra possibilidade seria a interação entre o íon fosfato e o ferro do grupo heme da enzima e\ou a melhor facilidade dos íons difundirem através do eletrodo de pasta de carbono, em comparação com os ânions dos outros tampões investigados.

A influência da concentração da solução tampão na resposta do biossensor pode ser vista na Figura V.7. Observa-se um aumento significativo da sensibilidade do biossensor, com o aumento da concentração até $0,25 \text{ mol l}^{-1}$. Acima desta concentração a sensibilidade praticamente manteve-se constante. Assim, fixou-se a concentração da solução tampão fosfato igual a $0,25 \text{ mol l}^{-1}$ para os estudos posteriores.

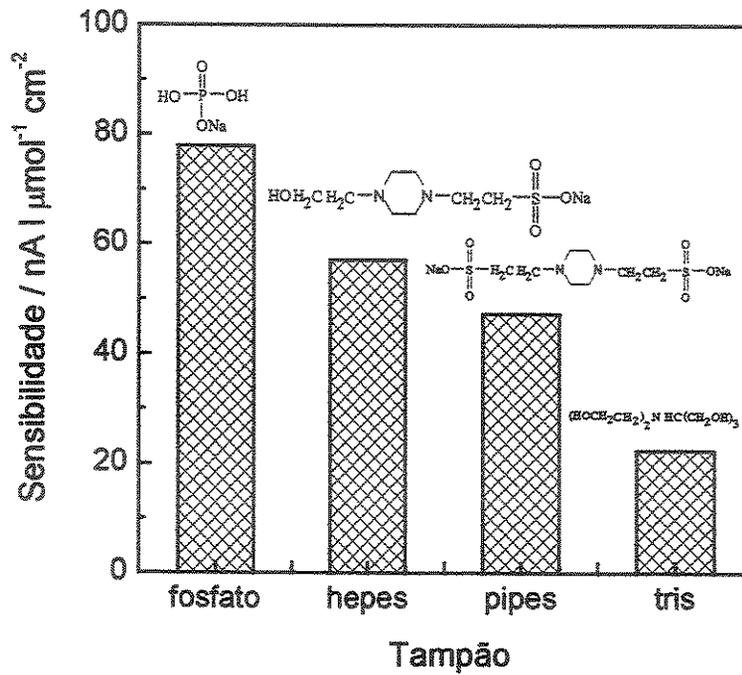


Figura V.6. Efeito da solução tampão sobre a resposta do biossensor em termos de sensibilidade, obtida em um potencial aplicado de 0mV vs Ag/AgCl, [H₂O₂] = 500μmol l⁻¹, pH das soluções = 7,0 e concentração das soluções = 0,1 mol l⁻¹, [HRP] = 1,2 U mg⁻¹.

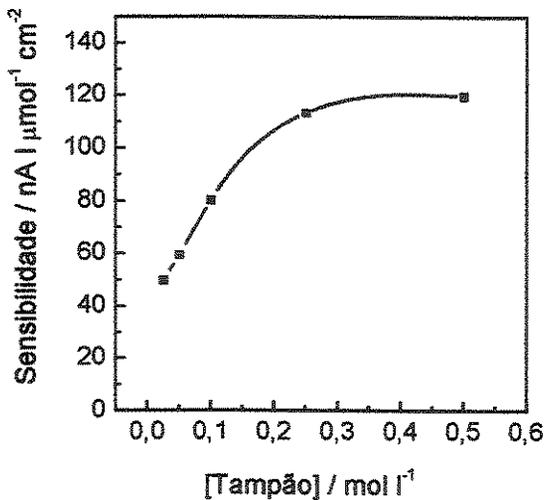


Figura V.7. Influência da concentração da solução tampão fosfato na resposta do biossensor, pH das soluções testadas = 7,0, E_{apl.} = 0 mV vs Ag/AgCl e [H₂O₂] = 500μmol l⁻¹ e [HRP] = 1,2 U mg⁻¹.

V.3.4. INFLUÊNCIA DO pH DA SOLUÇÃO TAMPÃO

O efeito do pH na estabilidade da enzima deve ser levado em consideração no estudo porque as enzimas apresentam um pH característico em que sua atividade é máxima e acima ou abaixo desse pH, a sua atividade se reduz.

A Figura V.8. mostra a influência do pH da solução tampão sobre a resposta do biossensor para ácido clorogênico, na presença de H_2O_2 . Pode-se observar pela tendência do gráfico que em pH próximo ou igual a 7,0 a resposta é máxima, esse pH é o mesmo valor observado para a enzima solúvel (Maehly, 1955).

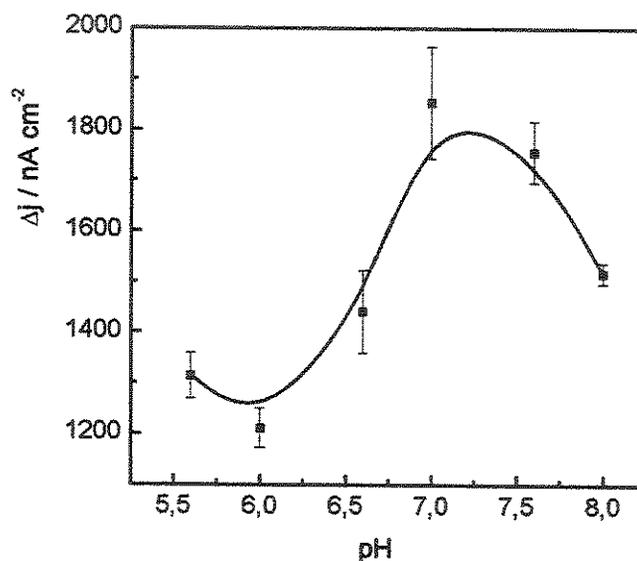


Figura V.8. Resposta do biossensor para ácido clorogênico em função do pH da solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol l}^{-1}$, $E_{\text{apl}} = 0 \text{ mV vs Ag/AgCl}$ e $[H_2O_2] = 100 \mu\text{mol l}^{-1}$ e $[ACG] = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$.

V.3.5. EFEITO DO POTENCIAL NA RESPOSTA DO BIOSENSOR

O potencial de trabalho tem uma influência significativa na resposta do sensor. O valor de potencial aplicado ao eletrodo irá contribuir para um aumento da sensibilidade e seletividade do sistema. Por isso estudou-se o efeito do potencial aplicado e os resultados estão apresentados na Tabela V.1. Observa-se um aumento da sensibilidade na resposta do biossensor à medida que o potencial imposto ao eletrodo torna-se mais negativo. Apesar disto, o potencial foi fixado em -50mV vs Ag/AgCl , porque foi observada uma pequena variação nos valores de sensibilidade na resposta do sensor entre -50mV a -100mV . Este intervalo é mais apropriado para as medidas, porque em intervalo de potencial -200mV a 0mV vs ECS , a contribuição de espécies interferentes é minimizada. Outra justificativa seria devido ao fato que em potenciais mais negativos tem sido observado uma desativação irreversível da HRP, devido a formação de um estado inativo da enzima (Csöregi *et al.*, 1993).

Tabela V.1. Influência do potencial aplicado sobre a sensibilidade da resposta do biossensor para ácido clorogênico, obtida em solução tampão fosfato $0,25\text{ mol l}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$ com $500\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ de H_2O_2 .

E_{apl} (mV vs Ag/AgCl)	Sensibilidade ($\text{nA l } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)
100	52 ± 2
50	73 ± 1
0	136 ± 2
-50	156 ± 3
-100	159 ± 2

V.4. CARACTERÍSTICAS DO SENSOR

V.4.1. CURVA ANALÍTICA E TEMPO DE RESPOSTA PARA ÁCIDO CLOROGÊNICO

A Figura V.9. mostra a curva de calibração obtida com o biossensor para o ácido clorogênico, na presença de H_2O_2 , em solução tampão fosfato, $\text{pH} = 7,0$. O biossensor nestas condições mostrou uma faixa de trabalho de 1 a $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ ajustada pela equação, $j = 323 (\pm 73) + 181 (\pm 2,4) [\text{ácido clorogênico}]$, com um coeficiente de correlação de 0,9997, $n = 6$, onde a densidade de corrente j é dada em nA cm^{-2} e a concentração de ácido clorogênico em $\mu\text{mol l}^{-1}$, com uma concentração fixa de H_2O_2 de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$. O limite de detecção foi de $0,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ calculado como sendo $3\sigma/S$ (Analytical Methods Committee, 1987) onde σ é o desvio padrão e S a sensibilidade.

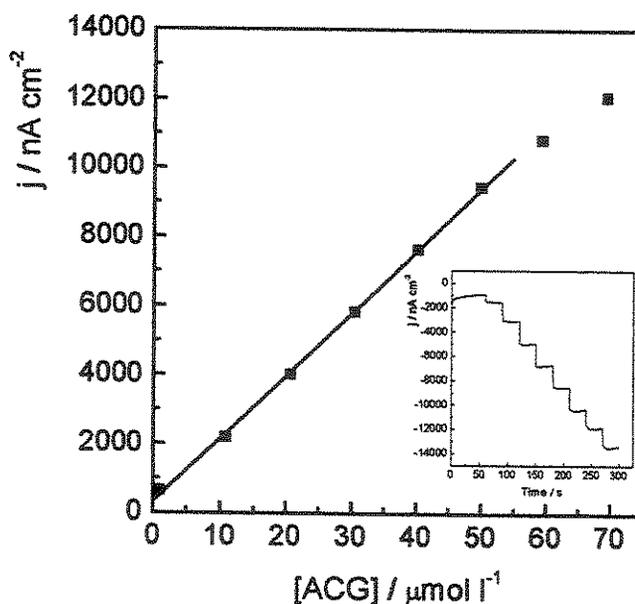


Figura V.9. Curva de calibração obtida com o biossensor Si-Ti / HRP com DNA para ácido clorogênico, na presença de $500 \mu\text{mol l}^{-1}$ de H_2O_2 , em solução tampão fosfato $0,25 \text{ mol l}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$, $E_{\text{apl.}} = -50 \text{ mV vs Ag/AgCl}$ e $1,2 \text{ Umg}^{-1}$ de HRP.

O tempo de resposta relaciona-se com a difusão do substrato através do eletrodo e a difusão dos produtos formados para fora do mesmo. O tempo de resposta considerando o tempo no qual ocorre uma mudança de 100% no sinal, foi aproximadamente 1s como pode ser visto na Figura V.10. Este tempo de resposta é bastante curto considerando que o eletrodo é a base de pasta de carbono. Esta resposta rápida esteja provavelmente relacionada com a forma e o procedimento usado para construir o biossensor. O eletrodo desenvolvido a base de pasta de carbono / Si-Ti modificado com HRP e contendo DNA, resulte num sistema bem empacotado, tornando difícil a difusão da solução através da pasta, pois somente os sítios superficiais devem contribuir para a resposta.

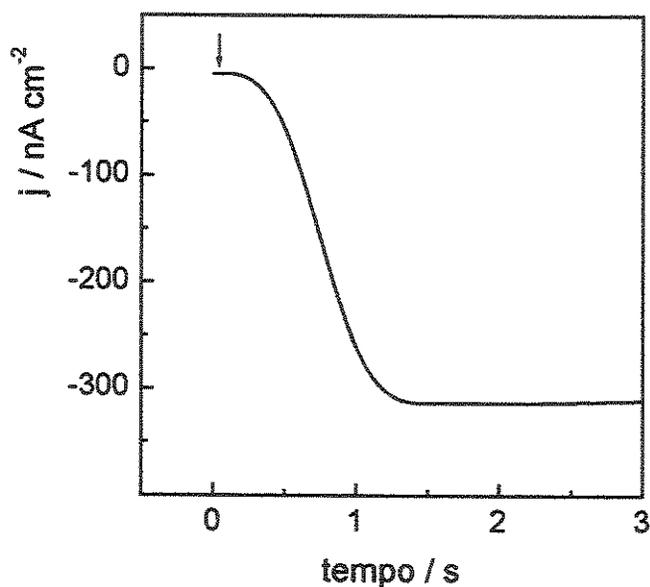


Figura V.10. Resposta em função do tempo apresentado para o biossensor, em solução tampão fosfato $0,25\mu\text{mol l}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$, $E_{\text{apl.}} = -50 \text{ mV vs Ag/AgCl}$, $1,2 \text{ Umg}^{-1}$ de HRP, $500\mu\text{mol l}^{-1}$ H_2O_2 adicionados e $10\mu\text{mol l}^{-1}$ de ACG.

V.4.2. ESTUDO DA ESTABILIDADE DO BIOSENSOR

Entre os maiores problemas referentes à pesquisa envolvendo biossensores enzimáticos está a estabilidade operacional que é dependente do tempo de vida e/ou da desnaturação por inativação da enzima empregada.

O DNA foi adicionado à pasta de carbono como aditivo e o seu uso é justificado na tentativa de melhorar a sensibilidade e estabilidade do biossensor. O DNA possui uma natureza condutora o que facilita a transferência de elétrons, além de proporcionar um ambiente hidrofílico para a enzima favorecendo a catálise (Rosatto *et al.*, 2001). Uma outra justificativa para a incorporação do DNA em biossensores para a detecção de compostos fenólicos é a melhor estabilidade observada. Este efeito estaria relacionado ao fato do DNA reagir com os possíveis radicais livres (Wu *et al.*, 1998). Na reação da peroxidase imobilizada em eletrodos durante a conversão dos fenóis em quinonas, dependendo da extensão da reação formariam espécies radicalares e estas espécies poderiam interagir com a enzima inativando-a.

O perfil do biossensor em função do número de determinações e a estabilidade em uso contínuo foi verificada. A Figura V.11. mostra a resposta do biossensor em função do número de determinações. O biossensor apresentou um declínio na variação da densidade de corrente após 60 determinações sucessivas e após este valor o sinal decresceu em aproximadamente 40% da sua resposta inicial.

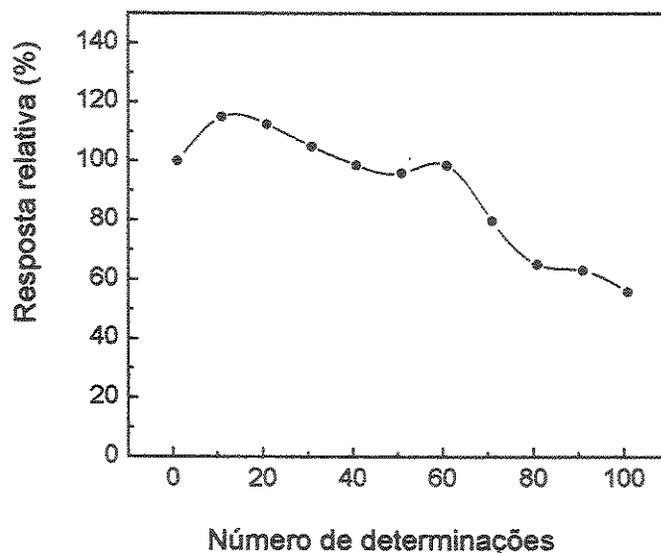


Figura V.11. Perfil da estabilidade do biossensor a base de HRP contendo DNA, em função do número de determinações. Resposta obtida em solução tampão fosfato $0,25 \text{ mol l}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$, $E_{\text{apl.}} = -50\text{mV vs Ag/AgCl}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 500\mu\text{mol l}^{-1}$.

A estabilidade do biossensor a base de HRP contendo DNA também foi estudada em termos da sensibilidade. Para isto foi verificada a resposta do biossensor construído no dia da preparação da pasta e, a sua resposta após estocagem da pasta por 30 dias sob refrigeração (4°C). Os resultados estão mostrados na Figura V.12. Pode-se observar que a estabilidade da pasta é boa, mantendo praticamente a mesma atividade da enzima durante este período, indicando que a resposta do biossensor é confiável neste intervalo de medida.

O perfil de estabilidade do biossensor e da pasta, em relação à estocagem, mostra uma grande vantagem em manter o bom desempenho operacional inicial do biossensor por substituição da pasta por uma nova porção de pasta estocada sob refrigeração.

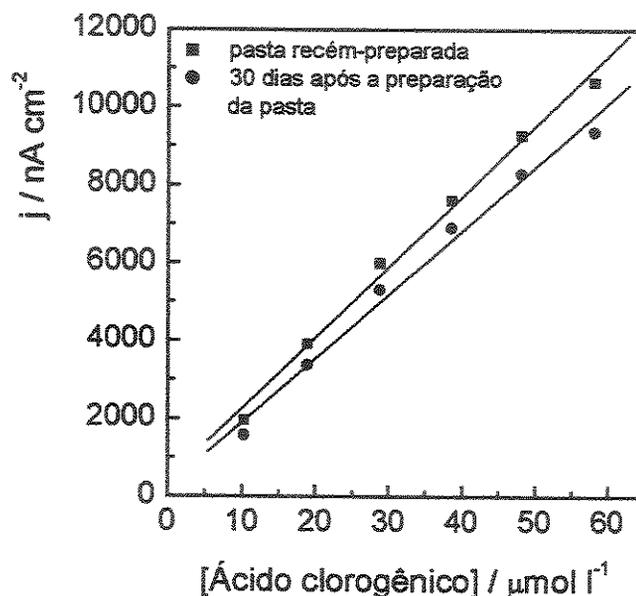


Figura. V.12. Curvas analíticas para ácido clorogênico obtidas com o biossensor contendo DNA no dia da preparação da pasta e após 30 dias de preparação estocada sob refrigeração. Medidas realizadas em solução tampão fosfato $0,25 \text{ mol l}^{-1}$, $\text{pH} = 7,0$, $E_{\text{apl.}} = -50\text{mV vs Ag/AgCl}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 500\mu\text{mol l}^{-1}$.

A Tabela V.2. mostra as melhores condições referentes à otimização do sistema envolvendo o biossensor, utilizando o ácido clorogênico como composto de referência. Após esta parte, foram realizados estudos finais relacionados à aplicação do biossensor para avaliação da capacidade antioxidante de amostras vegetais.

Tabela V.2. Parâmetros otimizados para o biossensor a base de HRP.

PARÂMETRO	VALOR OTIMIZADO
Razão $[H_2O_2] / [ACG]$	≤ 10
pH	7,0
Tampão	Fosfato
[tampão]	$0,25 \text{ mol l}^{-1}$
Potencial aplicado	-50 mV vs Ag/AgCl
Quantidade de enzima na pasta	$1,2 \text{ U mg}^{-1}$ *
Faixa de trabalho	1- 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$
Sensibilidade	$181 \text{ nA l } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$
Coef. corr.	$r = 0,9997$ (n = 6)
Limite de detecção ($3\sigma / S$)	$0,7 \mu\text{mol l}^{-1}$
Tempo de resposta	~1s
Repetibilidade	R.S.D. = 5,6% (n = 10)

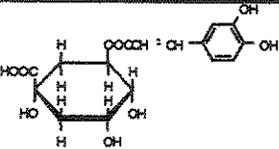
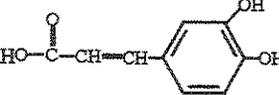
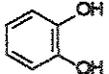
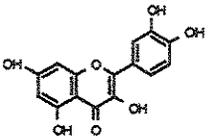
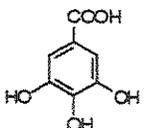
* U mg^{-1} = unidades de enzima por mg de pasta de carbono

V.4.3. RESPOSTA DO BIOSSENSOR NA PRESENÇA DE DIFERENTES SUBSTRATOS FENÓLICOS

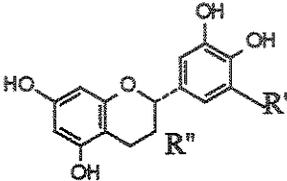
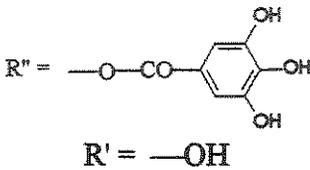
A resposta do biossensor foi avaliada na presença de outros compostos fenólicos usualmente presentes em extratos vegetais, pela comparação com a resposta destes compostos com a resposta obtida para o ácido clorogênico para a mesma concentração de H_2O_2 . Os resultados estão apresentados na Tabela V.3. O perfil de seletividade pode ser explicado considerando a estabilidade do radical fenóxi em meio aquoso e pela magnitude do potencial aplicado. O ácido clorogênico e seu precursor o ácido cafeico obtiveram melhores respostas. Estes compostos possuem um grupo acrílico ligado com o anel aromático o qual

facilita a oxidação para a correspondente o-quinona. Este radical o-quinona resultante é estabilizado pela dissipação de carga através do sistema conjugado (Mihailovic & Cekovic, 1971). Por isso o ácido clorogênico apresenta melhor resposta em comparação com outros derivados fenólicos mais simples como o catecol. Por outro lado, compostos flavonóides e catequinas apresentaram respostas menores. Isto pode ser explicado pelo impedimento estérico dificultando a transferência de elétrons entre o sítio ativo da enzima e o composto, apesar dos seus baixos potenciais de pico anódicos (Taylor & Battersby, 1967).

Tabela V.3. Resposta relativa do biossensor-HRP para diferentes substratos fenólicos e seus respectivos potenciais de oxidação para o eletrodo sem enzima. [composto fenólico] = $30\mu\text{mol l}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 300\mu\text{mol l}^{-1}$.

Composto	Estrutura	Resposta relativa (%)	$E_{p.a.}^* / \text{mV}$
Ácido clorogênico		100	+ 247
Ácido cafeico		96	+ 226
Catecol		21	+ 268
Quercitina		15	+129 e +240**
Ácido gálico		5	+ 258

Continuação da Tabela V.3.

Composto	Estrutura	Resposta relativa (%)	$E_{p.a.}^* / \text{mV}$
Ácido tânico	—	4	—
Catequinas ("Tea catechins")			
(-)- Epicatequina	$R' = \text{H}; R'' = \text{---OH}$	28	+ 206
(+)- Catequina	$R' = \text{H}; R'' = \text{---OH}$	19	+ 228
(-)- Galato de epicatequina	 $R' = \text{---OH}$	13	—
(-)- Galocatequina	$R' = \text{OH}; R'' = \text{---OH}$	4	—

* Valores reportados a 20 mV/s em tampão fosfato 0,25 mol l⁻¹ (pH 7,0), ** valores para a quercitina para o primeiro e segundo potenciais de pico anódicos, respectivamente. $E_{p.a.}$ = potencial de pico anódico.

V.5. APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR A BASE DE HRP EM AMOSTRAS

V.5.1. ESTUDO DE COMPOSTOS INTERFERENTES

Apesar da seletividade da enzima, eletrodos enzimáticos podem fornecer resultados errôneos quando usados em amostras reais, porque várias espécies eletroativas podem estar presentes e afetar o sinal do eletrodo. Alguns compostos podem atuar como inibidores ou ativadores ou como outro substrato para a enzima (Escarpa & González, 2001).

Glicose e ácido ascórbico são conhecidos por interferir na determinação de polifenóis pelo método de Folin-Ciocalteu e podem afetar o sinal do biossensor (Kong *et al.*, 2001; Singleton *et al.*, 1999). Ácido ascórbico pode ser eletroquimicamente oxidado a baixos potenciais e/ou reagir com o H₂O₂ adicionado. Por isso, a resposta do sensor foi avaliada, simultaneamente, na presença de ácido clorogênico e compostos interferentes comumente presentes nos extratos vegetais, tais como ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido glutâmico, glicose e cafeína em diferentes razões molares (1: 0,5; 1:0,7; 1:1; 1:2).

A Tabela V.4 mostra respostas relativas obtidas para 30 μmol l⁻¹ de ácido clorogênico na presença de diferentes compostos interferentes em várias razões molares. Como pode ser observado o biossensor não apresenta interferência significativa na presença dos compostos testados.

Tabela V.4. Valores de resposta relativa (%) obtidos com o biossensor para 30 μmol l⁻¹ de ácido clorogênico na presença de compostos interferentes em diferentes razões molares.

Composto interferente	Razão molar (ácido clorogênico : composto interferente)			
	1 : 0,5	1 : 0,7	1 : 1	1 : 2
Ácido ascórbico	103 ± 4*	106 ± 4*	101 ± 1*	99 ± 5*
Ácido cítrico	104 ± 3*	94 ± 1*	103 ± 3*	96 ± 2*
Ácido tartárico	99 ± 1*	96 ± 1*	99 ± 2*	101 ± 2*
Cafeína	95 ± 2*	100 ± 2*	96 ± 1*	94 ± 2*
Glicose	96 ± 3*	95 ± 1*	94 ± 2*	99 ± 2*
Ácido glutâmico	99 ± 3*	94 ± 4*	99 ± 3*	95 ± 2*

* Desvio padrão para três medidas.

V.5.2. DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM EXTRATOS VEGETAIS

No desenvolvimento de biossensores para aplicação em amostras, podem ser encontradas algumas limitações relacionadas a sensibilidade e estabilidade operacional, que os torna inaptos para uma análise efetiva.

Com o objetivo de verificar a compatibilidade do biossensor desenvolvido para aplicação prática, foi determinada a concentração de fenóis totais em amostras de chá e café e os resultados foram comparados com o método oficial de Folin-Ciocalteu. A Tabela V.5. mostra os resultados obtidos para os dois métodos utilizando ácido clorogênico como composto de referência.

Os valores obtidos com o biossensor são menores do que os obtidos com os métodos de referência. Estes resultados podem ser explicados considerando os vários tipos de compostos existentes nas amostras e que a maioria deles podem reagir com o reagente de Folin-Ciocalteu, obtendo-se compostos com diferentes coeficientes de extinção molar, ϵ , resultando em altos valores de concentração. O método de Folin-Ciocalteu apesar de ser bastante empregado para análise de fenóis totais, ele também é usado para quantificar aminoácidos e enzimas (Singleton *et al.*, 1999), o que faz este teste sujeito a inúmeros compostos interferentes. As respostas obtidas com o biossensor mostram-se mais seletivos em relação ao método de referência. O biossensor não responde significativamente para outros compostos redox não fenólicos encontrados em percentagem relevantes, como exemplificado pelos estudos mostrados no item V.5.1.

Tabela V.5. Concentração estimada de polifenóis determinada em extratos vegetais pelo método proposto e pelo método de Folin-Ciocalteu (FC).

Amostra	Conteúdo de polifenóis totais (mmol l ⁻¹) / g amostra	
	Biossensor *	Método FC *
Chá mate 1	3,1 ± 0,2	3 ± 1
Chá mate 2	2,0 ± 0,2	3,3 ± 0,1
Café instantâneo 1	3,6 ± 0,1	4,9 ± 0,4
Café instantâneo 2	3,4 ± 0,6	6,3 ± 0,1
Café em pó	1,00 ± 0,02	1,3 ± 0,1

* Desvio padrão para três replicatas.

V.5.3. ESTUDOS DE RECUPERAÇÃO

Estudos de recuperação nas amostras testadas foram realizados com uma quantidade conhecida de ácido clorogênico previamente determinada em ambos os métodos, o método do biossensor e o método de Folin-Ciocalteu. Os resultados estão mostrados nas Tabelas V.6 e V.7.

Valores de recuperação próximos a 100% foram obtidos com o método proposto e indicam que o biossensor pode ser aplicado neste tipo de amostra sem interferência significativa da matriz. Os altos desvios padrão observados nas análises, para ambos os métodos, podem ser justificados pelo tipo de amostra. O teor de polifenóis em vegetais é muito variável em termos de distribuição e concentração para uma mesma amostra vegetal, apesar de ter sido feita uma amostragem cuidadosa. Isto é devido principalmente a fatores ambientais variáveis, genéticos e dos diferentes tratamentos de cultivo que o vegetal é submetido (Escarpa & Gonzalez, 2001). Como resultado, as determinações em amostras vegetais podem ter, em alguns casos, baixa reprodutibilidade.

Tabela V.6. Estudos de recuperação em extratos vegetais determinados pelo método de Folin-Ciocalteu (FC) utilizando ácido clorogênico (ACG) como composto de referência.

Amostra	Conteúdo de ACG (mmol l ⁻¹)	ACG adicionado (mmol l ⁻¹)	ACG encontrado (mmol l ⁻¹)	Recuperação* (%)
Chá mate 1	1,05	1,50	2,9 ± 0,40	115 ± 18
Chá mate 2	1,05	1,50	2,6 ± 0,2	102 ± 7
Café instantâneo 1	1,05	1,50	2,3 ± 0,2	92 ± 9
Café instantâneo 2	1,05	1,50	3,0 ± 0,4	119 ± 16
Café em pó	1,05	1,50	2,4 ± 0,1	96 ± 5

* Desvio padrão para três replicatas.

Tabela V.7. Estudos de recuperação em extratos vegetais determinados com o biossensor utilizando ácido clorogênico (ACG) como composto de referência.

Amostra	Conteúdo de ACG (mmol l ⁻¹)	ACG adicionado (mmol l ⁻¹)	ACG encontrado (mmol l ⁻¹)	Recuperação* (%)
Chá mate 1	0,70	1,00	1,68 ± 0,20	99 ± 10
Chá mate 2	0,70	1,00	1,68 ± 0,10	99 ± 4
Café instantâneo 1	0,70	1,00	1,63 ± 0,05	96 ± 3
Café instantâneo 2	0,70	1,00	1,68 ± 0,03	99 ± 2
Café em pó	0,70	1,00	1,68 ± 0,13	99 ± 7

* Desvio padrão para três replicatas

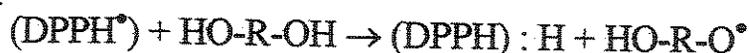
A literatura dispõe de muitos biossensores amperométricos desenvolvidos para compostos fenólicos que apresentam características operacionais atrativas como ampla faixa de resposta linear ou baixíssimos limites de detecção (Liu *et al.*, 2000; Campuzano *et al.*, 2003). Entretanto quando aplicados em amostras, muitas vezes apresentam baixo desempenho, mostrando resultados não muito confiáveis ou mesmo errôneos.

O biossensor exposto neste trabalho teve por objetivo estudar e otimizar todas as etapas necessárias para que pudesse ser útil na análise destes compostos em matrizes vegetais. Neste sentido, os parâmetros estudados relacionados com os parâmetros operacionais do biossensor revelaram a ótima seletividade e sensibilidade adequada para aplicação em amostras vegetais. Isto foi comprovado pela quantificação confiável do conteúdo de polifenóis em amostras consideradas um tanto complexas, como chá e café sem interferência significativa de outros inúmeros constituintes presentes nas amostras.

V.6. APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR-HRP PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS

V.6.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS VEGETAIS

Após avaliar a performance do biossensor na determinação do conteúdo de polifenóis totais nas matrizes de café e chá, o biossensor foi aplicado na avaliação da atividade antioxidante de amostras de chá preto (extrato fermentado de *Camellia sinensis*) e erva mate (extrato de *Ilex paraguariensis* tipo chá mate e tipo erva mate). Para isto, primeiramente foi determinada a atividade antioxidante dos extratos utilizando o ensaio do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), que se baseia na reação de um radical relativamente estável em solução (DPPH[•]) com os compostos antioxidantes (HO-R-OH) presentes nas amostras (Molyneux, 2004). O mecanismo pode ser ilustrado pelas reações:



O efeito antioxidante, na destruição de radicais livres como DPPH[•], apresentado pelas amostras em estudo, foi avaliado baseado no cálculo do IC₅₀. IC₅₀ representa a concentração necessária de antioxidante para reduzir 50% da concentração inicial deste radical, calculada por curva de calibração.

Amostras de chá preto mostraram melhores valores de IC₅₀ (IC₅₀ = 0,44 ± 0,10 μmol l⁻¹) em comparação ao chá mate (IC₅₀ = 12,0 ± 0,3 μmol l⁻¹) e erva mate (IC₅₀ = 35,0 ± 0,1 μmol l⁻¹). Estes resultados indicam que provavelmente folhas de chá preto contêm compostos com melhores propriedades antioxidantes. A variação apresentada pelas amostras pode ser devido às diferentes composições das plantas testadas. O tipo e a quantidade de compostos fenólicos em amostras de chá variam dependendo de fatores como: variedade da planta,

fatores ambientais, sistema de cultivo, época da colheita, tipo de processamento e condições de extração (Escarpa & González, 2001). Em amostras de chá não fermentadas como o chá mate e erva mate estão presentes compostos fenólicos mais simples e, portanto mais facilmente quantificados utilizando o biossensor. Em amostras de chá preto, durante a fermentação dos extratos de chá verde (*Camellia sinensis*) ocorre a oxidação destes compostos com a formação de estruturas conjugadas mais complexas, algumas denominadas de teaflavinas oxidadas (Astill *et al.*, 2001).

V.6.2. CORRELAÇÃO ENTRE A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (AAT) E O CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS

Para avaliar a existência ou não de uma correlação entre dois parâmetros, foram usadas soluções de extratos de chá e erva mate em diferentes concentrações. Alíquotas de concentração conhecida de polifenóis dos extratos vegetais foram adicionadas à solução etanólica de DPPH. Os valores de polifenóis totais referentes às alíquotas para amostras de chá preto variaram entre 0,018mmol l⁻¹ a 0,15mmol l⁻¹, para as amostras de chá mate variaram de 2,3mmol l⁻¹ a 23mmol l⁻¹ e para as amostras de erva mate os valores variaram de 4mmol l⁻¹ a 18mmol l⁻¹.

A atividade antioxidante total (AAT) relaciona a absorbância da solução de DPPH° (Abs_{padrão}) após a adição do padrão (Trolox) com a absorbância da solução de DPPH° (Abs_{Amostra}) após a adição do antioxidante, pela seguinte fórmula adaptada de Simonetti (Simonetti *et al.*, 1997):

$$AAT = \frac{Abs_{padrão}}{Abs_{amostra} - Abs_{padrão}}$$

As Figuras V.13 e V.14 mostram para o chá preto, chá mate e para a erva mate, respectivamente, a correlação feita entre a atividade antioxidante dos extratos com o conteúdo de polifenóis totais quantificado pelo biossensor a base de HRP. Em todos os casos o coeficiente de correlação foi maior que 0,9 indicando que a atividade antioxidante pode ser obtida das seguintes relações:

$$\text{AAT}_{\text{chá preto}} = 39 (\pm 3) [\text{fenol total}] + 2,5 (\pm 0,3) \quad (r = 0,989)$$

$$\text{AAT}_{\text{chá mate}} = 0,8 (\pm 0,1) [\text{fenol total}] + 2,83 (\pm 0,60) \quad (r = 0,986)$$

$$\text{AAT}_{\text{erva mate}} = 0,3 (\pm 0,1) [\text{fenol total}] - 0,4 (\pm 0,6) \quad (r = 0,973)$$

Apesar das amostras conterem outros compostos com conhecidas propriedades antioxidantes, como vitaminas e certos pigmentos, a fração de compostos fenólicos é responsável pela maior parte da capacidade antioxidante, como pode ser observado pelo bom coeficiente de correlação obtido.

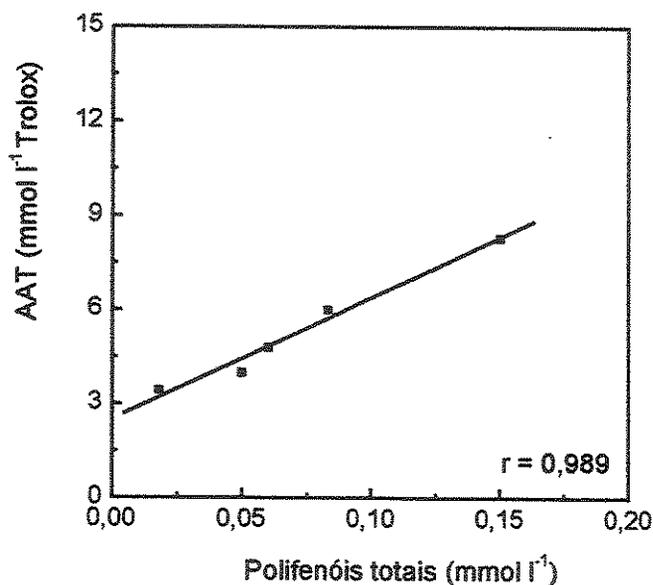


Figura V.13. Correlação entre a atividade antioxidante total (AAT) e o conteúdo de polifenóis totais em amostras de chá preto.

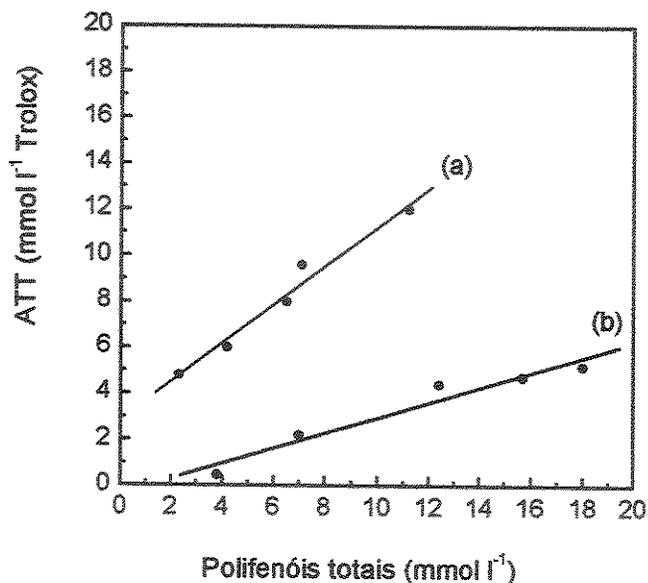


Figura V.14. Correlação entre a atividade antioxidante total (AAT) e o conteúdo de polifenóis totais em amostras de chá mate (a) ($r = 0,986$) e amostras de erva mate (b) ($r = 0,973$).

A fração de compostos fenólicos nas amostras testes é bastante significativa e muitos derivados fenólicos já foram classificados como componentes antioxidantes em muitos extratos de plantas (Rice-Evans, 2001). Assim, o biossensor desenvolvido pode ser usado para estimar a atividade antioxidante de infusões de chás devido a sua alta seletividade e confiabilidade na quantificação de fenóis totais. Neste tipo de análise é mais importante conhecer a quantidade de fenóis totais do que a concentração das espécies individualmente. Neste caso, o biossensor pode caracterizar de forma indireta, extratos de chás comumente usados para fins terapêuticos.

V.7. CONCLUSÕES PARCIAIS - Biossensor a base de HRP

A configuração do biossensor a base de pasta de carbono utilizando a enzima HRP imobilizada na matriz sílica-gel modificada com óxido de titânio mostrou-se adequada para o desenvolvimento de um dispositivo amperométrico apresentando características operacionais atrativas para análise de compostos fenólicos em amostras reais.

O processo de imobilização da enzima HRP na sílica modificada possibilitou o desenvolvimento de um biossensor bastante sensível para ácido clorogênico ($181 \text{ nA } 1 \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-2}$). Isto se deve ao bloqueio da transferência de elétrons direta entre a enzima e o eletrodo na presença apenas de peróxido de hidrogênio, provavelmente devido ao caráter isolante da matriz. O biossensor também apresentou, uma boa faixa de trabalho ($1 \text{ a } 50 \mu\text{mol l}^{-1}$) e curto tempo de resposta em um potencial de $-50 \text{ mV vs Ag/AgCl}$.

Os resultados obtidos na determinação de polifenóis em extratos vegetais utilizando o biossensor foram concordantes com o método oficial, evidenciando a viabilidade de aplicação do método proposto para análise de fenóis, sem a necessidade de pré-tratamento da amostra. Os estudos de recuperação mostraram que o biossensor não sofre interferência significativa da matriz; indicando que o biossensor é adequado para análise quantitativa de compostos fenólicos em extratos naturais.

A partir dos resultados obtidos utilizando o biossensor foi possível correlacionar o conteúdo de compostos fenólicos com a capacidade antioxidante das amostras testadas. Utilizando a correlação é possível estimar a capacidade antioxidante total de extratos de plantas de maneira indireta e seletiva.

V.8. BIOSSENSOR A BASE DE DNA

V.8.1. CONSIDERAÇÕES NO PREPARO DO SISTEMA

No preparo do sistema utilizando o biossensor a base de DNA como substrato no processo de oxidação por radicais livres ($^{\circ}\text{OH}$), envolveu basicamente três etapas; a preparação do biossensor, a interação do biossensor com a solução de Fenton com e sem a presença de antioxidantes e, a avaliação do evento que ocorre na superfície de eletrodo, por meio do sinal do DNA.

O procedimento de imobilização que compreende as etapas de pré-tratamento da superfície do eletrodo e imobilização do dsDNA, bem como as condições gerais do ensaio, como tipo e concentração do tampão e pH seguiram as condições descritas em trabalhos anteriores (Marrazza *et al.*, 1999; Chiti *et al.*, 2001).

Um importante parâmetro otimizado antes da aplicação do biossensor para estudos de antioxidantes, foi a concentração de DNA imobilizado. A Figura V.15. mostra este estudo. Como pode ser observada a resposta aumenta a medida que aumenta a concentração de DNA e a uma concentração maior do que 30 ppm de dsDNA, a resposta do biossensor aproxima-se de um comportamento de saturação.

O biossensor com 30 ppm de DNA imobilizado foi aplicado para avaliar a propriedade antioxidante de chás na presença de radicais hidroxila ($^{\circ}\text{OH}$). O radical $^{\circ}\text{OH}$ é uma das espécies mais comuns que causam dano ao DNA e outras biomoléculas. No sistema esta espécie foi gerada via reação de Fenton, utilizando ferro como catalisador na proporção 1:2:40 ($\text{Fe}^{2+}:\text{EDTA}:\text{H}_2\text{O}_2$).

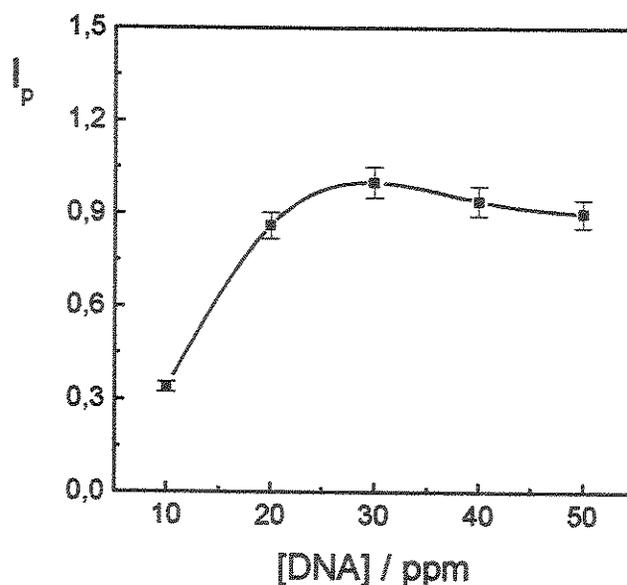


Figura V.15. Influência da concentração de dsDNA sobre a resposta do biossensor. Resultados obtidos em solução tampão acetato $0,25 \text{ mol l}^{-1}$ (pH=4,75), faixa de potencial +0,2V a +1,35V vs Ag, frequência = 200Hz, $E_{\text{step}} = 15\text{mV}$; $E_{\text{amplitude}} = 40\text{mV}$.

Dentre as condições envolvidas no sistema Fenton, o tempo de reação entre o radical $^{\circ}\text{OH}$ e o substrato depende da concentração e do tempo de meia vida da espécie radicalar (Dunford, 2002). No presente estudo, o tempo de contato do biossensor na solução de Fenton foi de apenas 5s. Este tempo foi suficiente para promover um dano considerável no DNA imobilizado. Tempos de reação maiores que este, não foram observados sinais do biossensor, indicando que provavelmente o DNA pode ter sido totalmente degradado ou mesmo lixiviado da superfície do eletrodo pela ação do radical $^{\circ}\text{OH}$ formado. Associado a isto, considerando a alta reatividade do H_2O_2 , a reação de Fenton foi iniciada por adição deste reagente no sistema. O sistema seguiu a ordem: Imersão do eletrodo na solução de $\text{Fe}^{2+}/\text{EDTA}$ seguido pela adição do reagente H_2O_2 .

V.8.2. PERFIL DE RESPOSTA DO BIOSENSOR

O perfil de resposta do biossensor pode ser visualizado na Figura V.16. que mostra os voltamogramas de onda quadrada do biossensor a base de DNA antes e após a sua interação com a solução de Fenton. O efeito da presença de antioxidantes na solução de clivagem (solução de Fenton) também é mostrado.

O voltamograma V.16.a. corresponde a oxidação dos resíduos da guanina em eletrodo a base de grafite. A corrente de pico mostrada é pequena, como resultado da lenta transferência de elétrons entre a guanina e a superfície do eletrodo de carbono, como reportado na literatura (Popovich *et al.*, 2002).

O efeito do contato do biossensor com a solução de Fenton pode ser visualizado na Figura V.16.b que mostra uma corrente de pico menor do que a corrente do biossensor somente em tampão acetato (voltamograma a). A exposição do DNA a espécies reativas como os radicais hidroxila, conduz a mudanças químicas nas bases do DNA ou ruptura da fita que pode resultar na liberação das bases da cadeia polimérica da biomolécula. A visualização destas mudanças utilizando a técnica voltamétrica usualmente é feita pelo decréscimo do sinal da base danificada (Fojta, 2002). No presente estudo este método de detecção baseou-se no decréscimo da corrente de pico da guanina em termos da percentagem (%) do sinal do DNA.

A interpretação desta interação pode ser feita com base no comportamento eletroquímico do DNA em eletrodos de carbono. É possível sugerir que o decréscimo do sinal devido a interação do DNA com radicais hidroxilas, conduz a mudanças no acesso da base guanina na superfície do eletrodo, para o processo de oxidação eletroquímica. Provavelmente, uma lesão causada por radicais hidroxila à cadeia polimérica do DNA conduza a uma oxidação química das bases. Como resultado, a quantidade de guanina disponível

para se oxidar eletroquimicamente é menor o que pode justificar o decréscimo do sinal.

O efeito da presença de amostras de chás (alíquotas de *Baccharis genstelloides*) na solução de Fenton pode ser visualizado no terceiro voltamograma da Figura V.16 (voltamograma c). O sinal observado é muito próximo do sinal do DNA intacto (voltamograma a). O efeito protetor da amostra testada foi comprovado na atividade contra os radicais hidroxila formados no sistema.

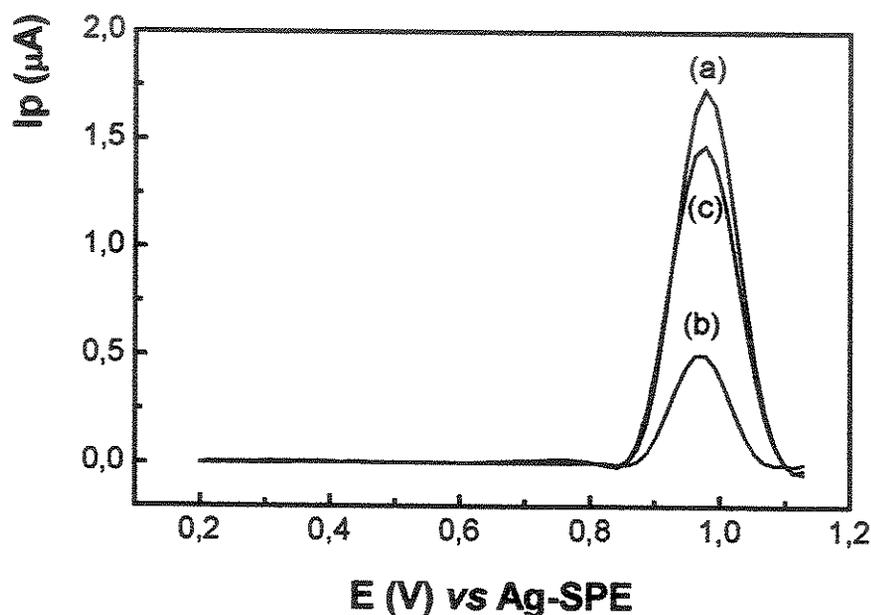


Figura V.16. Voltamogramas do biossensor a base de DNA obtidos em solução tampão acetato $0,25 \text{ mol l}^{-1}$ ($\text{pH}=4,75$), faixa de potencial $+0,2\text{V}$ a $+1,35\text{V}$ vs Ag-SPE, frequência $=200\text{Hz}$, $E_{\text{step}} = 15\text{mV}$; $E_{\text{amplitude}}=40\text{mV}$. (a) sinal do biossensor-DNA (sinal do branco), (b) sinal do biossensor após a imersão na solução de Fenton, $\text{Fe}^{2+}:\text{EDTA}:\text{H}_2\text{O}_2$ (1:2:40) e (c) sinal do biossensor-DNA após a imersão na solução de Fenton contendo alíquotas ($100\mu\text{l}$) de extratos de *Baccharis genstelloides* 5% (m/v). Tempo de imersão do eletrodo na solução de Fenton = 5s.

8.3. APLICAÇÃO DO BIOSENSOR NA AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE EXTRATOS VEGETAIS

A verificação das propriedades antioxidantes de amostras de chás utilizando o biossensor a base de DNA é mostrada na Figura V.17. Diferentes extratos de plantas foram testados contra uma solução antioxidante padrão, o Trolox. Praticamente todos os extratos de chás mostraram alguma intensidade na atividade antioxidante contra os radicais hidroxila, visto que o sinal do DNA, na presença das amostras é muito próximo do seu sinal original. Em algumas amostras como *Baccharis genstelloides* e *Peumus boldus* o sinal do biossensor foi igual ou até melhor que o sinal apresentado pelo Trolox.

A reprodutibilidade do biossensor foi boa, apresentando um desvio padrão médio relativo de 16% referente a média dos desvios de todas as seis amostras.

Os extratos de plantas testados são utilizados para fins terapêuticos no tratamento de enfermidades leves, como gastrite, anemia, distúrbios do fígado e outras. Apresentam alguma substância bioativa em suas composições, visto que possuem atividade antiinflamatória, antibacteriana, hepatoprotetora e diurética. Porém, poucos estudos científicos estão relacionados às suas propriedades antioxidantes. Entretanto das principais classes de constituintes químicos da plantas, como terpenóides, esteróides, cumarinas, alcalóides, fenóis e fenóis complexos (flavonóides), a atividade antioxidante, principalmente destas duas últimas classes de substâncias é bem reconhecida (Mongelli *et al.*, 1997; Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2003; Chandra & Mejia, 2004; SN & Karakaya, 2004).

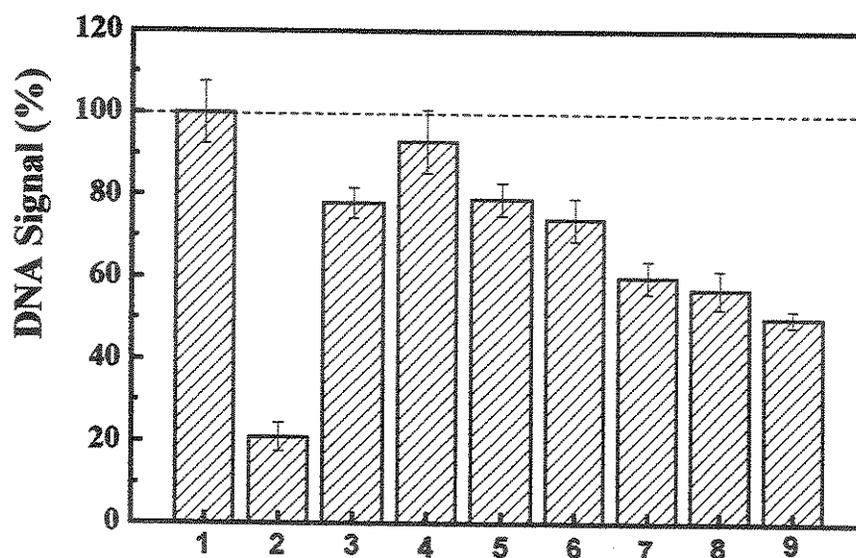


Figura V.17. Efeito da presença de antioxidantes no sistema reacional, no sinal do dsDNA imobilizado. (1) Sinal do branco (sinal do DNA); (2) Sinal do biossensor após a imersão na solução de Fenton (1:2:40), Fe^{2+} :EDTA: H_2O_2 ; (3) $[\text{Trolox}] = 1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$; (4) *Baccharis genstelloides*; (5) *Peumus boldus*; (6) *Foeniculum vulgare*; (7) *Cymbopogon citratus*; (8) *Camellia sinensis*; (9) *Mentha piperita*. Tempo de imersão do eletrodo na solução de Fenton = 5s. Quantidade adicionada dos extratos, 100 μl à concentração de 5% (m/v).

A eficiência do biossensor como teste screening para qualificar uma amostra como antioxidante, foi verificada comparando os resultados obtidos com o método proposto com os resultados obtidos com o teste do DPPH^o para as amostras testadas como pode ser visto nas Figuras V.18. e V.19.

Em ambos os métodos os resultados foram expressos em termos da percentagem de inibição dos radicais formados. No método proposto, o resultado foi obtido a partir da relação, % inibição = sinal do DNA (%) obtido com as amostras – sinal do DNA (%) obtido na presença da solução de Fenton. No teste do DPPH^o os resultados foram relacionados em termos da redução da

absorbância do DPPH^{*}, aplicando a fórmula, % inibição = $100 (Abs_0 - Abs_A) / Abs_0$, onde Abs_0 é a absorbância inicial da solução do DPPH^{*}, no tempo de reação, $t = 0$ min. e Abs_A é a absorbância da solução de DPPH^{*} na presença das amostras, após 15 minutos de reação ($t = 15$ min.) (Miliauskas *et al.*, 2004).

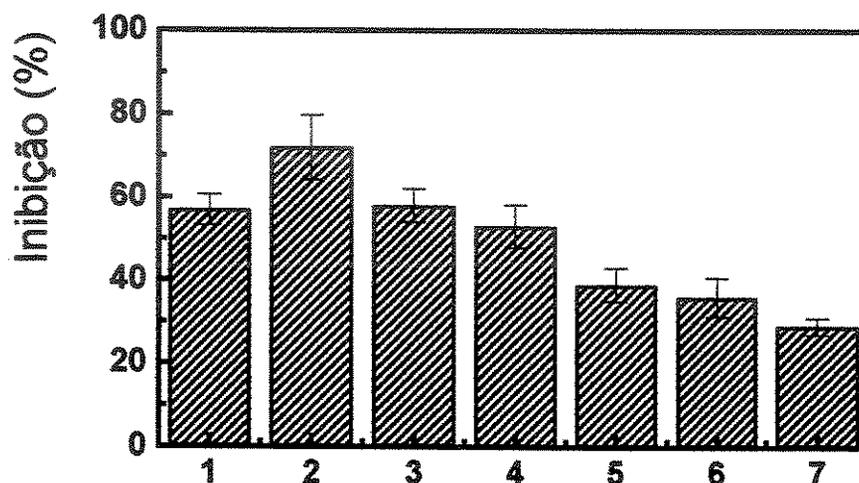


Figura V.18. Efeito antioxidante contra os radicais hidroxilas mostrados pelos extratos vegetais com o uso do biossensor a base de DNA. (1) [Trolox] = $1 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$; (2) *Baccharis genstelloides*; (3) *Peumus boldus*; (4) *Foeniculum vulgare*; (5) *Cymbopogon citratus*; (6) *Camellia sinensis*; (7) *Mentha piperita*. Quantidade adicionada dos extratos, $100 \mu\text{l}$ à concentração de 5% (m/v).

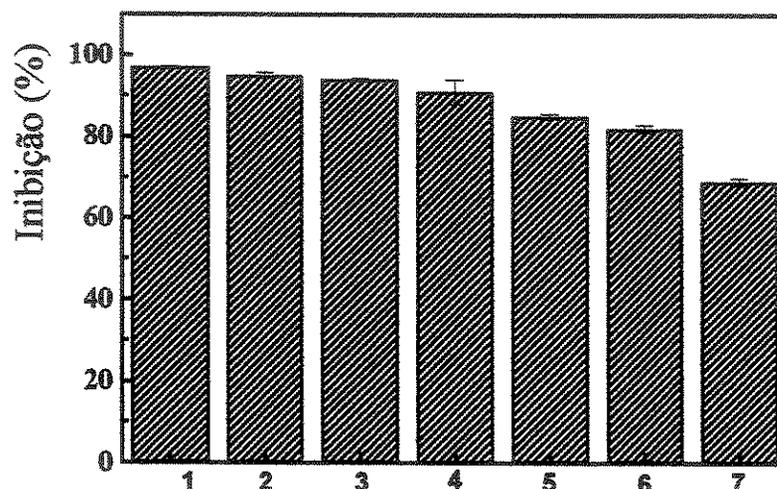


Figura V.19. Efeito antioxidante mostrados pelos extratos vegetais no ensaio do radical DPPH[•]. (1) [Trolox] = 1×10^{-4} mol l⁻¹; (2) *Peumus boldus*; (3) *Baccharis genstelloides*; (4) *Camellia sinensis*; (5) *Mentha piperita*; (6) *Foeniculum vulgare*; (7) *Cymbopogon citratus*. Quantidade adicionada dos extratos, 100µl à concentração de 5% (m/v).

Os comportamentos apresentados pelas amostras nos dois métodos foram levemente diferentes. As atividades antioxidante mostradas no método proposto, representadas pela percentagem de inibição, foram menores das apresentadas pelo método do DPPH[•]. As atividades apresentadas pelos extratos na proteção do DNA exposto a radicais livres ([•]OH), seguiu a ordem: *Baccharis genstelloides* > *Peumus boldus* > *Foeniculum vulgare* > *Cymbopogon citratus* > *Camellia sinensis* > *Mentha piperita*. No método de comparação, todas as amostras apresentaram decréscimo na absorbância da solução de DPPH[•] indicando alguma intensidade na propriedade antioxidante. A ordem apresentada pelas amostras foi: *Peumus boldus* > *Baccharis genstelloides* > *Camellia sinensis* > *Mentha piperita* > *Foeniculum vulgare* > *Cymbopogon citratus*.

O perfil de resposta apresentado pelos métodos pode ser justificado considerando que no método proposto está envolvida a formação de um radical extremamente reativo e, portanto para "neutralizá-lo" a amostra, a princípio, deverá ter uma capacidade antioxidante mais forte em comparação com o radical químico DPPH[•]. Apesar do comentário acima o biossensor mostrou-se bastante eficiente como um teste screening da capacidade antioxidante de amostras de modo fácil e prático.

A configuração final do sistema constituiu de três importantes características; o uso do DNA como marcador de oxidação, esta molécula é um marcador alvo de extrema importância em estudos bioquímicos e ou biológicos de todo tipo. Também a escolha do radical gerado no meio, o radical [•]OH é uma espécie altamente oxidante e uma das mais comuns formada *in vivo*. Outra característica importante foi o uso de um equipamento portátil de medida, combinado com o eletrodo impresso e resulta em um método prático para análise de forma simples, rápida, confiável e em campo.

Associado a isto, com a metodologia desenvolvida abriu-se a possibilidade de estudos de novos marcadores para monitoração do processo de oxidação.

V.9. CONCLUSÕES PARCIAIS - Biossensor a base de DNA

O eletrodo a base de DNA mostrou-se bastante promissor como sistema screening para avaliação da capacidade antioxidante de amostras de maneira direta. O método desenvolvido pode ser aplicado para diferentes matrizes sem necessidade de pré-tratamento da amostra ou calibração prévia e com possibilidade de análise quantitativa.

Cabe ressaltar que o sistema desenvolvido agregando uma biomolécula como o DNA imobilizado em um eletrodo, constituiu em uma nova forma de estudo de moléculas alvos no processo de oxidação *in vitro*.

O uso de um eletrodo descartável como suporte para imobilização do marcador de oxidação (o DNA) permitiu que a configuração final do sistema apresentasse características vantajosas como baixo custo, fácil manuseio, prático e com possibilidade de construção de dispositivos pequenos para uso em campo e comercializáveis. Associado a isto, os eletrodos descartáveis estão se tornando amplamente difundidos, devido a sua simplicidade e compatibilidade com instrumentos miniaturizados e portáteis. Também a possibilidade de elaborar pequenas células eletroquímicas completamente descartáveis pela impressão em uma única configuração dos três eletrodos, permite a adequação destes eletrodos em qualquer tipo de laboratório analítico.

Os eletrodos descartáveis de um modo geral apresentam excelente desempenho analítico e possibilitam modificações, como ocorre com os eletrodos sólidos em geral e de eletrodos de pasta de carbono, uma vez que dependendo do modificador, este pode ser incorporado à tinta.

Capítulo VI

Conclusões

VI. CONCLUSÕES GERAIS

O desenvolvimento do biossensor a base de HRP mostrou-se bastante eficiente na determinação de compostos fenólicos em amostras vegetais e que a medida realizada possibilitou a qualificação das amostras em termos de suas capacidades antioxidantes.

Complementando que, apesar da literatura descrever exemplos de biossensores amperométricos para compostos fenólicos muito mais sensíveis, com ampla faixa de trabalho e que apresentam limites de detecção na ordem de nanomolar, o objetivo do estudo do biossensor a base de HRP não foi o aprimoramento destas características, apesar de serem bastante relevantes no desenvolvimento de biossensores. No trabalho exposto, buscou-se desenvolver um biossensor em que pudesse ser aplicado na análise de amostras reais, sem pré-tratamento e com interferência mínima da matriz. O objetivo principal foi realizar uma análise que fosse representativa em termos da fração de compostos fenólicos e isto comprovasse a potencialidade antioxidante deste grupo de compostos presentes nas amostras testadas.

No desenvolvimento do biossensor a base de DNA, conclui-se que o sistema empregando o DNA imobilizado em um eletrodo descartável combinado com a formação de radicais hidroxila *in situ*, por meio da reação de Fenton, mostrou-se extremamente adequado para aplicação em ensaios farmacológicos e/ou bioquímicos, visto que o DNA é uma das moléculas mais importantes em estudos de bioensaios. O dano ao DNA é um evento fundamental no processo da carcinogênese e mutagênese, sendo assim, a metodologia proposta para avaliação das propriedades antioxidantes de plantas, pode contribuir para inferir alguma informação adicional sobre possíveis propriedades antimutagênicas *in vitro* das amostras.

Associado a isto, o emprego do equipamento portátil para as medidas eletroquímicas amplia a aplicação do sistema, por exemplo, no monitoramento em campo, auxiliando na popularização deste tipo de eletrodo e também tornando as análises mais fáceis e práticas.

Enfatizando a importância das metodologias desenvolvidas para esta nova aplicação. A avaliação da propriedade antioxidante de plantas constitui em um parâmetro importante na caracterização do vegetal com relação às suas potencialidades terapêuticas. Neste sentido, são poucos os estudos relacionando o uso de biossensores e atividades biológicas de plantas, apesar de vários biossensores enzimáticos, assim como biossensores utilizando DNA, terem sido desenvolvidos nos últimos anos.

Cabe ressaltar que na aplicação de uma determinada metodologia para avaliação da propriedade antioxidante, deve-se levar em consideração a composição do sistema. Algumas características são importantes, na escolha de um determinado teste como, o substrato oxidável, o método de indução da oxidação e a forma de caracterização da propriedade antioxidante. Vários métodos analíticos estão descritos na literatura, fazendo uso de diferentes substratos oxidáveis (DNA, lipídeos ou proteínas) e espécies radicalares formadas com diferentes modos de ação. Porém é importante adotar um método que seja específico e forneça alguma informação química de forma rápida que possa estar relacionada com a degradação oxidativa de sistemas biológicos, farmacológicos, alimentícios ou outros.

Capítulo VII

Referências

Bibliográficas

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASA, R.; VANNGARD, T. & DUNFORD, H.B. (1975). EPR studies on compound-I of horseradish peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* 391 (2), 259-264.
- ADEDIRAN, S.A. & LAMBEIR, A.M. (1989). Kinetics of the reaction of compound II of horseradish peroxidase with hydrogen peroxide to form compound III. *European Journal of Biochemistry* 186 (3), 571-576.
- ANALYTICAL METHODS COMMITTEE. (1987). Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit. *Analyst* 112, 199-112.
- ARUOMA, O.I. (2003). Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Mutation Research* 523 (2-3), 9-20.
- ARUOMA, O.I.; BAHORUM, T. & JEN, L.S. (2003). Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutation Research* 544 (2-3), 203-215.
- ARTS, M.J.T.J.; HAENEN, G.R.M.M.; VOSS, H.P. & BAST, A. (2004). Antioxidant capacity of reaction products limits the applicability of the Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (TEAC) assay. *Food and Chemical Toxicology* 42 (1), 45-49.
- ASTILL, C.; BIRCH, M.R.; DACOMBE, C.; HUMPHREY, P.G. & MARTIN, P.T. (2001). Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49 (11), 5340-5347.
- BANCI, L. (1997). Structural properties of peroxidases. *Journal of Biotechnology*, 53 (2-3), 253-263.
- BLASCO, A.J.; GONZÁLEZ, M.C. & ESCARPA, A. (2004). Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: Towards an electrochemical index of natural antioxidants. *Analytica Chimica Acta* 511 (1), 71-81.
- BLOIS, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181 (4617), 1199-1200.
- BORISH, E.T.; COSGRAVE, J.P.; CHURCH, D.F.; DEUTSCH, W.A. & PRIOR, W.A. (1985). Cigarette tar causes single-strand breaks in DNA. *Biochemical Research Communications* 133 (2), 780-786.

- BOX, H.C.; DAWIDZIK, J.B. & BUDZINSKI, E.E. (2001). Free radical-induced double lesions in DNA. *Free Radical and Medicine* 31 (7), 856-868.
- BRABEC, V. & PALECEK, E. (1972). Adsorption of single-stranded and double-helical polynucleotides on mercury-electrodes. *Biopolymers* 11 (12), 2577-2589.
- BRABEC, V. (1980). Electrochemical oxidation of nucleic acids and proteins at graphite electrode-qualitative aspects. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 7 (1), 69-82.
- BRABEC, V. (1981). Nucleic acids analysis by voltammetric at carbon electrodes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 8 (4), 437-449.
- BREEN, A.P. & MURPHY, J.A. (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radical Biology and Medicine* 18 (6), 1033-1077.
- BRETT, C.M.A.; BRETT, A.M.O. & SERRANO, S.H.P. (1994). On the adsorption and electrochemical oxidation of DNA at glassy carbon electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 366 (1-2), 255-231.
- BUETTNER, G.R. (1993). The pecking order of free radicals and antioxidants: Lipid peroxidation, α -tocopherol and ascorbate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 300 (2), 535-543.
- BURKITT, M.J. (2003). Chemical, biological and medical controversies surrounding the Fenton reaction. *Progress in Reaction Kinetics and Mechanism* 28 (1), 75-103.
- BURROWS, C.J. & MULLER, J.G. (1998). Oxidative nucleobase modifications leading to strand scission. *Chemical Reviews* 98 (3), 1109-1151.
- CAMPUZANO, S.; SERRA, B.; PEDRERO, M.; De VILHENA, F.J.M. & PINGARRON, J.M. (2003). Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds at self-assembled monolayer based tyrosinase biosensor. *Analytica Chimica Acta* 494 (1-2), 187-197.
- CHANDRA, S. & MEJIA, E.G. (2004). Polyphenols compounds, antioxidant capacity, and quinone reductase activity of an aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinensis*) teas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (11), 3583-3589.
- CHITI, G.; MARRAZZA, G. & MASCINI, M. (2001). Electrochemical DNA biosensor for environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta* 427 (3), 155-164.

- CLIFFORD, M. N. & WIGHT, J. (1976). The measurement of feruloylquinic acids and caffeoylquinic acids in coffee beans. Development of the technique and its preliminary application to green coffee beans. *Journal of Science of Food and Agricultural* 27 (1), 73-84.
- CLIFFORD, M. N. (1979). Chlorogenic acids - Their complex nature and routine determination in coffee beans. *Food Chemistry* 4 (1), 63-71.
- CLIFFORD, M.N.; SHUTLER, S.; THOMAS, G.A. & OHIOKPEHAL, O. (1987). The chlorogenic acid content of coffee substitutes. *Food Chemistry* 24 (2), 99-107.
- CLIFFORD, M. N. (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79 (3), 362-372.
- CSÖREGL, E.; JÖNSSON-PETTERSSON, G. & GORTON, LO. (1993). Mediatorless electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at graphite electrodes chemically modified with peroxidases. *Journal of Biotechnology* 30 (3), 315-337.
- DE SOUZA, A.C.; ALVIANO, D.S.; BLANK, A.F.; ALVES, F.B.; ALVIANO, C.S. & GATASS, C.R. (2004). *Melissa officinalis* L. essential oil: Antitumoral and antioxidant activities. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 56 (5), 677-681.
- DIZDAROGLU, M.; JARUGA, P.; BIRINCIUGLU, M. & RODRIGUEZ, H. 2002. Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and Measurement. *Free Radical Biology and Medicine* 32 (11), 1102-1115.
- DUNFORD, H.B. (1991). Horseradish peroxidase: Structure and kinetics properties. In *Peroxidases in Chemistry and Biology*, Vol. II, Chapter 1, Ed. Everse, J.; Everse, K. E. & Grisham, M. B., CRC Press, New York. Pages 2-24.
- DUNFORD, H.B. (2002). Oxidations of iron (II) / (III) by hydrogen peroxide: From aquo to enzyme. *Coordination Chemistry Reviews* 233-234 , 311-318.
- ERDEM, A. & OZSOZ, M. (2002). Electrochemical DNA biosensors based on DNA-interactions. *Electroanalysis* 14 (14), 965-974.
- ESCARPA, A. & GONZALEZ, M.C. (2001). An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods. *Critical Review in Analytical Chemistry* 31 (2), 57-139.
- ESCODD: European Standards Committee on Oxidative DNA Damage. (2000). Comparison of different methods of measuring 8-oxoguanine as a marker of oxidative DNA damage. *Free Radical Research* 32 (4), 333-341.

- FERAPONTOVA, E.E. (2004). Direct peroxidase bioelectrocatalysis on a variety of electrode materials. *Electroanalysis* 16 (13-14), 1101-1112.
- FOJTA, M. (2002). Electrochemical sensors for DNA interactions and damage. *Electroanalysis* 14 (21), 1449-1463.
- FOLKES, L. K. & CANDEIAS, L. P. (1997). Interpretation of the reactivity of peroxidase compounds I and II with phenols by the Marcus equation. *FEBS Letters*, 412 (2), 305-308.
- GHERGHI, I.CH.; GIROUSI, S.Th.; VOULGAROPOULOS, A.N. & TZIMOU-TSITOURIDOU, R. (2004). Differentiations in the electrochemical behaviour of the interactions between DNA and compounds with affinity for DNA. *Analytical Letters* 37 (5), 957-966.
- GOGATE, P.R. & PANDIT, A.B. (2004). A review of imperative technologies for wastewater treatment II: Hybrid methods. *Advances in Environmental Research* 8 (3-4), 553-597.
- GORTON, LO. (1995). Carbon paste electrodes modified with enzymes tissues and cells. *Electroanalysis* 71 (1), 23-45.
- HALLIWELL, B. (2001). Role of free radicals in the degenerative diseases - therapeutic implications for antioxidants treatment. *Drugs and Aging* 18 (9), 685-716.
- HART, J.P. & WRING, S.A. (1997). Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensor for biomedical, environmental and industrial analyses. *TRAC - Trends in Analytical Chemistry* 16 (2), 89-103.
- HART, J.P.; CREW, A.; CROUCH, E.; HONEYCHURCH, K.C. & PEMBERTON, R.M. (2004). Some recent designs and developments of a screen-printed carbon electrochemical sensors/biosensors for biomedical, environmental and industrial analyses. *Analytical Letters* 37 (5), 789-830.
- IUPAC (1976). Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC - IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Nomenclature of cyclitols. *Biochemistry Journal* 153 (1), 23-31.
- JAROSZ-WILKOLAZKA, A.; RUZGAS, T. & GORTON, LO. (2004). Use of laccase-modified electrode for amperometric detection of plant flavonoids. *Enzyme and Microbial Technology* 35 (2-3), 238-241.

- KASAI, H. (2002). Chemistry-based studies on oxidative DNA damage: Formation, repair and mutagenesis. *Free Radical Biology and Medicine* 33 (4), 450-456.
- KAUR, Ch & KAPOOR, H.C. (2001). Antioxidants in fruits and vegetables - the milenium's health. *International Journal of Food Science and Technology* 36 (7), 703-725.
- KENNEDY, J.F. & KAY, I.M. (1976). Hydrous titanium oxides - New supports for the simple immobilisation of enzymes. *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions 1* (3), 329-335.
- KENNEDY, J.F. & CABRAL, J.M.S. (1987). Use of titanium species for the immobilization of bioactive compounds - enzymes. *Transition Metal Chemistry* 12 (6), 481-493.
- KONG, Y.T.; IMABAYASHI, S.; KANO, K.; IKEDA, T. & KAKIUCHI, T. (2001). Peroxidase-based amperometric sensor for the determinations of total phenols using two-stage peroxidase reactions. *American Journal of Enology and Viticulture* 52 (4), 381-385.
- KRAKAUER, T. (2002). The polyphenols chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 24 (1), 113-119.
- KROON, P. A. & WILLIAMSON, G. (1999). Hydroxycinnamates in plants and food: Current and future perspectives. *Journal of Science of Food and Agricultural* 79 (3), 355-361.
- KY, C.-L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S. & NOIROT, M. (2001). Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry* 75 (2), 223-230.
- KUBOTA, L.T.; GUSHIKEM, Y.; CASTRO, S. & MOREIRA, J.C. (1991). Preparation and characterization of Ti (IV) oxide grafted onto silica on a silica gel surface. *Colloids and Surfaces* 57 (1-2), 11-15.
- LATTANZIO, V. (2003). Bioactive polyphenols; their role in quality and storability of fruit and vegetables. *Journal of Applied Botany* 77 (5-6), 128-146.
- LIU, Z.J.; LIU, B.H.; KONG, Q.L. & DENG, J.Q. (2000). Probing trace phenols based on mediator-free alumina sol-gel derived tyrosinase biosensor. *Analytical Chemistry* 72 (19) 4707-4712.

- LUCARELLI, F.; MARRAZZA, G.; TURNER, A.P.F. & MASCINI, M. (2004). Carbon and gold electrodes as electrochemical transducer for DNA hybridisation sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 19 (6), 515-530.
- MADHURJITH, T.; AMAROWICZ, R. & SHAHIDI, F. (2004). Phenolic antioxidants in beans and their effects on inhibition of radical-induced DNA damage. *Journal of the American Oil Chemists Society* 81 (7), 691-696.
- MAEHLI, A.C. (1955). Plant peroxidase. In *Methods in Enzymology*. Ed. Colowick, S.P. & Kaplan, N.O.; Academic Press Inc., New York. Pages 801-813.
- MARRAZZA, G.; CHIANELLI, I. & MASCINI, M. (1999). Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta* 387 (3), 297-307.
- MASCINI, M.; PALCHETTI, I. & MARRAZZA, G. (2001). DNA electrochemical biosensors. *Fresenius Journal of Analytical Letters* 369 (1), 15-22.
- MELLO, L.D. & KUBOTA, L.T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry* 77 (2), 237-256.
- MENEGHINI, R. 1997. Iron homeostasis, oxidative stress and DNA damage. (1997). *Free Radical Biology and Medicine* 23 (5), 783-792.
- MIGUEL, G.; SIMÕES, M.; FIGUEREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G. & CARVALHO, L. (2004). Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespitius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry* 86 (2), 183-188.
- MIHAJLOVIC, M.Lj & CEKOVIC, Z. (1971). In *The chemistry of hydroxyl group*. Ed. Patai, S.; John Wiley & Sons, New York. Pages 505-515.
- MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R., & VANBEEK, T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85 (2), 231-237.
- MOLYNEUX, P. (2004). The use of the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal Science Technology* 26 (2), 211-219.

- MONGELLI, E.; DESMARCHELIER, C.; TALOU, J.R.; COUSSIO, J. & CICCIA, G. (1997). *In vitro* antioxidant and cytotoxic activity of extracts of *Baccharis coridifolia* DC. *Journal of Ethnopharmacology* 58 (3), 157-163.
- NARDINI, M.; D'AQUINO, M.; TOMASSI, G.; GENTILI, V.; DI FELICE, M. & SCACCINI, C. (1995). Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivates. *Free Radical Biology and Medicine* 19 (5), 541-552.
- NASCIMENTO, V.B. & ANGNES, L. (1998). Eletrodos fabricados por "silk-screen". *Química Nova* 21 (5), 614-629.
- NELSON, D.L. & COX, M.M. (2002). *Lenhinger Princípios de Bioquímica*. 3º ed. Editora Savier Ltda, 2002. São Paulo, SP. Traduzido por Simões, A.A. & Lodi, W.R.N. Páginas 250-279.
- OHNISHI, M.; MORISHITA, H.; IWAHASHI, H.; TODA, S.; SHIRATAKI, Y.; KIMURA, M. & KIDO, R. (1994). Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and hemolysis. *Phytochemistry* 36 (3), 579-583.
- OLTHOF, M.R.; HOLLMAN, P.C.; ZOCK, P.L. & KATAN, M.B. (2001). Consumption of high doses of chlorogenic acid, present in coffee, or black tea increases plasma total homocysteine concentration in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 73 (3), 532-538.
- PALANTI, S.; MARRAZZA, G. & MASCINI, M. (1996). Electrochemical DNA probes. *Analytical Letters* 29 (13), 2309-2331.
- PALECEK, E. (1996). From polarography of DNA to microanalysis with nucleic acids modified electrodes. *Electroanalysis* 8 (1), 7-14.
- PALECEK, E. & FOJTA, M. (2001). DNA hybridization and damage. *Analytical Chemistry* 73 (3), 75A-83A.
- PALECEK, E. (2002). Past, present and future of nucleic acids electrochemistry. *Talanta* 56 (5), 809-819.
- PIETTA, P.G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products* 63 (7), 1035-1042.

- POPOVICH, N.D.; ECKHARDT, A.E.; MIKULECKY, J.C.; NAPIER, M.E. & THOMAS, R.S. (2002). Electrochemical sensor for detection of unmodified nucleic acids. *Talanta* 56 (5), 821-828.
- PURDON, M. P. & McCAMEY, D. A. (1987). Use of a 5-caffeoylquinic acid / caffeine ratio to monitor the coffee roasting process. *Journal of Food Science* 52 (6), 1680-1683.
- RICE-EVANS, C. & MILLER, N.J.; (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free Radical Biology and Medicine* 20 (7), 933-956.
- RICE-EVANS, C. (2001). Flavonoids antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* 8 (7), 797-807.
- ROBERTS, J.E.; HOFFMAN, B.M.; RUTTER, R. & HAGER, P.L. (1981). Electron-nuclear double-resonance of horseradish peroxidase compound-I detection of the porphyrin pi-cation radical. *Journal of Biological Chemistry* 256 (5), 2118-212.
- ROHN, S.; RAWEL, H.M. & KROLL, J. (2002). Inhibitory effects of plants phenols on the activity of selected enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50 (12), 3566-3571.
- ROSATTO, S.S.; KUBOTA, L.T. & NETO, G.O. (1999). Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on silica-titanium. *Analytica Chimica Acta* 390 (1-3), 65-72.
- ROSATTO, S.S.; NETO, G.O. & KUBOTA, L.T. (2001). Effect of DNA on the peroxidase based biosensor for phenol determination in waste waters. *Electroanalysis* 13 (6), 445-450.
- RUZGAS, T.; CSÖREGI, E.; EMNÉUS, J.; GORTON, LO & MARKO-VARGA, G. (1996). Peroxidase-modified electrodes: Fundamentals and application. *Analytica Chimica Acta* 330(2-3), 123-138.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International* 8 (3), 121-137.
- SANTOS-ALVAREZ, P. De Los; LOBO-CASTANON, M.J.; MIRANDA-ORDIERES, A.J. & TUNON-BLANCO, P. (2004). Electrochemistry of nucleic acids at solid electrodes and its applications. *Electroanalysis* 16 (15), 1193-1204.

- SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J.A.; THEODULOZ, C.; ASTUDILLO, S.L.; FERESIN, G.E. & TAPIA, A. (2003). Free-radical scavengers and antioxidants from *Peumus boldus* Mol. Free Radical Research 37 (4), 447-452.
- SCOUTEN, W.H.; LUONG, J.H.T. & BROWN, S. (1995). Enzyme or protein immobilization techniques for application in biosensor design. Trends in Biotechnology 13 (5), 178-185.
- SHIBATA, H.; SAKAMOTO, Y.; OKA, M. & KONO, Y. (1999). Natural antioxidant, chlorogenic acid, protects against DNA breakage caused by monochloramine. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 63 (7), 11295.
- SIMONETTI, P.; PIETTA, P. & TESTOLIN, G. (1997). Polyphenols content and total antioxidant potential of selected Italian wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry 45 (4), 1152-1155.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R. & LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 299, 152-178.
- SMITH, D.L. & ELVING, P.J. (1962a). Electrochemical reduction of pyrimidine, cytosine and related compounds - polarography and macroscale electrolysis. Journal of the American Chemical Society 84 (14) 2741-&.
- SMITH, D.L. & ELVING, P.J. (1962b). Electrochemical reduction of purine, adenine and related compounds - polarography and macroscale electrolysis. Journal of the American Chemical Society 84 (8), 1412-&.
- SN, EL. & KARAKAYA, S. (2004). Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. International Journal of Food Science and Nutrition 55 (1), 67-74.
- STEENKEN, S. (1989). Purine bases, nucleosides and nucleotides: Aqueous solution redox chemistry and transformation reactions of their radical cations and e⁻ and OH adducts. Chemical Reviews 89 (3), 503-520.
- STEVENS, L. (1993). Buffers and the determination of protein concentrations. In Enzymes assays: A practical approach, Chapter 11, Ed. Eisinger, R. & Donson, M.J., Ire Press, N.Y., Pages 316-329.

- SUN, D.M.; CAI, C.X.; LI, X.G.; XING, W. & LU, T.H. (2004). Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized on active carbon. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 566 (2), 415-421.
- SVANCARA, I.; VYTRAS, K.; BAREK, J. & ZIMA, J. (2001). Carbon paste electrodes in modern electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 31 (4), 311-345.
- TAPIERO, H.; TEW, K.D.; BA, G.N. & MATHÉ, G. (2002). Polyphenols: Do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedicine and Pharmacotherapy* 56 (4), 200-207.
- TAYLOR, W.T. & BATTERSBY, A.R. (1967). In *Oxidative coupling of phenols*. Ed. Taylor, W.T. & Battersby, A.R.; Marcell Dekker Inc., New York, Pages 58-77.
- TRUGO, L. C. & MACRAE, R. (1984a). Chlorogenic acid composition of instant coffees. *Analyst* 109, 263-266.
- TRUGO, L. C. & MACRAE, R. (1984b). A study of the effect of roasting on the chlorogenic acid composition of coffee using HPLC. *Food Chemistry* 15 (3), 219-227.
- VALOVANIDIS, A.; NISIOTOU, C.; PAPAGEORGIOU, Y.; KREMLI, I.; STRAVELAS, N.; ZINIERIS, N. & ZYGALAKI, H. (2004). Comparison of the radical scavenging potential of polar and lipidic fractions of olive oils and other vegetables oils under normal conditions and after thermal treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52 (8), 2358-2365.
- VERTUANI, S.; ANGUSTI, A. & MANFREDINI, S. (2004). The antioxidant and pro-antioxidants network: An overview. *Current Pharmacological Design* 10 (14), 1677-1694.
- WU, Y.; TAYLOR, K.E.; BISWAS, N. & BEWTRA, J.K. (1998). A model for the protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in the removal of phenol. *Enzyme and Microbial Technology* 22 (4), 315-322.
- ZHANG, S.; WRIGHT, G. & YANG, Y. (2000). Materials and techniques for electrochemical biosensor design and construction. *Biosensors and Bioelectronics* 15 (5-6), 273-282.

Capítulo VIII

Propostas

para

trabalhos

futuros

VIII. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Como propostas para trabalhos futuros, sugere-se:

● Com relação ao biossensor a base de HRP,

↳ Desenvolver novos dispositivos, empregando as enzimas Horseradish peroxidase ou polifenol oxidase para determinação de compostos fenólicos mais complexos, como flavonóides ou catequinas, ampliando a aplicabilidade das metodologias para outras amostras;

↳ Utilizar o sistema de eletrodos impressos no desenvolvimento de novos dispositivos enzimáticos, buscando aumentar a sensibilidade e seletividade;

↳ Utilizar sistema em fluxo empregando estes novos dispositivos para detecção de compostos fenólicos.

● Com relação ao biossensor a base de DNA,

↳ Prosseguir os estudos com o biossensor a base de DNA, buscando aperfeiçoar o sistema aplicando o biossensor para análise quantitativa;

↳ Estudo do mecanismo de interação dos radicais hidroxila com o DNA imobilizado no eletrodo, permitindo entender o mecanismo de resposta do biossensor;

↳ Desenvolver novas formas de imobilização do DNA associado mediadores de elétrons, buscando melhorar a estabilidade e sensibilidade do dispositivo;

↳ Combinar sistema em fluxo para geração contínua do radical hidroxila, buscando desenvolver novos sistemas para análise screening e quantitativa.
