

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2010.05.06	(73) Titular(es):
(30) Prioridade(s):	UNIVERSIDADE DO MINHO LARGO DO PAÇO 4704-553 BRAGA PT
(43) Data de publicação do pedido: 2011.11.07	(72) Inventor(es):
	MARIA DE FÁTIMA MALVEIRO BENTO PT
	MARIA DULCE SILVA GERALDO PT
	ANA PAULA ALMADA FARIA BETTENCOURT ESTEVIÃO PT
	RAQUEL SANTOS OLIVEIRA PT
	(74) Mandatário:

(54) Epígrafe: **SISTEMA PARA SENSORES DE ANTIOXIDANTES BASEADO NA RESPOSTA A UM ATAQUE OXIDATIVO PROMOVIDO POR VIA ELECTROQUÍMICA**

(57) Resumo: A PRESENTE INVENÇÃO CONSISTE NUM MÉTODO ANALÍTICO E NUM DISPOSITIVO PARA A DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES QUÍMICAS COM BASE NA SUA RESPOSTA A UM ATAQUE OXIDATIVO EM LARGA ESCALA PROMOVIDO ELECTROQUIMICAMENTE A POTENCIAL CONSTANTE. DEPENDENDO DO POTENCIAL APLICADO, AS REACÇÕES PROMOVIDAS PODEM ENVOLVER A TRANSFERÊNCIA DE ELECTRÕES OU O ATAQUE POR RADICAIS HIDROXILO GERADOS ANODICAMENTE, QUANDO A OXIDAÇÃO É REALIZADA EM MEIOS AQUOSOS A UM POTENCIAL EM QUE OCORRA EM SIMULTÂNEO A OXIDAÇÃO DA ÁGUA. O DISPOSITIVO DESENVOLVIDO CONSISTE NUM SISTEMA CONSTITUÍDO POR UM ÂNODO QUE PODE FUNCIONAR COMO FONTE DE RADICAIS HIDROXILO E COMO DETECTOR CRONOAMPEROMÉTRICO (A/RS/CD), UM DETECTOR VOLTAMÉTRICO DE ANTIOXIDANTES (VD) E UM ELÉCTRODO DE REFERÊNCIA (RE), PODENDO CONSTITUIR UM DISPOSITIVO DESCARTÁVEL, LIGADO A UM ELÉCTRODO SECUNDÁRIO (SE), NUMA CÉLULA DO TIPO 'BATCH' OU DE FLUXO COM DOIS COMPARTIMENTOS E AGITAÇÃO CONTROLADA. O DISPOSITIVO FUNCIONA AUTONOMAMENTE LIGADO A UM SISTEMA DE CONTROLO / AQUISIÇÃO DO TIPO POTENCIOSTATO, OU ACOPLADO A UM EQUIPAMENTO ANALÍTICO DO TIPO CROMATOGRÁFICO.

Resumo

"Sistema para sensores de antioxidantes baseado na resposta a um ataque oxidativo promovido por via electroquímica"

A presente invenção consiste num método analítico e num dispositivo para a determinação da actividade antioxidante de espécies químicas com base na sua resposta a um ataque oxidativo em larga escala promovido electroquimicamente a potencial constante. Dependendo do potencial aplicado, as reacções promovidas podem envolver a transferência de electrões ou o ataque por radicais hidroxilo gerados, quando a oxidação é realizada em meios aquosos a um potencial em que ocorra em simultâneo a oxidação da água.

O dispositivo desenvolvido consiste num sistema constituído por um ânodo que pode funcionar como fonte de radicais hidroxilo e como detector cronoamperométrico (A/RS/CD), um detector voltamétrico de antioxidantes (VD) e um eléctrodo de referência (RE), podendo constituir um dispositivo descartável, ligado a um eléctrodo secundário (SE), numa célula do tipo "batch" ou de fluxo com dois compartimentos e agitação controlada. O dispositivo funciona autonomamente ligado a um sistema de controlo / aquisição do tipo potenciostato, ou acoplado a um equipamento analítico do tipo cromatográfico.

Descrição

"Sistema para sensores de antioxidantes baseado na resposta a um ataque oxidativo promovido por via electroquímica"

Domínio técnico da invenção

A presente invenção refere-se a um método analítico e a um dispositivo para a determinação da actividade antioxidante de espécies químicas com base na sua capacidade de resposta a um ataque oxidativo extensivo perpetrado por meios electroquímicos.

A invenção é importante para estudos de stress oxidativo, sendo aplicável nas áreas de medicina e alimentar.

Antecedentes da invenção

Têm sido efectuados muitos esforços no sentido de desenvolver métodos analíticos que permitam avaliar a actividade antioxidante de moléculas com interesse biológico com diversas origens, tais como alimentos, fluidos humanos e fármacos. Os métodos electroquímicos encontram-se entre os mais utilizados com este fim. O potencial de oxidação é facilmente acedido através de medidas voltamétricas e, não obstante a não-reversibilidade dos processos de oxidação de bastantes espécies com capacidade antioxidante, é utilizado para estimar o E^0 e quantificar a actividade dos antioxidantes. Encontram-se descritos na literatura exemplos significativos da utilização

deste método: Chevion *et al.*, *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 22, No 3, pp 411-421, 1997, Korotkova *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 375, pp 465-468, 2003, Kilmartin, *Antioxidants & Redox Signaling*, vol. 3, Number 6, pp 941-953, 2001, Huang *et al.*, *Current Drug Discovery Technologies*, vol.1, Number 2, pp 173-179, 2004, Firuzi *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1721, pp 174-184, 2005 e Blasco *et al.*, *Electroanalysis* 19, Number 22, pp 2275-2286, 2007.

Foi recentemente proposto um ensaio electroquímico denominado CRAC (ceric reducing antioxidant capacity), em que a actividade antioxidante é avaliada com base na capacidade do antioxidante de reduzir o Ce(IV) recorrendo a uma determinação cronoamperométrica. Este ensaio tem como base um mecanismo de transferência electrónica (ET), diferindo no método de detecção utilizado relativamente aos ensaios FRAP, CuPRAC, TEAC e DPPH que são baseados em determinações espectrofotométricas (Ferreira *et al.*, *Electroanalysis*, vol.20, No. 12, pp 1323 - 1329, 2008).

Existem descritos métodos para avaliação da actividade antioxidante baseados em titulações coulométricas com electrogeração de halogéneos, como por exemplo o bromo e o iodo (Abdullin *et al.*, *Journal of Analytical Chemistry*, Vol. 56, No. 6, pp. 557-559, 2001; Ziyatdinova *et al.*, *Talanta*, Vol. 68, No. 3, pp 800-805, 2006). Uma proposta alternativa recorre à titulação potenciométrica com electrogeração de cloro (Martinez *et al.*, *Eur Food Res Technol*, Vol. 220, No 5-6, pp 658-661, 2005).

Outras abordagens para a avaliação da actividade antioxidante deram origem a diferentes configurações de sensores electroquímicos de antioxidantes. US-5,518,590 descreve um sensor electroquímico desenvolvido para avaliar a capacidade

antioxidante e de anti-desgaste de óleos de motores e outros lubrificantes. O sensor recorre a uma interface de electrólito tipo-gel ou líquida, através da qual os antioxidantes se podem deslocar de um meio não condutor e atingir o eléctrodo de trabalho. O estado de desgaste dos óleos é avaliado a partir da intensidade de corrente, obtida através de medições voltamétricas, que tende a diminuir à medida que o desgaste do óleo aumenta. Hodges e Chatelier (US-2004/0026244) propuseram um sensor descartável para avaliar o nível de analito oxidante ou antioxidante em fluidos, recorrendo a uma célula electroquímica de camada fina, contendo um reagente que participa directamente numa reacção redox com o analito. A capacidade antioxidante das amostras é avaliada com base na quantificação da concentração do reagente utilizado, obtida por potenciometria, coulometria ou amperometria. Um dispositivo para avaliar substâncias antioxidantes foi desenvolvido e testado em tecidos biológicos húmidos (WO 2006/094529) A1. O tratamento do sinal obtido com este dispositivo corresponde a uma pseudo-titulação de uma mistura de antioxidantes, utilizando carga eléctrica proveniente de um eléctrodo, sendo o resultado expresso em relação a um antioxidante de referência.

Recentemente surgiram dois métodos que envolvem a monitorização electroquímica de antioxidantes face a espécies reactivas de oxigénio (ROS). O método proposto por Wang e colaboradores (Electroanalysis, 12, 1395, 2009) baseia-se na geração de radicais hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), a partir da fotocatalise da água na presença de nanopartículas de TiO_2 , e na avaliação da actividade antioxidante com base na inibição da reacção de captura do $\text{HO}\cdot$ pelo 4-hidroxibenzóico (4-HBA). O 4-HBA, quantificado por voltametria, funciona como uma sonda. O sensor de antioxidantes proposto por Tacchini e colaboradores em WO

55738 recorre à utilização de radicais hidroxilo gerados electroquimicamente em eléctrodos modificados com óxidos metálicos. A avaliação da capacidade antioxidante é efectuada com base na monitorização da intensidade de corrente relativa à redução do radical hidroxilo no eléctrodo, obtida na presença e na ausência de antioxidante. A actividade antioxidante é estimada a partir da representação gráfica de uma grandeza determinada com base na diferença entre estas duas intensidades de corrente obtidas num conjunto de soluções de antioxidante de concentração variável e conhecida.

A presente invenção refere-se a um método analítico e a um dispositivo para a determinação da actividade antioxidante de espécies químicas, em soluções ou em sistemas naturais tais como sumos de fruta, extractos de plantas ou fluidos biológicos, com base na medição da sua resposta a um ataque oxidativo extensivo, realizado através da aplicação de um potencial fixo a um ânodo durante um tempo determinado.

Este método de avaliação da actividade antioxidante apresenta a vantagem marcante de utilizar condições experimentais próximas das dos sistemas naturais, possibilitando a simulação da reactividade de espécies reactivas de oxigénio (ROS) nessas mesmas condições. Nos outros métodos que envolvem transferência de electrões disponíveis a actividade antioxidante é avaliada face a espécies oxidantes sintéticas (como o radical DPPH, o radical ABTS ou o complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina férrico), cujos resultados apresentam um significado questionável quando se pretende transpor para sistemas naturais. A utilização de espécies oxidantes como estas, pouco relevantes no contexto dos sistemas naturais, e com potenciais redox diferentes dos potenciais das ROS, leva ao estabelecimento de várias escalas de reactividade, sem qualquer

paralelismo entre elas. Esses métodos apresentam ainda a desvantagem de não permitirem a incorporação do efeito do pH na reactividade das ROS. Para além das especificidades em termos do poder oxidante de cada uma destas espécies sintéticas, a utilização desses métodos é muitas vezes condicionada por limitações inerentes à sua solubilidade e estabilidade, nomeadamente em termos do pH e natureza do solvente.

Descrição Geral

A presente invenção consiste num método analítico e num dispositivo adequado à determinação da actividade antioxidante de espécies químicas com base na sua capacidade de resposta a um ataque oxidativo extensivo perpetrado por meios electroquímicos.

A oxidação das espécies (antioxidantes) é promovida a potencial fixo, num ânodo sujeito a uma polarização adequada de forma a conduzir uma electrólise extensiva.

De acordo com o potencial fixado num ânodo, são promovidas reacções que podem envolver a transferência de electrões ou o ataque por radicais hidroxilo electrogerados, quando a oxidação é realizada em meios aquosos a um potencial em que se verifica a oxidação simultânea da água.

O potencial utilizado para a oxidação pode ser idêntico ao de uma espécie oxidante responsável pela degradação oxidativa em meios naturais, como por exemplo de uma espécie reactiva de oxigénio (ROS). Nestas circunstâncias o método permite caracterizar a acção de um antioxidante, ou de um conjunto de antioxidantes, relativamente à espécie oxidante cujo potencial redox é idêntico ao seleccionado para a electrólise.

A capacidade de resposta de um antioxidante, quer em termos termodinâmicos quer cinéticos, depende em primeira análise do potencial redox estabelecido para a oxidação. Assim, num ensaio em que o potencial é fixado a 2,20 V avalia-se a resposta dos antioxidantes que têm capacidade para reduzir o radical hidroxilo num meio fisiológico ($E^{0'}(\text{OH}\cdot/\text{H}_2\text{O}) = 2,31 \text{ V}$, $\text{pH } 7$), enquanto que para caracterizar a resposta dos antioxidantes com capacidade para reduzir o radical superóxido num vinho ($E^{0'}(\text{O}_2\cdot/\text{H}_2\text{O}) = 1,63 \text{ V}$, $\text{pH } 3$) deverá fixar-se o potencial do ânodo em 1,63 V.

A susceptibilidade de um antioxidante ao ataque oxidativo pode ser avaliada através da monitorização do seu consumo durante a electrólise, recorrendo a um detector voltamétrico (VD) ou a outro sistema analítico. A resposta dos antioxidantes pode ser quantificada em termos da intensidade de corrente gerada no ânodo / fonte de radicais / detector cronoamperométrico (A/RS/CD). A partir da curva da variação da intensidade de corrente em função do tempo é possível estimar a carga da electrólise em intervalos de tempo estabelecidos. Assim, a carga determinada para um tempo infinito (Q_∞) permite estimar o grau de protecção que um antioxidante (AO) confere. A partir da razão $Q_\infty/([AO]VF)$, onde V é o volume da solução de antioxidante e F a constante de Faraday, pode estimar-se a estequiometria aparente da reacção (n_{ap}), que numa base de tempo alargada compreende também a ocorrência de reacções envolvendo os produtos formados na oxidação do antioxidante. Por outro lado, através da avaliação da carga transferida num intervalo de tempo fixo (Q_t) é possível caracterizar a acção do antioxidante em termos cinéticos. Com base em Q_t é possível comparar a acção de diferentes antioxidantes relativamente a um mesmo potencial

de oxidação ou a acção de um mesmo antioxidante quando submetido a um ataque oxidativo a potenciais diferentes.

Através da análise da forma da curva I vs t é ainda possível fazer uma caracterização mecanística da acção do antioxidante pela identificação de constrangimentos cinéticos relacionados com a presença de reacções químicas acopladas e da sua susceptibilidade à variação da temperatura.

A aplicação deste método deve ser efectuada em soluções diluídas de antioxidantes que podem ser amostras sintéticas ou naturais.

O dispositivo desenvolvido consiste num sistema constituído por um ânodo/fonte de radicais/detector cronoamperométrico (A/RS/CD), um detector voltamétrico de antioxidantes (VD) e um eléctrodo de referência (RE), podendo constituir um dispositivo descartável. Este dispositivo funciona ligado a um eléctrodo secundário (SE), numa célula do tipo "batch" ou de fluxo com dois compartimentos e agitação controlada. O dispositivo funciona ligado a um circuito electrónico capaz de: i) controlar o potencial de A/RS/CD (controlo potenciostático) e de VD (controlo potenciodinâmico) entre - 5 e 5 Volts; e ii) medir as intensidades de corrente geradas em A/RS/CD e em VD entre 1 picoampere e 1 Ampere.

A utilização do método requer que a oxidação dos antioxidantes não bloqueie a superfície do A/RS/CD, o que é conseguido preferencialmente com a utilização de concentrações reduzidas de antioxidante (na ordem dos milimolar ou sub-milimolar), ou através de um pré-tratamento que envolva a oxidação da superfície deste eléctrodo, ou ainda através de um revestimento com um polímero como o Nafion.

Os ensaios podem ser conduzidos em diferentes intervalos de tempo, em monitorizações contínuas ou intermitentes. Para tempos curtos, são estimadas velocidades iniciais sendo a caracterização baseada na acção do antioxidante na sua forma original, enquanto que para tempos mais longos pode verificar-se a acção combinada do antioxidante e dos produtos de reacção formados, que podem ainda manifestar actividade antioxidante significativa. A possibilidade de analisar o antioxidante em bases de tempo diferentes permite aceder a informação relevante do ponto de vista mecanístico.

Breve descrição das figuras

Figura 1 - Avaliação da actividade antioxidante do ácido gálico (AG) quando sujeito a ataque oxidativo efectuado através de electrólises conduzidas aos potenciais indicados. O consumo do AG foi monitorizado por voltametria de varrimento linear em VD.

Figura 2 - Caracterização da actividade antioxidante do ácido gálico (AG) e do ácido ferúlico (AF) a partir de Q_t e de Q_∞ relativamente a ataques oxidativos conduzidos a diferentes potenciais.

Descrição detalhada da invenção

Dispositivo

O dispositivo da presente invenção consiste num sistema combinado de eléctrodos, composto por: um ânodo / fonte de

radicais / detector cronoamperométrico (A/RS/CD), um detector voltamétrico de antioxidantes (VD) e um eléctrodo de referência (RE), podendo constituir um dispositivo descartável, ligado a um eléctrodo secundário (SE), numa célula do tipo "batch" ou de fluxo com dois compartimentos e agitação controlada. O dispositivo funciona autonomamente ligado a um sistema de controlo / aquisição do tipo potenciostato, ou acoplado a um equipamento analítico cromatográfico.

Eléctrodos que compõem o dispositivo:

- O primeiro eléctrodo, denominado A/RS/CD, é um eléctrodo cuja área deve ser elevada relativamente ao volume da solução de modo a permitir uma elevada eficiência de transporte de massa, reduzindo o tempo das electrólises. O potencial deste eléctrodo é controlado de modo a estabelecer uma interacção com o antioxidante envolvendo: i) a troca electrónica directa (A) ou, ii) a geração de radicais hidroxilo (RS), por electrooxidação da água. A detecção cronoamperométrica (CD) é efectuada neste eléctrodo permitindo a caracterização da actividade do antioxidante. O A/RS/CD pode ser constituído por qualquer material que permita estabelecer a transferência electrónica como por exemplo, platina, ouro, diamante dopado com boro (BDD), óxido de estanho dopado com antimónio, óxido de irídio ou misturas destes, entre outros. Podem ser usados estes materiais ou depósitos destes materiais em camadas ou na forma de nanopartículas depositadas sobre uma matriz condutora adequada.

- O segundo eléctrodo é o detector voltamétrico, VD, utilizado para monitorizar o consumo de antioxidante que pode ser constituído por um material adequado como o carbono ou o BDD, entre outros.

- O terceiro eléctrodo é o eléctrodo de referência, RE, que é constituído por um metal em contacto com um sal do metal, por exemplo Ag/AgCl ou Hg/Hg₂Cl₂. O potencial de A/RS/CD e de VD é estabelecido relativamente a este eléctrodo de referência.

O dispositivo pode funcionar apenas com dois eléctrodos, o A/RS/CD e o RE quando:

- a caracterização do antioxidante é baseada exclusivamente na determinação de I vs t , Q_{∞} e Q_t .

- a variação da concentração de antioxidante promovida pelo ataque oxidativo é avaliada recorrendo a um sistema analítico acoplado, tal como HPLC.

Método

A presente invenção baseia-se na simulação de um ataque oxidativo extensivo de uma ROS por via electroquímica. A proximidade entre as condições de aplicação do método e as efectivas, quando o ataque é efectuado por uma ROS, é estabelecida a partir dos seguintes parâmetros experimentais: i) o pH da solução, ii) o potencial do ânodo e iii) o tempo da electrólise.

A possibilidade de ajustar o pH da solução ao da matriz natural em que o antioxidante será utilizado é importante pois este valor determina a forma química em que o antioxidante se encontra, e conseqüentemente a sua reactividade. Por outro lado, a selecção do potencial do ânodo permite que a transferência electrónica ocorra de acordo com a reactividade de uma espécie oxidante específica (desde o O₂ até ao HO[•]), atendendo ao efeito do pH nos potenciais formais, $E^{0'}$, ~~des~~ das

ROS. Finalmente, a possibilidade de ajustar o tempo da electrólise permite avaliar a acção do antioxidante em condições em que o seu grau de conversão é apreciável. Nestas condições poderão ser detectadas eventuais reacções entre o antioxidante e as espécies que se formam durante o ataque oxidativo, aumentando a acção antioxidante ou em oposição, gerando um efeito pró-oxidante.

A caracterização da reactividade dos antioxidantes pode ser efectuada com base na monitorização da sua reacção de oxidação a partir dos dados recolhidos em VD (ou num outro sistema analítico) e em CD.

Em seguida descreve-se a análise dos resultados experimentais que permite aceder a parâmetros característicos da actividade dos antioxidantes.

1. Monitorização da variação da concentração de antioxidantes

O consumo de antioxidantes pode ser monitorizado a partir da intensidade de corrente de pico obtida por voltametria de varrimento linear em VD ou por análise cromatográfica. A partir da variação de $I_p/I_{p,0}$ vs t (ou $[AO]/[AO]_0$ vs t) acede-se ao valor de p^{AO} (a partir do ajuste a uma função exponencial do tipo $I_p/I_{p,0} = e^{-pt}$ ou $[AO]/[AO]_0 = e^{-pt}$) que é uma medida da velocidade específica do processo. A razão entre este valor e o obtido para um processo de transferência electrónica controlado por difusão, p^{Ref} , permite avaliar um parâmetro de eficiência adimensional independente da configuração da célula electroquímica (p^{AO}/p^{Ref}).

2. A análise da forma da curva I vs t

A análise dos valores de I vs t permite estimar o valor de p^{AO} através de um ajuste semelhante ao apresentado para a análise da variação da concentração (ou intensidade de corrente de pico). Tal como apresentado no ponto 1, este parâmetro de eficiência pode ser normalizado considerando a sua razão relativamente ao obtido para uma transferência electrónica reversível (p^{AO}/p^{Ref}).

Os valores de p^{AO} podem variar ao longo da electrólise no caso de haver mais do que uma espécie a ser oxidada ou quando se verifica a variação da estequiometria da reacção ao longo do tempo (devido à ocorrência de reacções envolvendo quer o antioxidante quer os seus produtos).

3. Comparação dos valores de p^{AO}/p^{Ref} estimados através dos dados obtidos em VD e em CD

Informação adicional relativa ao poder redutor dos produtos da oxidação do antioxidante pode ser avaliada por comparação dos valores de p^{AO}/p^{Ref} estimados a partir da análise dos resultados obtidos em VD e em CD.

4. Determinação da actividade do antioxidante em termos da sua capacidade redutora estimada para um tempo infinito

A partir da integração da intensidade de corrente ao longo do tempo é possível estimar a capacidade redutora do antioxidante em termos da quantidade total de carga que pode ser transferida na redução de espécies oxidantes (Q_{∞}). A estimativa deste valor

pode ser efectuada considerando o prolongamento da curva com base no valor de p^{AO} determinado a partir da análise da parte final da curva. Para tempos mais curtos, o valor estimado depende essencialmente da capacidade redutora do antioxidante, havendo uma influência reduzida por parte dos produtos da reacção. Para tempos mais longos, e verificando-se a variação de p^{AO} , obter-se-ão estimativas diferentes de Q_{∞} , indicando a presença de outros processos que podem envolver os produtos resultantes da oxidação.

A comparação de resultados obtidos em soluções com concentrações diferentes de antioxidante deverá basear-se no valor de $Q_{\infty}/([AO]V)$, onde V é o volume da solução de antioxidante. Este valor característico de cada antioxidante num determinado potencial é uma medida da carga que o antioxidante tem capacidade para transferir por mole. A partir deste valor pode estimar-se a estequiometria aparente da reacção ($n_{ap} = Q_{\infty}/([AO]VF)$, onde V é o volume da solução de antioxidante e F a constante de Faraday).

56. Determinação da actividade do antioxidante em termos da quantidade de carga transferida num intervalo de tempo fixo

A quantidade de carga que o antioxidante tem capacidade para transferir na redução de espécies oxidantes num intervalo de tempo fixo (Qt) pode ser estimada a partir da integração da curva I vs t . Alternativamente este valor pode ser estimado a partir da integração considerando o prolongamento da curva definido com base no valor de p^{AO} , como descrito no ponto 4. O intervalo de tempo pode ser definido com base na resposta da intensidade de corrente em função do tempo obtida numa

electrólise de uma espécie de referência conduzida a um potencial em que o processo de transferência electrónica seja controlado por difusão. Assim, pode estabelecer-se um tempo relativo a uma conversão fixa, de por exemplo 50%, da espécie de referência. Este tempo permite a obtenção de resultados comparáveis e independentes da configuração da célula.

A comparação de diferentes antioxidantes submetidos a um ataque oxidativo conduzido a um mesmo potencial pode ser efectuada com base nos valores de $Q_t/([AO]V)$.

Usos e aplicações

O método apresentado e o respectivo dispositivo permitem a avaliação da actividade antioxidante de espécies químicas, com base na sua reactividade face a um ataque oxidativo perpetrado através de uma electrólise extensiva a potenciais seleccionados. Esta avaliação é relevante em estudos de stress oxidativo, permitindo:

- Classificar moléculas bio-activas com potencial efeito como antioxidante relativamente a ROS específicos, de modo a serem seleccionadas para uso na prevenção e tratamento de doenças associadas ao envelhecimento, tais como, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas (doenças de Alzheimer, Parkinson) e alguns cancros;
- Prever a susceptibilidade de indivíduos a doenças associadas ao envelhecimento (a partir da monitorização do nível de antioxidantes em fluidos biológicos);
- Avaliar o valor nutricional de alimentos naturais e sintéticos (como o vinho e extractos vegetais) e estimar a resistência oxidativa desses produtos de modo a prever a sua durabilidade.

Exemplo

A actividade do ácido gálico (AG) como antioxidante foi avaliada utilizando uma célula electroquímica do tipo "batch" com dois compartimentos, separados por uma placa de vidro sinterizado. No compartimento anódico encontrava-se o dispositivo composto por um eléctrodo A/RS/CD de rede de platina (5,60 cm² de área), um detector VD de carbono vítreo (0,28 cm² de área) e um eléctrodo de referência (Ag|AgCl, [KCl] = 3 mol dm⁻³) ligado a um eléctrodo secundário de rede de platina (5,60 cm² de área) posicionado no compartimento catódico. A solução de amostra ([AG]₀ = 0,50 mmol dm⁻³, solução tampão fosfato pH 3,20 e V_{solução} = 9,0 ml) foi mantida a temperatura controlada (± 0,3°C) e sob agitação controlada.

O A/RS/CD foi submetido a um pré-tratamento de limpeza electroquímica (E = 2,0 V durante 600 s) numa solução de ácido sulfúrico 1 M. Este pré-tratamento tem como função a eliminação de possíveis contaminantes adsorvidos à superfície da platina e a oxidação da sua superfície.

Na figura 1 estão apresentados os resultados relativos à caracterização da actividade do AG com base na resposta a ataques oxidativos extensivos conduzidos a potenciais diferentes, 1,1 V, 1,3 V, 1,6 V e 2,0 V, realizados à temperatura de 20°C. A monitorização foi efectuada a partir da intensidade de corrente de pico, I_p, dos voltamogramas obtidos em VD, entre 0 e 1,4 V, à velocidade de varrimento de 100 mV s⁻¹. Os valores de I_p/I_p⁰ (onde I_p⁰ é a intensidade de corrente de pico obtida para t = 0) estão representados em função do tempo da electrólise. As curvas apresentadas correspondem ao ajuste

dos resultados por uma função exponencial, tendo-se obtido para os potenciais inferiores a 1,6 V $I_p/I_p^0 = 1,0e^{-9,4 \times 10^{-2} t}$, $r = 0,997$, enquanto que para o potencial de 2,0 V a equação determinada foi $I_p/I_p^0 = 1,0e^{-1,4 \times 10^{-1} t}$, $r = 0,998$. Obtendo-se valores de $p^{AG} = 9,4 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ para aos ensaios realizados a potenciais inferiores a 1,6 V e de $p^{AG} = 1,4 \times 10^{-1} \text{ min}^{-1}$ para os realizados ao potencial de 2 V. As duas curvas ilustram a ocorrência de dois regimes de oxidação diferentes. A variação de concentração observada para os potenciais mais baixos é independente do potencial e corresponde à oxidação através de transferência electrónica directa. Em oposição, a 2,0 V a oxidação do AG é mais eficiente, envolvendo a acção de radicais hidroxilo gerados por oxidação da água.

Na figura 2 encontram-se representadas as cargas obtidas através da integração das curvas I vs t obtidas em CD relativamente a ataques oxidativos realizados a diferentes potenciais. A carga Q_∞ corresponde à quantidade de carga obtida por extrapolação da curva I vs t para um tempo infinito. A carga Q_t corresponde à quantidade de carga obtida por integração da curva I vs t para um tempo de 5 minutos. Este tempo foi estabelecido com base na conversão de 50% do quinol quando a sua oxidação foi efectuada em condições de controlo por difusão.

Na figura 2 encontram-se os valores de Q_∞ e Q_t relativos ao ácido gálico, AG, e ao ácido ferúlico, AF à temperatura de 20 °C. A partir da análise dos resultados do AG, verifica-se que Q_∞ e Q_t aumentam com o potencial.

Braga, 18 de Novembro de 2010

Reivindicações

1. Método para a determinação da actividade/capacidade antioxidante de espécies químicas através da avaliação da resposta a um ataque oxidativo extensivo conduzido a potencial constante caracterizado pelos seguintes passos:

- a. Colocar a solução de amostra em contacto com o dispositivo composto por um ânodo/fonte de radicais/detector cronoamperométrico (A/RS/CD), um detector voltamétrico de antioxidantes (VD) e um eléctrodo de referência (RE);
- b. Ligar o dispositivo a um eléctrodo secundário (SE);
- c. Polarizar o A/RS/CD através de um potenciostato ao potencial seleccionado;
- d. Caracterizar a actividade dos oxidantes através da monitorização de I vs t em CD e/ou do consumo de antioxidante em VD.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a monitorização da reacção de oxidação do antioxidante poder ser efectuada através da monitorização do consumo do antioxidante.

3. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a avaliação da reacção de oxidação do antioxidante poder ser efectuada através da monitorização da intensidade de corrente gerada em CD.

4. Método de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por a monitorização do antioxidante consistir na quantificação através do detector voltamétrico (VD) ou qualquer outro

sistema analítico para obtenção de um sinal eléctrico directamente proporcional à concentração do antioxidante.

5. Método de acordo com a combinação das reivindicações 2 e 3, caracterizado por efectuar-se a monitorização da concentração do antioxidante e da intensidade de corrente gerada em CD.

6. Método de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado por a quantificação dos parâmetros que descrevem a resposta do antioxidante ao ataque oxidativo extensivo ser obtida a partir da análise:

- a. do decréscimo da concentração de antioxidante expresso pela razão das intensidades de corrente de pico I_p/I_p^0 obtidas na detecção voltamétrica;
- b. ou da forma da curva I vs t;
- c. ou por combinação das alíneas anteriores.

7. Método de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por a expressão da actividade antioxidante relativa, face a um antioxidante de referência, ser avaliada a partir da razão entre as cargas obtidas para electrólises conduzidas em soluções de igual concentração, realizadas ao mesmo potencial Q_∞^{AO} , $Q_\infty^{AO, ref}$ ou $Q_t^{AO}/(Q_t/Q_\infty)^{AO, ref}$.

8. Método de acordo com as reivindicações anteriores caracterizado por a expressão da actividade antioxidante ser baseada num dos seguintes parâmetros obtidos a partir de electrólises realizadas ao mesmo potencial:

- a. quantidade total de carga a tempo infinito, Q_∞ ;

- b. quantidade total de carga a tempo fixo, Q_t ;
- c. quantidade de carga a tempo infinito por mole de antioxidante $Q_\infty / ([AO]V)$;
- d. quantidade de carga a tempo fixo por mole de antioxidante $Q_t / ([AO]V)$;
- e. estequiometria aparente da reacção n_{ap} .

9. Método de acordo com as reivindicações anteriores, caracterizado por a expressão da capacidade antioxidante de amostras compreendendo diversos antioxidantes, ser baseada na quantificação de qualquer um dos seguintes parâmetros:

- a. quantidade total de carga a tempo infinito por unidade de volume de amostra, Q_∞/V ;
- b. quantidade total de carga a tempo fixo por unidade de volume de amostra, Q_t/V .

10. Dispositivo para a determinação da actividade/capacidade antioxidante de espécies químicas através da resposta ao ataque oxidativo extensivo conduzido numa electrólise a potencial constante conforme descrito na reivindicação 1 caracterizado por compreender três eléctrodos:

- a. Um eléctrodo como ânodo (A), fonte de radicais (RS) por polarização anódica via potenciostática que pode funcionar simultaneamente como detector cronoamperométrico (CD),
- b. Um detector voltamétrico (VD),
- c. Um eléctrodo de referência (RE).

11. Dispositivo de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado por utilizar os eléctrodos A/RS/CD e RE

quando se utiliza outro sistema analítico em substituição de VD.

12. Dispositivo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por A/RS/CD ser constituído por metais (como a platina ou o ouro), óxidos de metais (como o óxido de irídio ou o óxido de chumbo) ou materiais dopados (como o óxido de estanho dopado com antimónio ou o diamante dopado com boro) ou misturas destes, que podem ser depositados em camadas ou na forma de nanopartículas sobre uma matriz condutora, expostos directamente à solução ou revestidos com filmes poliméricos como o Nafion.
13. Dispositivo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por VD ser composto por carbono ou BDD, ou outros.
14. Dispositivo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado por RE ser um eléctrodo de referência como o Ag/AgCl ou o Hg/Hg₂Cl₂, entre outros.
15. Equipamento para a determinação da actividade/ capacidade antioxidante de espécies químicas conforme descrito na reivindicação 1, caracterizado por compreender o dispositivo, um eléctrodo secundário e um circuito electrónico capaz de aplicar um sinal de potencial entre - 5 Volts e 5 Volts, e medir intensidades de corrente entre 1 picoampere e 1 Ampere.
16. Utilização do método e respectivo dispositivo, conforme descrito nas reivindicações 1 a 15, caracterizado por medir a resposta de substâncias com potencial actividade

antioxidante a um ataque oxidativo extensivo conduzido a potencial constante.

17.Utilização do método e respectivo dispositivo, de acordo com a reivindicação anterior caracterizado por medir a capacidade antioxidante (actividade e extensão da resposta a um ataque oxidativo extensivo) de misturas de antioxidantes em diferentes amostras, incluindo bebidas, alimentos líquidos, extractos de alimentos, cosméticos, medicamentos e fluidos biológicos, como saliva, lágrimas, urina ou sangue.

Braga, 18 de Novembro de 2010

Desenhos

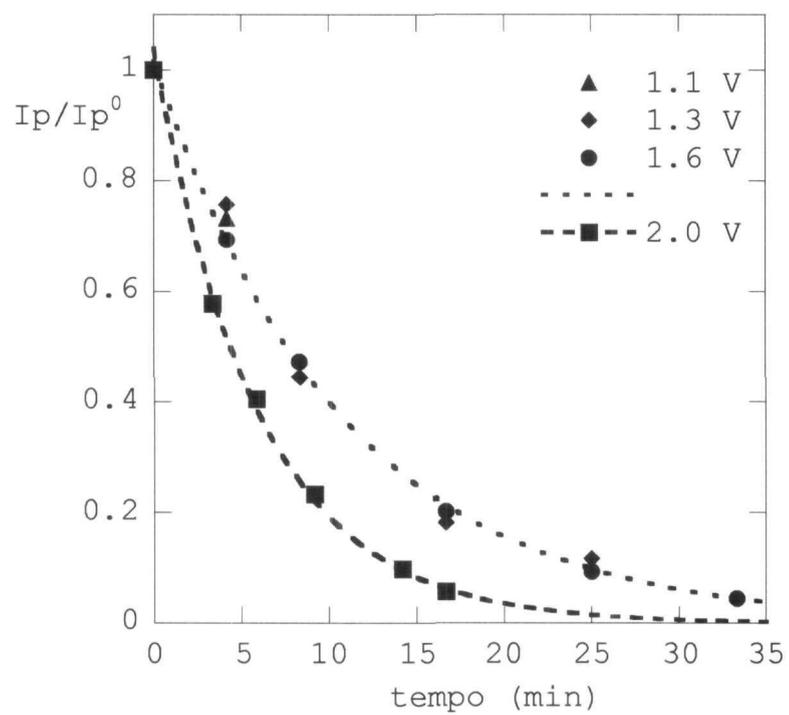


Figura 1

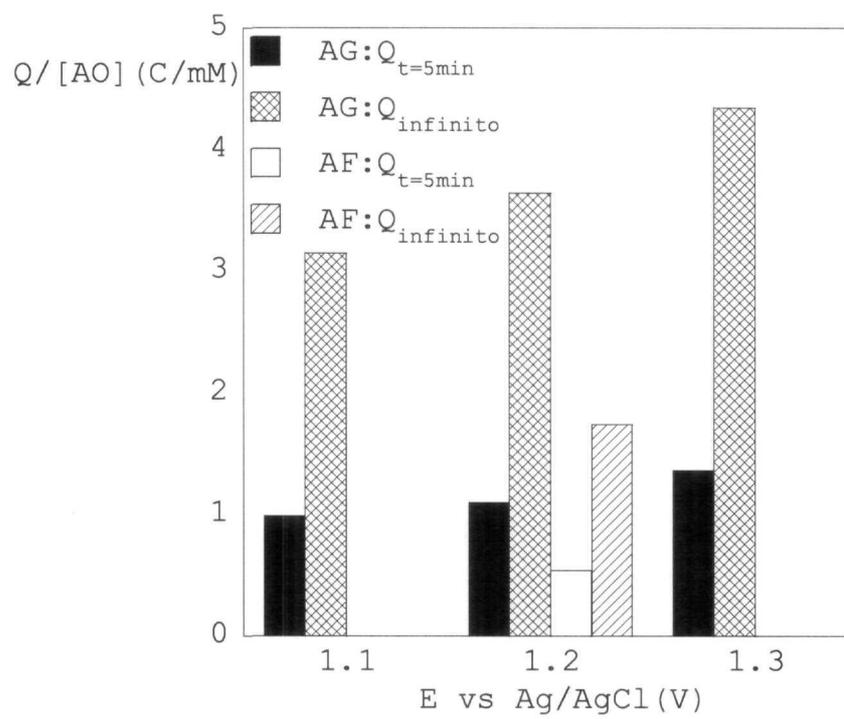


Figura 2