

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS- GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DANILO BRAGA RIBEIRO

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE CHÁS E  
FONTES COMERCIAIS DE VITAMINA C, UTILIZANDO UM BIOSSENSOR  
ENZIMÁTICO

São Luís

2020

DANILO BRAGA RIBEIRO

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE CHÁS E  
FONTES COMERCIAIS DE VITAMINA C, UTILIZANDO UM BIOSSENSOR  
ENZIMÁTICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal do Maranhão, para a  
obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gilvanda Silva Nunes

São Luís

2020

Danilo Braga Ribeiro

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE AMOSTRAS DE CHÁS E  
FONTES COMERCIAIS DE VITAMINA C, UTILIZANDO UM BIOSENSOR  
ENZIMÁTICO

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal do Maranhão, para a  
obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Gilvanda Silva Nunes

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Gilvanda Silva Nunes

Orientador-DETQI-UFMA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Clécia Santos de Alcântara

DEQUI-UFMA

---

Prof. Dr. Paulo Cesár Mendes Villis  
MMA-UNICEUMA

## RESUMO

Radicais livres são espécies químicas que apresentam alta reatividade por terem em sua estrutura um elétron de valência desemparelhado e, por consequência, um tempo de meia vida geralmente muito curto, sendo considerados potentes agentes oxidantes. Antioxidantes são compostos sintéticos ou naturais capazes de prevenir ou retardar o dano oxidativo causado por essas espécies químicas. No presente trabalho, empregou-se um biossensor amperométrico para determinação de atividade antioxidante de chás e fontes comerciais de vitamina C. A determinação do potencial antioxidante foi baseada na monitoração *online* do peróxido de hidrogênio formado durante a reação de oxidação de hipoxantina a ácido úrico, catalisada pela enzima xantina oxidase (XOD). Foi empregado um sensor composto de três eletrodos, tendo sido avaliado o desempenho dos seguintes mediadores eletroquímicos: azul de meldola combinado com sal de Reineck (MBRS), azul da Prússia (PB) e ftalocianina de cobalto (CoPC). Outras condições operacionais, como o tempo de polimerização por ocasião da imobilização enzimática e o processo de agitação no decorrer das medidas cronoamperométricas, foram otimizadas. O mediador azul da Prússia demonstrou ser o mais eficiente e a fotopolimerização em PVA-AWP foi o procedimento de imobilização mais adequado. Após otimizado o biossensor, bem como os parâmetros operacionais, este mostrou-se estável por um período de 7 meses, apresentando limites de detecção e de quantificação, respectivamente, de 4,93 e 16,43  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . O sistema foi então empregado na determinação da capacidade antioxidante de chás comerciais e vitamina C efervescentes de diferentes marcas, tendo sido previamente definidos os procedimentos de preparo das amostras. Os chás de camomila e hortelã apresentaram cerca de 67% e 64 % de potencial antioxidante, respectivamente. Os testes com as pastilhas de Vitamina C evidenciaram que as formulações podem possuir capacidades antioxidante distintas, variando de 26 a 37 %, não obstante seus rótulos indiquem o mesmo teor do vitamina C.

Palavras chaves: antioxidantes; biossensor; xantina oxidase; chás; vitamina C.

## ABSTRACT

Free radicals are chemical species that show high reactivity because they have an unpaired valence electron in their structure and, consequently, a generally very short half-life, being considered potent oxidizing agents. Antioxidants are synthetic or natural compounds capable of preventing or delaying oxidative damage caused by these chemical species. In the present work, an amperometric biosensor was used to determine the antioxidant activity of teas and drugs available on the market. The determination of the antioxidant potential was based on the online monitoring of hydrogen peroxide formed during the oxidation reaction of hypoxanthine to uric acid, catalyzed by the enzyme xanthine oxidase (XOD). A three electrodes-based sensor was used, and the performance of the following electrochemical mediators was evaluated: meldonium blue combined with Reineck's salt (MBRS), Prussian blue (PB) and cobalt phthalocyanine (CoPC). Other operational conditions, such as the polymerization time in the enzymatic immobilization procedure and the agitation process during the chronoamperometric measurements, were analyzed. The PB mediator showed to be the most efficient and the photopolymerization in PVA-AWP was the most suitable immobilization process. After optimizing the biosensor, as well as the operational parameters, it proved to be stable for a period of 7 months, with detection and quantification limits of  $4.93 \mu\text{mol.L}^{-1}$  and  $16.43 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , respectively. The system was then used to determine the antioxidant capacity of commercial teas and effervescent vitamin C from different suppliers, with sample preparation procedures previously defined. Chamomile and mint teas showed to have about 67% and 64% of antioxidant potential, respectively. Tests with Vitamin C tablets showed that the formulations may have different antioxidant capacities, varying from 26 to 37%, although their labels indicate the same vitamin C content.

Key words: antioxidants; biosensors; xanthine oxidase; teas; vitamin C.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Equilíbrio entre compostos antioxidantes e as EROs.....  | 13 |
| <b>Figura 2</b> - Esquema de equações químicas envolvidas nos testes colorimétricos DPPH e ABTS .....  | 17 |
| <b>Figura 3</b> - Esquema de equação química envolvida na medida da capacidade de sequestro do radical superóxido pelo método NBT .....  | 18 |
| <b>Figura 4</b> - Configuração de um biossensor, mostrando a organização dos seus componentes funcionais.....  | 19 |
| <b>Figura 5</b> - Esquema dos principais tipos de imobilização. A) adsorção B) encapsulamento/aprisionamento C) Ligação covalente (LC) D) LC cruzada .....   | 20 |
| <b>Figura 6</b> - Representação de um sistema mediado, onde Mx e Ex representam mediador e enzima, respectivamente.....  | 21 |
| <b>Figura 7</b> - Sensor eletroquímico baseado em um sistema convencional serigrafado contendo três eletrodos .....  | 24 |
| <b>Figura 8</b> - Voltamograma cíclico do sensor de pasta de grafite sem modificação em tampão K-PBS pH 7,5, com velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> .....  | 30 |
| <b>Figura 9</b> - Voltamograma cíclico do sensor de pasta de grafite modificado com uma camada (1X) de MBRS em tampão K-PBS pH 7,5, com velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> .....   | 31 |
| <b>Figura 10</b> - Voltamograma cíclico do sensor de pasta de grafite modificado com duas camada (2X) de MBRS em tampão K-PBS pH 7,5 ,com velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> .....   | 31 |
| <b>Figura 11</b> - Voltamograma cíclico do sensor de pasta de grafite modificado com CoPC em tampão K-PBS pH 7,5 ,com velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> .....   | 32 |
| <b>Figura 12</b> - Voltamograma cíclico do sensor de pasta de grafite modificado com PB em tampão K-PBS pH 7,5 ,com velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> .....   | 33 |
| <b>Figura 13</b> - Estrutura cristalográfica (monómero) de uma xantina oxidase bovina. ...   | 34 |
| <b>Figura 14</b> - Voltamograma cíclico do biossensor à base da enzima XOD, tendo como eletrodo de trabalho pasta de grafite sem modificação em tampão K-PBS pH 7,5 ,com velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> .....          | 35 |
| <b>Figura 15</b> - Voltamograma cíclico do biossensor à base da enzima XOD, tendo como eletrodo de trabalho pasta de grafite modificado com MBRS (1X) em tampão K-PBS pH 7,5 ,com velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> ..... | 36 |
| <b>Figura 16</b> - Voltamograma cíclico do biossensor à base da enzima XOD, tendo como eletrodo de trabalho pasta de grafite modificado com MBRS (2X) em tampão K-PBS pH 7,5, com velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> ..... | 36 |
| <b>Figura 17</b> - Voltamograma cíclico do biossensor à base da enzima XOD, tendo como eletrodo de trabalho a pasta de grafite modificado com CoPC em tampão K-PBS pH 7,5 ,com velocidade de varredura de 50 mV s <sup>-1</sup> .....    | 37 |
| <b>Figura 18</b> - Voltamograma cíclico do biossensor à base da enzima XOD, tendo como eletrodo de trabalho pasta de grafite modificado com PB em tampão K-PBS pH 7,5, com velocidade de varredura de 50 mV.s <sup>-1</sup> .....        | 38 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 19</b> - Efeito do pH sobre o comportamento eletroquímico do biossensor à base da enzima XOD modificado com MBRS em tampão K-PBS .....   | 40 |
| <b>Figura 20</b> - Efeito do pH sobre o comportamento eletroquímico do biossensor à base da enzima XOD modificado com PB em tampão K-PBS com diferentes pHs .....  | 41 |
| <b>Figura 21</b> - Esquema de funcionamento do biossensor proposto.....  | 42 |
| <b>Figura 22</b> - Resposta do biossensor amperométrico com adição sucessiva de HX, tendo o MBRS (1X) como mediador e 8 mU (A) e 15 um (B) de carga enzimática imobilizada. ....   | 44 |
| <b>Figura 23</b> - Resposta do biossensor amperométrico com adição sucessiva de HX, tendo o MBRS (1X) como mediador e 8 mU de carga enzimática imobilizada, em diferentes potenciais de trabalho.....  | 45 |
| <b>Figura 24</b> - Resposta do sensor, sem e com o MBRS (1X) como mediador e 5 mU de carga enzimática livre e potencial de trabalho de -180 mV vs. Ag/AgCl. ....   | 46 |
| <b>Figura 25</b> - Resposta do biossensor amperométrico com a adição sucessiva de HX sob agitação constante de 300 rpm, tendo o PB como mediador e 8 mU de carga enzimática imobilizada, com tempos de polimerização diferentes. E = -100 mV ..... | 47 |
| <b>Figura 26</b> - Curva analítica do biossensor amperométrico modificado com PB e tempo de polimerização de 60 min.....   | 48 |
| <b>Figura 27</b> - Resposta do biossensor amperométrico com a adição sucessiva de HX sob agitação controlada, tendo o PB como mediador e 8 mU de carga enzimática imobilizada, com tempos de polimerização diferentes. E = -100 mV .....           | 49 |
| <b>Figura 28</b> - Resposta do biossensor amperométrico com a adição sucessiva de HX sob agitação controlada, com tempos de polimerização de 60 min, agitação 30 s, repouso 15 s, aferição da corrente 60 s. E = -100 mV .....                     | 50 |
| <b>Figura 29</b> - Curva analítica do biossensor. Condição: agitação 30 s, repouso 15, aferição da corrente 60s.....   | 50 |
| <b>Figura 30</b> - Intensidade da corrente gerada no sistema biossensor, em função das concentrações de HX e do ácido gálico .....   | 52 |
| <b>Figura 31</b> - Capacidade antioxidante do ácido gálico, em função da sua concentração, determinada pelo sistema biossensor.....  | 53 |
| <b>Figura 32</b> - Efeito antioxidante dos chás comerciais: resposta do biossensor amperométrico em função de sucessivas adições do substrato hipoxantina (HX), na ausência e na presença das infusões dos chás .....                              | 54 |
| <b>Figura 33</b> - Capacidade antioxidante dos chás avaliados pelo biossensor desenvolvido .....   | 55 |
| <b>Figura 34</b> - Curvas analíticas construídas na presença de diferentes concentrações de ácido ascórbico puro .....   | 57 |
| <b>Figura 35</b> - Curva de sensibilidade em função de diferentes concentrações de ácido ascórbico.....  | 58 |
| <b>Figura 36</b> - Capacidade antioxidante de Vitamina C efervescente (marca 1) em diferentes concentrações .....  | 59 |
| <b>Figura 37</b> - Capacidade antioxidante das três formulações comerciais de Vitamina C efervescentes.....  | 60 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 38</b> - Espectros de infravermelho de amostras de três formulações comerciais de Vitamina C efervescentes. Faixa espectral: 500 a 4000 cm, com resolução de 4 cm, utilizando meio espectral de 40 varreduras em brometo de potássio ..... | 61 |
| <b>Figura 39</b> - Carta de controle estatístico para monitoramento da estabilidade do biossensor. ....  | 62 |



## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> - Parâmetros voltamétricos extraídos dos voltamogramas dos sensores e biossensores ..... | 39 |
| <b>Tabela 2</b> - Eficiência analítica do biossensor, expressa em sensibilidade e linearidade .....      | 48 |
| <b>Tabela 3</b> - Eficiência do biossensor, expressa em sensibilidade e linearidade.....                 | 51 |
| <b>Tabela 4</b> - Parâmetros analíticos e condições operacionais do biossensor.....                      | 63 |

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | 11 |
| <b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>  | 13 |
| 2.1 Antioxidantes  | 13 |
| 2.2 Métodos Espectroscópicos para Determinação de Atividade Antioxidante | 14 |
| 2.2.1 Método ABTS  | 15 |
| 2.3.2 Método DPPH  | 16 |
| 2.2.3 Método NBT   | 16 |
| 2.3 Biossensores   | 18 |
| 2.4 Mediadores Eletroquímicos  | 21 |
| <b>3. OBJETIVOS</b>  | 22 |
| 3.1 Geral  | 22 |
| 3.2 Específicos  | 22 |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>  | 23 |
| 4.1 Reagentes e Soluções   | 23 |
| 4.2 Equipamentos   | 23 |
| 4.3 Preparo do Sensor Serigrafado  | 24 |
| 4.4 Imobilização Enzimática e Otimização                                 | 25 |
| 4.5 Caracterização Eletroquímica dos Sensores e Biossensores Modificados | 25 |
| 4.6 Princípio do Biossensor e Medidas Amperométricas                     | 26 |
| 4.7 Análises de Amostras Reais   | 27 |
| 4.8 Estabilidades do Biossensor  | 27 |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>   | 29 |
| 5.1 Comparação dos Desempenhos dos Mediadores Eletroquímicos             | 29 |
| 5.4 Funcionamento do Biossensor e Otimização de Parâmetros               | 41 |
| 5.5 Determinações da Capacidade Antioxidantes de Amostras Comerciais     | 51 |
| 5.5.1 Amostras de chás   | 51 |
| 5.5.2 Amostras de Vit. C efervescentes                                   | 56 |
| 5.6 Estabilidades do Biossensor  | 62 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>  | 64 |
| <b>REFERÊNCIAS</b>   | 65 |