

UFAL

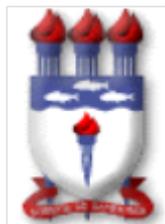
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

ANA CAROLINE FERREIRA SANTOS

**TIÓIS DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA: ELETROANÁLISE EM DIFERENTES
SUPERFÍCIES ELETRÓDICAS E UTILIZAÇÃO DE POLÍMEROS
MOLECULARMENTE IMPRESSOS MAGNÉTICOS PARA SEPARAÇÃO E AVALIAÇÃO DE
GLUTATIONA**

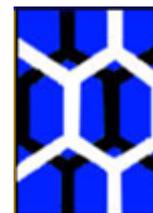
Universidade Federal de Alagoas

**Campus A. C. Simões
Tabuleiro do Martins
57072-970 - Maceió-AL**



UFAL

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA**



IQB

ANA CAROLINE FERREIRA SANTOS

**TIÓIS DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA: ELETROANÁLISE EM DIFERENTES
SUPERFÍCIES ELETRÓDICAS E UTILIZAÇÃO DE POLÍMEROS
MOLECULARMENTE IMPRESSOS MAGNÉTICOS PARA SEPARAÇÃO E
AVALIAÇÃO DE GLUTATIONA**

Maceió – AL

2018

ANA CAROLINE FERREIRA SANTOS

**TIÓIS DE IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA: ELETROANÁLISE EM DIFERENTES
SUPERFÍCIES ELETRÓDICAS E UTILIZAÇÃO DE POLÍMEROS
MOLECULARMENTE IMPRESSOS MAGNÉTICOS PARA SEPARAÇÃO E
AVALIAÇÃO DE GLUTATIONA**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência.

Orientador: Prof.^a Dr.^a **Marília O. F. Goulart**
Coorientador: Prof. Dr. **Flavio Santos Damos**

Maceió – AL

2018

Catlogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante

S194t Santos, Ana Caroline Ferreira.

Tióis de importância biológica: eletroanálise em diferentes superfícies eletródicas e utilização de polímeros molecularmente impressos magnéticos para a separação e avaliação de glutatona / Ana Caroline Ferreira Santos . – 2018.

122 f. : grafs., tabs.

Orientadora: Marília Oliveira Fonseca Goulart.

Co-orientador: Flávio Santos Damos.

Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2018.

Bibliografia: 113-122

1. Biotiós. 2. Glutatona. 3. Ácido lipoico. 4. N-acetilcisteína. 5. Polímeros impressos. I. Título.

CDU: 543.552



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA

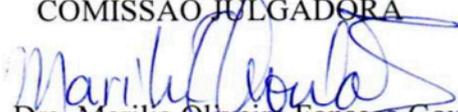


BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

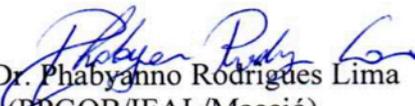
FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **Ana Caroline Ferreira Santos** intitulada: **“Tióis de importância biológica: eletroanálise em diferentes superfícies eletródicas e utilização de polímeros molecularmente impressos magnéticos para separação e avaliação de glutatona”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 09 de março de 2018, às 14h, no Auditório do LCCV/UFAL.

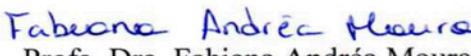
COMISSÃO JULGADORA


Profa. Dra. Marília Oliveira Fonseca Goulart
(Orientadora - PPGQB/UFAL)


Prof. Dr. Flávio dos Santos Damos
(Coorientador – UFMA/São Luís/MA)


Prof. Dr. Phabynno Rodrigues Lima
(PPGQB/UFAL/Maceió)


Profa. Dra. Daniela Santos Anunciação
(PPGQB/UFAL)


Profa. Dra. Fabiana Andréa Moura
(FANUT/UFAL)


Profa. Dra. Maria del Pilar Taboada-Sotomayor
(UNESP/Araraquara)


Prof. Dr. Cleylton Bezerra Lopes
(UFAL/Maceió)

- ♥ Aos meus pais, Antonio Luis e Rosenir de Maria
- ♥ À minha avó paterna Raimunda Santos (*in memorian*)
- ♥ À minha avó materna Raimunda Ferreira (*in memorian*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre proteger e iluminar o meu caminho a cada conquista.

A minha família, pelo amor e incentivo oferecido por toda a minha vida pessoal e acadêmica.

Ao meu noivo Sidney, por todo amor, paciência e apoio em todas as etapas e escolhas da vida.

À Prof^a. Dr^a. Marília Oliveira Fonseca Goulart, meu especial agradecimento não só apenas pela orientação, mas, também pela amizade, paciência, disponibilidade e por nunca ter medido esforços para tornar esse trabalho possível.

Aos professores Dr. Flavio Damos e a Prof. Dr^a. Rita de Cassia, meu especial agradecimento pela coorientação, por toda disponibilidade e por todos os ensinamentos para meu crescimento intelectual.

A Professora Dr^a. Maria del Pilar pelos ensinamentos e receptividade no seu laboratório (UNESP).

Aos professores Lauro Kubota, Auro Tanaka e Fabiane Moura pelas valiosas sugestões e contribuições no decorrer do trabalho.

À Universidade Federal de Alagoas pelo amparo e aos professores que, durante o curso, proporcionaram crescimento intelectual, profissional e pessoal.

A todos meus professores da Universidade Federal do Maranhão, pelos conhecimentos transmitidos e por muito ter contribuído para minha formação profissional.

A todos os amigos e colegas do laboratório de Eletroquímica –UFAL.

Aos amigos do Laboratório de Eletroquímica da UFMA por todos os ensinamentos compartilhados e pelos momentos de descontração.

Ao grupo de eletroanalítica de Araraquara (GEAr) pelo aprendizado, pelas colaborações e por terem me recebido de braços abertos;

Ao Prof. Romeu Cardosa Rocha Filho, pela preparação e gentil doação do eletrodo de diamante dopado com boro;

A CAPES pela bolsa concedida.

Aos órgãos financiadores CNPQ, CAPES, FAPEAL e INCT-Bioanalítica, pelo apoio financeiro.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

RESUMO

Tióis de relevância biológica (biotióis), os mais importantes antioxidantes endógenos sistêmicos e intracelulares, apresentam funções essenciais na proteção contra o dano oxidativo, causa bioquímica de uma série de doenças. Na classe, são incluídas proteínas com resíduos de cisteína e compostos sulfurados de baixa massa molecular. Devido à importância ambiental, bioquímica, química e farmacológica dos tióis e dissulfetos, sua determinação acurada tem ganhado atenção significativa na comunidade analítica. A detecção eletroquímica destes oferece vantagens analíticas. O presente trabalho tem como objetivos o desenvolvimento de estratégias eletroanalíticas para a determinação de vários biotióis, juntamente com a aplicação de técnicas seletivas baseadas em polímeros molecularmente impressos para a separação e quantificação de um dos mais importantes biotióis, a glutathiona reduzida (GSH). Um método eletroquímico simples e sensível, baseado em voltametria cíclica (VC) e de pulso diferencial (VPD), para a determinação da *N*-acetilcisteína (NAC) e glutathiona reduzida (GSH), em eletrodo de carbono vítreo (ECV), foi desenvolvido, com base na reatividade química entre tióis e dissulfetos, no caso, o dissulfeto ácido lipoico (LipS₂). Os resultados indicaram que a presença de LipS₂, em solução, em ECV, facilitou a oxidação eletroquímica de tióis: NAC, GSH, cisteína (Cys) e homocisteína (HCys), com um aumento substancial da corrente, no potencial da oxidação de LipS₂, em pH neutro. O LipS₂ desempenha um importante papel como mediador redox, em solução, sendo regenerado, após oxidação e captura de elétrons dos tiolatos analisados. Em condições otimizadas, empregando VPD, as curvas analíticas para NAC e GSH foram obtidas no intervalo de 1 a 10 μmol L⁻¹ e 1 até 60 μmol L⁻¹, respectivamente. A quantificação foi realizada com alta sensibilidade, reprodutibilidade e limite de detecção (LD) submicro de 0,27 e 0,67 μmol L⁻¹ para NAC e GSH, respectivamente. O método adição de padrão foi aplicado com sucesso na determinação de NAC e GSH em amostras de saliva artificial e urina humana, com excelentes resultados de recuperação. O desempenho analítico do método foi, também, avaliado usando um eletrodo de diamante dopado com boro (DDB), para a determinação de NAC. As figuras de mérito analíticas para NAC revelaram um intervalo de 1 a 100 μmol L⁻¹ e LD em nível nanomolar (93 nmol L⁻¹). O método foi aplicado com sucesso para quantificar NAC em preparações farmacêuticas (cápsulas, xarope e em suspensão), sem efeitos de matriz. O presente estudo evidenciou que a reação homogênea redox entre os tiolatos estudados e o LipS₂, em dois eletrodos não modificados, constitui uma ferramenta analítica promissora, hábil para quantificar tióis de maneira simples, rápida, conveniente, sensível, de baixo custo e fácil preparação. Polímeros magnéticos molecularmente impressos (MMIP) são ferramentas analíticas eficientes, hábeis em realizar detecção e separação de analitos, em amostras complexas. Nesse trabalho, o analito utilizado foi GSH. A síntese do MMIP foi realizada por termopolimerização e fotopolimerização, variando o monômero funcional (alilamina e acrilamida). O MNIP foi sintetizado de maneira semelhante sem a presença de GSH. O MMIP foi lavado, para remoção da molécula impressa (GSH). Os MMIPs e MNIPs foram avaliados por espectrofotometria UV/Vis. Os materiais sintetizados foram caracterizados fisicamente, com diferença significativa entre o MMIPs e MNIPs, indicativas de ligações específicas no MMIPs, sendo material promissor para captura e detecção de GSH.

Palavras-chave: Glutathiona. Ácido lipoico. *N*-acetilcisteína. Polímeros impressos magnéticos.

ABSTRACT

Biologically relevant thiols (biothiols), the most important systemic and intracellular endogenous antioxidants, play essential roles in the protection against oxidative damage, cause of several diseases. They include proteins with reduced cysteine residues and low-molecular weight (LMW) sulfur compounds. As the result of environmental, biochemical, clinical, and pharmacological importance of the thiols and disulfides, an accurate determination has gained significant attention within the analytical community. Electrochemical detection offers advantages in terms of analytical methods. The present work aims to develop electroanalytical strategies for determination of several biothiols, together with a selective approach based on molecular imprinted polymer for the separation and quantification of one of the most important biothiols, reduced glutathione (GSH). A simple and sensitive electrochemical method for the determination of *N*-acetyl-cysteine (NAC) and reduced glutathione (GSH), on glassy carbon electrode (GCE), using cyclic (CV) and differential pulse (DPV) voltammetries, was developed, based on the chemical reactivity between sulfides and disulfides, especially the lipoic acid (LipS₂). The results indicate that lipoic acid (LipS₂) can facilitate the electrochemical oxidation of thiolates, in a neutral pH, with a substantial increase in the anodic current, for the oxidation of NAC, GSH, cysteine (Cys) and homocysteine (HCys). LipS₂ plays an important role as a redox mediator, in solution, being regenerated, at the electrode surface, after oxidation and electron capture from the thiolates. Under optimized conditions, by DPV, the analytical parameters for NAC and GSH were obtained in the range of 1 up to 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 1 up to 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The quantification was performed with high sensitivity, reproducibility and submicro detection limit (LOD) of 0.27 and 0.67 $\mu\text{mol L}^{-1}$ for NAC and GSH, respectively. The standard addition method was successfully applied to the determination of NAC and GSH, in artificial saliva and human urine samples, with excellent recovery results. The sensitivity of the method was also evaluated using a boron doped diamond electrode (BDDE) for the determination of NAC. Several analytical parameters were obtained for NAC, in the interval of 1 up to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and nanomolar LOD of 93 nmol L^{-1} . The method was successfully applied to the quantification of NAC in pharmaceutical preparations (capsules, syrup and suspension), without matrix effects. The present study shows that the redox reaction between the studied thiolates and LipS₂, in BDDE, is a promising analytical tool, which can be used for quantifying NAC in a simple, rapid, convenient, sensitive and low-cost way, for both unmodified electrodes. Magnetic Molecularly Imprinted Polymers (MMIP) are efficient analytical tools with high potential for detecting and separating analytes in complex matrices. In this work, the analyte used was GSH. Thus, the polymer synthesis for GSH identification was performed by thermopolymerization and photopolymerization, by varying the functional monomer (allylamine and acrylamide). MNIP was similarly synthesized, in the absence of GSH. MMIP was washed for removal of the imprinted molecule (GSH). The technique of analysis for the evaluation of MMIPs and MNIPs was UV/Vis spectrophotometry. The synthesized materials were physically characterized, with a significant difference between MMIPs and MNIPs, indicating that in MMIPs, a specific binding occurs, showing this device to be a promising material for GSH detection and separation.

Keywords: Glutathione. Lipoic acid. *N*-Acetylcysteine. Magnetic imprinted polymers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Uma visão integrada e simplificada dos estresses oxidativo, nitrosativo e carbonílico: agentes, causas e consequências.....	23
Figura 2 -	A química redox de tióis e tiolatos: oxidação via um, dois ou mais elétrons de tióis. Reatividade frente a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Geração de uma série de grupos funcionais orgânicos de enxofre.....	27
Figura 3 -	Estrutura molecular da NAC.....	28
Figura 4 -	Estrutura molecular do LipS ₂	30
Figura 5 -	Estruturas molecular da (a) GSH e (b) GSSG.....	32
Figura 6 -	Estrutura molecular da HCys.....	33
Figura 7 -	Reação do DNTB (reagente de Ellman) na presença de tióis.....	34
Figura 8 -	Esquema ilustrativo das etapas envolvidas na síntese de polímeros com impressão molecular.....	38
Figura 9 -	Esquema ilustrativo das etapas envolvidas na síntese de polímeros magnéticos com impressão molecular.....	39
Figura 10 -	Fluxograma representando as etapas das eletroanálises dos tióis.....	42
Figura 11 -	Fluxograma representando as etapas para a obtenção e avaliação dos MMIPs e MNIPs.....	43
Figura 12 -	Voltamogramas cíclicos registrados em eletrodo CV, tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7, registrados na ausência de analito (branco), na presença de NAC (500 μmol L ⁻¹), na presença de LipS ₂ (500 μmol L ⁻¹), com ambos os analitos, LipS ₂ (500 μmol L ⁻¹) + NAC (500 μmol L ⁻¹) e NAC (500 μmol L ⁻¹) + LipS ₂ (500 μmol L ⁻¹).....	51
Figura 13 -	Voltamogramas cíclicos da oxidação de LipS ₂ registrados sobre o eletrodo de CV, em diferentes velocidades de varredura do potencial, contendo 500 μmol L ⁻¹ de LipS ₂ , em 0,1 mol L ⁻¹ de tampão fosfato pH 7.....	52
Figura 14 -	Gráfico da dependência de <i>I</i> _{pa} com (v) ^{1/2}	53

Figura 15 -	Voltamogramas cíclicos da oxidação de LipS ₂ + NAC registrados sobre o eletrodo CV, em diferentes velocidades de varredura do potencial, com 500 μmol L ⁻¹ de LipS ₂ + 500 μmol L ⁻¹ de NAC, em 0,1 mol L ⁻¹ de tampão fosfato pH 7.....	54
Figura 16 -	Gráfico de $I_{pa}/v^{1/2}$ vs. v para a oxidação de LipS ₂ na presença de NAC....	54
Figura 17 -	Gráfico da dependência de I_{pa} com $(v)^{1/2}$ para a oxidação de LipS ₂ na presença de NAC.....	55
Figura 18 -	Os voltamogramas cíclicos registrados no eletrodo CV, em tampão Fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes tióis: (a) branco, GSH, LIPS ₂ , e LIPS ₂ +GSH (1:1); (b) branco, HCys, LIPS ₂ , LIPS ₂ + HCys (1:1); (c) branco, Cys, LIPS ₂ , LIPS ₂ + Cys(1:1); (d) branco, GSSG, LIPS ₂ , e LIPS ₂ + GSSG (1:1). Todos os analitos com concentração de 500 μmol L ⁻¹	56
Figura 19 -	Os voltamogramas cíclicos no eletrodo CV, em tampão Fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes tióis: (a) branco, Metilbenzenotiol, LIPS ₂ , e LIPS ₂ + Metilbenzenotiol (1: 1); (b) branco, Metoxitiofenol, LIPS ₂ , LIPS ₂ + Metoxitiofenol (1: 1) Todos os analitos com concentração de 500 μmol L ⁻¹	58
Figura 20 -	Voltamogramas cíclicos registrados sobre o eletrodo CV em soluções tampão Britton Robinson de diferentes valores de pH: (a) pH 2, (b) pH 4, (c) pH 6, (d) pH 7, (e) pH 7,4, (f) pH 8, (g) pH 9 e (h) pH 10, $v=10 \text{ mV s}^{-1}$	59
Figura 21 -	Voltamogramas de varredura linear registrados sobre o eletrodo CV em soluções tampão Britton Robinson de diferentes valores de pH: 2; 4; 6; 7; 7,4; 8 e 10, contendo 250 μmol L ⁻¹ de cada analito: (a) GSH + LipS ₂ , (b) HCys + LipS ₂ , (c) Cys + LipS ₂ , $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	61
Figura 22 -	Voltamogramas de varredura linear registrados sobre o eletrodo CV em diferentes soluções tampão em pH 7,4 contendo 500 μmol L ⁻¹ de NAC + 500 μmol L ⁻¹ de LipS ₂ , $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	62
Figura 23 -	Voltamogramas de varredura linear registrados sobre o eletrodo de CV, em soluções tampão McIlvaine de diferentes concentrações, contendo 500 μmol L ⁻¹ de NAC + 500 μmol L ⁻¹ de LipS ₂ , pH 7,4, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$..	63

Figura 24 -	Voltamogramas cíclicos registrados sobre o eletrodo CV em diferentes temperaturas: 288,15 K; 298,15 K; 308,15 K; 318,15 K; 328,15 K; 338,15 K, tampão McIlvaine, pH 7,4 contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC + 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS ₂ , $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$	64
Figura 25 -	Voltamogramas cíclicos sobre o eletrodo CV, 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS ₂ , com a adição de diferentes concentrações de NAC, em tampão McIlvaine pH 7,4. Temperatura 55° C, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$. A inserção mostra a curva analítica.....	65
Figura 26 -	Relação entre $\ln k^0$ versus a velocidade de varredura para a oxidação NAC + LipS ₂ em solução tampão McIlvaine pH 7,4, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$	66
Figura 27 -	Voltamogramas de pulso diferencial para LIPS ₂ (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e NAC (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) registrados sobre eletrodo de CV, em diferentes velocidades de varredura de potencial, amplitude fixada em 50 mV. Solução tampão McIlvaine 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,4.....	67
Figura 28 -	Estudo da variação de <i>Ipa</i> em função ν	68
Figura 29 -	Voltamogramas de pulso diferencial para LIPS ₂ (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e NAC (500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) registrados sobre eletrodo de CV, em diferentes amplitudes e ν fixada em 10 mV, solução tampão McIlvaine 0,1 mol L ⁻¹ em pH 7,4.....	69
Figura 30 -	Estudo da variação de <i>Ipa</i> em função da amplitude.....	69
Figura 31 -	Voltamogramas de pulso diferencial para adições consecutivas de: NAC (1 a 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (b) GSH (1 a 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$); (c) HCys (1 a 86 $\mu\text{mol L}^{-1}$) pH 7,4 em solução tampão de McIlvaine 0,1 mol L ⁻¹ na presença de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS ₂	70
Figura 32 -	Voltamogramas cíclicos sobre o eletrodo de DDB registrados na ausência de analíto (branco), em soluções contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC, 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS ₂ e de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC e LipS ₂ (1:1) em 0,1 mol L ⁻¹ tampão fosfato, pH 7, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$	74
Figura 33 -	Voltamogramas cíclicos utilizando o eletrodo de DDB, em tampão Fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes tióis: (a) branco, GSH e LIPS ₂ +GSH (1: 1); (b) branco, HCys e LIPS ₂ +HCys (1: 1); (c) branco, Cys, LIPS ₂ + Cys. Todos os analitos com concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$	75

Figura 34 -	Voltamogramas cíclicos registrados sobre o eletrodo de DDB em soluções tampão Britton Robinson de diferentes valores de pH: (a) 2, (b) 4, (c) 6, (d) 7, (e) 7,4, (f) 8 e (g) 10, $v=10 \text{ mV s}^{-1}$	76
Figura 35 -	Voltamogramas de varredura linear registrados sobre o eletrodo de DDB em: (a) diferentes soluções tampão em pH 7,4, contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC + $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS ₂ ; (b) diferentes concentrações da solução tampão McIlvaine, em pH 7,4 contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC + $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS ₂ , $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$	78
Figura 36 -	Voltamogramas de pulso diferencial para adições consecutivas de NAC (concentração de NAC de 1 a $100 \mu\text{mol L}^{-1}$), pH 7,4 em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão McIlvaine, na presença de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ LipS ₂ . A inserção mostra a curva analítica para NAC.....	79
Figura 37 -	Valores de energia de ligação entre GSH com os 20 monômeros tabelados.....	84
Figura 38 -	Estrutura molecular dos dois monômeros funcionais escolhidos na síntese (a) Alilamina, (b) Acrilamida.....	85
Figura 39 -	Espectros de absorção na região UV-VIS para soluções com diferentes concentrações de GSH, em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato pH7.....	85
Figura 40 -	Espectros de absorção na região ultravioleta para as soluções de limpeza do MMIP (a) monômero alilamina (b) monômero acrilamida.....	86
Figura 41 -	Espectro na região do infravermelho para GSH.....	87
Figura 42 -	Espectro na região do infravermelho para alilamina e acrilamida.....	88
Figura 43 -	Espectro na região do infravermelho para o TRIM.....	90
Figura 44 -	Espectro na região do infravermelho para o MMIP e o MNIP usando o monômero funcional acrilamida.....	91
Figura 45 -	Espectro na região do infravermelho para o MMIP e o MNIP, a partir do monômero funcional alilamina.....	91
Figura 46 -	Espectro na região do infravermelho para o MMIP (acrilamida), MMIP (alilamina) e o TRIM.....	92
Figura 47 -	Curvas de histerese magnética para Fe ₃ O ₄ (magnetita); Fe ₃ O ₄ @TEOS; Fe ₃ O ₄ @MPS.....	93
Figura 48 -	Curvas de histerese magnética dos MMIPs e MNIPs para os monômeros funcionais acrilamida e alilamina.....	94

Figura 49 -	Imagens de MEV-FEG para as nanopartículas: a) magnetita; b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$; e c) $(\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C}=\text{C})$ com ampliação de 25.000 e 150.000 X.....	95
Figura 50 -	Imagens de MEV-FEG para MMIP (a) e o MNIP (b) usando o monômero acrilamida com ampliação de 5.000, 10.000 e 50.000 X.....	96
Figura 51 -	Imagens de MEV-FEG para MMIP (a) e o MNIP (b) usando o monômero alilamina com ampliação de 5.000, e 10.000 X.....	98
Figura 52 -	Estudo de ligação em entre GSH o polímero sintetizado com o monômero funcional acrilamida em água e proporções de metanol: 90, 70 e 50%.....	99
Figura 53 -	Estudo de ligação em entre GSH e o polímero sintetizado com o monômero funcional acrilamida em proporções de etanol: 90, 70 e 50%.	100
Figura 54 -	Estudo de ligação entre GSH e o polímero sintetizado com o monômero funcional alilamina em água e proporções de metanol: 90, 70 e 50%.....	101
Figura 55 -	Estudo de ligação em entre GSH o polímero sintetizado com o monômero funcional alilamina em de etanol: 90, 70 e 50%.....	102
Figura 56 -	Análise do tempo de interação entre GSH e os polímeros obtidos nas sínteses usando o monômero funcional acrilamida.....	103
Figura 57 -	Análise do tempo de interação entre GSH e os polímeros obtidos nas sínteses usando o monômero funcional alilamina.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise da variação de k^0 em função da temperatura.....	65
Tabela 2 -	Parâmetros termodinâmicos e cinéticos para a oxidação de NAC, em presença de LipS ₂	66
Tabela 3 -	Parâmetros analíticos obtidos para o NAC, GSH e HCys.....	71
Tabela 4 -	Avaliação da seletividade da interação LIPS ₂ +NAC em relação a possíveis interferentes.....	72
Tabela 5 -	Determinação de NAC em amostras artificiais de saliva e urina.....	73
Tabela 6 -	Determinação de GSH em amostras artificiais de saliva e urina.....	73
Tabela 7 -	Determinação de NAC em amostras de capsulas, xarope e suspensão de saliva.....	80
Tabela 8 -	Detecção eletroquímica de NAC, GSH, e HCys relatada na literatura.....	81
Tabela 9 -	Monômeros comumente usados na síntese de MMIPs e escolhidos para realizar as simulações computacionais.....	83
Tabela 10 -	Bandas dos espectros no infravermelho para GSH.....	88
Tabela 11 -	Bandas dos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) para o monômero funcional acrilamida com as respectivas atribuições. Dados extraídos da Figura 42...	89
Tabela 12 -	Bandas dos espectros de infravermelho (cm ⁻¹) para o monômero funcional alilamina com as respectivas atribuições. Dados extraídos da Figura 42.....	89
Tabela 13 -	Bandas dos espectros no infravermelho (cm ⁻¹) para o monômero estrutural (TRIM) com as respectivas atribuições. Dados extraídos da Figura 43.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<i>A</i>	Área eletroativa do eletrodo
AGEs	Produtos de glicação avançada
AIBN	2,2-azo-bisisobutironitrila
ALEs	Produtos de lipoxidação avançada
AMP	Amperometria
<i>C</i>	Concentração da espécie em solução
CAT	Catalase
CH ₃ COOH	Ácido acético
COX	Ciclooxygenase
CV	Carbono vítreo
Cys	Cisteína
CySS	Cistina
<i>D</i> ₀	Coeficiente de difusão
DDB	Diamante dopado com boro
<i>E</i> _a	Energia de ativação
EGDMA	Etilenoglicol dimetacrilato
EO	Estresse oxidativo
<i>E</i> _p	Potencial de pico
<i>E</i> _{p/2}	Potencial de pico de meia onda
ECRs	Espécies carbonílicas reativas
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FT-IR	Infravermelho por transformada de Fourier
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
<i>h</i>	Constante de Planck

HCys	Homocisteína
HNO ₂	Ácido nitroso
HO•	Radical hidroxila
HOCl	Ácido hipocloroso
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<i>I_p</i>	Corrente de pico
<i>I_{pa}</i>	Corrente de pico anódica
K	Kelvin
<i>k_B</i>	Constante de Boltzmann
LD	Límite de detecção
LipS ₂	Ácido lipóico
LQ	Límite de quantificação
LSV	Voltametria de varredura linear
Met	Metionina
MIP	Polímeros de impressão molecular
mM	Milimolar
MMIP	Polímero magnéticos de impressão molecular
MNIP	Polímero magnéticos não impressos
mol L ⁻¹	Mol por litro
MPS	3-(trimetoxisilil) propil metacrilato
mV s ⁻¹	Milivolt por segundo
<i>n</i>	Número de elétrons
NAC	N-acetil- <i>L</i> -cisteína
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido
NF-κB	Fator nuclear Kappa intensificador das células B ativado
NIP	Polímeros não impressos
nmol	nanomol
R-NH ₂	Grupo amina de aminoácidos
RAGEs	Receptores sensíveis a Ages

RO•	Radical alcoxila
ROO•	Radical peroxila
RSH	Tióis protonados
SOD	Superóxido dismutase
TEOS	Tetraetilortossilicato
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRIM	Trimetilopropano trimetacrilato
TrX	Tiorredoxina
UV	Ultra violeta
v	Deformação axial
$V s^{-1}$	Volts por segundo
VC	Voltametria cíclica
Vis	Visível
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
VSM	Magnetometria de amostra vibrante
α_{na}	Parâmetro que reflete a irreversibilidade da equação
δ_{as}	Deformação angular assimétrica
ΔE_p	Diferença de potencial de pico anódico e catódico
δ_s	Deformação angular simétrica
λ	Comprimento de onda
μA	Microampère
μmol	Micromol
v	Velocidade de varredura
ω	Deformação angular fora do plano
ΔG	Variação da energia livre de Gibbs
ΔH	Variação de entalpia
ΔS	Variação de entropia
1O_2	Oxigênio singlete

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	A idéia por trás dos fatos	20
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1	Espécies reativas e desequilíbrio redox	21
2.2	Antioxidantes	24
2.2.1	Biotióis.....	24
2.2.2	Química dos tióis.....	25
2.2.3	<i>N</i> -Acetilcisteína (NAC).....	27
2.2.4	Ácido Lipoico (LipS ₂).....	30
2.2.5	Glutationa (GSH).....	31
2.2.6	Homocisteína (HCys).....	32
2.2.7	Métodos para a determinação de tióis.....	33
2.3	Polímeros molecularmente impressos magnéticos (MIPs)	36
3	OBJETIVOS	41
3.1	Objetivo geral	41
3.2	Objetivos específicos	41
4	EXPERIMENTAL	42
4.1	Reagentes e Soluções	43
4.2	Equipamentos	44
4.3	Medidas eletroquímicas	45
4.3.1	Pré-tratamento da superfície do eletrodo CV.....	45
4.3.2	Pré-tratamento da superfície do eletrodo DDB.....	46
4.3.3	Aplicações em amostras de urina e saliva.....	46
4.3.4	Preparo das Amostras Farmacêuticas para as Medidas Eletroquímicas.....	47
4.4	Preparo dos MMIPs e NIPs	47
4.4.1	Síntese e modificação de nanopartículas de Fe ₃ O ₄	47
4.4.2	Simulação computacional.....	47
4.4.3	Síntese dos MIPs e NIPs.....	48
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1	Determinação eletroanalítica de NAC e GSH usando CV	50

5.1.1	Estudo do comportamento voltamétrico da oxidação do LipS ₂ e NAC sobre o eletrodo CV	50
5.1.2	Estudo da velocidade de varredura.....	51
5.1.3	Estudo da oxidação do LipS ₂ sobre o eletrodo CV com outros tióis.....	55
5.1.4	Otimização de Parâmetros Analíticos para a determinação de NAC.....	58
5.1.5	Influência da temperatura.....	63
5.1.6	Voltametria de pulso diferencial (VPD) usando o eletrodo de CV.....	67
5.1.7	Obtenção da Curva Analítica.....	70
5.1.8	Estudo de Interferentes.....	71
5.1.9	Aplicações em amostras reais.....	72
5.2	Determinação eletroanalítica de tióis usando eletrodo de diamante dopado com boro (DDB).....	73
5.2.1	Estudo do comportamento voltamétrico da oxidação do LipS ₂ e da NAC sobre eletrodo DDB.....	73
5.2.2	Estudo do comportamento voltamétrico da o LipS ₂ e tióis sobre o sobre eletrodo DDB.....	74
5.2.3	Variação de pH usando eletrodo DDB para detecção NAC.....	75
5.2.4	Voltametria de pulso diferencial (VPD) usando o eletrodo DDB.....	78
5.2.5	Determinação de NAC em amostras farmacêuticas empregando o eletrodo DDB.....	79
5.3	Polímeros magnéticos molecularmente impressos (MMIPs) e não impressos.....	83
5.3.1	Otimização da síntese dos MMIPs empregando ferramentas computacionais.....	83
5.3.2	Síntese e otimização de síntese do MMIP para GSH.....	86
5.3.3	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	87
5.3.3.1	Analito.....	87
5.3.3.2	Monômeros Funcionais.....	88
5.3.3.3	Monômero Estrutural.....	89
5.3.4	Magnetometria de amostra vibrante (VSM).....	92
5.3.5	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG).....	94
5.3.6	Avaliação da eficiência do MMIP sintetizado por meio de experimentos de afinidade.....	98
6	CONCLUSÕES.....	105

7	PERSPECTIVAS.....	107
	REFERÊNCIAS.....	108

1 INTRODUÇÃO

1.1 A idéia por trás dos fatos

O ácido α -lipóico (LipS₂) e a *N*-acetilcisteína (NAC) são suplementos utilizados para combater o estresse oxidativo e a inflamação. Ambos os compostos têm sido objeto de pesquisa intensa nos últimos anos e foram avaliados como potentes agentes antioxidantes e anti-inflamatórios, especialmente quando atuam em conjunto. Os dois têm sido utilizados em diversas condições clínicas e patológicas, dentre elas, a colite ulcerativa, uma doença inflamatória intestinal, cuja etiologia é multifacetada, mas comprovadamente ligada à alteração da resposta imune e ao estresse oxidativo. Os efeitos da administração de diversos antioxidantes em modelos animais com colite ulcerativa provocada por sulfato de sódio dextrana têm sido investigados (AMROUCHE-MEKKIOUI; DJERDJOURI, 2012; ANCHA et al., 2009; JENA; TRIVEDI; SANDALA, 2012; KOLGAZI et al., 2007), inclusive, por nosso grupo de pesquisa (MOURA et al., 2016). Nos resultados obtidos pelo nosso grupo, a NAC demonstrou uma melhor atividade antioxidante quando comparado ao LipS₂. Outro resultado importante foi que a combinação LipS₂ e NAC demonstrou efeitos adversos. Ambos os antioxidantes, quando fornecidos em conjunto e ao mesmo tempo, apesar de estarem em uma dose baixa, comparada à dose máxima considerada segura, demonstraram um perfil prejudicial, aumentando condições oxidativas e inflamatórias em ambos os órgãos: cólon e fígado dos animais investigados. Dessa forma, quando os dois foram administrados, em conjunto, nos animais, ocorreu efeito antagônico. Estudos relacionados à interação entre estes dois antioxidantes inexistem, na literatura. Com base nestes resultados e devido à importância desses dois antioxidantes, nos fizemos avaliar se ocorreria alguma interação entre o LipS₂ e NAC via eletroquímica. Os resultados da avaliação eletroquímica preliminar se revelaram intrigantes, com efeito aparentemente eletrocatalítico para a oxidação da NAC, em presença de LipS₂. Em vista disto, devido à importância ambiental, bioquímica, química e farmacológica dos tióis e dissulfetos, os mais importantes antioxidantes endógenos sistêmicos e intracelulares, e à necessidade de sua determinação acurada, a presente tese aprofundou-se na temática da eletroanalítica de biotióis, com atenção adicional aos processos de separação seletiva, via emprego de polímeros magnéticos molecularmente impressos, desta feita, em relação à glutatona, o mais importante dos biotióis.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Espécies reativas e desequilíbrio redox

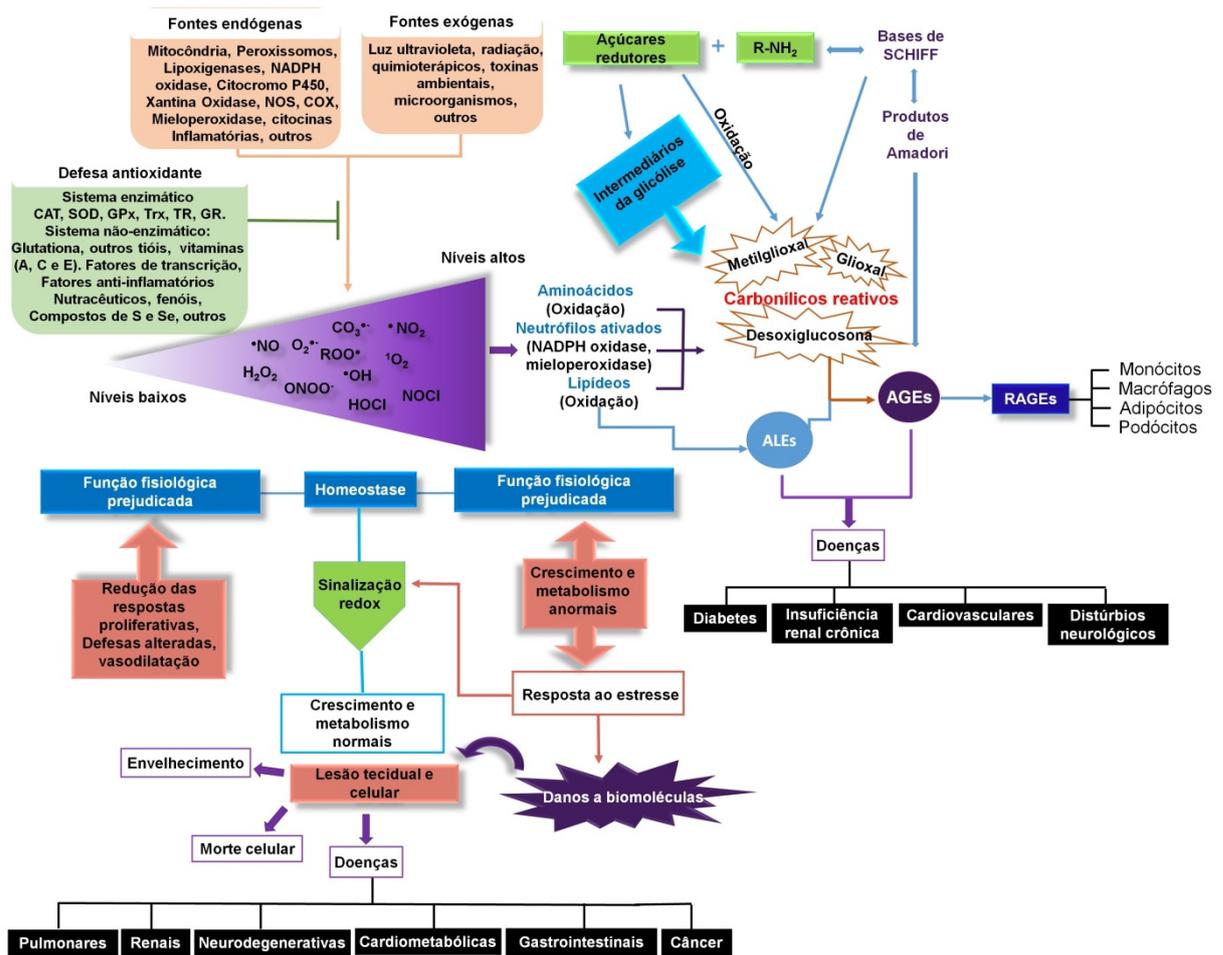
A vida na terra é dependente de sistemas redox, devido à importância central dos processos de transferência de elétrons na obtenção de energia, na defesa, na reprodução, nos caminhos de sinalização e na dinâmica molecular de proteínas (GROITL; JAKOB, 2014). O oxigênio é de suma importância para a eficiência energética, porém, em sua presença, há geração das chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs), que a depender da escala de intensidade, podem desencadear processos nocivos aos organismos.

Em sistemas biológicos, diversos fatores metabólicos e ambientais são responsáveis pela produção de EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Quando a produção é exacerbada ou quando há uma diminuição significativa na eficácia das defesas contra essas espécies, ocorre o desequilíbrio redox, ou o chamado estresse oxidativo (EO), causando a disfunção da sinalização redox e dos mecanismos de controle, com consequentes danos a macromoléculas biológicas, sendo, alguns deles, irreversíveis (FREITAS; LIMA; FERNANDES, 2009; SIES, 2015; SIES; BERNDT; JONES, 2017). As EROs e as ERNs formadas *in vivo* são espécies químicas que apresentam comportamento fisiológico duplo (“*Janus faced*”), sendo benéficas (*oxidative eustress*) ou nocivas (*oxidative distress*), a depender de sua concentração, do local e finalidade de sua geração. Elas são continuamente produzidas no corpo humano, pois desempenham papéis importantes em uma variedade de processos fisiológicos e patológicos e são essenciais para o fornecimento de energia, desintoxicação, sinalização química e função imunológica (ALI et al., 2008; WANG, 2016). Entretanto, podem também causar danos e morte celular, por uma série de alterações oxidativas, em micro- ou macromoléculas ou em sistemas supramoleculares (SIES, 2017).

O aumento do nível dessas espécies está associado ao surgimento e progressão de várias doenças (PRIOR, 2015). As ERNs podem agir em conjunto com as EROs, danificando células, causando o chamado estresse nitrosativo (WINK; MITCHELL, 1998), e que adicionados ao estresse carbonílico, causado especialmente por metabólitos α -oxaldeídicos gerados no curso de reações do tipo Maillard (PORTO BARBOSA et al., 2016) contribuem para o desenvolvimento de diversas doenças, como diabetes (AOUACHERI et al., 2015), câncer (AGGARWAL et al., 2013), doenças gastrointestinais (QUEIROZ DE ANDRADE et al., 2015), cardiometabólicas e neurodegenerativas (CHEN; ZHANG; HUANG, 2016) entre outras.

A Figura 1 representa um esquema geral, envolvendo a geração, as estruturas das espécies reativas biológicas mais relevantes, seus papéis fisiológicos e as consequências de suas presenças em restrição e excesso no organismo. As espécies reativas podem ser formadas a partir do metabolismo mitocondrial, por meio de reações enzimáticas ou não, ou por meio da ação de citocinas; bem como em decorrência de estímulos e fontes exógenas, sendo formadas, principalmente, EROs, ERNs, espécies reativas de cloro, de carbono, mistas e ainda espécies reativas advindas da reação do tipo Maillard, as denominadas espécies carbonílicas reativas (ECRs), as quais também podem ter origem endógena ou exógena. Além da formação endógena, favorecida em condições de maior disponibilidade de substratos, como no diabetes (maiores concentrações de glicose), as ECRs podem ser absorvidas a partir da dieta, dos poluentes ambientais e de produtos farmacêuticos (medicamentos e cosméticos). Os níveis dessas espécies devem ser controlados de forma a manter um equilíbrio no organismo (a homeostase), pois níveis baixos prejudicam muitas funções fisiológicas, resultando em problemas nas respostas proliferativas, disfunção no sistema imunológico e defeito na vasodilatação, ocasionando alterações como a doença granulomatosa crônica e algumas doenças auto-imunes (WANG, 2016). Para o controle biológico frente a todas essas espécies existem as defesas antioxidantes, que podem ser enzimáticas ou não, e também podem ser obtidas de fontes exógenas ou endógenas. Porém, se houver falha nas defesas e/ou produção exacerbada dessas espécies, danos a biomoléculas podem ocorrer, com consequente lesão local em células, tecidos e sistemas.

Figura 1 - Uma visão integrada e simplificada dos estresses oxidativo, nitrosativo e carbonílico: agentes, causas e consequências.



Legenda: AGEs = Produtos de glicação avançada (do inglês *Advanced Glycation Endproducts*), ALEs = do inglês *Advanced Lipoxidation Endproducts*, CAT = catalase, COX = Ciclooxigenase, GPx = glutathione peroxidase, GR = glutathione redutase, NADH = dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido; NADPH = nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido, NOS = óxido nítrico sintase, R-NH₂= grupo amina de aminoácidos, RAGEs = Receptores sensíveis a AGEs, SOD = superóxido dismutase, TrX = tioredoxina.

Fonte: CAMATARI, 2017.

Dentre as EROs podem ser destacados: o radical ânion superóxido (O₂^{•-}), o radical hidroxila (HO[•]), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o oxigênio singlete (¹O₂) e o ácido hipocloroso (HOCl), além dos radicais peroxila (ROO[•]) e alcóxila (RO[•]). Dentre as ERNs, destacam-se o monóxido de nitrogênio, mais conhecido como óxido nítrico ([•]NO) e o peroxinitrito (ONOO⁻), entretanto há também muitas outras ERNs advindas de rearranjo ou decomposição dessas, como trióxido de dinitrogênio (N₂O₃), ácido nitroso (HNO₂), dióxido de nitrogênio e ânion nitrito ([•]NO₂, NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻). Além das EROs e ERNs, são relevantes fisiologicamente, ECRs (ex. glioxal, metilglioxal e outras), espécies reativas de carbono,

enxofre, halogenadas, mistas e outras (Figura 1) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; LUSHCHAK, 2014).

As espécies reativas podem ser radicalares e não radicalares. Dentre as formas radicalares incluem-se: $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , ROO^{\bullet} , RO^{\bullet} , $\bullet NO$ e $\bullet NO_2$, enquanto as não radicalares são H_2O_2 , 1O_2 , $HOCl$, $ONOO^-$, N_2O_3 , HNO_2 , NO_2^- e NO_3^- . A forma radicalar é definida como uma espécie atômica ou molecular que contém um ou mais elétrons não emparelhados em um dos seus orbitais moleculares. As formas não radicalares não apresentam elétrons desemparelhados, mas são moléculas que podem ser tão reativas ou mais que os radicais (KRUMOVA; COSA, 2016; THANNICKAL; FANBURG, 2000).

2.2 Antioxidantes

Para se proteger contra o dano oxidativo, os organismos desenvolvem sistemas de resposta diferentes, cuja principal função é detectar e responder rapidamente a mudanças nos níveis de oxidantes específicos, que são os chamados antioxidantes, substâncias que, em baixas concentrações, previnem ou retardam significativamente a oxidação de substratos por agentes oxidantes (SUBRAMANIAN; SUBBRAMANIYAN; RAJ, 2013). Dessa forma, exercem funções importantes na manutenção do equilíbrio orgânico redox e de mecanismos fisiológicos de defesa em combate aos agentes pró-oxidantes, substâncias endógenas ou exógenas, que possuem a capacidade de oxidar moléculas alvo (Figura1). Dessa forma, podem retardar ou prevenir a oxidação de substratos, como proteínas, ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídios, redução do sistema operacional, mutações do DNA, transformações malignas, bem como outros parâmetros de dano celular (CERQUEIRA; GENNARI DE MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; GARAGUSO; NARDINI, 2015; WU et al., 2015).

2.2.1 Biotióis

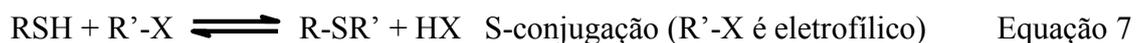
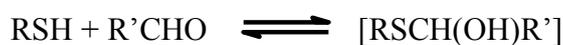
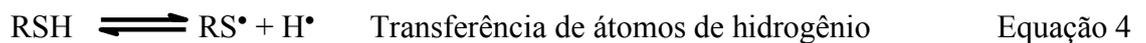
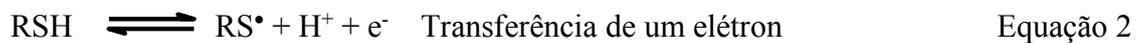
Entre os antioxidantes endógenos sistêmicos e intracelulares mais importantes, podemos destacar os tióis, que têm sido foco do interesse particular da comunidade científica. Os tióis biologicamente relevantes (biotióis) incluem proteínas com resíduos de cisteína e compostos de baixo peso molecular, em última análise, são derivados do aminoácido cisteína (TRUJILLO; ALVAREZ; RADI, 2016).

Os tióis são os principais contribuintes para o ambiente redox das células. Eles estão envolvidos na função e no controle de muitas proteínas. Os pares de tiol/dissulfeto têm diversas

funções na sinalização celular, regulação de proteínas e estrutura macromolecular. Muitos desses pares, como glutathiona reduzida/Glutathiona oxidada (GSH/GSSG) e cisteína/cistina (Cys/CySS), e pares de ditiol/dissulfeto em proteínas, tais como a tiorretoxina -1 e -2, existem em estados de não equilíbrio em que a cinética da oxidação e redução determinam o equilíbrio estacionário entre formas oxidadas e reduzidas (POOLE, 2015). Este deslocamento do equilíbrio permite uma rápida regulação dinâmica, suporta a sinalização redox e representa um alvo central de mecanismos não-radicaais de estresse oxidativo (GILBERT, 1990).

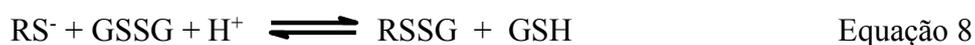
2.2.2 Química dos tióis

A química de tióis pode ser representada, de maneira simples por reações de troca, substituição e adição nucleofílicas, reações de transferência de 1 ou 2 elétrons, transferência de hidretos e S-conjugação (Equações 1-8).



A reação de troca tiol/dissulfeto (Equação 1) é uma das mais comuns, *in vivo*.

De uma forma mais adequada, a reação deve ser escrita, com os tióis na forma ionizada, a depender do pKa dos tióis envolvidos. Na maioria dos casos, as espécies reativas são os tiolatos (RS^-), que são melhores nucleófilos do que os tióis protonados (RSH).



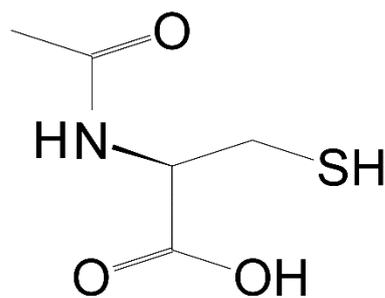
As reações de compostos tiólicos com diferentes oxidantes formados *in vivo* contribuem para suas ações antioxidantes. Além disso, a oxidação de grupos tiol em resíduos de proteína, é crucial na sinalização redox, um processo pelo qual um sistema biológico responde a mudanças nos níveis de ERONs (FORMAN; FUKUTO; TORRES, 2004; GO; JONES, 2013).

A Figura 2 esquematiza a química redox dos tióis. Dissulfetos podem ser reduzidos de volta aos tióis com redutores adequados. Outros podem ser considerados produtos de oxidação final. Em geral, as vias de oxidação de um elétron foram tradicionalmente relacionadas ao dano oxidativo, enquanto que as ações de sinalização foram associadas à oxidação por dois elétrons. RS-

A oxidação dos biotióis participa não apenas na defesa contra o dano oxidativo, mas também nos mecanismos catalíticos enzimáticos e nos processos de transdução de sinais. Os tióis são redutores versáteis que reagem com espécies oxidantes por mecanismos de um (Equação 2) e dois elétrons (Equação 3), levando a radicais tiila e ácidos sulfênicos, respectivamente. Esses intermediários, dependendo das condições, participam de novas reações que convergem em diferentes produtos estáveis (TRUJILLO; ALVAREZ; RADI, 2016).

(ATKURI et al., 2007). Além disso, é um agente redutor mais forte que a GSH e a cisteína, apresentando um potencial redox superior em 63 mV e 106 mV do que os do GSH/GSSG e os pares redox cisteína/cistina, respectivamente (NOSZÁL; VISKY; KRASZNI, 2000). Embora a NAC tenha a capacidade de eliminar diretamente as espécies reativas, as constantes de velocidade na reação com as EROs são menores do que as das enzimas antioxidantes, como a SOD, a CAT e a GPx (JONES et al., 2003). Assim, a eliminação direta dos radicais não é a atividade antioxidante da NAC mais importante.

Figura 3 - Estrutura molecular da NAC.



Fonte: Estrutura baseada no site da empresa Sigma-Aldrich.

A NAC, consumida oralmente, é absorvida no estômago e no intestino e é transportada ao fígado através da veia porta, em que já se encontra quase em sua totalidade na forma de cisteína. O fígado incorpora a maior parte da cisteína em GSH que, em seguida, é lançada na circulação (ATKURI et al., 2007). Não são reconhecidos efeitos adversos clinicamente com a administração oral da NAC em doses de até 8000 mg/dia (DE ROSA et al., 2000). Nos estudos que testaram doses orais de NAC em ratos machos e fêmeas, a fim de determinar a toxicidade sub-aguda (2000 mg/kg de peso corporal/d por 4 semanas) e sub-crônica (1000 mg/kg de peso corporal/d por 28 semanas), observaram que essas quantidades não afetaram o comportamento, ganho de peso corporal, hematologia, função hepática e renal, e tempo de protrombina. Resultados da autópsia e exames histológicos não evidenciaram lesões patológicas (BONANOMI; GAZZANIGA, 1980).

Os mecanismos de defesa antioxidante endógenos incluem a eliminação de EROs e das ERNs ou seus precursores, a ligação a íons metálicos envolvidos na geração de EROs e ERNs e aumento da regulação endógena de defesas antioxidantes (SAMUNI et al., 2013).

Os pares redox interdependentes GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺, NADH/NAD⁺ e tioredoxina (Trx(SH)₂/TrxS-S) interagem entre si para regular o ambiente redox. A baixa

capacidade antioxidante em um ambiente celular com EO é principalmente devida à diminuição da GSH e/ou aumento da GSSG, pelo fato da GSH ser o tiol mais abundante no meio intracelular (TIROUVANZIAM et al., 2006). A GSH é fonte de tiol no organismo e um importante antioxidante envolvido em inúmeros processos fisiológicos. Estes incluem a desintoxicação de xenobióticos eletrofílicos, modulação da regulação redox na transdução de sinal, regulação da resposta imunológica, metabolismo da prostaglandina e leucotrienos, defesa antioxidante, sinalização de neurotransmissores, modulação da proliferação celular, entre outros (SIES, 1999). Daí a importância da NAC, aumentando a defesa antioxidante através do fornecimento de cisteína, necessária para a síntese de GSH.

Quanto à capacidade de eliminação direta das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), a NAC reage com os radicais altamente oxidantes, tais como o HO[•], NO₂ e radical carbonato (CO₃^{•-}) (SAMUNI et al., 2013). Além disso, é capaz de quelar íons de metais de transição, tais como cátions de cobre (Cu⁺²) e ferro (Fe⁺³) e íons de metais pesados, tais como cádmio (Cd²⁺), mercúrio (Hg²⁺) e chumbo (Pb⁺²) (KASPERCZYK et al., 2014), principalmente através de sua cadeia lateral tiol, formando estruturas complexas, as quais são facilmente excretados do corpo, sendo removidos assim do meio intra e extracelular (SAMUNI et al., 2013).

A atividade anti-inflamatória da NAC vem sendo amplamente estudada, especialmente pelo seu efeito sobre o fator nuclear Kappa intensificador das células B ativadas (NF-κB), que é central na regulação da expressão de genes envolvidos na resposta ao EO e inflamatório (HADDAD, 2002). No entanto, a NAC afeta também outras vias de transdução e a expressão de vários genes, e diretamente modula a atividade de fatores de transcrição tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SAMUNI et al., 2013).

Por apresentar a função de precursora de GSH, a capacidade hepatoprotetora de NAC tem sido associada à prevenção de doenças hepáticas caracterizadas pela diminuição de GSH e/ou aumento do EO (LASRAM et al., 2014) e nas colites ulcerativa idiopática, cuja produção e liberação das EROs são pontos cruciais na fisiopatologia da doença, pois resultam em dano oxidativo e dissolução das junções intercelulares e da membrana basal epitelial que mantêm a função da barreira colônica (PRAVDA, 2005) podendo levar a vários processos metabólicos que desencadeiam o dano hepático. Cabe salientar, que essas situações patológicas já são estudadas *in vivo* por nosso grupo de estudo, o que contribuiu para a idealização deste trabalho, como já mostrado na introdução.

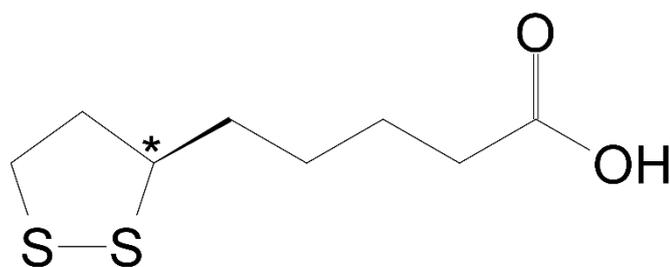
Outros efeitos benéficos da NAC são: 1) redução das ligações dissulfeto das proteínas, interrompendo suas ligações e alterando suas estruturas, o que pode justificar a atividade mucolítica da NAC, além do bloqueio do fator de necrose tumoral α (TNF- α), através da redução da afinidade pelo receptor (HAYAKAWA et al., 2003); 2) regulação do ciclo celular e apoptose; 3) atividade anti-neoplásica e anti-mutagênica (PARASASSI et al., 2005); 4) modulação na expressão gênica e transdução de sinal; 5) modulação no sistema imune (BREITKREUTZ et al., 2000).

Dessa forma, a avaliação de novas metodologias para a determinação de NAC é de fundamental importância, sendo a NAC um agente antioxidante comprovadamente eficaz em diversas patologias, cujo estresse oxidativo participa da patogênese.

2.2.4 Ácido Lipoico (LipS₂)

O ácido α -lipoico (1,2-ditiolano-3-pentanoico) é um composto organosulfurado, de ocorrência natural e sintetizado em pequenas quantidades por plantas e animais. Sua estrutura (Figura 4) é constituída de uma cadeia de 8 carbonos, com uma carboxila em uma das extremidades como grupo funcional e um anel ditiolano, com início no carbono 6, na outra. O anel ditiolano consiste de um anel heterocíclico de cinco membros contendo dois átomos de enxofre vizinhos (ALARFAJ, 2009; CORDUNEANU; GARNETT; BRETT, 2007; MIRANDA et al., 2012). O carbono 6 do LipS₂ é um carbono quiral (está ligado a quatro substituintes diferentes entre si), e, portanto, a molécula se apresenta sob a forma dos enantiômeros R ou S.

Figura 4 - Estrutura molecular do LipS₂.



Fonte: Estrutura baseada no site da empresa Sigma-Aldrich.

O LipS₂ é um cofator que contém naturalmente o enxofre que é sintetizado enzimaticamente em mitocôndrias humanas a partir de cisteína e ácido octanóico. É um antioxidante capaz de produzir seus efeitos em ambientes aquosos ou lipofílicos. O lipoato é a

base conjugada do LipS₂ e a forma mais prevalente de LipS₂ sob condições fisiológicas. Aumenta a expressão de enzimas antioxidantes e participa na reciclagem de vitaminas C e E, desempenha um papel central no metabolismo celular, bem como em vários complexos multi-enzimáticos. Devido a essas propriedades, LipS₂ é chamado de "antioxidante universal" (MOURA et al., 2015a).

O LipS₂ é encontrado no germe de trigo, no levedo de cerveja e na carne vermelha (MORIKAWA; YASUNO; WADA, 2001). Este ácido aumenta o fluxo sanguíneo para os nervos e melhora a condução dos impulsos nervosos, sendo indicado no tratamento de problemas neurológicos como dormências e formigamentos de qualquer origem, não apenas os decorrentes do diabetes (BILSKA; WŁODEK, 2005).

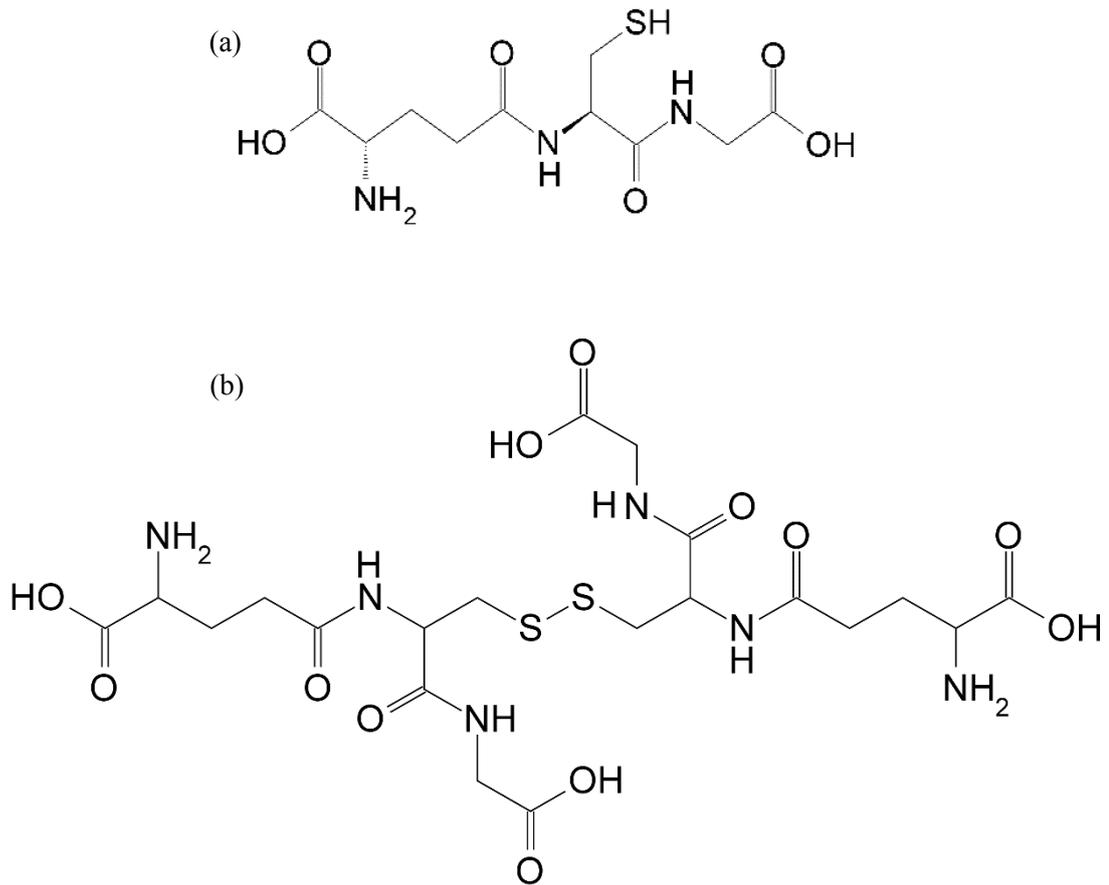
Devido ao seu potencial antioxidante o LipS₂ tem sido estudado como agente terapêutico para diversos distúrbios: isquemia (GHIBU et al., 2009), intoxicação por metais (GURER et al., 1999), diabetes (ZIEGLER et al., 1999), síndrome da imunodeficiência adquirida (BIEWENGA; HAENEN; BAST, 1997), esclerose múltipla e distúrbios neurodegenerativos, como mal de Alzheimer e demências relacionadas (HOLMQUIST et al., 2007), bem como para o tratamento de vírus da imunodeficiência humana (HIV) (PATRICK, 2000).

2.2.5 Glutathione (GSH)

Glutathione (l-glutamyl-l-cysteinylglycine), é um tripéptido que está presente em altas concentrações (gama mM) em diferentes tecidos, incluindo o fígado, exerce um papel importante nas reações de desintoxicação, como a remoção de peróxido de hidrogênio celular e a conjugação de metabólitos eletrofílicos de xenobióticos (KAPLOWITZ; AW; OOKHTENS, 1985). Adicionalmente, é um antioxidante fisiológico muito importante, que atua tanto no combate de espécies reativas como também aumenta a capacidade funcional de outros antioxidantes cruciais, como vitaminas E e C (DRÖGE et al., 1986; MEISTER; ANDERSON, 1983).

Durante a biossíntese da glutathione, a GSH (Figura 5a) pode se oxidar para formar dímero correspondente, GSSG (Figura 5b), reagindo com espécies reativas de oxigênio (PASTORE et al., 2003). O par químico GSH/GSSG é talvez o principal regulador redox intracelular (CAO et al., 2013). Sua análise quantitativa como moléculas individuais e/ou proporção GSH/GSSG pode ser valiosa para medir a toxicidade celular, assim, indicando estresse oxidativo (MELONI; NICOLAY, 2003).

Figura 5 - Estruturas molecular: (a) GSH e (b) GSSG.



Fonte: Estrutura baseada no site da empresa Sigma-Aldrich.

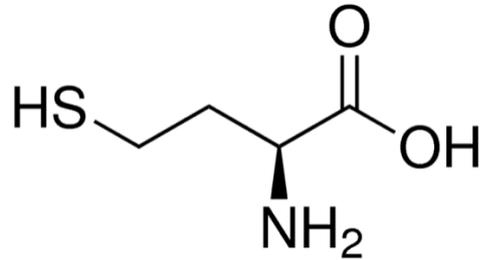
No corpo humano, as propriedades antioxidantes da glutathione são bem reconhecidas. Sua capacidade de eliminar os radicais livres fisiológicos é de particular importância considerando a liberação de óxido nítrico associada a distúrbios inflamatórios (COLEMAN, 2001; KLATT; LAMAS, 2000). Como resultado, as alterações nas concentrações fisiológicas desta molécula estão correlacionadas com diversos distúrbios como o Alzheimer (LIU et al., 2004; PINNEN et al., 2011), Parkinson (LANG, 2007; MAETZLER et al., 2011), diabetes mellitus (NWOSE et al., 2006; WHILLIER; RAFTOS; KUCHEL, 2008), bem como numerosos tipos de câncer (WONG et al., 1994; YEH et al., 2006).

2.2.6 Homocisteína (HCys)

A homocisteína (Figura 6) é aminoácido não protéico, contendo um grupo tiol, que participa de funções que mantêm o metabolismo, é gerado pela desmetilação da metionina. Uma vez formado, HCys é irreversivelmente catabolizado por transulfuração para cisteína ou

remetilado para metionina (Met). Essas transformações são controladas por reações enzimáticas (DUCROS et al., 2002).

Figura 6 - Estrutura molecular da HCys.



Fonte: Estrutura baseada no site da empresa Sigma-Aldrich.

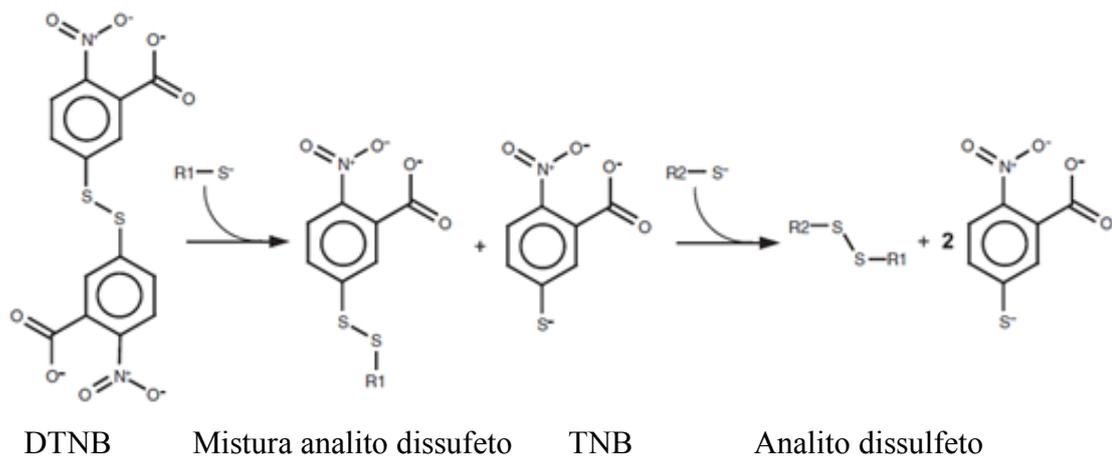
Os níveis de homocisteína podem levar a implicações para a leucemia (REFSUM; WESENBERG; UELAND, 1991), doença de Alzheimer (WANG et al., 2005), câncer (MAYER; JACOBSEN; ROBINSON, 1996) e (HANKEY; EIKELBOOM, 1999). Embora sejam encontrados níveis fisiológicos de homocisteína em plasma sanguíneo saudável, cerca de 5-15 $\mu\text{mol L}^{-1}$, pode ocorrer uma condição médica caracterizada por um nível anormalmente alto (acima de 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$) de homocisteína no sangue, chamado hiper-homocisteinemia (GUO et al., 2009). A concentração total de homocisteína no plasma de humanos saudáveis (jejum) é baixa e seu nível está entre 5,0 e 15,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ quando avaliado com o uso de HPLC ou 5,0-12,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ quando são utilizados métodos de imunoenensaio (BASZCZUK; KOPCZYŃSKI, 2014). Quando o nível está entre 16-30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ é classificado como moderado, 31-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ é considerado intermediário e um valor acima de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ é classificado como homocisteinemia grave (HANKEY; EIKELBOOM, 1999), elevando, dessa forma, o risco de doenças cardiometabólicas.

2.2.7 Métodos para a determinação de tióis

Devido à importância biológica, ambiental, farmacológica e terapêutica dos tióis faz-se necessário aplicar metodologias para detecção e quantificação em uma grande variedade de amostras (dieta, suplementos, medicamentos e matrizes biológicas), isolados e em misturas de tióis. Os tióis podem ser detectados por uma variedade de reagentes e técnicas químicas. O reagente cromogênico clássico para a detecção de tiol é o ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzôico) (DTNB), também conhecido como reagente de Ellman (ELLMAN, 1959). Este composto tem uma ligação dissulfeto altamente oxidante, que é reduzida estequiometricamente por tióis livres

numa reação de troca (Equação 1), formando um dissulfeto misto e liberando uma molécula de ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, na forma ionizada, a depender do pH do meio (TNB) (WINTHER; THORPE, 2014). TNB é um excelente grupo de saída, com uma função tiolada, com pKa de 4,5, próximo ao de ácidos carboxílicos (RIDDLES; BLAKELEY; ZERNER, 1983). Se um segundo tiol R_2-SH estiver presente, a reação com o o dissulfeto mixto, formado anteriormente, pode ocorrer, formar um terceiro dissulfeto ($R_1-S-S-R_2$) misto, conforme mostrado na Figura 7, liberando assim, o segundo TNB. Em ambos os casos, um TNB é liberado para cada tiol oxidado após o tratamento com DTNB.

Figura 7- Reação do DNTB (reagente de Ellman) na presença de tióis.



Fonte: WINTHER; THORPE, 2014

Técnicas químicas e instrumentais para a determinação de tióis têm sido amplamente relatadas na literatura. Entre as técnicas mais regularmente utilizadas, estão as técnicas cromatográficas (CONCHA-HERRERA; TORRES-LAPASIÓ; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, 2004) e eletroforese capilar (ZHANG; HU; CHEN, 2005). No entanto, essas técnicas requerem instrumentações complexas, preparação laboriosa de amostras e necessidade de derivação o que limita sua utilidade. Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography* – HPLC) combinada a outros modos de detecção, tais como fluorimetria (KAND'ÁR et al., 2007) e espectrometria de massa (IWASAKI et al., 2012) também estão sendo utilizadas. Os detectores fluorimétricos possuem alta sensibilidade, no entanto, estes ensaios requerem a preparação laboriosa da amostra e um alto custo de reagentes. A técnica de HPLC acoplada à espectrometria de massas, normalmente, oferece uma alta sensibilidade e seletividade, mas o equipamento possui um alto custo e um maior tempo de

análise e recursos são necessários, que podem potencialmente causar substanciais atrasos na obtenção de resultados. Comparado com outros métodos analíticos, os métodos eletroquímicos têm sido empregados com sucesso para produtos farmacêuticos, biológicos e detecção ambiental, devido à sua resposta rápida, baixa custo, boa seletividade, alta sensibilidade e portabilidade (KALCHER et al., 1995).

Nesse sentido, diferentes eletrodos de trabalho têm sido empregados para a determinação desses tióis, eletrodos não modificados (RAOOF et al., 2010) e eletrodos modificados (INOUE; KIRCHHOFF, 2000). No entanto, eletrodos não modificados sofrem de falta de sensibilidade, devido ao envenenamento da sua superfície, em potenciais de oxidação altos, enquanto que os eletrodos modificados têm desvantagens devido às diferentes etapas de preparação e falta de reprodutibilidade de sinal. Assim, os esforços para ampliar a detecção eletroquímica de tióis com metodologias simples e sensíveis têm sido desafiadores.

Uma alternativa para diminuir as limitações dos sensores eletroquímicos, envolve o uso de mediadores eletroquímicos homogêneos ou heterogêneos (LEE; GONCALVES; COMPTON, 2015; RAOOF et al., 2010). Com o mediador eletroquímico em solução, evita-se o envenenamento do eletrodo sem a necessidade de modificação, tornando a metodologia eletroquímica simples, rápida e facilmente aplicada. Diferentes superfícies eletródicas podem ser aplicadas nessas análises, eletrodos convencionais (carbono vítreo, ouro, grafite) que se destacam pelo baixo custo, ou eletrodos mais sofisticados, como o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). Em comparação com eletrodos convencionais, o DDB oferece muitos benefícios exclusivos, como baixa corrente capacitiva, uma janela grande de potencial de trabalho, alta resistência mecânica e é menos propenso à passivação superficial devido à sua inércia física e química (SIANGPROH; NGAMUKOT; CHAILAPAKUL, 2003). Dessa forma, o uso de diferentes superfícies eletródicas aliadas ao mediador eletroquímico nos fornece uma ferramenta analítica promissora para a determinação de tióis em matrizes relevantes.

Dependendo da matriz, a metodologia pode ser facilmente aplicada, porém, algumas matrizes apresentam alta complexidade, devido aos baixos teores dos constituintes de interesse e presença de interferentes. Nesse sentido, o emprego de polímeros molecularmente impressos, ou de impressão molecular (do inglês - "*Molecularly Imprinted Polymers*" - MIPs), tem demonstrado ser uma eficiente ferramenta analítica e com grande potencialidade para minimizar essas limitações, sendo altamente seletivo.

2.3 Polímeros molecularmente impressos (MIPs)

A história da tecnologia de impressão molecular teve seu início na década de 1930, quando Polyakov explicou a seletividade em termos de um efeito de modelo, embora os aditivos foram incluídos após a polimerização (POLYAKOV, 1931). Na década de 1940, Pauling apresentou pela primeira vez a idéia sobre a impressão molecular, a teoria segundo a qual os anticorpos adotam uma estrutura complementar tridimensional específica em relação ao antígeno após contato com ele (PAULING, 1940). No entanto, nenhum avanço significativo na impressão molecular foi feito nos 20 anos seguintes. Em 1972, Wulff e Sarhan lançaram as bases para a área de pesquisa atual com o primeiro relato de polímeros orgânicos que foram preparados por ligações químicas reversíveis (WULFF; SARHAN, 1972). No início dos anos 80, Vlatakis e colaboradores prepararam com sucesso os MIPs usando tecnologia de impressão molecular não covalente (VLATAKIS et al., 1993). Com base nestes estudos pioneiros, a tecnologia de impressão molecular começou a crescer rapidamente.

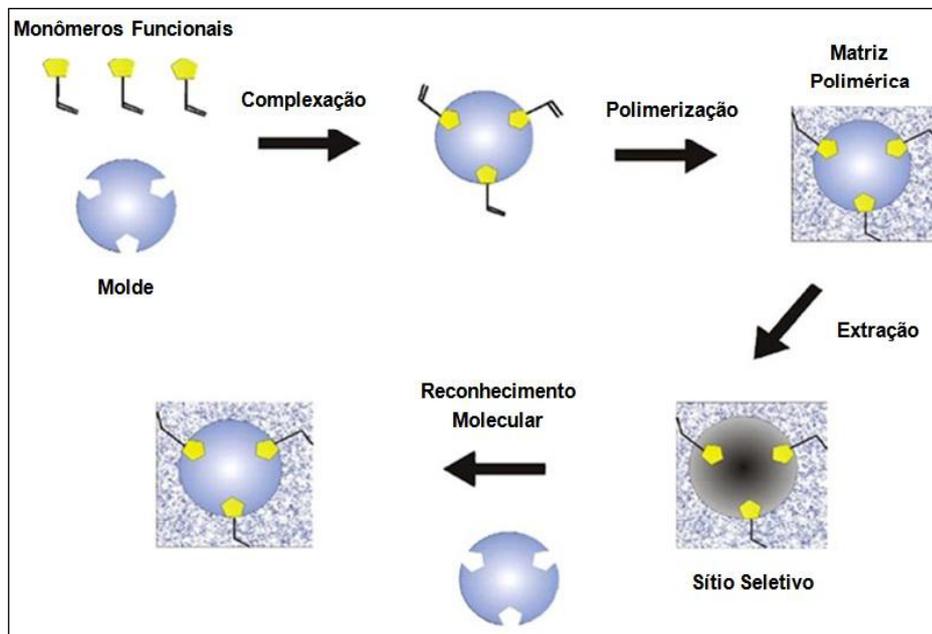
Existem três processos diferentes de moldagem molecular para a preparação de MIPs, que são: covalentes, não covalentes e semi-covalentes, esses processos diferem da forma como o modelo está ligado ao monômero funcional e, portanto, dos sítios de ligação resultantes. A abordagem covalente envolve a formação de ligações covalentes reversíveis entre o molde e o monômero funcional, este procedimento produz um polímero impresso caracterizado pela distribuição homogênea dos locais de ligação devido à forte interação entre a molécula-molde e o monômero. Similar é a opção semi-covalente, mas neste caso, é usada uma molécula molde que estabelece uma ligação covalente com os monômeros funcionais e, na etapa de religação, é estabelecida uma ligação de natureza não covalente. A abordagem não covalente, é a mais utilizada nos processos de impressão molecular, uma vez que podem ser utilizados vários monômeros comercialmente disponíveis, esse processo envolve a formação de interações fracas e não covalentes entre o modelo e o monômero na mistura de reação (interações iônicas, ligação de hidrogênio, forças de van der Waals e empilhamento π - π). Esta abordagem é particularmente interessante pela sua simplicidade, permitindo a obtenção de MIP que apresentam uma afinidade elevada para o seu alvo e uma ampla aplicabilidade. Assim, usando essencialmente o mesmo procedimento e mudando a molécula alvo, podem ser desenvolvidos MIPs com capacidade para reconhecer uma grande variedade de compostos (SELLERGRÉN; ALLENDER, 2005).

Os MIPs são polímeros que realizam reconhecimento específico por formarem cavidades que são complementares em tamanho e forma ao analito; sendo denominados também de polímeros biomiméticos por imitarem o sistema de reconhecimento biológico baseado em afinidade, como o sistema antígeno/anticorpo (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005). O reconhecimento molecular do MIP é baseado nos sistemas biológicos; contudo, os polímeros apresentam diversas vantagens em relação aos biosistemas: baixo custo, fácil preparação (podem ser sintetizados de diferentes modos de acordo com a necessidade), alta resistência mecânica e térmica (HAUPT et al., 2011; UZURIAGA-SÁNCHEZ et al., 2016).

Os polímeros não-molecularmente impressos (NIPs) são polímeros de controle de MIPs. Sua síntese é semelhante, praticamente a mesma que a síntese dos MIPs, com a única diferença de que a molécula modelo não é adicionada, desta forma é possível estudar se a interação que ocorre entre o polímero e a molécula modelo é devida à capacidade que o MIP reconhece o modelo e não apenas a interação de monômeros funcionais e estruturais com o modelo; e se a cavidade originada na síntese de MIP é o que torna o polímero altamente seletivo.

Em linhas gerais, os MIP (Figura 8) são obtidos por polimerização na presença de uma molécula molde a ser impressa (*template*), de tal forma que um esqueleto polimérico é formado ao redor do analito ou de uma molécula com estrutura análoga. Após a polimerização, a molécula que foi impressa é removida por dissolução ou evaporação, revelando nanosítios de ligação (cavidades nanoporosas) que são complementares em forma e tamanho do analito. Com esta estratégia, o resultado é uma “memória” molecular em um polímero nanoporoso, que é apropriada para que ocorra um processo de inclusão reversível e um enriquecimento seletivo do analito. A primeira etapa da síntese consiste em misturar o monômero contendo grupos funcionais complementares àqueles da molécula molde, o que permite formar, em solução, o complexo “monômero-molécula molde”, por meio de interações (covalentes ou não covalentes) entre os respectivos grupos funcionais complementares. Posteriormente, são adicionados ao meio reacional, o reagente de ligação cruzada (monômero estrutural) e o iniciador radicalar de polimerização. Finalmente, a polimerização é induzida por meio de calor e/ou luz UV na ausência de oxigênio. A seguir, o MIP formado é avaliado em relação à sua seletividade, capacidade de extração e de pré-concentração do analito (TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005).

Figura 8 - Esquema ilustrativo das etapas envolvidas na síntese de polímeros com impressão molecular.



Fonte: Baseado em TARLEY; SOTOMAYOR; KUBOTA, 2005

Para a impressão molecular, a molécula modelo é de grande importância porque influencia diretamente a organização de monômeros funcionais. Mas nem todas as moléculas podem ser modelo, a escolha dos monômeros funcionais é influenciada pela sua afinidade com a molécula modelo, em geral, para a impressão molecular não covalente, a razão molar entre o modelo e o monômero funcional é de 1 a 4. As três principais funções do monômero estrutural são, controle da morfologia do polímero da matriz, estabilidade dos locais de ligação impressa e estabilidade mecânica do polímero da matriz (CORMACK; ELORZA, 2004)

Os MIPs produzidos pelos métodos convencionais de síntese, embora muito eficientes, ainda apresentam alguns problemas no seu desempenho de reconhecimento. As partículas formadas possuem os sítios de ligação específica distribuídos de maneira não homogênea e no interior da partícula, o que diminui a acessibilidade do analito na cavidade do MIP (SHAHAR; TAL; MANDLER, 2016).

Assim, um dos modos encontrados de minimizar e/ou acabar com os inconvenientes mencionados foi através da junção dos polímeros impressos com nanopartículas.

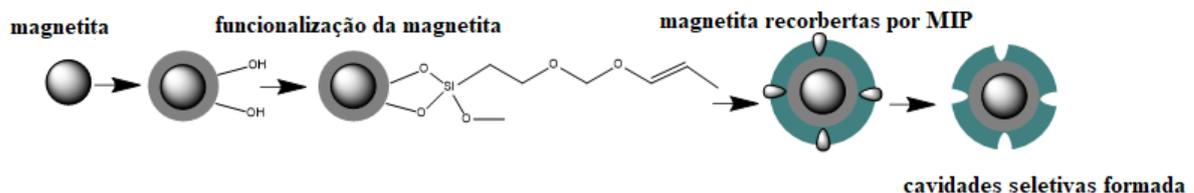
As nanopartículas magnéticas atraíram uma atenção considerável devido ao interesse científico fundamental e às aplicações promissoras em diversas áreas: separação, catálise,

biológica e ambiental. Além disso, apresentam também vantagens como baixa toxicidade e baixo custo (HUANG et al., 2015). Aliando as vantagens das nanopartículas magnéticas com técnica de impressão molecular os benefícios aumentam em seletividade e sensibilidade. Essa união gerou materiais nanocompósitos do tipo core@shell, no qual o núcleo é formado por nanopartículas sólidas recobertas com uma camada de MIP (WACKERLIG; LIEBERZEIT, 2015).

O processo de preparação mais comumente usado inclui quatro etapas: 1) preparação de nanopartículas magnéticas; 2) modificação ou funcionalização da superfície dos componentes magnéticos (onde um dos métodos mais comuns para a preparação de MMIP emprega substratos funcionalizados com vinil); 3) polimerização impressa na superfície, usando nanopartículas funcionalizadas como um núcleo magnético na presença da molécula modelo, monômero funcional e monômero estrutural; 4) a remoção da molécula modelo do polímero (UZURIAGA-SÁNCHEZ et al., 2016; ZHANG et al., 2010).

Os passos gerais da preparação dos MMIPs são apresentados a Figura 9. O processo MIPs na superfície modificada com nanopartículas magnéticas é análogo ao da síntese de polímeros.

Figura 9 - Esquema ilustrativo das etapas envolvidas na síntese de polímeros magnéticos com impressão molecular.



Fonte: PUPIN, et al, 2016.

Os MMIPs são dotados de alta afinidade com os modelos como os MIP tradicionais e permitem monitorar compostos segmentados em matrizes ambientais complexas de forma rápida, barata e precisa (LIN et al., 2016). Os MMIPs são preparados pela encapsulação de partículas magnéticas inorgânicas com um polímero orgânico, o que resulta em um produto que combina as vantagens das altas propriedades de reconhecimento de MIP e a conveniência de manipulação da separação magnética. Enquanto isso, o processo de separação magnética pode ser realizado diretamente em amostras complexas, sem a necessidade de preparo de amostras. Portanto, os MMIP podem ser promissores candidatos multifuncionais para o processo de

adsorção/ separação (HUANG et al., 2015; HUSSAIN et al., 2016; LI et al., 2012; LIU et al., 2016; NING et al., 2014).

Assim, com base no anteriormente exposto, este trabalho propõe duas metodologias para a determinação de tióis, a primeira utilizando métodos eletroanalíticos sensíveis, simples e de baixo custo e a segunda metodologia é a síntese de polímeros magnéticos molecularmente impressos que fazem ligações específicas com analito, para separar e determinar GSH, em misturas mais complexas, com seletividade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver metodologias analíticas com alta sensibilidade, seletividade e estabilidade para a determinação de tióis empregando eletrodos de carbono vítreo (CV) e diamante dopado com boro (DDB) e a síntese de um material híbrido no formato *core@shell*, constituído de nanopartículas magnéticas modificadas (core) com MIP (shell) para a determinação de GSH em amostras mais complexas.

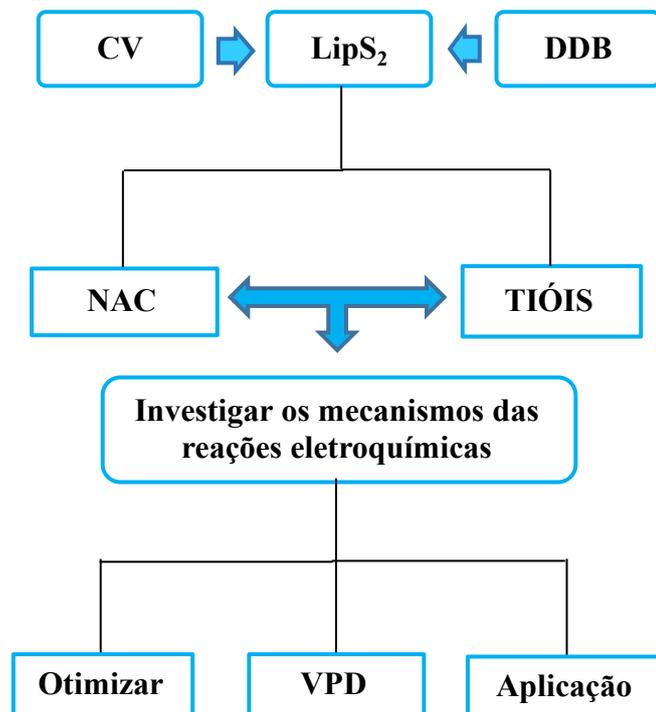
3.2 Objetivos específicos

- Investigar o comportamento do eletrodo CV na presença de tióis de interesse biológico;
- Investigar os mecanismos das reações eletroquímicas dos analitos estudados usando as voltametrias cíclica e de voltametria de pulso diferencial;
- Realizar eletroanálise e obter as respectivas figuras de mérito analíticas;
- Aplicar a metodologia em matrizes distintas;
- Comparar os resultados obtidos com o eletrodo de DDB (sob condições otimizadas);
- Sintetizar as nanopartículas magnéticas;
- Modificar as nanopartículas magnéticas com MIP (MMIP) para GSH;
- Otimizar os parâmetros de síntese do MMIP;
- Caracterizar o MMIP;
- Avaliar o desempenho do MMIP sintetizado.

4 PARTE EXPERIMENTAL

O trabalho foi dividido em duas partes. O primeiro tópicos refere-se à análise eletroquímica de LipS_2 e NAC, com experimentos realizados em ECV, utilizando a técnica de voltametria cíclica (VC). Posteriormente, foi realizada a análise com diferentes tióis e dessa forma, foi possível estabelecer o mecanismo de reação entre o LipS_2 e os tióis. Para melhor desempenho da metodologia adotada, os parâmetros experimentais que influenciam na sensibilidade, estabilidade e resposta dos tióis foram otimizados. A técnica de voltametria de pulso diferencial (VPD) é uma técnica mais sensível que a VC, portanto, foi a técnica utilizada para a obtenção dos parâmetros analíticos e para a aplicação em amostras reais. Todo o processo foi repetido, aplicando-se, desta feita, o eletrodo de diamante dopado com boro (DDB). A comparação entre as duas metodologias em diferentes superfícies eletródicas foi possível. A Figura 10 apresenta o fluxograma para cada etapa seguida no trabalho.

Figura 10 - Fluxograma representando as etapas das eletroanálises dos tióis.

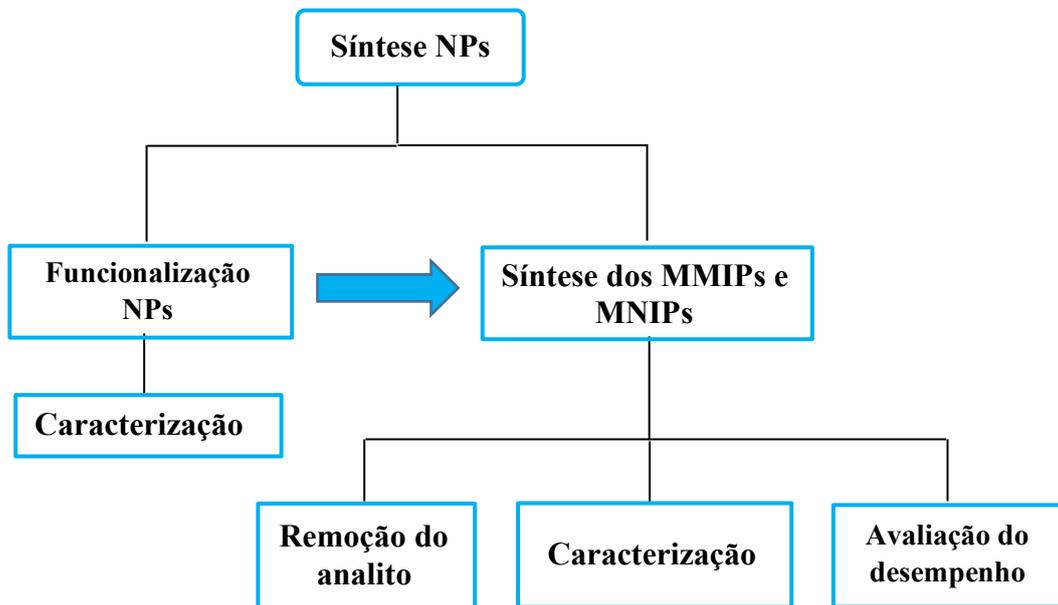


Fonte: Autora do trabalho.

A segunda etapa do trabalho relata a síntese de MMIPs e MNIPs para a determinação de GSH. Esse tiol foi escolhido devido à sua importância biológica. As etapas aplicadas na execução do trabalho são apresentadas na Figura 11.

Inicialmente realizou-se a síntese de nanopartículas magnéticas e a sua funcionalização. Em seguida, a camada impressa molecularmente é formada na superfície por polimerização dos grupos vinila com monômero estrutural e funcional na presença de GSH para a formação do MMIPs e na ausência de GSH para formação dos MNIPs. Após a polimerização, o analito foi removido da cavidade do MMIPs, caracterizado e avaliado seu desempenho em relação do MNIP. Todos produtos oriundos de cada etapa da síntese foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG), infravermelho e magnetometria de amostra vibrante.

Figura 11 - Fluxograma representando as etapas para a obtenção e avaliação dos MMIPs e MNIPs.



Fonte: Autora do trabalho.

4.1 Reagentes e Soluções

Os reagentes LipS₂, NAC, GSH, GSSG e HCys, Cys foram adquiridos da Sigma-Aldrich, as soluções estoques foram preparadas diariamente, antes das medidas voltamétricas. Os tampões: Britton-Robinson (H₃BO₃/ H₃PO₄/ CH₃COOH/ NaOH), Fosfato de sódio (NaH₂PO₄/NaOH), McIlvaine (Na₂HPO₄/C₆H₈O₇), Sorensen (Na₂HPO₄/ KH₂PO₄) foram de

grau analítico (adquirido da Sigma e Merck). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura, obtida em Milli-Q Millipore.

Para síntese e modificação das nanopartículas magnéticas os reagentes utilizados foram $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich); NH_4OH (Synth); tetraetilortossilicato (TEOS) da Acrós; 3- (trimetoxisilil) propil metacrilato (MPS) da Sigma-Aldrich, etanol e tolueno, ambos fornecidos pela Synth.

Os reagentes utilizados na a síntese dos polímeros foram GSH, alilamina, acrilamida, trimetilolpropano trimetacrilato (TRIM), etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e 2,2-azobisisobutironitrila (AIBN), todos fornecidos pela Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados foram acetonitrila e metanol da Panreac, tolueno e ácido acético glacial da Synth.

4.2 Equipamentos

Todas as experiências eletroquímicas foram realizadas num potenciostato Autolab-tipo II (Eco Chemie, Holanda) acoplado a um microcomputador controlado pelo software GPES (*General Purpose Electrochemical Software*) para controle de potencial e aquisição de dados. Para ajuste do pH das soluções tampões, foi utilizado um medidor de pH calibrado (Quimis Q-400MT, Diadema, SP, Brasil). O estudo da temperatura foi realizado e controlado com a ajuda de um banho ultra-termostático (Solab, modelo SL-152/10), em célula de vidro dividida, encamisada, adquirida da Labsolution.

As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis com arranjo linear de diodos da Bel Photonics modelo UV-M 51, comandado pelo programa UV Professional. Todas as medidas foram realizadas utilizando cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e em comprimentos de onda no intervalo de 370 a 800 nm.

Para a caracterização magnética foi usada a técnica de magnetometria de amostra vibrante (VSM- do inglês *Vibrating Sample Magnetometer*) o equipamento LakeShore VSM série 7300. As medidas foram realizadas pelo Dr. Luis Alvares, pesquisador do Centro Atômico Bariloche, Divisão de Ressonâncias Magnéticas, Argentina.

Para as medidas no infravermelho por transformada de Fourier foi empregado um espectrômetro FT-IR Vertex 70 da Bruker, com uma fonte de laser e detector L-alanina dopado com sulfato de triglicina deuterada (DLaTGS), utilizando uma faixa de leitura de 4000 a 400

cm⁻¹. A análise foi realizada diretamente nas amostras sólidas ou líquidas, no modo de refletância total atenuada.

A morfologia dos polímeros foi analisada utilizando a técnica de microscopia eletrônica de varredura com campo de emissão (MEV-FEG; Jeol JSM 6330F), onde as nanopartículas e os polímeros foram dispersos em álcool isopropílico e colocados em um banho ultrassom (Unique modelo USC – 1400) por 10 min, os polímeros foram recobertos com ouro, para posterior análise no microscópio.

4.3 Medidas Eletroquímicas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em uma célula eletroquímica convencional, utilizando três eletrodos: um eletrodo de trabalho (CV ou DDB), um eletrodo auxiliar (fio de platina) e um eletrodo de referência (Ag/AgCl, KCl sat.).

4.3.1 Pré-tratamento da superfície do eletrodo CV

Inicialmente, a superfície do eletrodo de carbono vítreo (CV) foi lixada sequencialmente com lixas de carvão de silício de granulometria 600, 1200 e 2000 (3M do Brasil, São Paulo-SP). Em seguida, o eletrodo foi lavado com água purificada e, posteriormente, imerso em água em um sistema de banho ultrassom, por cerca de dez minutos, para a remoção de possíveis partículas de carvão de silício impregnadas na superfície do eletrodo.

Em seguida, o eletrodo de CV foi submetido a um polimento manual, com suspensão aquosa de granulações de alumina 1,00; 0,30 e 0,05 µm (Micropolishing Material, Buehler Ltda). Após o polimento, o eletrodo foi lavado com água purificada, e posteriormente, imerso em água purificada e levado para um sistema de banho ultrassom por cerca de dez minutos, para a remoção de possíveis partículas de alumina da sua superfície.

A área eletroativa do eletrodo CV (0,056 cm²) foi calculada empregando a equação de Randles-Sevcik (Equação 9) (BARD; FAULKNER, 2001; LAVIRON, 1979):

$$I_p = 2,69 \times 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot A \cdot C \cdot D \cdot v^{1/2} \quad \text{Equação 9}$$

onde I_p é a corrente de pico, A a área eletroativa (cm²), D o coeficiente de difusão (6,2 x 10⁻⁶ cm² s⁻¹), n o número de elétrons da reação, v a velocidade de varredura (V s⁻¹) e C a concentração da espécie em solução (mol cm⁻³), empregando a técnica de voltametria cíclica em diversas

velocidades de varredura e solução de ferricianeto de potássio ($K_3(Fe(CN)_6)$) 2 mmol L^{-1} em KCL $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

4.3.2 Pré-tratamento da superfície do eletrodo de DDB

O eletrodo de DDB foi, inicialmente, lavado com água deionizada, em seguida, limpou-se suavemente com um pedaço de pano de seda úmido até obter uma aparência espelhada (com mínima probabilidade de danos mecânicos da superfície). Posteriormente, foi pré tratado anodicamente, aplicando o potencial de $+2 \text{ V}$ durante 180 s em 1 mol L^{-1} de ácido sulfúrico (H_2SO_4) para limpar a superfície do eletrodo (eliminar quaisquer impurezas) seguido de pré-tratamento catódico a -2 V durante 180 s para renovar a superfície (STANKOVIĆ; MEHMETI; KALCHER, 2016).

Antes das medidas eletroquímicas, as soluções eletrolíticas foram mantidas saturadas com gás nitrogênio (N_2) do tipo 5.0 – Gases Especiais da White Martins S.A., para eliminação de possíveis interferências causadas pelo oxigênio nas curvas corrente-potencial.

4.3.3 Aplicações em amostras de urina e saliva

As amostras de urina humana foram obtidas a partir de duas pessoas saudáveis, com idade de 25 anos. As amostras foram transferidas para a célula voltamétrica para serem analisadas, sem qualquer pré-tratamento. Estas amostras de urina foram analisadas imediatamente ou foram armazenados à baixa temperatura, até à análise. A saliva artificial foi adquirida em farmácia de manipulação (São Luis, MA, Brasil), e é composta de: 5 mmol L^{-1} de cloreto de sódio, 1 mmol L^{-1} de cloreto de cálcio, 15 mmol L^{-1} de cloreto de potássio, 1 mmol L^{-1} de ácido cítrico, 5 mmol L^{-1} de ácido úrico, 1 mmol L^{-1} de ácido ascórbico, $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de lactato, $1,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de tiocianato de potássio, 4 mmol L^{-1} de cloreto de amônio e 10 g L^{-1} de carboximetil celulose de sódio, em água.

Os testes de recuperação para NAC e GSH foram realizados para avaliar os efeitos da matriz em amostras de saliva e urina artificial usando o método de adição de padrão. Inicialmente, as amostras de urina e saliva sintética foram enriquecidos com: NAC ($1,0$ e $2,9 \mu\text{mol L}^{-1}$) e GSH ($9,8$ e $19,3 \mu\text{mol L}^{-1}$) respectivamente, para dar dois diferentes níveis de fortificação, a partir de uma solução estoque 1 mmol L^{-1} de NAC. Correntes de pico vs. as concentrações de cada analito foram construídas e as concentrações de NAC e GSH das amostras fortificadas foram determinadas.

4.3.4 Preparo das amostras farmacêuticas para as medidas eletroquímicas

As amostras NAC (cápsulas, xarope e suspensão) foram adquiridas em uma farmácia de Maceió- AL (Farmácia Homeopática Natural – FHN). De acordo com o rótulo apresentado nos frascos, cada cápsula continha 10 mg, a suspensão 2mg mL⁻¹ e o xarope 20 mg mL⁻¹ do analito. Foram utilizados o conteúdo de 5 (cinco) cápsulas, solubilizados em água deionizada. Todas as amostras foram filtradas e transferidas para um balão volumétrico. No final todas as amostras continham uma solução estoque de 1 mmol L⁻¹ de NAC.

4.4 Preparo dos MMIPs e NIPs

4.4.1 Síntese e modificação de nanopartículas de Fe₃O₄

O procedimento de síntese das nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄) é baseado no método publicado por KONG et al., 2012. Foi realizada a co-precipitação de 0,01 mmol de Fe²⁺ e 0,02 mmol de Fe³⁺ em meio básico. Para isso, solubilizou-se os sais de ferro em 80,0 mL de H₂O, com agitação vigorosa (800 rpm) sob nitrogênio. O precipitado das MNPs foi separado com um ímã permanente e lavado com água, para remover os produtos químicos não reagidos e depois secado no vácuo. Posteriormente, 300 mg de MNPs foram dispersos em 40 mL de etanol, em meio básico e colocados no banho ultrassom durante 15 min, seguido da adição de 2 mL de tetraetilortossilicato (TEOS). Deixou-se a mistura reagir durante 12 h à temperatura ambiente por agitação (400 rpm). Os produtos foram coletados por separação magnética, lavados com ácido clorídrico diluído e água ultrapura e secados no vácuo. Os MNPs de Fe₃O₄ @ SiO₂ foram modificados por MPS, através da dispersão de 250 mg dos MNP Fe₃O₄ @ SiO₂ em 50 mL de tolueno anidro contendo 5 mL de MPS e deixou-se reagir a mistura durante 12 h sob nitrogênio. Após separação magnética, lavou-se com água e secou-se no vácuo, obtendo-se os produtos (Fe₃O₄@ SiO₂-C=C).

4.4.2 Simulação computacional

A otimização da síntese dos MIPs para GSH em relação ao monômero funcional mais adequado foi realizada usando modelagem molecular computacional. Para tal foram usados os programas (WONG et al., 2015): (i) HyperChem® 8.0.5: utilizado para modelagem das moléculas a serem utilizadas na síntese dos MIPs. (ii) OpenEye® (pacote de softwares) contendo os programas: VIDA 3.0.0: utilizados para visualizar as moléculas modeladas para conferir possíveis erros de ligações entre átomos. Omega2: Gera diversos confôrmeros das

moléculas, o que torna possível levar em consideração possíveis impedimentos espaciais. Por padrão, são gerados 10 confôrmeros de cada analito, sendo escolhidos 3 ao acaso para realizar os testes simulatórios. Szybki 1.2.2: Programa que leva a molécula até seu estado de menor energia e, portando, mais estável. (iii) *AutoIt 3.3.6.0*: Aplicativo que utiliza linhas de comandos (*scripts*) para automatizar processos repetitivos durante a modelagem molecular, eliminando erros humanos durante os procedimentos. (iv) *Multiple Minima Hypersurfaces (MMH)* com MOPAC (Molecular Orbital PACkage) 2009: utilizado para realizar as simulações propriamente ditas. Este programa faz a aproximação dos monômeros com a molécula que será usada como molde, calculando a energia liberada, resultando assim a afinidade entre os mesmos. MOPAC é um utilitário que emprega química quântica semi-empírica para os cálculos de aproximação.

4.4.3 Síntese do MMIPs e MNIPs

A síntese dos polímeros impressos (MIPs) e não impressos (NIPs) sobre as nanopartículas magnéticas funcionalizadas, gerando MMIPs e MNIPs para GSH, foi realizada pelo método de precipitação. Para isso, 1,5 mmol de GSH (como molécula molde, 3 mmol de alilamina ou acrilamida (como monômero funcional) e 100 mL de 3:1 acetonitrila/tolueno (usado como solvente porogênico) foram dissolvidos em 8 mL de água. A mistura foi deixada interagir por 2 h, sob agitação constante. A seguir, 200 mg de nanopartículas de magnetita modificadas foram adicionadas a esta solução e acrescentou-se à mistura 14 mmol de EDGMA e 1 mmol de AIBN (iniciador radicalar), sendo nitrogênio borbulhado à solução continuamente em baixo fluxo, de maneira a impedir que o oxigênio interfira na polimerização. A temperatura de reação foi aumentada de 25 para 60 °C por 4 h, para o método inicial de termopolimerização. Os NIPs correspondentes foram preparados de forma semelhante, mas sem a molécula modelo, no caso GSH.

A fotopolimerização foi realizada sob as mesmas condições empregadas, no entanto o monômero estrutural utilizado foi o trimetilolpropano trimetacrilato (TRIM) e foi acionada a lâmpada de vapor de Hg de alta pressão (125 W) em tubo de quartzo sob nitrogênio por 4 h. Os NIPs correspondentes foram preparados de forma semelhante, mas sem a molécula modelo.

Em seguida, o polímero obtido foi colocado para lavagem em sistema Soxhlet. Nas primeiras 24 h, foram lavadas com água ultrapura para a retirada da molécula molde, após, 24 h foram lavadas com 100 mL da proporção 70/30 (v/v) metanol: ácido acético, para remoção

do excesso de reagentes da síntese e depois mais 24 h com 100 mL de água. Com o intuito de verificar a eficiência de remoção da GSH do polímero, as soluções do solvente de lavagem foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis a cada 12 h.

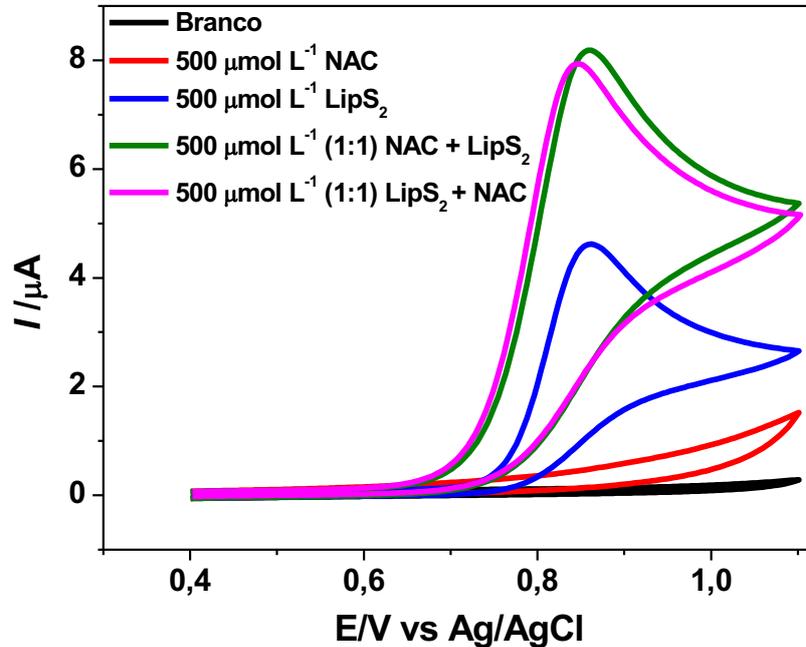
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Determinação eletroanalítica de NAC e GSH usando CV

5.1.1 Estudo do comportamento voltamétrico da oxidação do ácido LipS₂ e NAC sobre o eletrodo CV.

Os perfis de oxidação de NAC e LipS₂, foram investigadas por VC no eletrodo de CV, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7. A faixa de potencial usada foi de 0,4 - 1,1 V vs. Ag/AgCl e velocidade de varredura de 10 mV s⁻¹. A Figura 12 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados, na ausência do analito (branco), o qual não apresenta qualquer pico voltamétrico (processo faradaico), ou seja, não se observa transferência de elétrons na interface eletrodo-eletrólito e a corrente observada é de natureza capacitiva. Após a adição de 500 μmol L⁻¹ de NAC, na região de oxidação, a análise dos voltamogramas cíclicos mostra que não há pico definido e apenas um pequeno aumento de corrente (1,5 μA) foi observado. De forma diferente, o perfil mostrado por LipS₂ (500 μmol L⁻¹), apresenta um pico de oxidação intenso em torno 0,85 V vs. Ag/AgCl, com uma corrente de 5 μA aproximadamente. Surpreendentemente, a adição de NAC à solução de LipS₂ provoca um aumento significativo na corrente de pico a 0,85 V vs. Ag/AgCl (corrente de cerca de 8,0 μA). Comportamento similar foi observado, quando LipS₂ foi adicionado à solução de NAC, com semelhança de corrente de oxidação na presença dos dois analitos. Com base neste primeiro resultado, é evidente que LipS₂ e NAC interagem, em solução, o que leva ao aumento da onda de oxidação, relacionada à oxidação de LipS₂, sugestivo de um aumento de sua concentração, na superfície do eletrodo.

Figura 12 - Voltamogramas cíclicos registrados em eletrodo CV, tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7, registrados na ausência de analito (branco), na presença de NAC (500 μmol L⁻¹), na presença de LipS₂ (500 μmol L⁻¹), com ambos os analitos, LipS₂ (500 μmol L⁻¹) + NAC (500 μmol L⁻¹) e NAC (500 μmol L⁻¹) + LipS₂ (500 μmol L⁻¹).



Fonte: Autora do trabalho.

5.1.2 Estudo da velocidade de varredura

Para compreendermos melhor o processo de oxidação do LipS₂ no eletrodo CV, foi realizado o estudo de velocidade somente na presença de LipS₂ de acordo com a Figura 13. A partir destes dados, foi construído o gráfico de corrente de pico anódica (I_{pa}) em função de $(v)^{1/2}$, resultando numa dependência linear (Figura 14), ou seja, um processo eletroquímico irreversível e com controle difusional expresso pela Equação 10 (BARD; FAULKNER, 2001):

$$I_{pa} = (2.99 \times 10^5) n(\alpha n_{\alpha})^{1/2} A C_o^* D_o^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Equação 10}$$

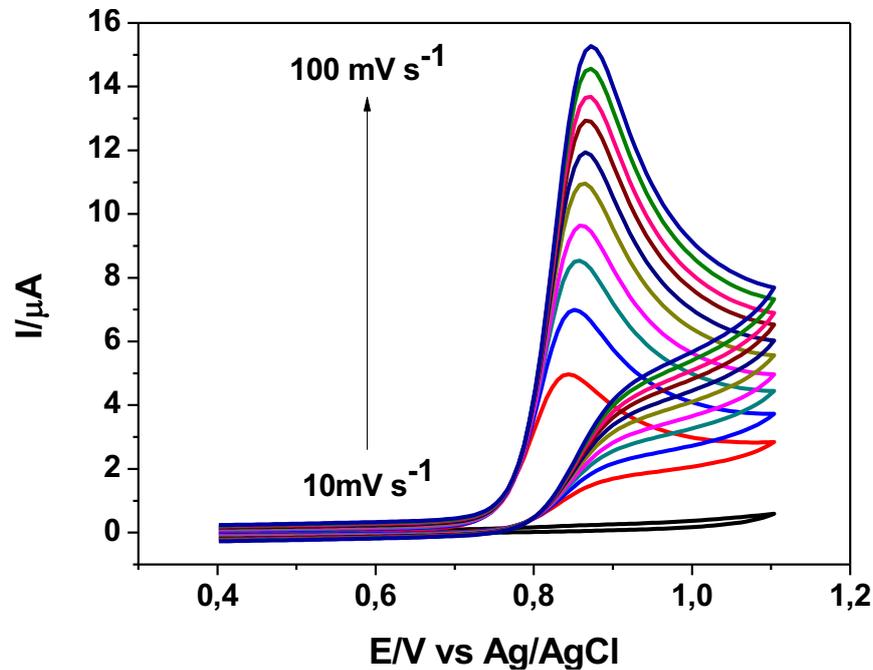
onde n representa o número total de elétrons envolvidos na reação de oxidação de LipS₂; A , a área do eletrodo de trabalho (0,056 cm²); “ αn_{α} ” o parâmetro que reflete a irreversibilidade da reação e; “ D_o ” (cm² s⁻¹), o coeficiente de difusão da espécie eletroativa em solução (1,1x10⁻⁵ cm² s⁻¹); C_o^* (mol cm⁻³), a concentração dessas espécies (CORDUNEANU; GARNETT; BRETT, 2007).

O parâmetro αn_a na Equação 10 pode ser determinado através potencial de pico (E_p) e o potencial de pico de meia onda ($E_{p/2}$), de acordo com a Equação 11 (BARD; FAULKNER, 2001):

$$|E_p - E_{p/2}| = \frac{47.7}{\alpha n_a} mV \quad \text{Equação 11}$$

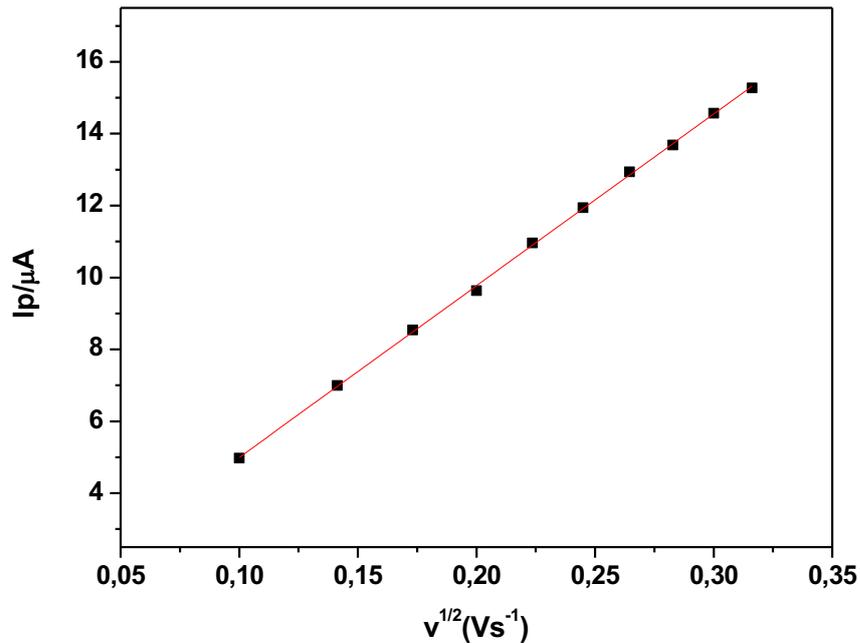
Assim, o valor para αn_a foi determinado como sendo de aproximadamente 0,85 para LipS₂. Substituindo-se este valor na Equação 10, foi possível obter um valor para n de 1,74, aproximadamente 2 elétrons na oxidação de LipS₂.

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos da oxidação de LipS₂ registrados sobre o eletrodo de CV, em diferentes velocidades de varredura do potencial, contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS₂, em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato pH 7.



Fonte: Autora do trabalho.

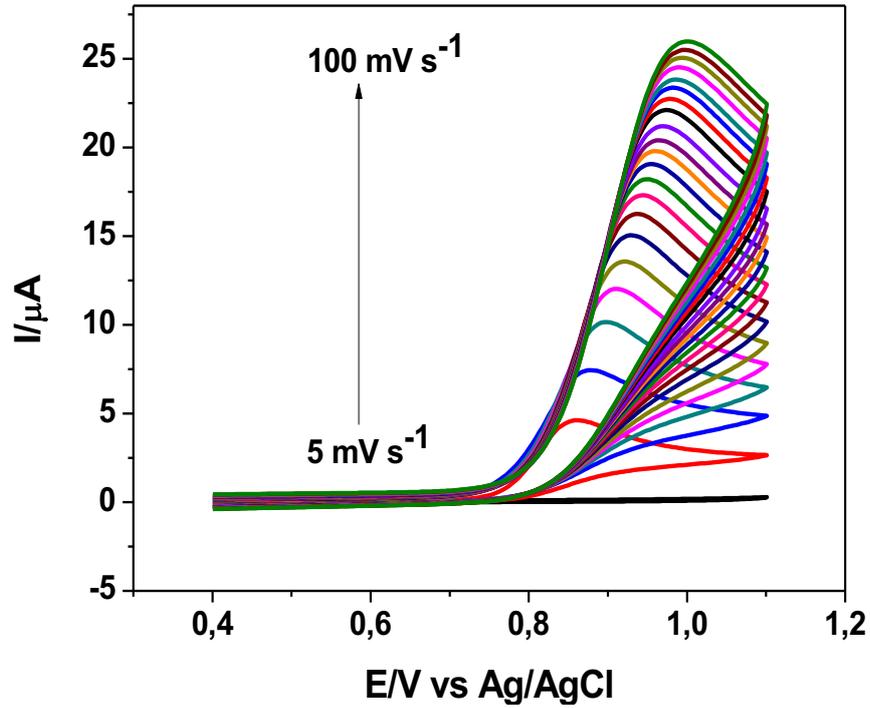
Figura 14 - Gráfico da dependência de I_p com $(v)^{1/2}$, dados extraídos da Figura 13.



Fonte: Autora do trabalho

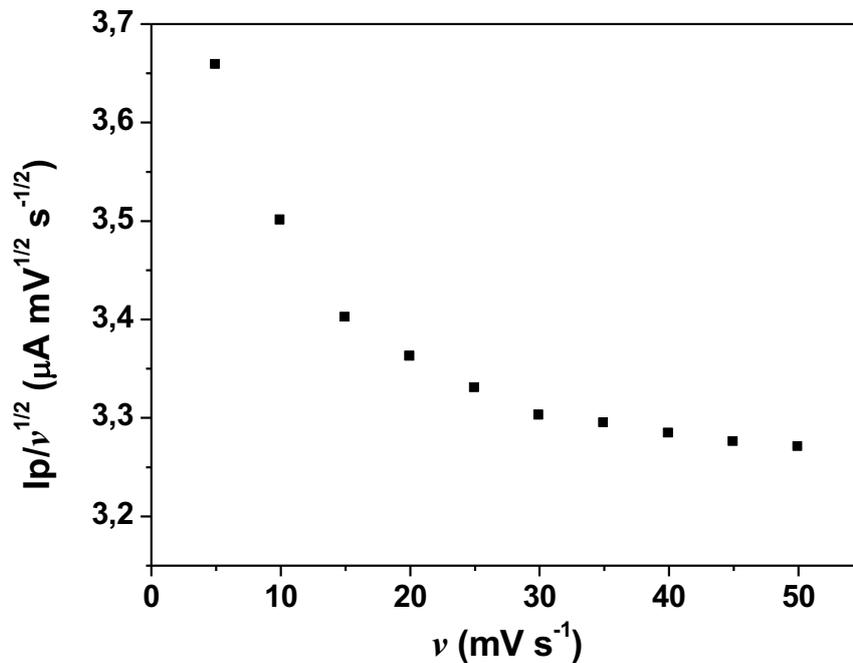
A Figura 15 apresenta os voltamogramas cíclicos, registrados em diferentes velocidades de varredura (v) para a oxidação da mistura reacional $LipS_2$ e NAC, sobre o eletrodo de CV. Os voltamogramas apresentados mostram que há um aumento do sinal analítico (correntes anódicas), com o aumento da velocidade de varredura do potencial. Esses estudos indicam que há uma reação química acoplada no processo de oxidação da NAC, portanto um gráfico da razão entre a corrente e a velocidade de varredura ($I_p/v^{1/2}$) vs. velocidade de varredura foi construído (Figura 16) e apresenta o comportamento característico típico de um processo EC' , no qual a função de corrente a baixas velocidades de varredura apresenta elevados valores de I_p e a altas velocidades de varredura, a função de corrente converge para o coeficiente angular da curva I_p vs. $v^{1/2}$. A partir destes dados, foi construído o gráfico de I_p em função de $(v)^{1/2}$, o qual resultou numa dependência linear (Figura 17), ou seja, de acordo com o esperado para um processo eletroquímico irreversível, com controle difusional.

Figura 15 - Voltamogramas cíclicos da oxidação de LipS₂ + NAC registrados sobre o eletrodo CV, em diferentes velocidades de varredura do potencial, com 500 μmol L⁻¹ de LipS₂ + 500 μmol L⁻¹ de NAC, em 0,1 mol L⁻¹ de tampão fosfato pH 7.



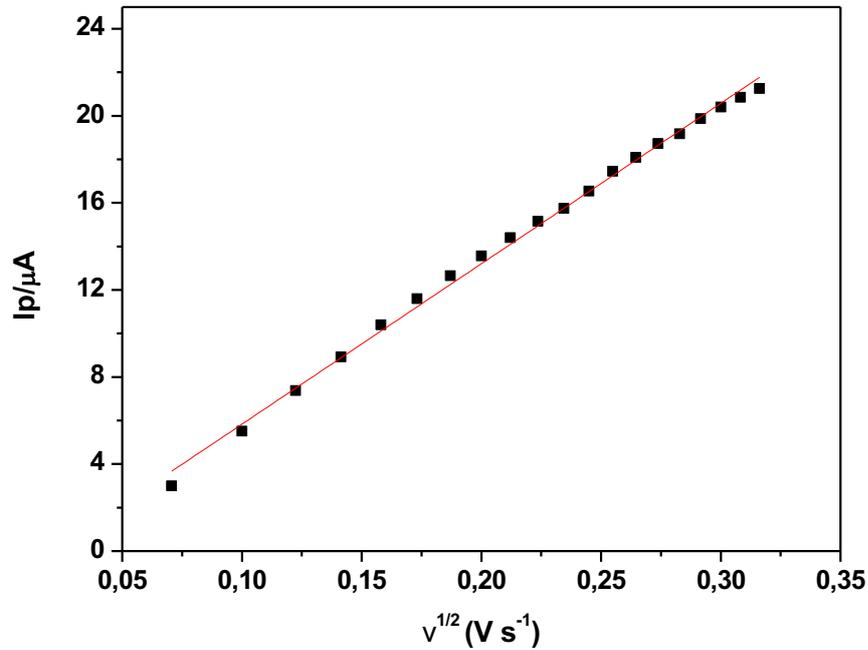
Fonte: Autora do trabalho.

Figura 16 - Gráfico de $I_{pa}/v^{1/2}$ vs. v para a oxidação de LipS₂ na presença de NAC. Dados extraídos da Figura 15.



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 17 - Gráfico da dependência de I_{pa} com $(v)^{1/2}$ para a oxidação de LipS₂ na presença de NAC, dados extraídos da Figura 15.



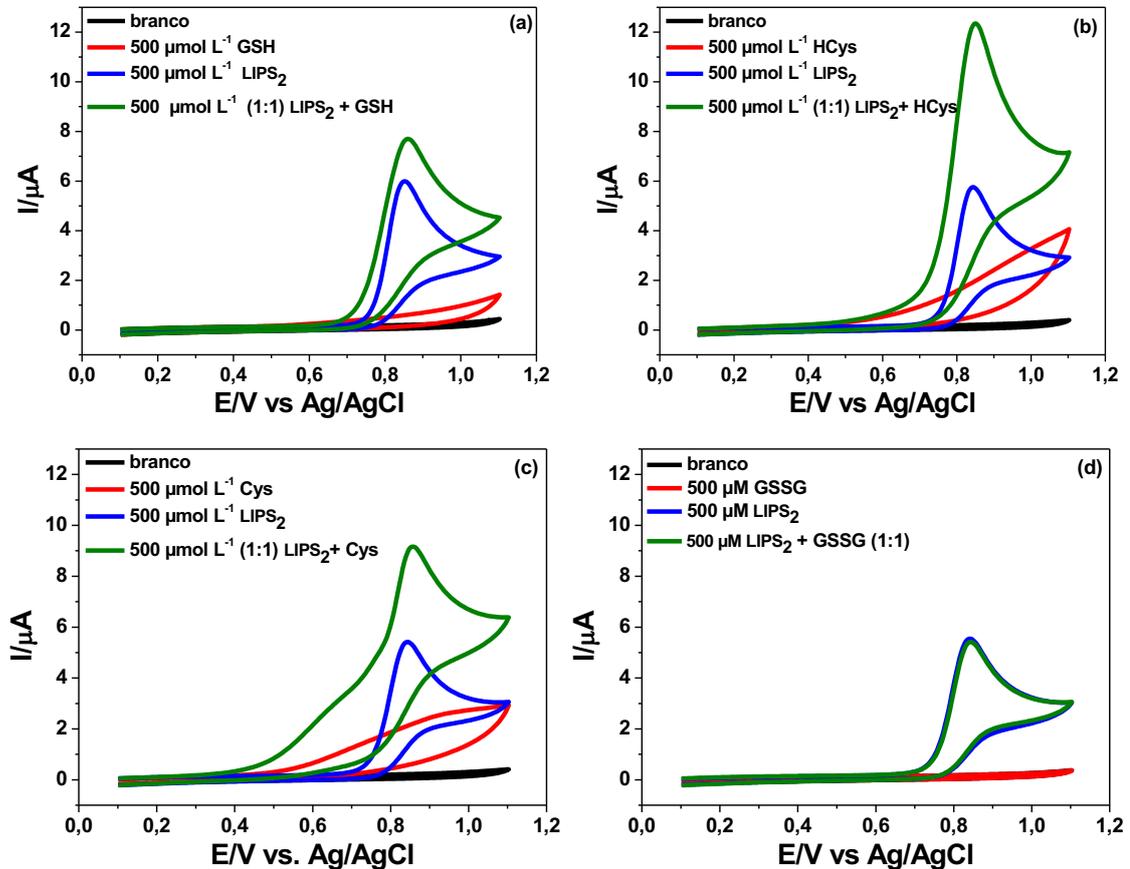
Fonte: Autora do trabalho.

5.1.3 Estudo da oxidação do LipS₂ sobre o eletrodo CV com outros tióis

Para avaliar o perfil de oxidação de LipS₂ frente a outros tióis, ele foi investigado, na presença de: GSH, GSSG, HCys e Cys (Figura 18).

De acordo com os voltamogramas, podemos observar que a adição dos tióis GSH (Figura 18a), HCys (Figura 18b), Cys (Figura 18c) à solução de LipS₂, provoca o aumento da corrente anódica de LipS₂. No entanto, na presença da GSSG (Figura 18d), a corrente de oxidação continua a mesma. Estas experiências indicam que LipS₂ é oxidado, em 0,85 V, no eletrodo CV, e, que, provavelmente, devido ao aumento de corrente, é regenerado por reação com tióis ou intermediários, em solução.

Figura 18 - Os voltamogramas cíclicos registrados no eletrodo CV, em tampão Fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes tióis: (a) branco, GSH, LIPS₂, e LIPS₂ + GSH (1:1); (b) branco, HCys, LIPS₂, LIPS₂+ HCys (1:1); (c) branco, Cys, LIPS₂, LIPS₂+ Cys(1:1); (d) branco, GSSG, LIPS₂, e LIPS₂ + GSSG (1:1). Todos os analitos com concentração de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$.



Fonte: Autora do trabalho.

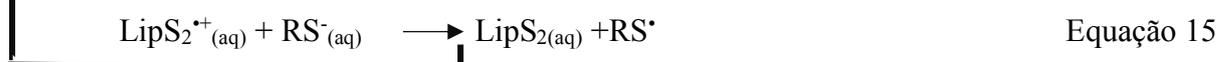
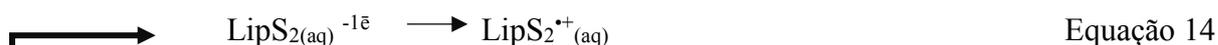
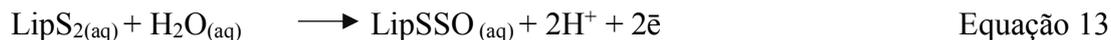
Há uma diversidade de estados de oxidação de enxofre e grupos funcionais à base de enxofre, espelhado por um comportamento redox complexo, que transcende as reações clássicas de transferência de 1 ou 2 elétrons (TRUJILLO; ALVAREZ; RADI, 2016). O enxofre prontamente participa na química radicalar e em reações de transferência de hidreto. Ele também sofre alterações em seu estado redox como parte do sistema “tiol / dissulfeto” em reações de troca (Equação 12) (TRUJILLO; ALVAREZ; RADI, 2016):



A última reação (Equação 12) é a base para o bem conhecido ensaio de Ellman estequiométrico colorimétrico (Figura 7) (ELLMAN, 1959; RIDDLES; BLAKELEY; ZERNER, 1983) e modificado (HANSEN et al., 2009).

Certamente, as oxidações dos tióis NAC, GSH, HCys e Cys são facilitadas por LipS₂, que desempenha papel de mediador eletroquímico homogêneo. O dissulfeto (GSSG) não é afetado. Um possível mecanismo pode ser proposto. No presente caso, LipS₂, por si só, sofre oxidação, via 2 elétrons (conforme resultados já apresentados), conduzindo provavelmente para o sulfóxido (representada como LipSSO) e outros produtos, bem como relatado na literatura (MCNEIL et al., 2015; MIRANDA et al., 2012) (Equação 13). No entanto, na presença de tiolatos (representada como RS⁻), LipS₂ sofre uma oxidação de 1 elétron com a formação de um cátion radical tiol reativo (LipS₂^{•+}) (Equação 14), que, na presença de ânions tiolato (RS⁻, a partir de GSH, NAC ou HCys), é regenerado (LipS₂), dando origem a radicais tiola (RS[•]), como intermediários (Equação 15). Estas espécies reagem com outras semelhantes, que conduzem, finalmente, para os dissulfetos (RSSR), na ultima etapa (Equação 16).

A reação é interrompida, na ausência de tiolatos (já consumidos em reações de dimerização), o que conduz, finalmente, aos produtos finais estáveis, LipSSO (Equação 12) e RSSR (Equação 16). Quando LipS₂ encontra outros dissulfetos, como é o caso da GSSG, nenhuma reação ocorre (Figura 18d).

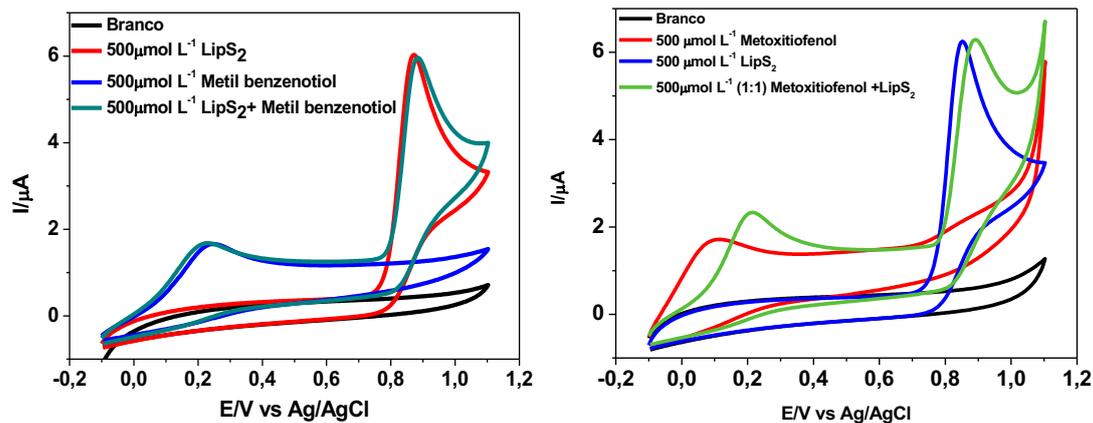


Em resumo, LipS₂ é oxidado no eletrodo, mas é regenerado por tiolatos, em solução. A plena compreensão do mecanismo está sob investigação. Os parâmetros eletroquímicos, principalmente a cinética reacional, dependem da reatividade dos diferentes radicais tiola, como evidenciado pelo aumento de corrente de oxidação combinada, diferente para cada tiol, em concentração similar.

O perfil voltamétrico de LipS₂, foi investigado na presença de tióis aromáticos: metilbenzenotiol e metoxitiofenol. A Figura 19a apresenta os voltamogramas cíclicos referentes ao metilbenzenotiol, que apresenta um potencial de pico em torno de 0,25 V vs Ag/AgCl ao adicionar LipS₂ em solução nenhuma alteração na corrente de pico foi observada, indicando que não ocorre interação entre esses tióis. Um perfil semelhante foi observado para o

metoxitiofenol (Figura 19b) que apresenta um potencial de pico em torno de 0,1 V vs Ag/AgCl, onde a adição de LipS₂ não interferiu na corrente de pico. Estes resultados indicam que a metodologia não pode ser aplicada em compostos aromáticos, pois eles são facilmente oxidados, impedindo assim a interação com LipS₂.

Figura 19 - Os voltamogramas cíclicos no eletrodo CV, em tampão Fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes tióis: (a) branco, Metilbenzenotiol, LIPS₂, e LIPS₂ + Metilbenzenotiol (1: 1); (b) branco, Metoxitiofenol, LIPS₂, LIPS₂+ Metoxitiofenol (1: 1) Todos os analitos com concentração de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

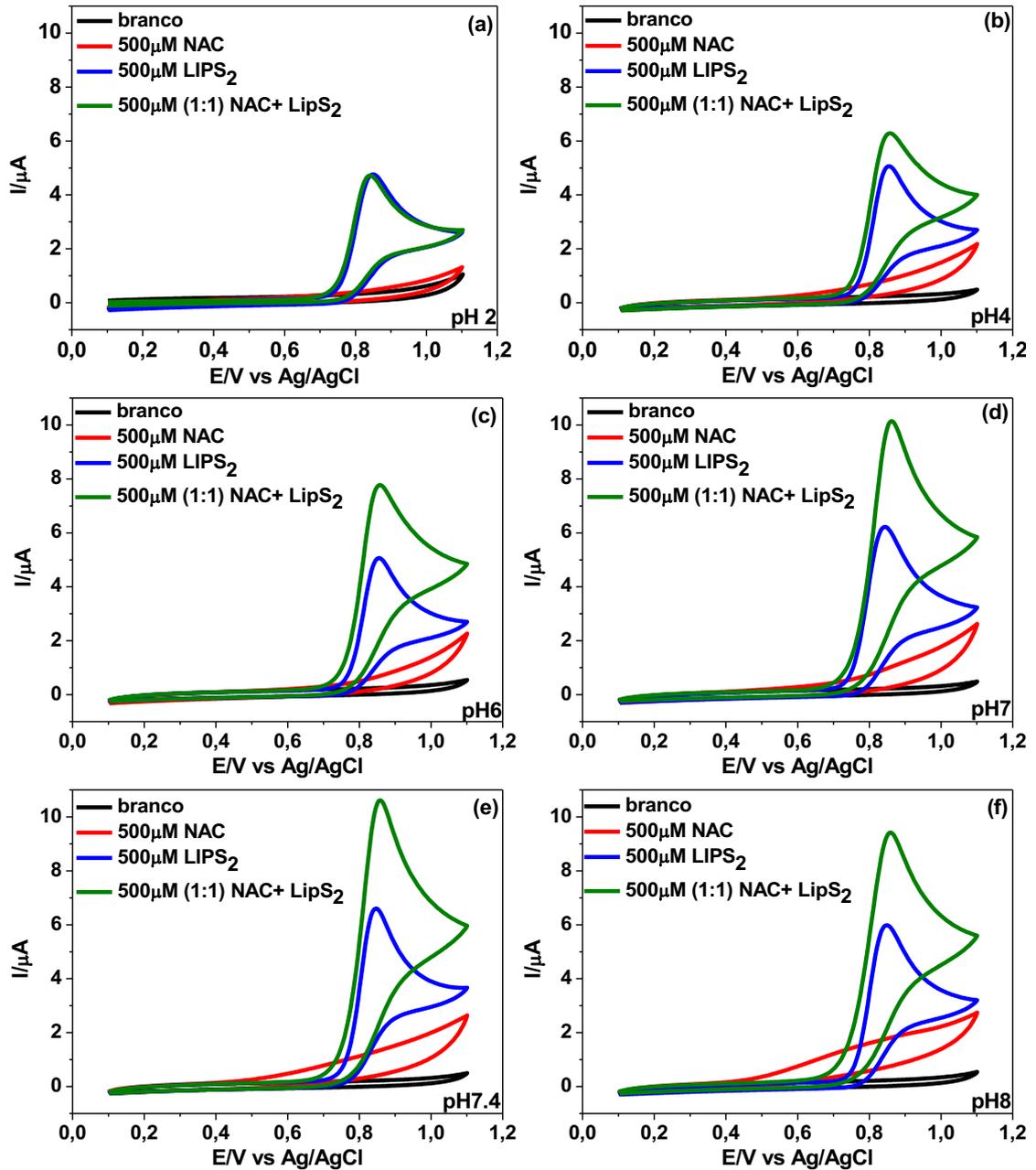


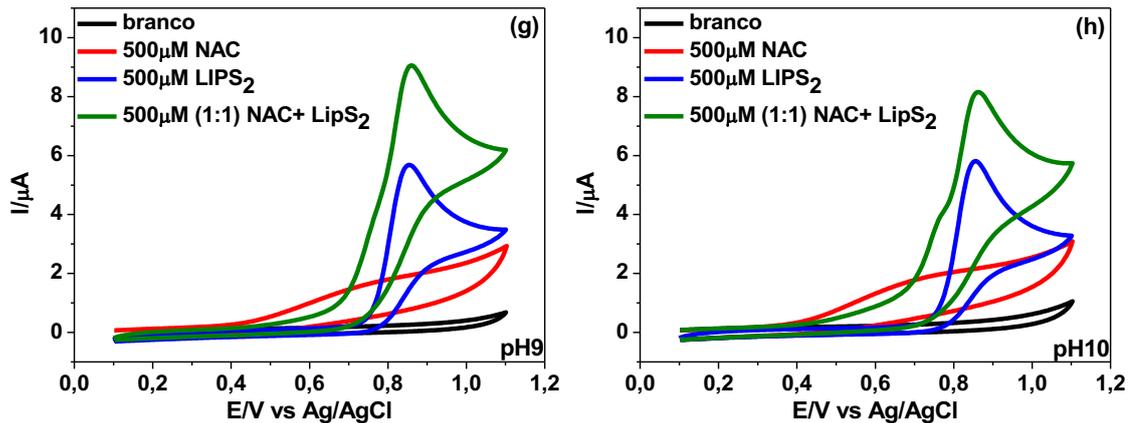
Fonte: Autora do trabalho.

5.1.4 Otimização de Parâmetros Analíticos para a determinação de NAC

Para investigar a possibilidade de estabelecer as melhores condições eletroanalíticas sobre o eletrodo CV, na oxidação de LipS₂ e tióis, principalmente NAC, experimentos para otimizar o sistema foram realizados. Inicialmente, foram feitas medidas de voltametria cíclica em uma solução tampão Britton Robinson, em diferentes valores de pH, contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC + 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS₂ (Figura 20).

Figura 20 - Voltamogramas cíclicos registrados sobre o eletrodo CV em soluções tampão Britton Robinson de diferentes valores de pH: (a) pH 2, (b) pH 4, (c) pH 6, (d) pH 7, (e) pH 7,4, (f) pH 8, (g) pH 9 e (h) pH 10, $\nu=10 \text{ mV s}^{-1}$.



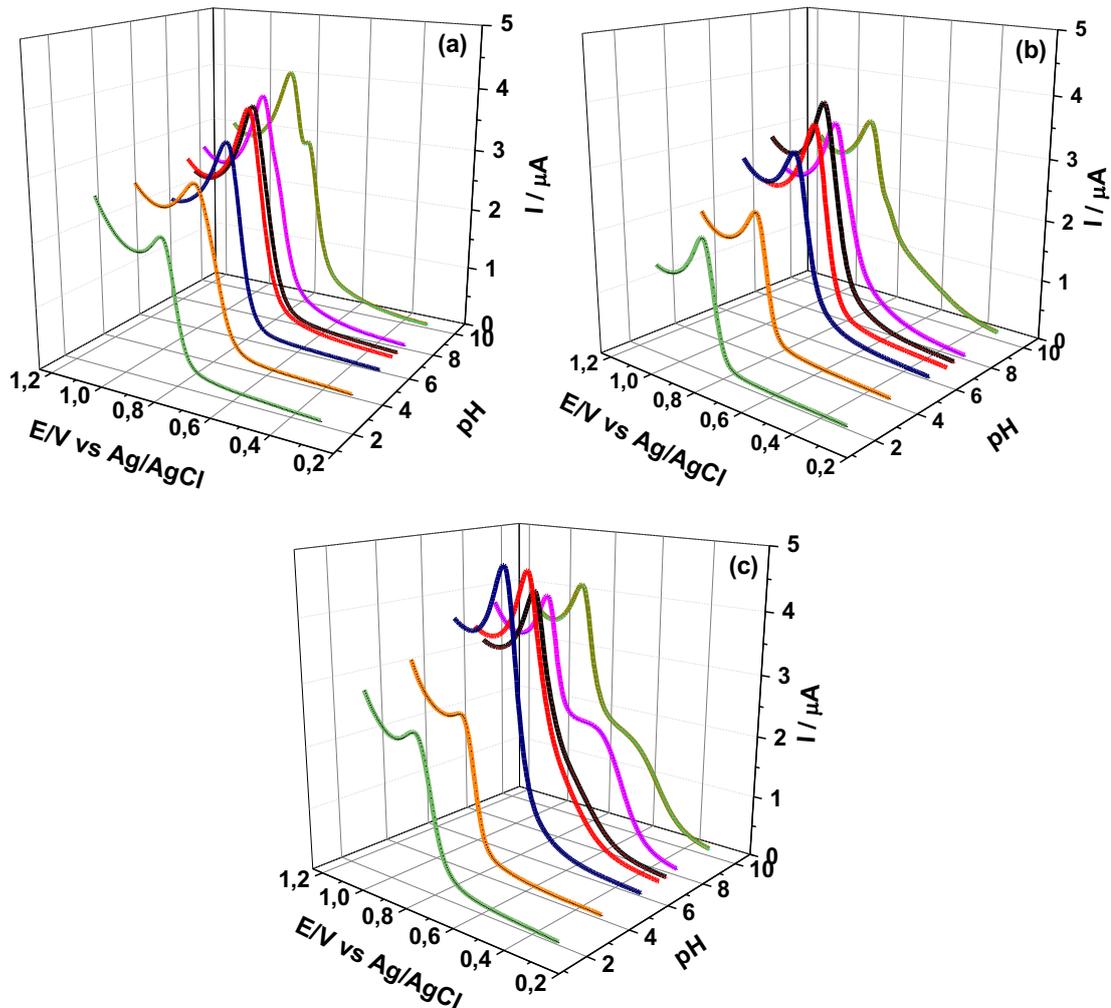


Fonte: Autora do trabalho.

Os estudos, em diferentes valores de pH, permitem evidenciar que, em valores de pH entre 2 a 4, não há uma interação significativa entre o LipS₂ e a NAC. Por outro lado, em tampões com valores de pH entre 6 e 10, evidenciou-se intensa resposta voltamétrica, após a adição da NAC às soluções contendo LipS₂. Neste sentido, a resposta eletroquímica da NAC assistida pelo LipS₂ é fortemente dependente do pH, bem como é favorecida em meios de pH neutro e entre os pKa do LipS₂ (pKa 4,7: -COOH) e da NAC (pKa 3,24: -COOH e 9,5: -SH). Em valores de pH acima de 8 (Figura 20 f, g e h), podemos observar um segundo Ep em torno de 0,75 V vs Ag/AgCl, provavelmente devido à presença de formas dissociadas, no caso, o tiolato, mais facilmente oxidável. Assim, o pH ideal para estudos posteriores foi estabelecido como 7,4 por apresentar maior corrente e além disso, o pH fisiológico é de aproximadamente 7,4, o que facilita a aplicação e o estudo desta interação em amostras biológicas.

Ao avaliar que a resposta eletroquímica é dependente do pKa do tiol estudado, realizou-se o estudo de influência do valor de pH na oxidação dos tióis (Figura 21).

Figura 21 - Voltamogramas de varredura linear registrados sobre o eletrodo CV em soluções tampão Britton Robinson de diferentes valores de pH: 2; 4; 6; 7; 7,4; 8 e 10, contendo 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de cada analito: (a) GSH + LipS₂, (b) HCys + LipS₂, (c) Cys + LipS₂, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



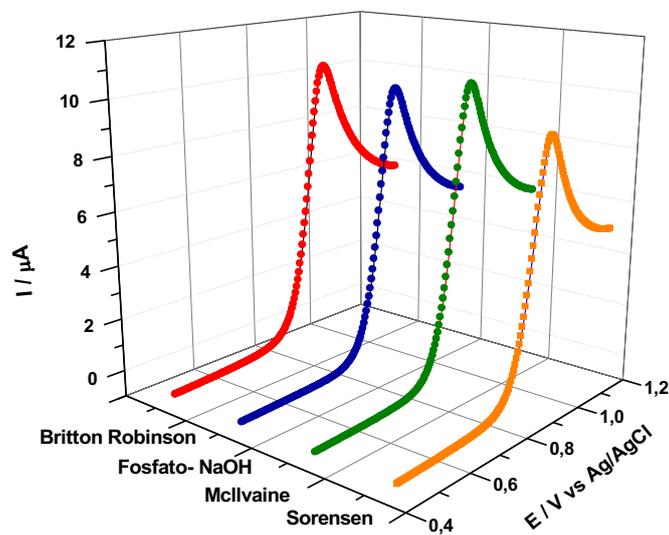
Fonte: Autora do trabalho

Nos tióis estudados, GSH ($\text{pK}_{\text{a}1\text{COOH}} = 3,69$, $\text{pK}_{\text{a}2\text{SH}} = 8,75$, $\text{pK}_{\text{a}3\text{NH}_3^+} = 9,65$), HCys ($\text{pK}_{\text{a}1\text{COOH}} = 2,22$, $\text{pK}_{\text{a}2\text{SH}} = 8,87$, $\text{pK}_{\text{a}3\text{NH}_3^+} = 10,86$) e Cys ($\text{pK}_{\text{a}1\text{COOH}} = 1,71$, $\text{pK}_{\text{a}2\text{SH}} = 8,33$, $\text{pK}_{\text{a}3\text{NH}_3^+} = 10,78$), obteve-se um comportamento semelhante ao observado com NAC. Nos valores de pH 2, não se observa interação entre LipS₂+GSH e LipS₂ + HCys; observa-se uma pequena interação para a Cys, provavelmente, devido ao valor do pH ser maior que o $\text{pK}_{\text{a}1}$ da Cys, o que não ocorre com os outros tióis que possuem o $\text{pK}_{\text{a}1}$ maior que 2. Para GSH, HCys e Cys, o maior valor de I_p obtido foi para os valores de pH entre 6 e 8. Em valores de pH acima de 8, a Cys apresenta um segundo pico em torno de +0.6 V vs Ag/AgCl, com facilitação da oxidação, provavelmente devido à dissociação da ligação S-H. Estes resultados indicam claramente que os vários equilíbrios hidrogeniônicos são fatores importantes nas reações baseadas em tiol, em termos intermoleculares, com atrações e repulsões eletrostáticas, como

em reações redox. No presente caso, é uma relação entre a atração eletrostática entre os intermediários eletrogerados e a oxidação mais fácil dos tiolatos (RS^-) em relação aos tióis correspondentes (RS^H).

O segundo parâmetro avaliado foi a influência da natureza da solução tampão no comportamento oxidativo de $LipS_2$ e NAC, em eletrodo de CV. Experimentos similares foram realizados em 4 (quatro) soluções tampão: 1) Britton-Robinson, 2) Fosfato ($NaH_2PO_4/NaOH$), 3) McIlvaine ($Na_2HPO_4/ C_6H_8O_7$), Sørensen (Na_2HPO_4/ K_2HPO_4), em pH 7,4, e os resultados são apresentados na Figura 22. As soluções-tampão McIlvaine e Britton-Robinson foram as que provocaram uma maior magnitude de corrente. O tampão McIlvaine foi escolhido para dar continuidade ao experimento.

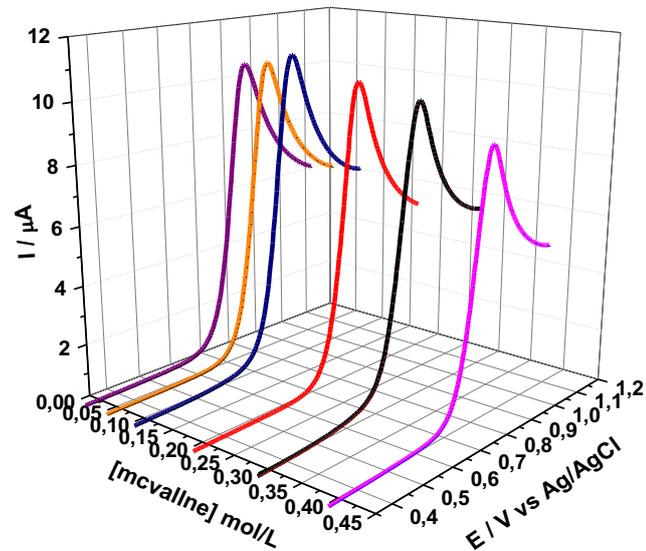
Figura 22 - Voltamogramas de varredura linear registrados sobre o eletrodo CV em diferentes soluções tampão em pH 7,4 contendo $500 \mu mol L^{-1}$ de NAC + $500 \mu mol L^{-1}$ de $LipS_2$, $v = 10 mV s^{-1}$.



Fonte: Autora do trabalho.

A partir dos dados obtidos, realizou-se o estudo da concentração do tampão (Figura 23), onde se pode observar que a resposta voltamétrica de $LipS_2 + NAC$ não foi influenciada significativamente pela concentração do eletrólito de suporte. Assim, uma solução de tampão McIlvaine $0,1 mol L^{-1}$ foi escolhida como eletrólito de suporte para dar continuidade aos experimentos.

Figura 23 - Voltamogramas de varredura linear registrados sobre o eletrodo de CV, em soluções tampão Mcllvaine de diferentes concentrações, contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC + $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS_2 , pH 7,4, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

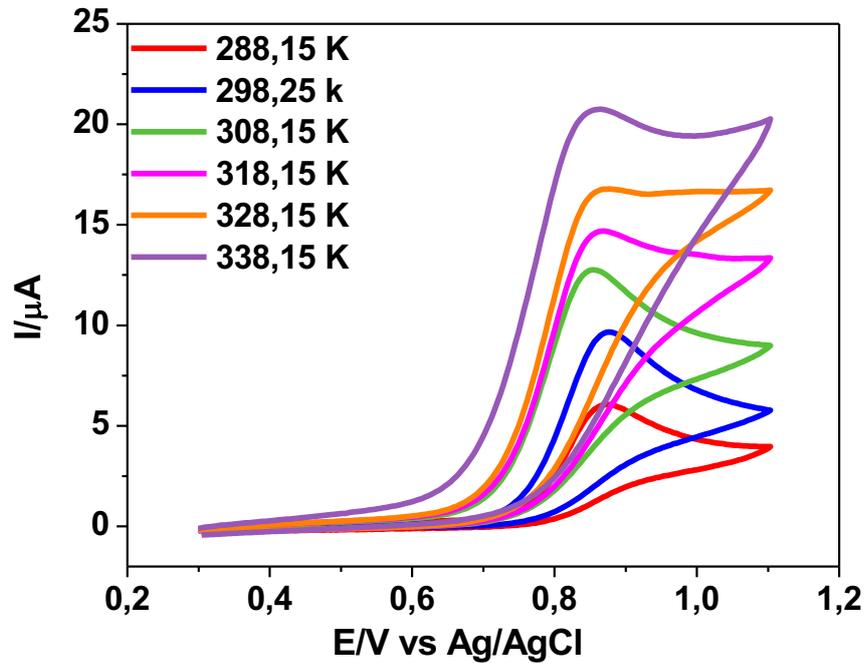


Fonte: Autora do trabalho.

5.1.5 Influência da temperatura

Estudos da variação de temperatura foram realizados para verificar o comportamento cinético da oxidação $\text{LipS}_2 + \text{NAC}$ sobre eletrodo de CV. Como podemos observar na Figura 24, com o aumento da temperatura há um aumento significativo na corrente de oxidação, bem como o deslocamento para valores menos positivos de potencial de pico.

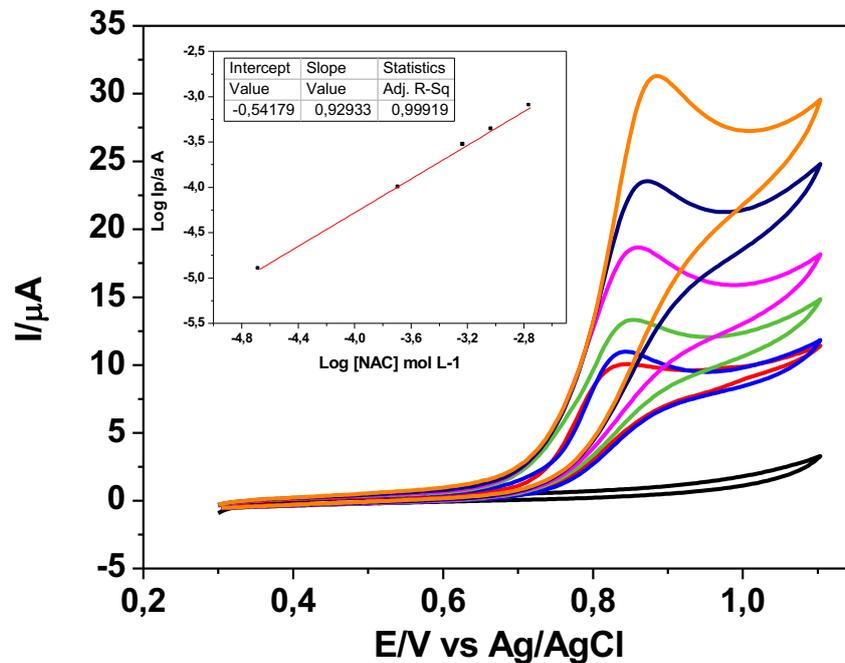
Figura 24 - Voltamogramas cíclicos registrados sobre o eletrodo CV em diferentes temperaturas: 288,15 K; 298,15 K; 308,15 K; 318,15 K; 328,15 K; 338,15 K, tampão McIlvaine, pH 7,4 contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC + $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS₂, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora do trabalho.

Para o estudo da ordem de reação, a concentração de NAC foi variada de 2×10^{-5} a $1,72 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e a concentração de LipS₂ foi mantida em $500 \mu\text{mol L}^{-1}$, para diversas temperaturas (15, 25, 35,45 e 55 °C). Com o aumento da concentração de NAC, temos um aumento na densidade de corrente como pode ser observado na Figura 25. Com base nestes experimentos, foi construído um gráfico do logaritmo de densidade de corrente ($\log I_p/A$) vs. o logaritmo da concentração [NAC], o coeficiente angular fornece a ordem da reação. Em relação ao NAC, a ordem de reação foi aproximadamente 1 em todas as temperaturas estudadas, ou seja, ao dobrarmos a concentração de NAC, a velocidade da reação dobrará.

Figura 25 - Voltamogramas cíclicos sobre o eletrodo CV, 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS₂, com a adição de diferentes concentrações de NAC, em tampão McIlvaine pH 7,4. Temperatura 55° C, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$. A inserção mostra a curva analítica.



Fonte: Autora do trabalho.

Para determinação dos parâmetros cinéticos, calculou-se o valor de k , por meio da seguinte Equação 17 (BARD; FAULKNER, 2001):

$$I_p = 0.227nFAC_o^*k^0 \exp\left[-\left(\frac{\alpha n_{\alpha} F}{RT}\right)(E_p - E^0)\right] \quad \text{Equação 17}$$

onde α é o coeficiente de transferência, F a constante de Faraday, k^0 a constante heterogênea de velocidade de transferência de elétrons na reação, n o número de elétrons transferidos, e E^0 é o potencial formal. Os valores de k^0 são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Análise da variação de k^0 em função da temperatura.

Temperatura (K)	$k \text{ s}^{-1}$ [NAC]
288,15	0,0456
298,15	0,0474
308,15	0,0502
318,15	0,0538
328,15	0,0626

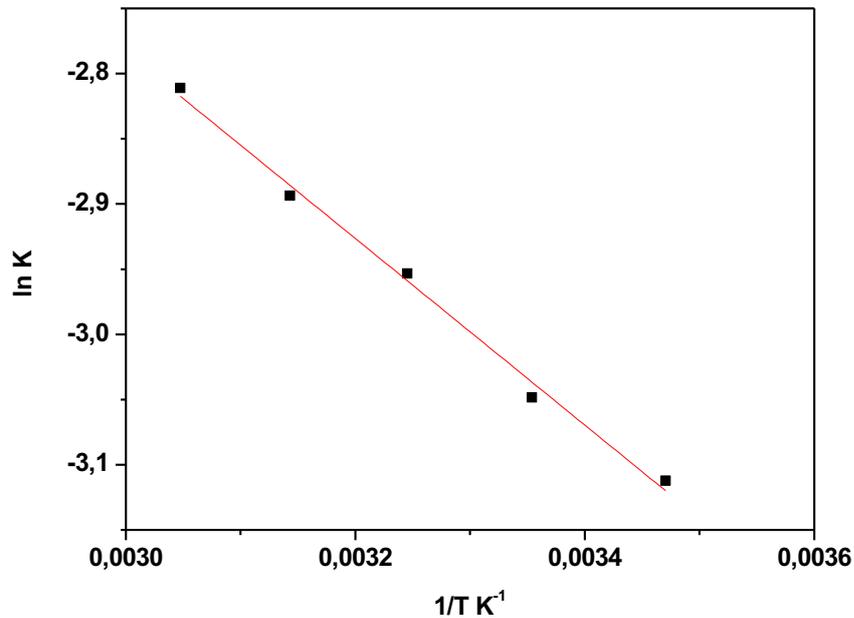
Fonte: Autora do trabalho.

A partir dos valores obtidos de k^0 foi construído um gráfico de $\ln k$ versus $1/T$ em relação à constante para NAC (Figura 26), de acordo com a equação:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\frac{k_b}{h} + \left(\frac{\Delta S^*}{R}\right) - \left(\frac{\Delta H^*}{RT}\right)$$

onde k_b é a constante de Boltzmann, h é a constante Plank, ΔH^* é a entalpia e ΔS^* é a entropia. Da inclinação da dependência linear ($\Delta H^*/R$) de $\ln(k/T)$ a entalpia foi calculada, e do intercepto [$\ln(k_b/h) + (\Delta S^*/R)$] a entropia foi calculada. A variação da energia livre de Gibbs ($\Delta G^* = \Delta H - T\Delta S$) também foi calculada e os resultados são apresentados na Tabela 2.

Figura 26 - Relação entre $\ln k^0$ versus a velocidade de varredura para a oxidação NAC + LipS₂ em solução tampão Mcllvaine pH 7,4, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora do trabalho.

Tabela 2 - Parâmetros termodinâmicos e cinéticos para a oxidação de NAC, em presença de LipS₂.

	Ea kJ mol ⁻¹	ΔH kJ mol ⁻¹	ΔS J mol ⁻¹	ΔG kJ mol ⁻¹
NAC	5,95	5,38	-202,784	64,86

Fonte: Autora do trabalho.

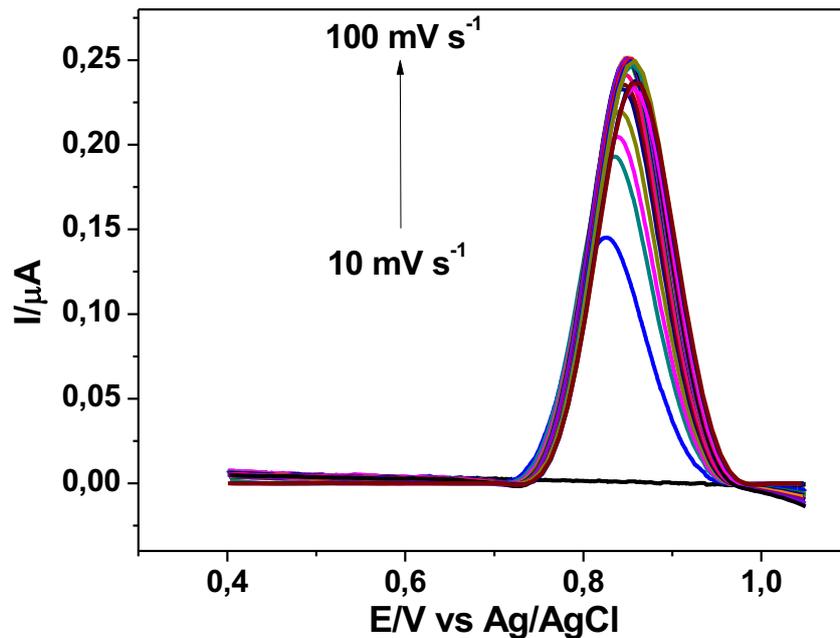
O valor positivo da entalpia de ativação e da energia livre de ativação, bem como o valor negativo de entropia de ativação significa que a reação de LipS₂ e de NAC é endotérmica, não espontânea e ordenada. Verificou-se, que ao baixar a temperatura do sistema, ocorre diminuição

da velocidade de troca de elétrons entre o eletrodo e as espécies eletroativas na célula eletroquímica.

5.1.6 Voltametria de pulso diferencial (VPD) usando o eletrodo de CV

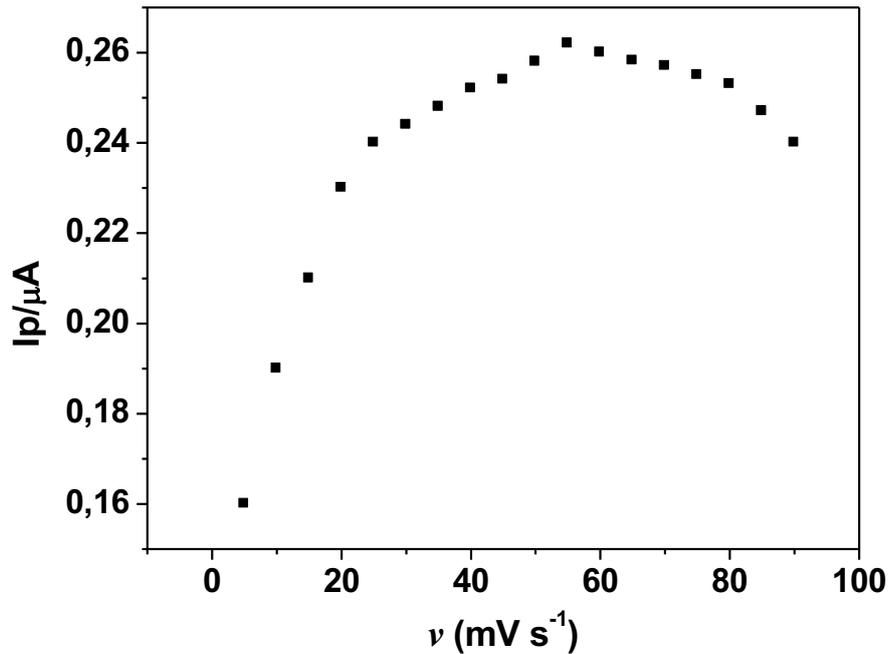
Após estudos empregando voltametria cíclica, verificou-se o comportamento deste eletrodo na oxidação de LipS₂+NAC utilizando a técnica de VPD. Na voltametria de pulso diferencial, é de grande importância a otimização dos parâmetros para se obter as melhores respostas. Desta forma, os parâmetros velocidade de varredura e amplitude de pulso foram avaliados. Inicialmente, estudou-se a velocidade de varredura no intervalo de 5 a 100 mV s⁻¹, e a amplitude de pulso foi mantida em 50 mV. Na Figura 27, são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial obtidos em diferentes velocidades de varredura de potencial. Observa-se que os picos se mostram bem definidos em baixas velocidades de varredura; em altas velocidades, há diminuição de *I_{pa}* (Figura 28), uma vez que, em altas velocidades o tempo é insuficiente para que a reação LipS₂ e NAC ocorra. Nesse sentido, foi escolhida a velocidade de 10 mV s⁻¹ para dar prosseguimento ao trabalho.

Figura 27 - Voltamogramas de pulso diferencial para LIPS₂ (500 μmol L⁻¹) e NAC (500 μmol L⁻¹) registrados sobre eletrodo de CV, em diferentes velocidades de varredura de potencial, amplitude fixada em 50 mV. Solução tampão McIlvaine 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,4.



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 28 - Estudo da variação de I_{pa} em função da ν , dados retirados da Figura 27.

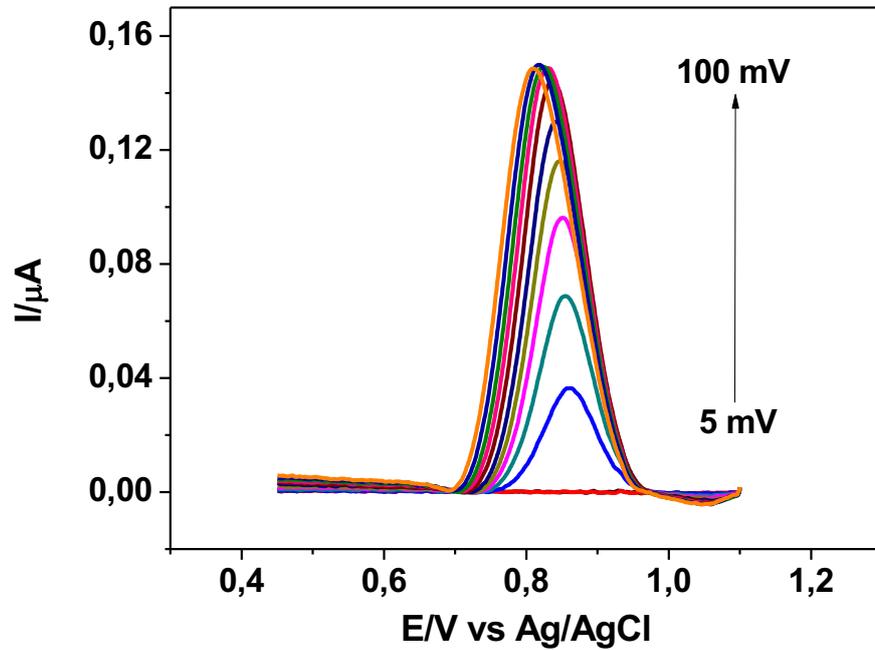


Fonte: Autora do trabalho.

Em seguida, foi analisada a variação da amplitude do pulso. Este estudo foi realizado no intervalo de 10 a 100 mV, com variação de 10 mV, sendo fixada a velocidade de varredura em 10 mV s^{-1} .

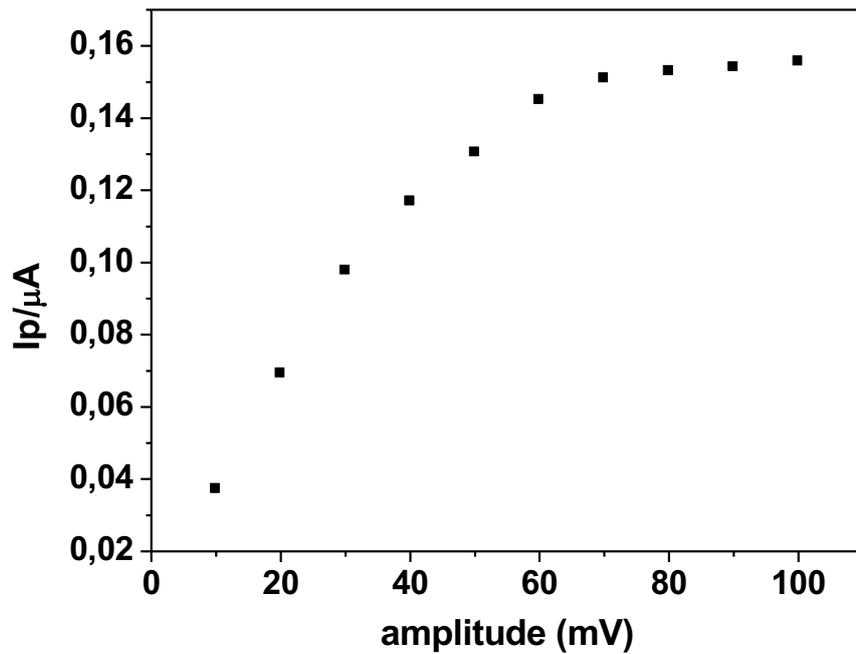
A Figura 29 mostra os voltamogramas de pulso diferencial de LIPS_2 , obtidos em diferentes amplitudes de pulso. Observa-se que à medida em que se aumenta a amplitude de pulso, ocorre um aumento na intensidade de corrente de pico até $0,06 \text{ V}$. A partir daí os valores de I_p permanecem constantes (Figura 30) e associados ao deslocamento de potencial de pico. Neste caso, para os estudos subsequentes, foi escolhida a amplitude de pulso de 50 mV , devido ao alto valor de corrente, sem deslocamento de potencial.

Figura 29 - Voltamogramas de pulso diferencial para LIPS₂ (500 μmol L⁻¹) e NAC (500 μmol L⁻¹) registrados sobre eletrodo de CV, em diferentes amplitudes e ν fixada em 10 mV, solução tampão McIlvaine 0,1 mol L⁻¹ em pH 7,4.



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 30 - Estudo da variação de I_{pa} em função da amplitude, dados retirados da Figura 29.

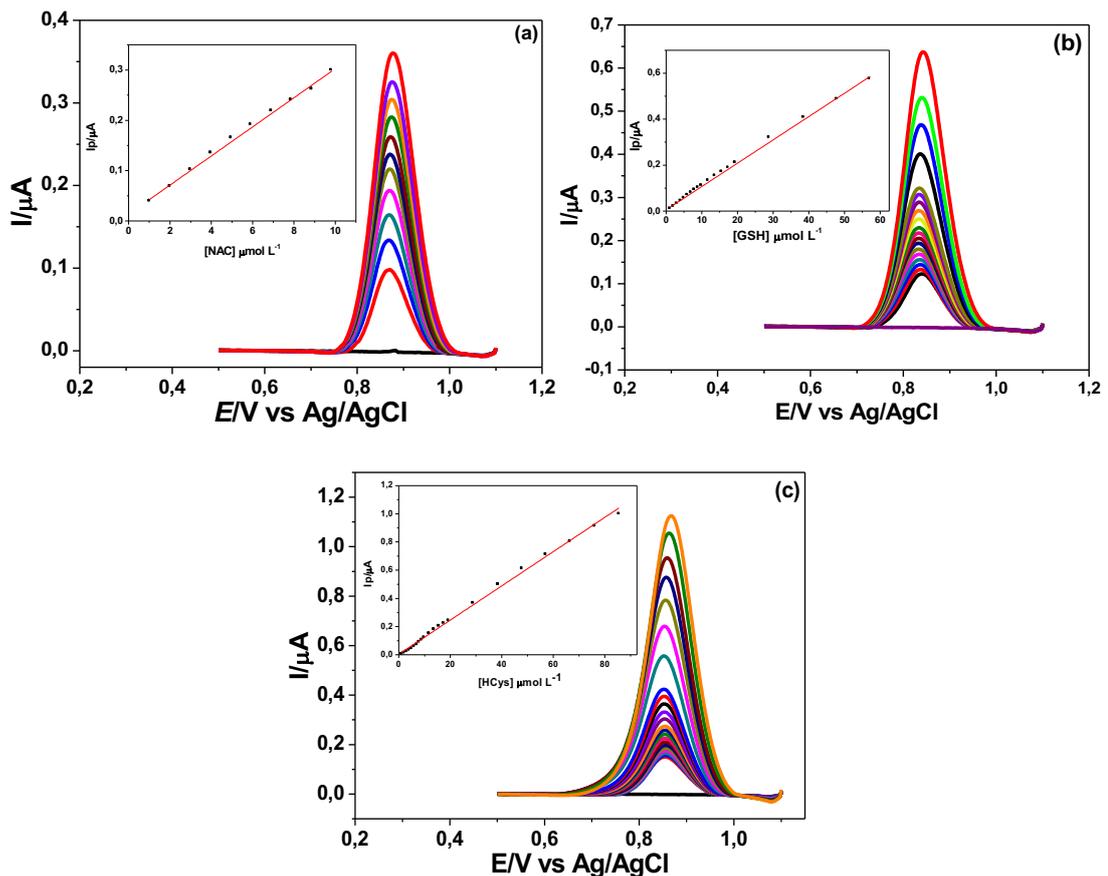


Fonte: Autora do trabalho.

5.1.7 Obtenção da Curva Analítica

Após a otimização dos parâmetros experimentais e operacionais, a curva analítica foi construída para verificar a resposta eletroquímica do eletrodo CV em função da concentração de NAC, GSH e HCys. Na Figura 31, são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial registrado sobre o eletrodo de CV, onde fixou-se a concentração de LipS_2 em $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e realizaram-se sucessivas adições de NAC, GSH e de HCys individualmente. Os voltamogramas mostram que a corrente de pico versus a concentração é linear. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do NAC, GSH e HCys (Tabela 3), usando o eletrodo CV, na presença de LipS_2 , foram estimados a partir das inclinações das respectivas correlações lineares ($y = a+bx$) e o desvio padrão na ausência de analito, utilizando para o limite de detecção (LD) ($3 s / b$) e o limite de quantificação (LQ) ($10 s / b$), onde s é o desvio padrão do valor médio para 10 voltamogramas e b é a inclinação da curva de calibração, determinada de acordo com as recomendações da IUPAC.

Figura 31 - Voltamogramas de pulso diferencial para adições consecutivas de: NAC (1 a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$); (b) GSH (1 a $60 \mu\text{mol L}^{-1}$); (c) HCys (1 a $86 \mu\text{mol L}^{-1}$), pH 7,4 em solução tampão de McIlvaine $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS_2 .



Fonte: Autora do trabalho.

Tabela 3 - Parâmetros analíticos obtidos para o NAC, GSH e HCys.

	NAC	GSH	HCys
Equação da reta (<i>Ipa</i>/μA)	0,016 + 0,029 [NAC] μmol L ⁻¹	0,011 + 0,010 [GSH] μmol L ⁻¹	0,035 + 0,015 [HCys] μmol L ⁻¹
LD (μmol L⁻¹)	0,27	0,67	0,46
LQ (μmol L⁻¹)	0,89	2,23	1,53
Faixa linear (μmol L⁻¹)	1-10	1-60	1-86

Fonte: Autora do trabalho.

O estudo demonstra que o presente método empregado é uma ferramenta analítica promissora, que pode ser usada, como um sensor para detectar NAC, GSH e HCys de forma simples e rápida.

5.1.8 Estudo de Interferentes

Um elevado grau de seletividade é fundamental para o desenvolvimento e aplicação de sistemas de sensores. Para que a metodologia empregada seja eficaz para a detecção seletiva de tióis, a resposta de possíveis interferências comumente encontradas em amostras biológicas precisa ser examinada. Estas incluem espécies que sofrem uma reação eletroquímica direta no eletrodo ou simplesmente reagem com LipS₂ para produzir indiretamente uma resposta devido à regeneração de LipS₂ pelo eletrodo. A seletividade do presente método, foi investigada em termos de quantificação de NAC. A Tabela 4 lista os resultados obtidos, utilizando a técnica de VPD, quando foram adicionados NAC (5 μmol L⁻¹) e LipS₂ (5 μmol L⁻¹), juntamente com possíveis interferentes, em tampão McIlvaine 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,4). A investigação foi realizada em triplicata. As espécies eletroativas como o ácido ascórbico, o ácido úrico, a adrenalina e a dopamina são interferentes notórios em amostras biológicas e geralmente produzem uma resposta analítica capaz de prejudicar a detecção de tiol. Os resultados mostraram que, para os compostos ativos redox testados, nenhum provocou interferência significativa na detecção dos analitos, utilizando uma proporção de 1 : 1, e que conduz a um erro inferior a 3%, para a determinação de NAC.

Tabela 4 - Avaliação da seletividade da interação LIPS₂+NAC em relação a possíveis interferentes

Interferentes	Resposta Relativa
Ácido Ascórbico	99,7 (±0,3)
Ácido Úrico	97,7 (±0,6)
Dopamina	98,0 (±0,4)
Epinefrina	98,5 (±0,5)

Fonte: Autora do trabalho.

5.1.9 Aplicações em amostras reais

O método proposto foi aplicado à análise individual de NAC e GSH em amostras sintéticas de saliva e urina, livres desses analitos, com o intuito de avaliar o desempenho das oxidações dos tióis frente à presença de interferentes em matriz complexa, sem pré-tratamento das amostras. O procedimento de adição padrão foi realizado pela adição de uma solução padrão dos analitos de NAC ou GSH para alíquotas contendo volumes idênticos. A curva analítica para cada amostra foi obtida, relacionando-se as quantidades de NAC ou GSH adicionadas à amostra com as respectivas ΔIpa determinadas por VPD sob condições experimentais e operacionais otimizadas. O ponto no qual a curva analítica cortou o eixo das ordenadas correspondeu à de ΔIpa , sem qualquer adição do padrão. A extrapolação da reta definiu, no eixo das abscissas, a concentração de NAC ou GSH na amostra fortificada, os valores obtidos em cada amostra são apresentados na Tabela 5 para NAC e na Tabela 6 para GSH.

A percentagem dos valores de recuperação foi calculada comparando-se a concentração obtida das amostras com concentrações reais e adicionadas. A recuperação das amostras para NAC variou entre 97,6 e 103,5% e para GSH variou entre 98,0 e 103,1%, indicando que o método proposto é efetivo e pode ser aplicado para detecção de NAC e GSH em amostras reais. Pode-se observar claramente que não há influência das matrizes no método desenvolvido para as amostras avaliadas. Neste sentido, é demonstrado que o método é uma alternativa viável, sensível, estável e boa para a determinação de NAC e GSH.

Tabela 5 - Determinação de NAC em amostras artificiais de saliva e urina.

[NAC]			
Amostras N=3	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado %
Saliva	2,00	2,07 ($\pm 0,05$)	103,5
Artificial	5,90	6,01 ($\pm 0,14$)	101,9
	2,00	1,96 ($\pm 0,05$)	98,0
Urina	5,90	5,76 ($\pm 0,09$)	97,6

Fonte: Autora do trabalho.

Tabela 6 - Determinação de GSH em amostras artificiais de saliva e urina.

[GSH]			
Amostras N=3	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado %
Saliva	9,8	10,10 ($\pm 0,31$)	103,1
Artificial	19,3	19,80 ($\pm 0,35$)	102,6
	9,8	9,60 ($\pm 0,18$)	98,0
Urina	19,3	19,20 ($\pm 0,38$)	99,4

Fonte: Autora do trabalho.

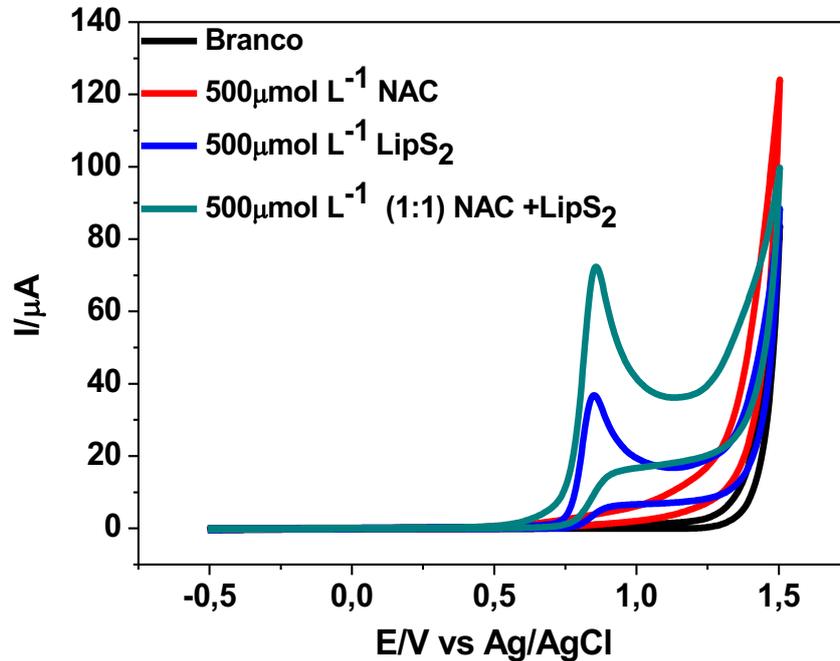
5.2 Determinação eletroanalítica de tióis usando eletrodo de Diamante Dopado com Boro (DDB)

5.2.1 Estudo do comportamento voltamétrico da oxidação do LipS₂ e da NAC sobre o eletrodo de DDB.

A atividade catalítica do eletrodo de DDB para a reação de oxidação de NAC + LipS₂ foi investigada por voltametria cíclica. A Figura 32 apresenta os voltamogramas cíclicos. Em presença de eletrólito suporte (branco), observa-se somente a corrente capacitiva. A oxidação da NAC eletrodo de DDB apresenta pico de oxidação mal definido, manifestando apenas um pequeno aumento de corrente (4 μA); o LipS₂ apresenta um potencial de pico de oxidação em torno de 0,85 V vs. Ag/AgCl e corrente aproximada em 36 μA ; a adição de NAC à solução de LipS₂ resultou em um aumento significativo na corrente de pico de oxidação (aproximadamente 72 μA). Como verificado em CV, as oxidações de NAC são facilitadas pelo LipS₂. Os perfis voltamétricos foram semelhantes aos perfis obtidos com o eletrodo CV, no mesmo potencial,

com a vantagem do eletrodo de DDB ser mais sensível, com valores de I_p mais altos, quando comparado ao eletrodo CV.

Figura 32 - Voltamogramas cíclicos sobre o eletrodo de DDB registrados na ausência de analito (branco), em soluções contendo $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC, $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS₂ e de $500 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC e LipS₂ (1:1) em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ tampão fosfato, pH 7, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.

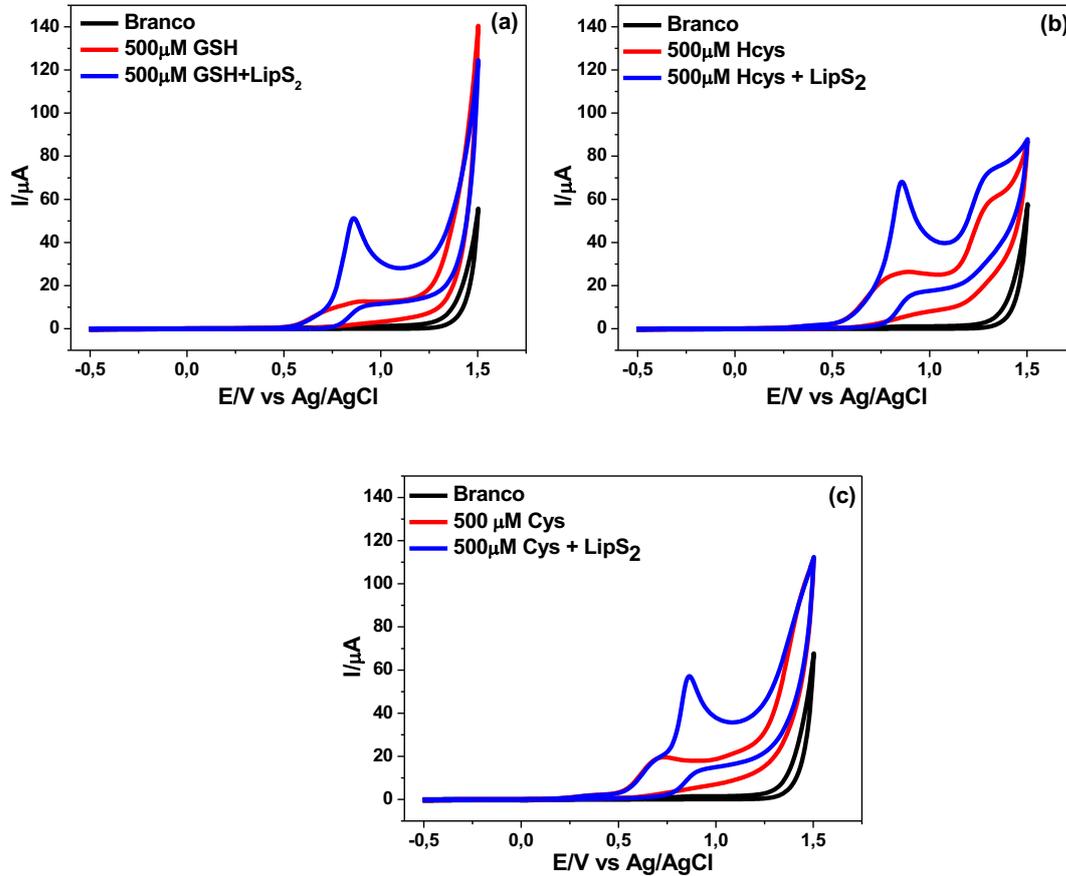


Fonte: Autora do trabalho

5.2.2 Estudo do comportamento voltamétrico da oxidação do LipS₂ e tióis sobre o eletrodo de DDB.

A oxidação do LipS₂ foi investigada sobre o eletrodo de DDB na presença dos tióis anteriormente estudados (GSH, HCys e Cys). De acordo com os voltamogramas (Figura 33), podemos observar que a GSH (Figura 33a) apresenta um potencial de pico de oxidação em torno de 0,9 vs. Ag/AgCl e a corrente de pico de 14 μA ; com a adição de LipS₂, há um aumento de corrente para 51 μA . O voltamograma da HCys (Figura 33b) apresenta dois picos de oxidação em potenciais de $E_{a1} = +0,9 \text{ V}$ e $E_{a2} = +1,3 \text{ V}$ vs Ag/AgCl, enquanto para Cys (Figura 33c) a oxidação ocorre em um potencial de oxidação de 0,73 V vs Ag/AgCl. Todos os tióis estudados, apresentaram picos bem definidos, sendo possível a sua detecção somente com o eletrodo de DDB.

Figura 33 - Voltamogramas cíclicos utilizando o eletrodo de DDB, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$, em diferentes tióis: (a) branco, GSH e LIPS₂+GSH (1: 1); (b) branco, HCys e LIPS₂+HCys (1: 1); (c) branco, Cys, LIPS₂+Cys. Todos os analitos com concentração de 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

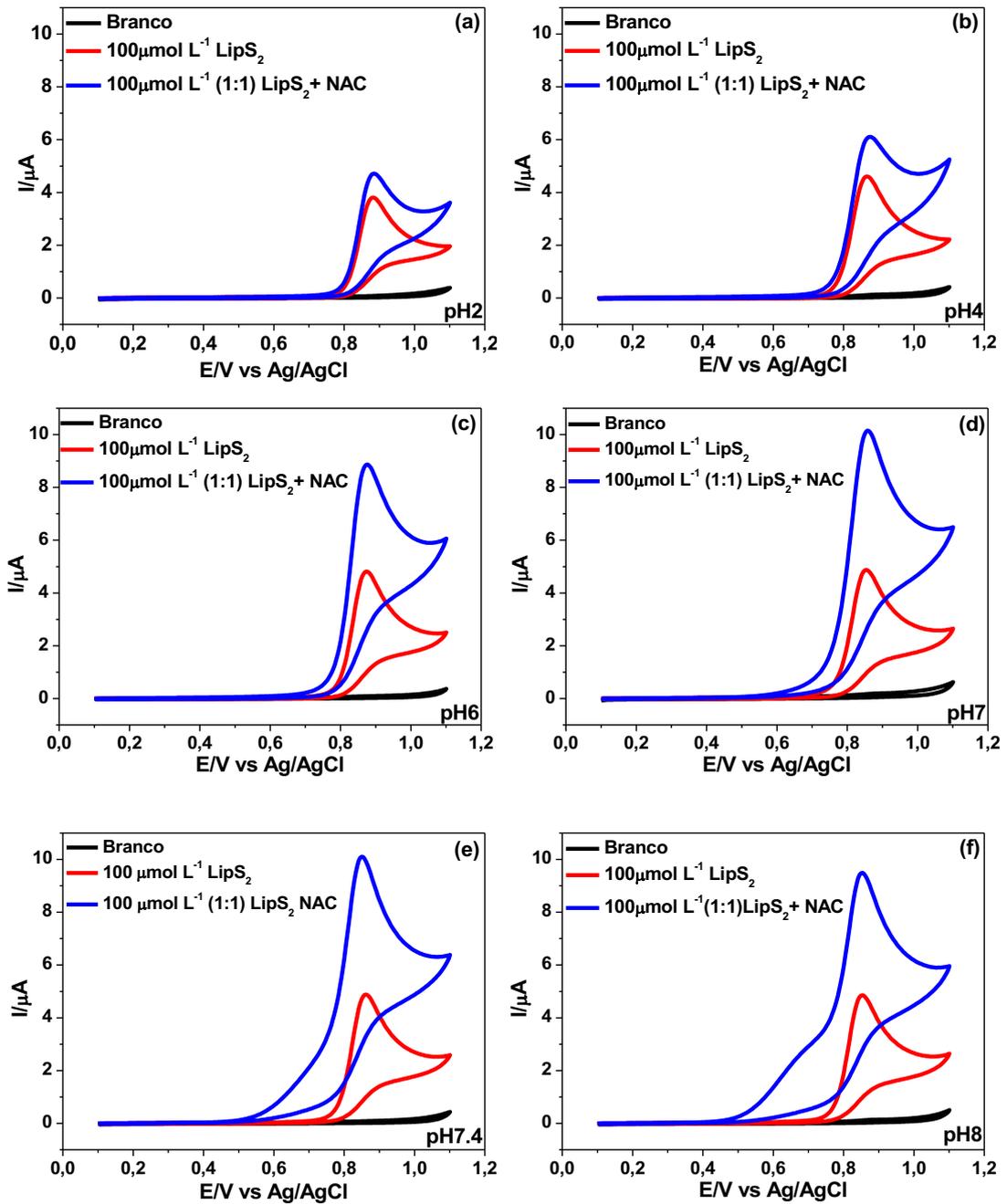


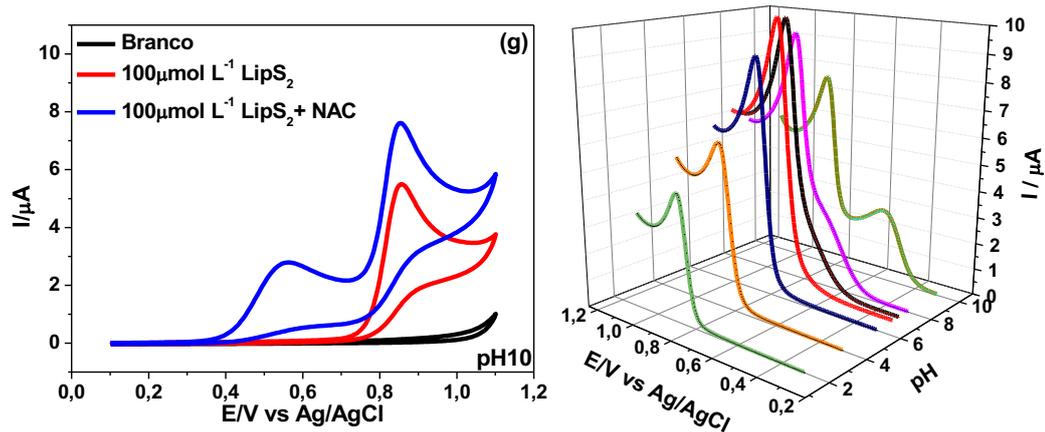
Fonte: Autora do trabalho.

5.2.3 Variação de pH usando eletrodo DDB para detecção de NAC

O efeito do pH sobre a corrente de pico anódica e o potencial de pico obtidos a partir de voltamogramas cíclicos (10 mV s^{-1}) foi investigado em tampão Britton Robinson de pH 2,0 a 10,0, na ausência de analitos, na presença de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS₂ e na presença de $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS₂ + $100 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC (Figura 34). Observa-se que há um aumento gradual da corrente de pico com o aumento do pH até o pH 7,4; em valores maiores, há a diminuição da corrente de pico e um segundo de pico de oxidação em torno de 0,6 V vs Ag/AgCl. Assim, o pH 7,4 foi escolhido para estudos posteriores, porque além de apresentar melhores valores de I_p , esse valor de pH facilita a aplicação e o estudo desta interação em amostras biológicas.

Figura 34 - Voltamogramas cíclicos registrados sobre o eletrodo de DDB em soluções tampão Britton Robinson de diferentes valores de pH: (a) 2, (b) 4, (c) 6, (d) 7, (e) 7,4, (f) 8 e (g) 10, $\nu=10$ mV s^{-1} .

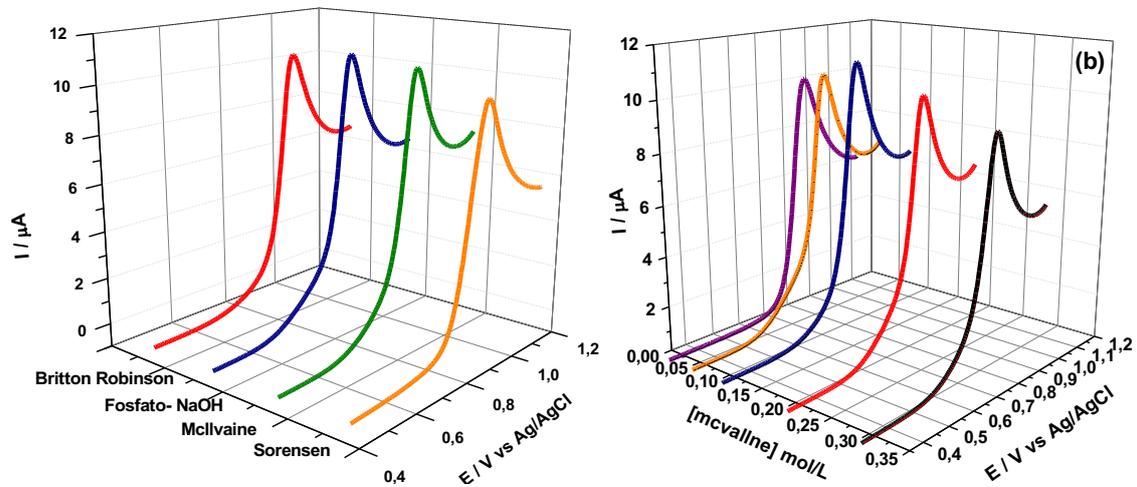




Fonte: Autora do trabalho

A influência da natureza do tampão sobre o sinal analítico foi avaliada em quatro diferentes soluções tampão: McIlvaine, Sorensen, Britton Robinson e fosfato, mantendo o pH em 7,4. Os respectivos voltamogramas obtidos sobre o eletrodo de DDB, na presença de $100\mu\text{mol L}^{-1}$ (1:1) $\text{LipS}_2 + \text{NAC}$ são apresentados na Figura 35a. A intensidade de pico em cada perfil voltamétrico não foi significativamente influenciada pela natureza do tampão, então, o tampão McIlvaine foi adotado nas medidas posteriores. A partir destes dados, a concentração de tampão McIlvaine foi analisada ($0,01$; $0,05$; $0,1$; $0,2$; $0,3\text{ mol L}^{-1}$). O perfil voltamétrico de $\text{LipS}_2 + \text{NAC}$ (Figura 35b) apresentou a maior intensidade de pico, na concentração de $0,1\text{ mol L}^{-1}$, assim, o tampão McIlvaine $0,1\text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, foi escolhido como o eletrólito de suporte para os experimentos seguintes.

Figura 35 - Voltamogramas de varredura linear registrados sobre o eletrodo de DDB em: (a) diferentes soluções tampão em pH 7,4, contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC + 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS₂; (b) diferentes concentrações da solução tampão McIlvaine, em pH 7,4 contendo 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de NAC + 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de LipS₂, $\nu = 10 \text{ mV s}^{-1}$.



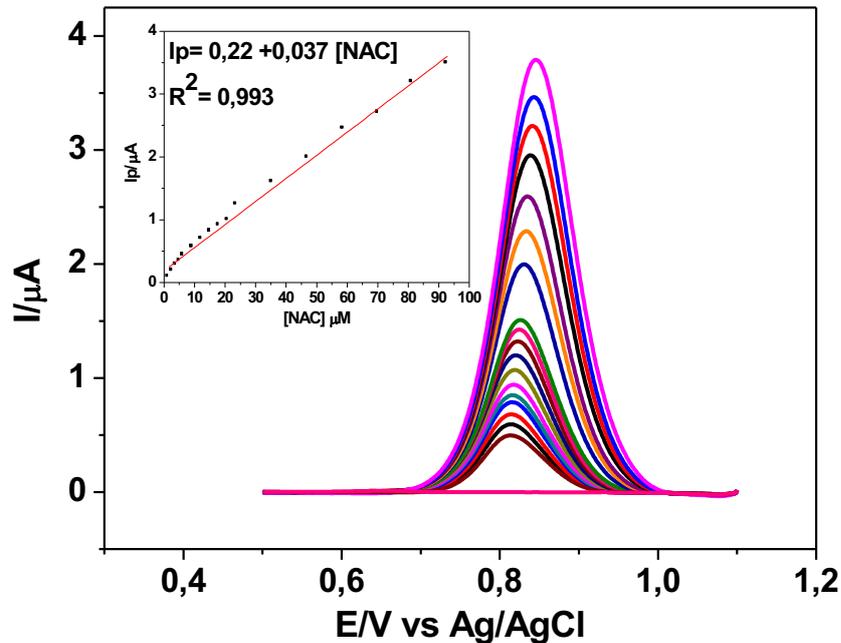
Fonte: Autora do trabalho.

5.2.4 Voltametria de pulso diferencial (VPD) usando o eletrodo de DDB

A voltametria de pulso diferencial, no eletrodo de DDB, foi utilizada para a quantificação de NAC, utilizando LipS₂ como par redox homogêneo. No entanto, para se estabelecer os melhores parâmetros experimentais foram avaliados: a faixa de varredura (5-100 mV s^{-1}) e amplitude do pulso (10-100 mV), sendo os valores otimizados para a taxa de varredura (10 mV s^{-1}) e amplitude do pulso (50 mV). Depois de otimizar os parâmetros experimentais, construiu-se a curva analítica. A concentração de LipS₂ foi fixada em 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e alíquotas de uma solução recentemente preparada de NAC de 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foram adicionadas, em sequência.

Os voltamogramas de pulso diferencial (Figura 36) mostram que a concentração de pico vs. concentração de NAC é linear para NAC de 1-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo a equação de regressão ($I_{pa} / \mu\text{A}$) = 0, 22 + 0,04x [NAC] $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r^2 = 0,993$). Os limites de detecção e quantificação foram determinados como 0,09 e 0,31 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para NAC, respectivamente.

Figura 36 - Voltamogramas de pulso diferencial para adições consecutivas de NAC (concentração de NAC de 1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$), pH 7,4 em 0,1 mol L^{-1} tampão McIlvaine, na presença de 5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ LipS₂. A inserção mostra a curva analítica para NAC.



Fonte: Autora do trabalho.

5.2.5 Determinação de NAC em amostras farmacêuticas empregando o eletrodo de DDB

As concentrações de NAC em amostras farmacêuticas foram determinadas usando o método de adição padrão, onde foram selecionados dois valores de concentração dentro da faixa linear de cada um dos tióis. A curva analítica para cada amostra foi obtida, relacionando-se as quantidades de NAC adicionadas à amostra com as respectivas I_{pa} determinadas pelos voltamogramas de pulso diferencial desenvolvidos sob condições experimentais e operacionais otimizadas. A quantidade de NAC encontrada em cada uma das amostras farmacêuticas é apresentada na Tabela 7. É importante ressaltar que os resultados das determinações da quantidade de NAC nas amostras farmacêuticas analisadas apresentaram baixos desvio padrão e que as amostras foram analisadas sem nenhum tratamento prévio, o que pode estar associado a uma boa repetibilidade das análises. Todos as quantidades de NAC estão próximas ao valor rotulado. Adicionalmente, foram calculados os valores de recuperação para cada amostra. A porcentagem de recuperação foi dada pela razão entre a concentração de NAC encontrada e a concentração adicionada multiplicada por 100. Como observado na Tabela 7, NAC + LipS₂ permitiu uma boa recuperação para NAC nas amostras analisadas, com valores de recuperação compreendidos entre 97 e 104 %, evidenciando a precisão do método proposto.

Tabela 7 - Determinação de NAC em amostras de capsulas, xarope e suspensão.

Amostras n = 3	[NAC]	[NAC]	Recuperação %
	adicionada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	
Cápsula	5,0	5,2 ($\pm 0,36$)	104
	50,0	50,4 ($\pm 2,45$)	101
Xarope	5,0	4,86 ($\pm 0,26$)	97,2
	50,0	49,8 ($\pm 2,7$)	99,6
Suspensão	5,0	4,88 ($\pm 0,18$)	97,6
	50,0	49,2 ($\pm 3,5$)	98,4

Fonte: Autora do trabalho.

Os eletrodos CV e DDB, apresentaram resultados satisfatórios, e podem ser aplicados em diferentes metodologias, as vantagens do eletrodo de CV é que possui um menor custo e maior acessibilidade, além de ter oxidados todos os tióis propostos no mesmo potencial sendo possível, a detecção de tióis totais. O eletrodo de DDB, é um eletrodo mais sensível, portanto temos ganho analíticos, como: maior sensibilidade, maior faixa linear de trabalho e melhor limite de detecção.

A Tabela 8 compara o desempenho analítico do eletrodo CV e DDB com métodos eletroquímicos propostos na literatura. Na determinação de NAC eletrodos com diferentes modificações foram empregados, grande parte dos trabalhos apresentam potencial de oxidação para NAC menor do que a metodologia proposta nesse trabalho, no entanto, possuem um maior limite de detecção, necessidade de renovação da superfície, gasto de tempo e reagente no preparo dos eletrodos, são desvantagens consideráveis que compensam a vantagem de oxidarem mais facilmente a NAC. Um Eletrodo de DDB funcionalizado com grupos amino foi também utilizado para a determinação de NAC, no entanto, além de apresentar um alto potencial de oxidação (+1,36 V) foi empregado em meio ácido (pH2,7) o que torna inviável a aplicação desse eletrodo em amostras biológicas. Para a determinação de GSH e HCys, eletrodos modificados têm sido relatados, e mesmo apresentando menores potenciais de oxidação possuem a desvantagem falta da reprodutibilidade do sinal e maior tempo gasto na análise. Portanto, a metodologia aplicada nesse trabalho apresenta vantagens quando comparadas as metodologias reportadas na literatura, por ser de baixo custo, rápida e sem a necessidade de pré-tratamento das amostras antes das aplicações, proporcionando maior vantagem em relação as outras metodologias propostas na literatura.

Tabela 8 - Detecção eletroquímica de NAC, GSH, e HCys relatada na literatura.

Eletrodo	Método eletroquímico	pH	Ep	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Refs
NAC						
Eletrodo de pasta de carbono modificado com Cobre(II) hexacyanoferrate(III)	LSV	6	0,8 V vs Ag/AgCl	63	100-830	(SUAREZ; MARCOLINO; FATIBELLO-FILHO, 2006)
CV modificado com magnetita /compósito de oxido de grafeno reduzido	VC	7	0,5 V vs Ag/AgCl	41,8	100-890	(CARDOSO DE SÁ et al., 2011)
CV na presença de 4-clorocatecol	VPD	7	0,24 vs Ag/AgCl	3,5	5-45	(JAHANSHAHI et al., 2014)
Pasta de carbono modificado com nanotubo de carbono com Pt/nanotubos de carbono e 8,9-dihidroxi -7- metil - 12H - benzothiazolo quinazolin-12-one	VOQ	7	0,48 V vs Ag/AgCl	0,07	0,1-600	(ARABALI et al., 2015)
Pasta de carbono modificado com 5-amino-3',4'-dimetilbifeenyl-2-ol	VOQ	7	0,21 V vs Ag/AgCl	0,2	0,4-900	(BEITOLLAHI et al., 2012)
Eetrodo de DDB terminados com NH ₂	VPD	2,7	0,21 V vs Ag/AgCl		12-300	(ABT et al., 2016)
Eletrodo DDB na presença de LipS ₂	VPD	7	0,85 vs Ag/AgCl	0,093	1-100	Este trabalho
GSH						
Eletrodo de pasta de nanotubos carbono e parede múltipla mediados por cloropromazina	VPD	4	0,65 V vs Ag/AgCl	0,16	0,3-18,3	(ENSAFI et al., 2010)
Eletrodo de pasta de nanotubo de carbono modificado com ácido ferroceno dicarboxílico	VPD	7	0,15 V vs Ag/AgCl	0,2	0,5-122	(RAOOF et al., 2011)
Eletrodo impresso modificado com nanotubo de carbono	VOQ	7	0,48 V vs Ag/AgCl	3	10-100	(LEE; GONCALVES; COMPTON, 2015)
Eletrodo de pasta de carbono modificado com 2,7-bis (ferrocenil etil) fluoren-9-one	VPD	7	0,3 V vs Ag/AgCl	0,5	0,92-11	(RAOOF; OJANI; KARIMI-MALEH, 2009)
NAC and GSH						
Eletrodo de alumínio paladizado modificado com filme azul da Prússia	NAC			0,54	2-40	(POURNAGHI-AZAR; AHOUR, 2008)
	GSH	AMP	2	0,3 V vs SCE	0,46	

CV modificado com polipirrol / pirroloquinolina quinona	NAC	AMP	3,4	0,5 V vs Ag/AgCl	5,54	-	(INOUE; KIRCHHOFF, 2000)
	GSH				11,4	-	
CV na presença de LipS ₂	NAC	VPD	7,4	0,85 V vs Ag/AgCl	0,27	1-10	Este trabalho
	GSH				0,67	1-60	
Hcys							
Eletrodos com base em óxido de grafeno reduzido-TiO ₂ (RGO-TiO)		AMP	7	0,2 V vs Ag/AgCl	0,024	0,1 - 80	(ZHAO et al., 2017)
Eletrodo coloidal de ouro-cisteamina e pasta de carbono, Aucoll-Cyst-CPE		VPD	7,4	0,56 V vs Ag/AgCl	1,21	2-20	(EKSIN; ERDEM, 2014)
Eletrodo de pasta de carbono modificado com nanotubos e isoprenalina como mediador		VPD	3,5	0,56 V vs Ag/AgCl	3,3	5-800	(FOULADGAR; MOHAMMADZ ADEH; NAYERI, 2014)
CV na presença de LipS ₂		VPD	7	0,85 V vs Ag/AgCl	0,46	1-86	Este trabalho

LSV, Voltametria de varredura linear; VPD, Voltametria de pulso diferencial; VOQ, Voltametria de onda quadrada; CV, voltametria cíclica; AMP, Amperometria; SCE, eletrodo de calomelano saturado.

Fonte: Autora do trabalho.

É importante ressaltar a abrangência da metodologia, o ácido lipóico é o personagem principal para aplicação do método, ele é um dissulfeto e por apresentar, cadeia linear, ser facilmente oxidado em superfícies eletródicas e por não possuir impedimento histérico, facilita, desta forma, a reação com tióis, estes, que por sua vez devem ser estruturalmente disponíveis e alifáticos. Nesse sentido, é possível prever em quais tióis podem ocorrer a reação e ampliar o estudo para uma grande variedade de moléculas.

É uma metodologia muito simples, e pode ser facilmente aplicada em amostras de saliva, urina e medicamentos, no entanto, ela responde a uma classe de moléculas em vez de um analito específico, é necessário um método adicional mais seletivo para atingir o nível de especificidade necessário para a análise de tióis em uma mistura complexa, em vários meios biológicos, com a vantagem adicional de permitir a sua separação, em matriz complexa. Nesse sentido, foram sintetizados polímeros molecularmente impressos (MIP), em conjunto com nanopartículas magnéticas, originando polímeros magnéticos molecularmente impressos (MMIP) para separação e determinação específica de GSH.

5.3 Polímeros magnéticos molecularmente impressos (MMIPs) e não impressos (MNIPs) para GSH

5.3.1 Otimização da síntese dos MMIPs empregando ferramentas computacionais

Para a síntese de MMIPs e de MNIPs, há uma grande quantidade de monômeros funcionais que podem ser utilizados, sendo comum, um grande consumo de tempo e reagentes na tentativa de obter o polímero mais adequado para o analito escolhido, além de acarretar o aumento do custo de pesquisa e descarte de reagentes contaminantes.

A modelagem molecular computacional pode auxiliar a prever as melhores condições experimentais para este fim, reduzindo custos e eliminando o fator “tentativa e erro”, obtendo MMIPs mais seletivos e com melhor desempenho na extração e pré- concentração do analito, pois as simulações químicas computacionais podem mostrar, por exemplo, quais monômeros terão melhor afinidade com a molécula de interesse, resultando em polímeros mais eficientes. Neste sentido, a simulação computacional foi realizada com o intuito de verificar a variação da energia de ligação de GSH com diversos monômeros funcionais. Foram avaliados os 20 monômeros apresentados na Tabela 9, os quais foram nomeados de MP1 a MP20 (WONG et al., 2015).

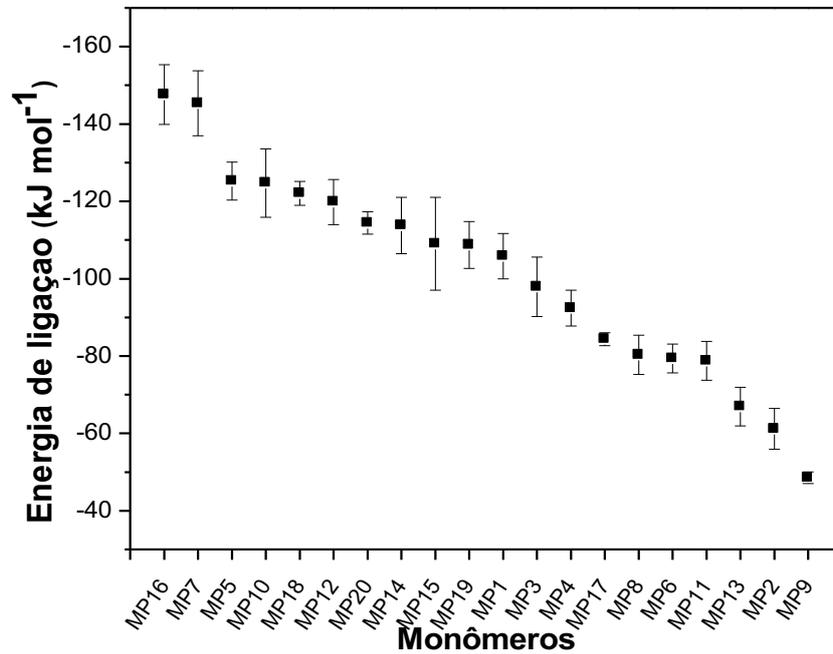
Tabela 9 - Monômeros comumente usados na síntese de MMIPs e escolhidos para realizar as simulações computacionais.

Sigla	Monômero	Sigla	Monômero
MP1	<i>bis</i> -acrilamida de <i>N,N</i> -metileno	MP11	Ácido metileno succínico
MP2	Ácido imidazol-4-acrílico	MP12	Ácido metacrílico
MP3	Etil éster de imidazol-4-acrílico	MP13	3-divinilbenzeno
MP4	Ácido acrílico	MP14	4-divinilbenzeno
MP5	Acrilamida	MP15	Estireno
MP6	Acroleína	MP16	1-vinilimidazol
MP7	Alilamina	MP17	2-vinilpiridina
MP8	Acrilonitrila	MP18	4-vinilpiridina
MP9	Etileno glicol dimetacrilato	MP19	Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propano-sulfônico
MP10	2-(cianoetilamino)etilmetacrilato	MP20	2-hidroxietil metacrilato

Fonte: Autora do trabalho.

A Figura 37 mostra os resultados obtidos a partir da simulação computacional. Os valores de energia podem ser interpretados como a energia liberada na aproximação entre cada monômero e GSH, sendo que quanto maior a energia liberada (mais negativo o valor), maior a afinidade entre eles, e teoricamente mais seletivo o polímero resultante.

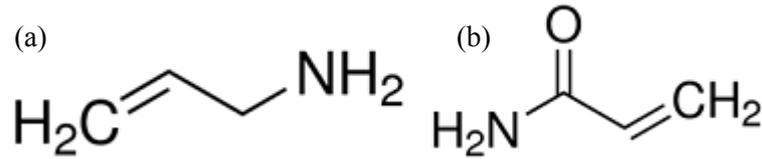
Figura 37 - Valores de energia de ligação entre GSH com os 20 monômeros tabelados.



Fonte: Autora do trabalho.

Observando os resultados obtidos, nota-se que os monômeros de maior energia liberada (maior estabilidade) para o GSH foram a 1-vinilimidazol (MP16), alilamina (MP11) e acrilamida (MP5). Descartou-se o monômero de maior energia liberada - 1-vinilimidazol (MP16) e os dois monômeros seguintes foram utilizados para realizar as sínteses e avaliar o comportamento frente ao reconhecimento GSH. As estruturas destes monômeros funcionais estão representadas na Figura 38 e são de grande importância para a análise da interação com GSH.

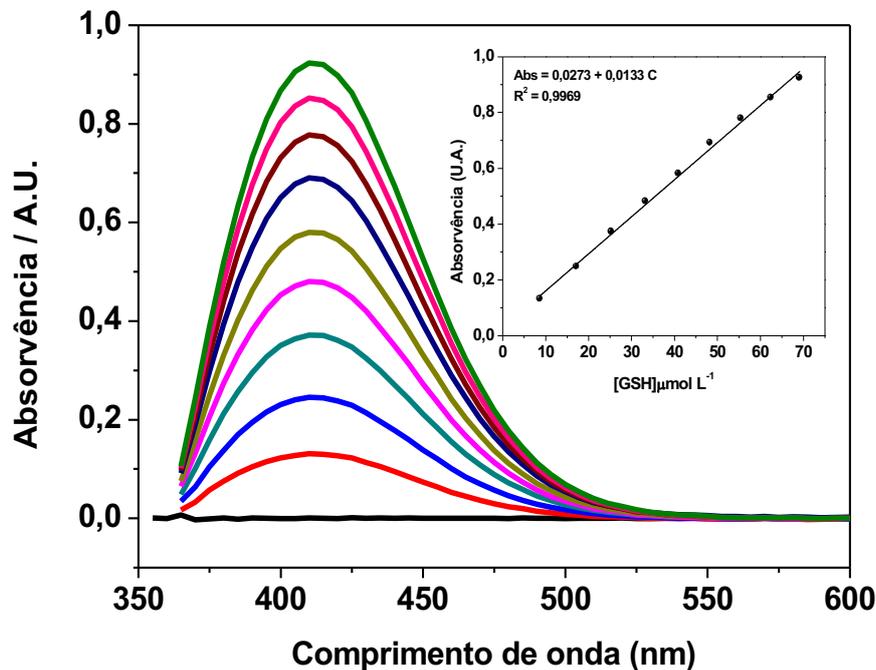
Figura 38 - Estrutura molecular dos dois monômeros funcionais escolhidos na síntese (a) alilamina, (b) acrilamida.



Fonte: Estrutura baseada no site da empresa Sigma-Aldrich.

A espectrofotometria no UV-VIS foi a técnica utilizada para a otimização dos parâmetros experimentais empregando o MMIP. A GSH apresenta uma banda de absorção abaixo de 200 nm, portanto, foi empregado o método de Ellman (DTNB, TNB, ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)) para a sua determinação (COŞKUN; ZİHNİOĞLU, 2002). A reação que ocorre foi apresentada na Figura 8. A mistura reacional compreendeu 1,0 mL de 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato (pH 7,0) e 0,1 mL de reagente Ellmann (1 mg em 1mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7). A absorvência da mistura reacional foi determinada a 410 nm. A concentração de glutathiona foi variada de 8-70 µmol L⁻¹. Na Figura 39, observa-se que a concentração de NAC na faixa estudada, o sistema obedece a lei de Lambert-Beer. Para os testes de otimização, a concentração de 40 µmol L⁻¹ foi a escolhida como a mais adequada, pois se encontra dentro da faixa linear da curva analítica.

Figura 39 - Espectros de absorção na região UV-VIS para soluções com diferentes concentrações do GSH, em 0,1 mol L⁻¹ tampão fosfato pH 7.



Fonte: Autora do trabalho.

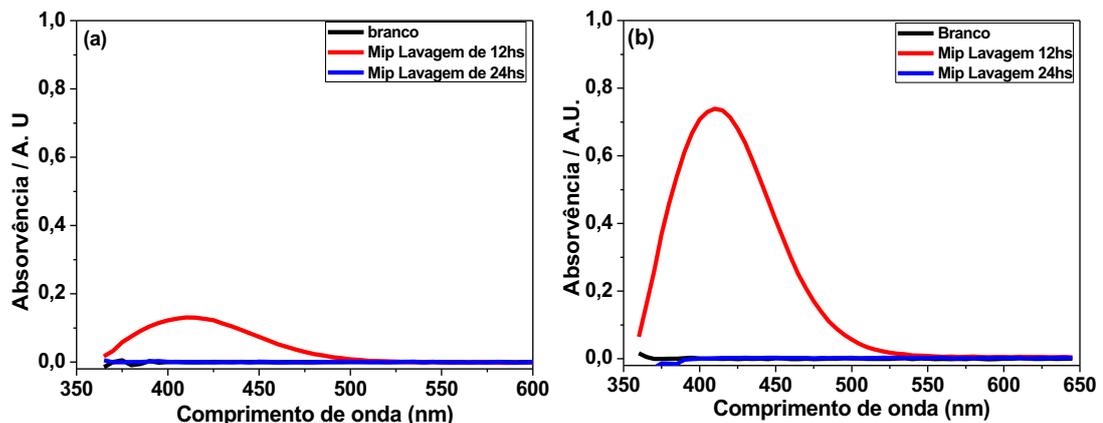
5.3.2 Síntese e otimização de síntese do MMIP para GSH

A síntese foi, inicialmente, realizada empregando o método de termopolimerização, no entanto, observou-se que mesmo antes da mistura reacional polimerizar o solvente (acetonitrila/tolueno, 3:1) evaporava, devido ao baixo ponto de ebulição desses solventes, impedindo assim, de serem obtidos MMIP e MNIP com propriedade físicas e químicas desejadas. Portanto, a síntese foi realizada por fotopolimerização (radiação UV), utilizando o método de precipitação. Desta forma, foram sintetizados MMIPs com os monômeros funcionais alilamina e acrilamida, obtendo-se partículas mais homogêneas.

Com o intuito de verificar a eficiência de remoção do GSH dos polímeros sintetizados, as soluções do solvente de lavagem foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis a cada 12 h.

A Figura 40 apresenta os gráficos de lavagens do MMIP. Pode-se observar que a remoção da molécula molde ocorre após 24 hs, indicando uma facilidade da remoção do analito as cavidades específicas, para os dois monômeros funcionais empregados na síntese, pois não é mais observada a banda correspondente ao GSH (410 nm). Para garantir também a remoção total dos componentes da síntese que ficaram em excesso, o procedimento adotado de limpeza a partir de então para ambos os polímeros foi de 72 h, dividido em três etapas de 24 h; na primeira etapa, utilizou-se água para a remoção do analito, na segunda etapa, utilizou-se uma solução de metanol: ácido acético na proporção 90/10 (v/v) para a remoção de reagentes orgânicos em excesso na síntese, e na última etapa utilizou-se água novamente.

Figura 40 - Espectros de absorção na região ultravioleta para as soluções de limpeza do MMIP (a) monômero alilamina (b) monômero acrilamida.



Fonte: Autora do trabalho.

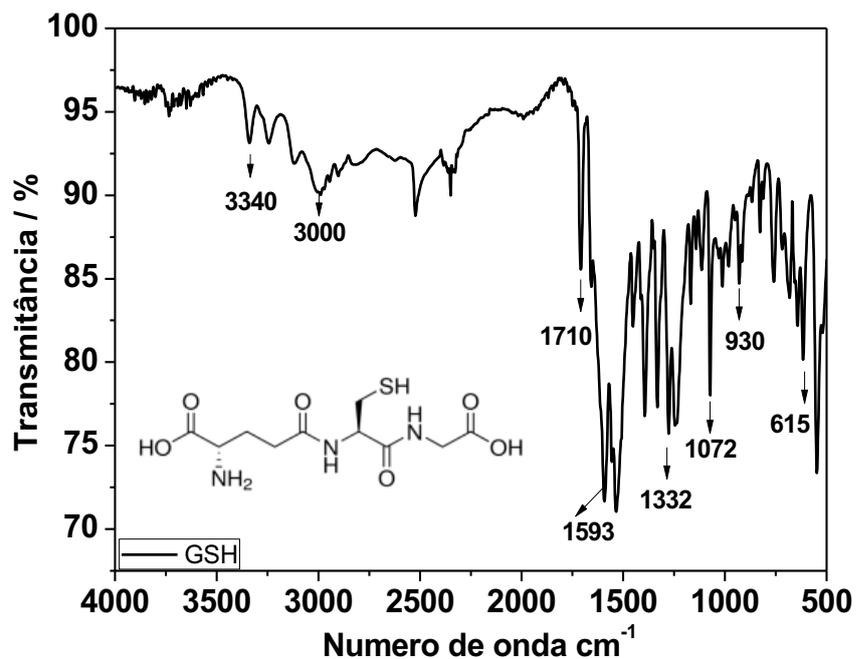
5.3.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

A caracterização da estrutura do MMIP, foi realizada através de medidas espectrométricas no infravermelho com transformada de Fourier, onde, cada reagente utilizado foi analisado para posterior comparação entre todos os reagentes aplicados na síntese, cada banda foi especificada de acordo com a literatura (LARKIN, 2011; LOPES; FASCIO, 2004; PAVIA et al., 2015; SILVERSTEIN et al., 2000).

5.3.3.1 Analito

A Figura 41 apresenta os espectros no FT-IR, característicos da GSH, onde é possível observar, inicialmente, pequenas bandas na região de 3340 e 3000 cm^{-1} , são regiões típicas de vibrações O-H e N-H, respectivamente. O grupo éster é identificado pelas bandas em 1710 cm^{-1} (estiramento C=O) e 1332 cm^{-1} (estiramento C-O). As atribuições de cada banda estão listadas na Tabela 10.

Figura 41 - Espectro na região do infravermelho para GSH.



Fonte: Autora do trabalho.

Tabela 10 - Bandas dos espectros no infravermelho para GSH.

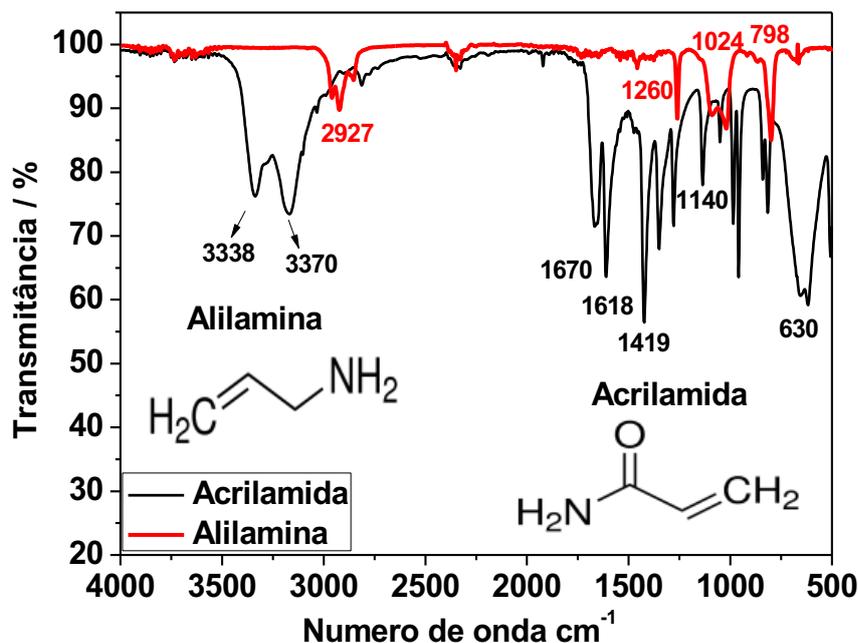
Principais bandas GSH	3340	3000	2950-2850	1710	1630-1510	1440-1210	1240-1168	960-880	750-600
Atribuições	v O-H	v N-H	v C-H	v C=O	δ_s N-H	v C-O	v C-N	ω C-O	ω N-H

v=deformação axial; δ_s =deformação angular simétrica; ω =deformação angular fora do plano

Fonte: Autora do trabalho.

5.3.3.2 Monômeros Funcionais

Os monômeros funcionais empregados na síntese do MMIP foram a acrilamida e a alilamina. A Figura 42 apresenta as bandas nos espectros de FT-IR para cada monômero estudado. Para a acrilamida, as principais bandas são devidas à deformação axial N-H entre 3340 e 3170 cm^{-1} . A absorção mais forte do espectro corresponde à deformação da carbonila, em 1419 cm^{-1} , as demais bandas são apresentadas na Tabela 11. Para o monômero alilamina, é possível observar as bandas referentes ao deslocamento axial das ligações C-H (2950-2850) e C-N (1228-1274) e a deformação angular simétrica fora do plano N-H (800-666) (Tabela 12).

Figura 42 - Espectro na região do infravermelho para alilamina e acrilamida.

Fonte: Autora do trabalho.

Tabela 11 - Bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) para o monômero funcional acrilamida com as respectivas atribuições. Dados extraídos da Figura 42.

Principais bandas	3340-3176	2950-2850	1614	1419	1240	750-600
Atribuições	ν N-H	ν C-H	δ_s NH	ν C-O	ν C-N	ω N-H

ν =deformação axial; δ_s =deformação angular simétrica; ω =deformação angular fora do plano

Fonte: Autora do trabalho.

Tabela 12 - Bandas dos espectros de infravermelho (cm^{-1}) para o monômero funcional alilamina com as respectivas atribuições. Dados extraídos da Figura 42.

Principais bandas	2950-2850	1228-1254	800-600
Atribuições	ν C-H	ν C-N	ω N-H

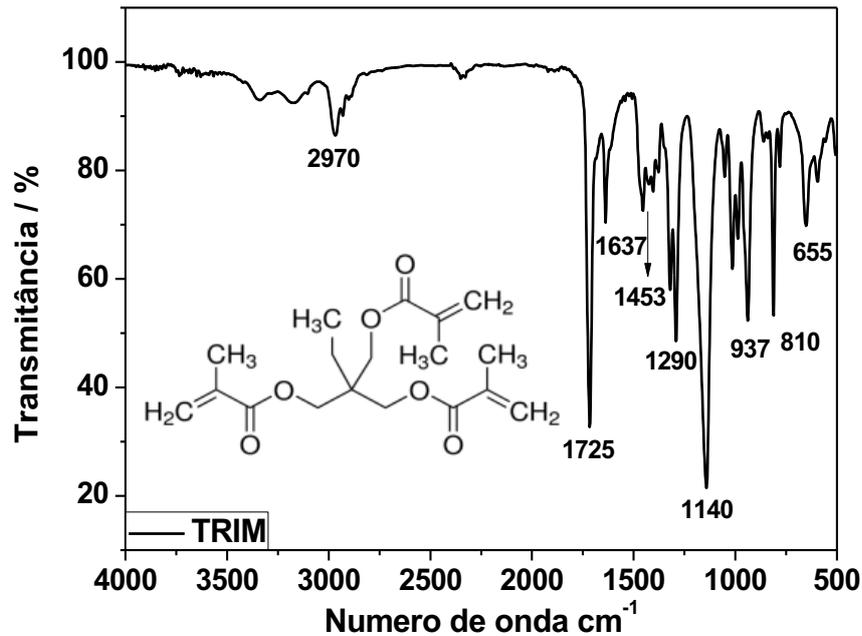
ν =deformação axial; ω =deformação angular fora do plano

Fonte: Autora do trabalho.

5.3.3.3 Monômero Estrutural

O espectro de FT-IR do monômero estrutural do trimetilolpropano trimetacrilato (TRIM) é apresentado na Figura 43 e as bandas estão listadas e atribuídas na Tabela 13, onde é possível observar as bandas características do grupo éster em 1715 e 1290 cm^{-1} , referentes, respectivamente, ao estiramento da carbonila (C=O) e da ligação C-O, C-H sp^2 e sp^3 de estiramento e dobramento; além dos dobramentos angulares referentes às ligações duplas em 1453 cm^{-1} . Em 2970 até 2850 cm^{-1} , os estiramentos C-H sp^3 .

Figura 43 - Espectro na região do infravermelho para o TRIM.



Fonte: Autora do trabalho.

Tabela 13 - Bandas dos espectros no infravermelho (cm⁻¹) para o monômero estrutural (TRIM) com as respectivas atribuições. Dados extraídos da Figura 43.

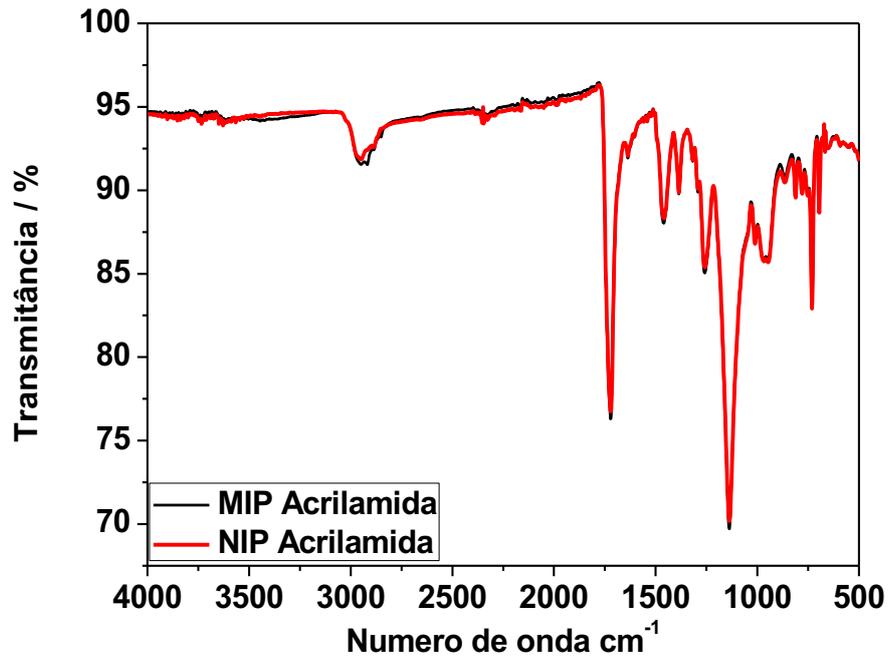
Principais bandas	2970-2850	1725	1637	1453	1290 e 1160	937, 810 e 655
Atribuições	v C-H sp ³	v C=O	v C=C	δ CH ₂	v C-O	ω C-O

v=deformação axial; δ=deformação angular s; ω=deformação angular fora do plano

Fonte: Autora do trabalho.

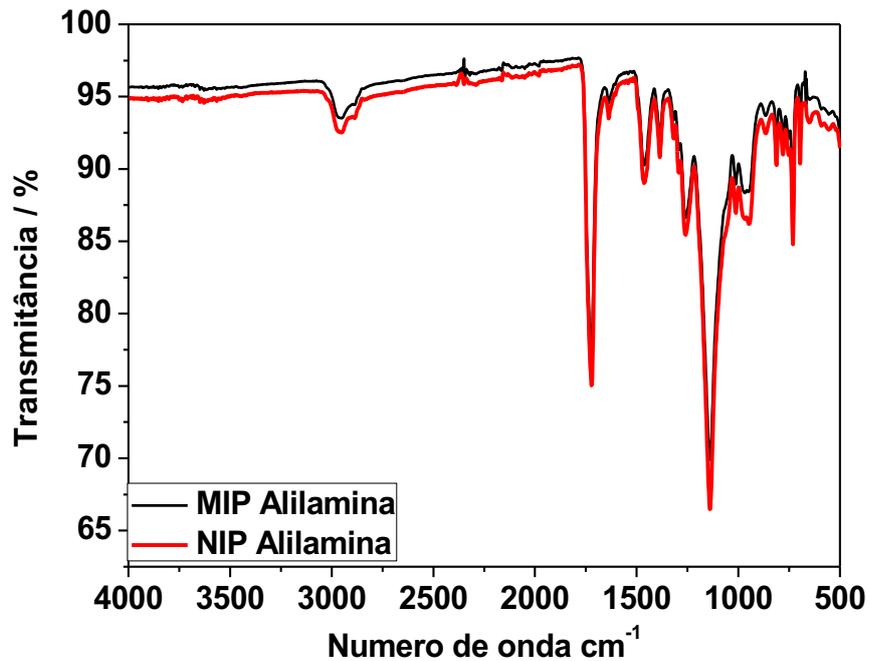
A Figura 44 apresenta dois espectros do MMIP e MNIP usando o monômero acrilamida, enquanto a Figura 45 apresenta os espectros de MMIP e MNIP, usando o monômero alilamina. Nos dois espectros apresentados não se observou diferença entre o MMIP e o MNIP, ou seja, comparando-se os espectros observa-se que o analito foi removido da cavidade seletiva do MMIP e os polímeros apresentaram bandas idênticas. Os dois polímeros impressos, com diferentes monômeros, apresentaram bandas semelhantes, como esperado, uma vez que o monômero funcional foi empregado em menor quantidade e não apresentam bandas características destes.

Figura 44 - Espectro na região do infravermelho para o MMIP e o MNIP usando o monômero funcional acrilamida.



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 45 - Espectro na região do infravermelho para o MMIP e o MNIP, usando o monômero funcional alilamina.

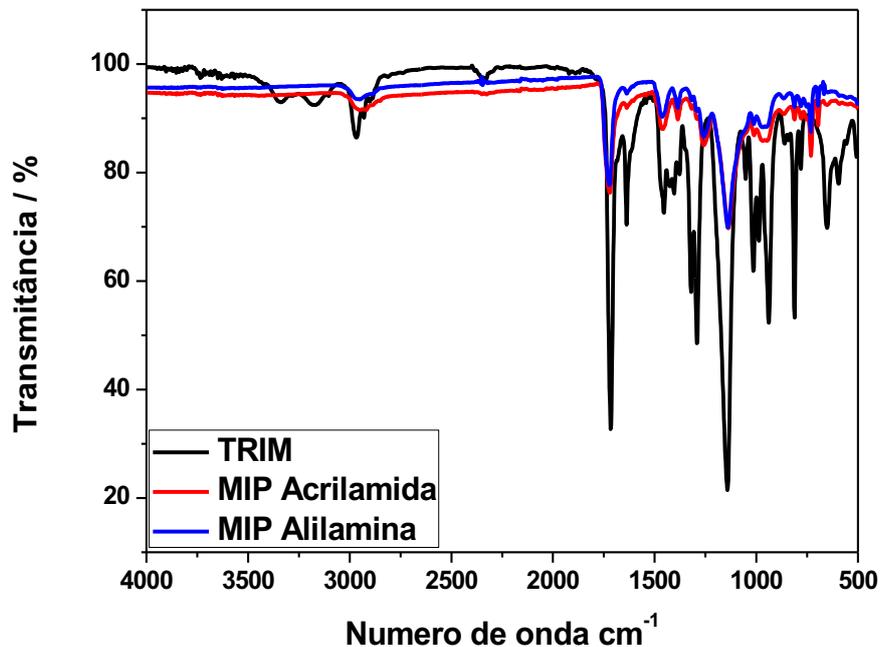


Fonte: Autora do trabalho.

O espectro no IV comparando os MMIPs com o monômero estrutural é apresentado na Figura 46. Podemos observar que a estrutura do polímero é constituída basicamente do monômero estrutural, uma vez que é o componente da síntese empregado em maior quantidade. Adicionalmente, os estiramentos e transições são conservados na formação do polímero.

Outra observação interessante obtida no espectro do MMIP é a ausência do sinal referente à ligação dupla entre os carbonos (C=C) em 1637 cm^{-1} , presente no espectro do TRIM, indicando que ocorreu a polimerização pelas quebras das ligações duplas entre os carbonos pelo iniciador radicalar.

Figura 46 - Espectro na região do infravermelho para o MMIP (acrilamida), MMIP (alilamina) e o TRIM.



Fonte: Autora do trabalho.

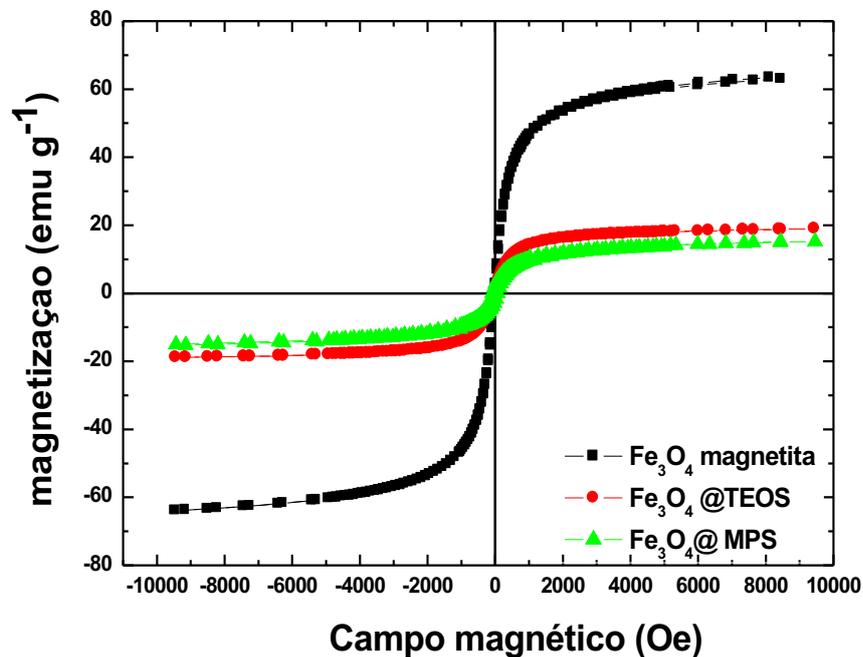
5.3.4 Magnetometria de amostra vibrante (VSM)

A técnica de magnetometria de amostra vibrante é baseada na lei de indução de Faraday na qual a variação de fluxo magnético induz uma força eletromotriz em um condutor próximo. Seu princípio de funcionamento é fazer vibrar uma amostra magnetizada próximo a bobinas detectoras. Essa vibração é responsável pela variação de fluxo magnético, que produz uma tensão alternada proporcional a magnetização (SMITH, 1956).

Todas as etapas da síntese foram caracterizadas com o propósito de verificar se há conservação das propriedades magnéticas após as diversas modificações. Na Figura 47 apresenta as curvas de histerese das NPs (Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MPS}$) não foi observada histerese e nem magnetização remanescente, como esperado para materiais superparamagnéticos (SODIPO; AZIZ, 2016). No entanto, é possível visualizar uma queda nos valores de magnetização de saturação, devido a funcionalização das nanopartículas magnéticas.

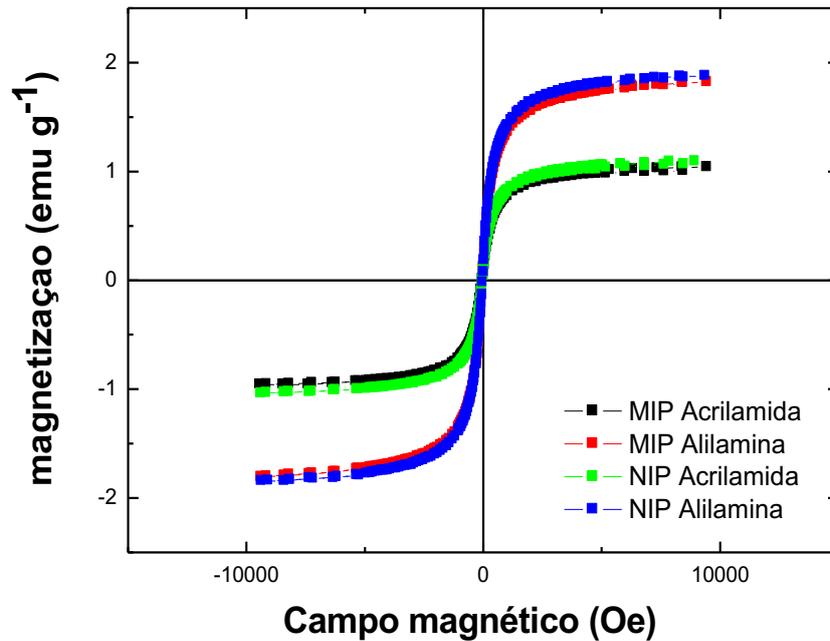
Para o MMIPs e MNIPs o estudo de magnetização é apresentado na Figura 48 para os dois monômeros estudados. Observa-se o comportamento superparamagnético, no entanto temos uma diminuição no valor de magnetização do MMIP, quando comparado com as NPs, devido a polimerização e o recobrimento das nanopartículas.

Figura 47 - Curvas de histerese magnética para Fe_3O_4 (magnetita); $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{TEOS}$; $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MPS}$.



Fonte: Autora do trabalho.

Figura 48 - Curvas de histerese magnética dos MMIPs e MNIPs para os monômeros funcionais acrilamida e alilamina.



Fonte: Autora do trabalho.

5.3.5 Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)

Cada etapa da síntese dos MMIP foi analisada pela técnica MEV-FEG, com o intuito de observar diferenças na sua morfologia, distribuição e características superficiais.

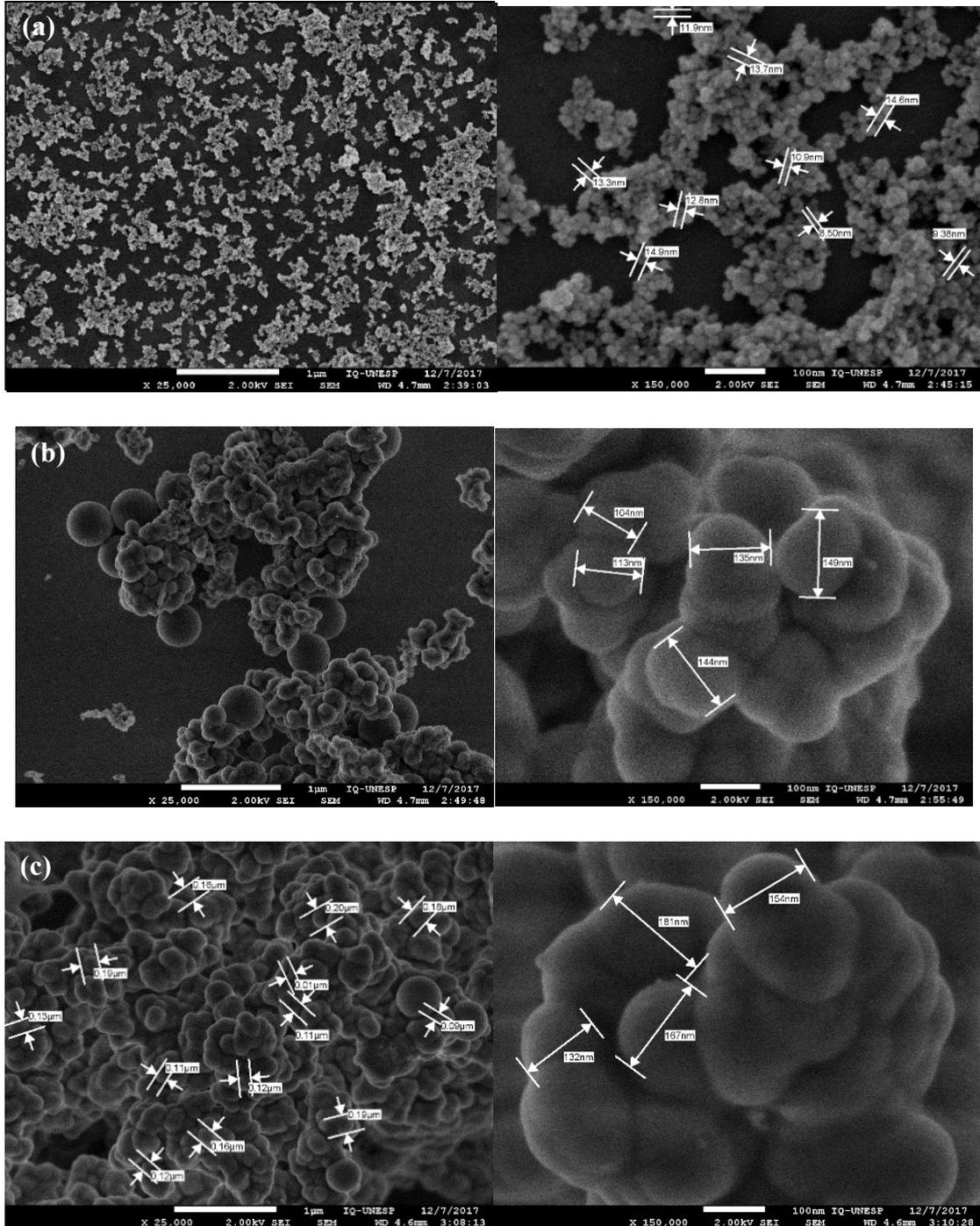
A Figura 49 apresenta as nanopartículas magnéticas obtidas nas três primeiras etapas da síntese, antes da obtenção do MMIP.

Na primeira etapa (a), as partículas estão um pouco aglomeradas e seus tamanhos variam de 8 a 15 nm. Na segunda etapa de síntese, ocorreu o recobrimento das nanopartículas com o TEOS ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$), onde podemos observar o aumento no tamanho das nanopartículas que possuem a variação de 100 a 150 nm (b), e na terceira etapa (c), ao serem tratadas com MPS ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-C}=\text{C}$) aumenta ainda mais o tamanho devido ao processo de silanização (inserção de um grupo metacrílico), com a variação no tamanho das nanopartículas de 130 a 190 nm.

As Figuras 50 (a, b) e 51 (a, b) referem-se a MMIP e MNIP da acrilamida e alilamina, respectivamente. Pode-se observar que as partículas obtidas têm um formato esférico e uniforme, com uma ligeira aglomeração. Possuem tamanhos maiores por terem sofrido

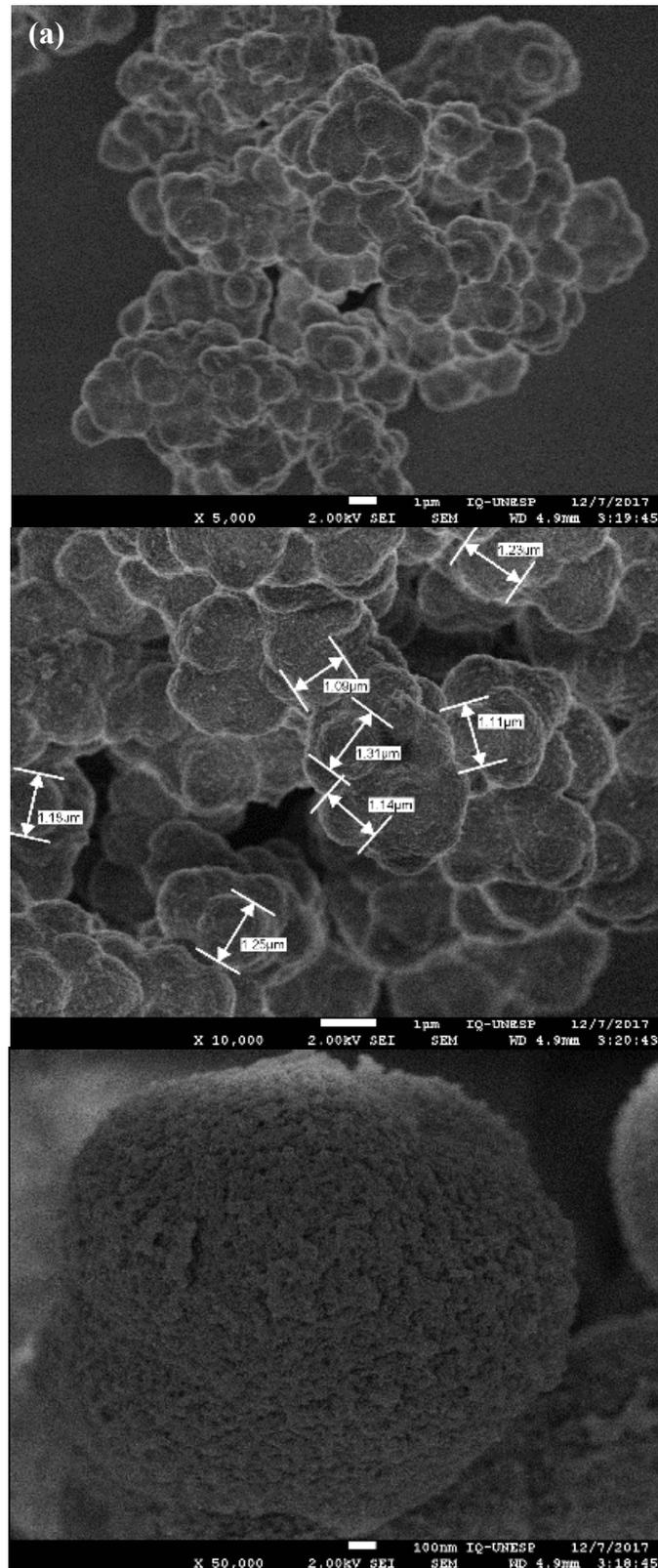
polimerização e é possível verificar uma diferença na superfície ou morfologia das partículas do MMIP, que apresentam uma superfície aparentemente mais porosa em relação ao MNIP.

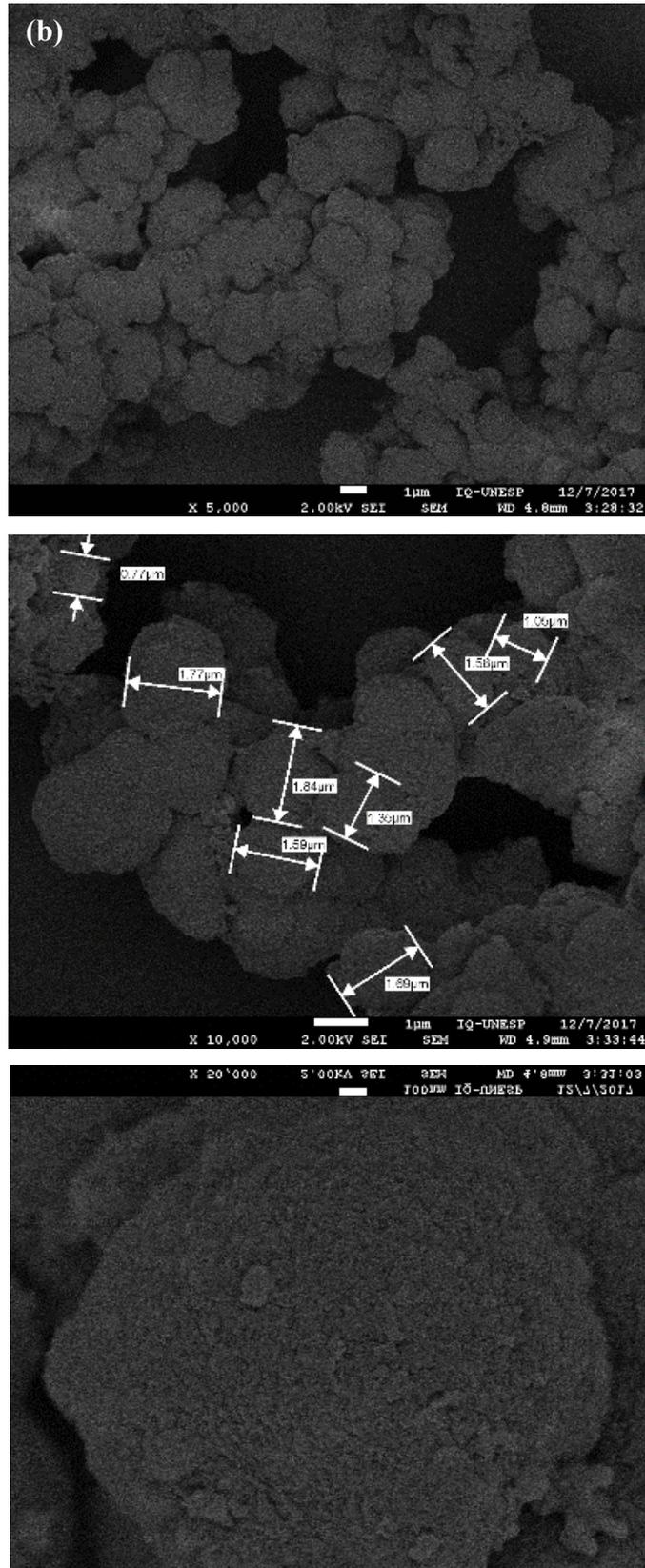
Figura 49 - Imagens de MEV-FEG para as nanopartículas: a) magnetita; b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$; e c) $(\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2-\text{C}=\text{C})$ com ampliação de 25.000 e 150.000 X.



Fonte: Autora do trabalho.

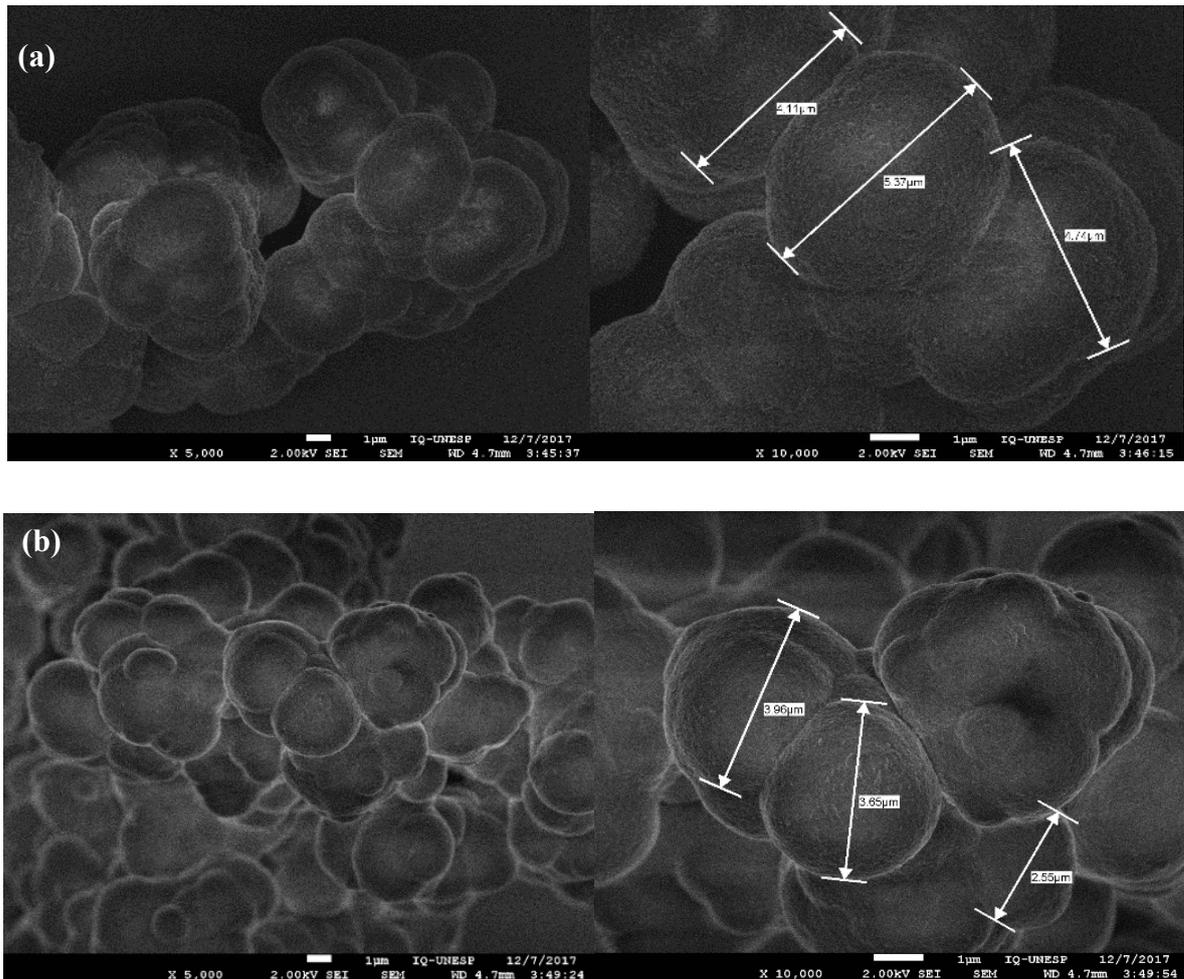
Figura 50 - Imagens de MEV-FEG para MMIP (a) e o MNIP (b) usando o monômero acrilamida com ampliação de 5.000, 10.000 e 50.000 X.





Fonte: Autora do trabalho.

Figura 51 - Imagens de MEV-FEG para MMIP (a) e o MNIP (b) usando o monômero alilamina com ampliação de 5.000, e 10.000 X.



Fonte: Autora do trabalho.

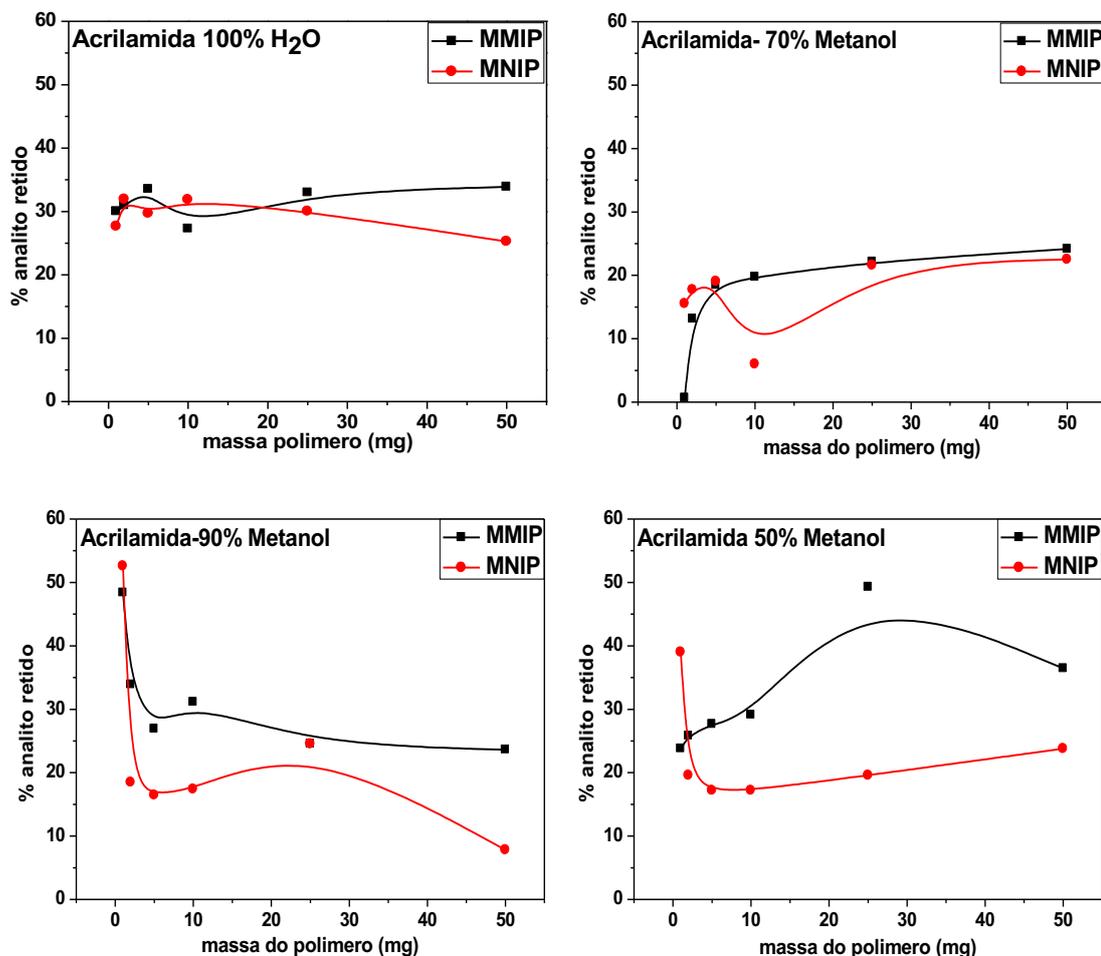
4.3.6 Avaliação da eficiência do MMIP sintetizado por meio de experimentos de afinidade

Depois de sintetizados e lavados adequadamente, os diversos MMIPs (com diferentes monômeros funcionais) tiveram suas eficiências avaliadas pela capacidade de se religar a GSH, ou seja, foi avaliada a especificidade do MMIP frente ao MNIP, em função de sua cavidade. Com o intuito de maximizar a retenção do GSH, foram avaliadas diferentes condições reacionais, tais como soluções de religação, quantidade de massa de adsorvente e tempo de interação para atingir o equilíbrio. Em todas as etapas de otimização, as medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis.

Para os estudos de religação, a concentração de GSH foi fixada em $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e variou-se a massa do polímero (1 a 50 mg) e o solvente (água, metanol e etanol) simultaneamente o tempo de interação foi fixado em 180 min.

Na Figura 52 é possível analisar, que a porcentagem de GSH retida para o monômero acrilamida em água, apresentou uma diferença pequena na curva de retenção do MMIP e MNIP, ou seja, em água, as ligações observadas são não específicas. Ao se utilizar proporções do metanol como solvente (b, c e d), o melhor perfil da curva foi obtido, utilizando-se metanol 50% e a maior diferença de retenção do analito no MMIP e MNIP foi obtida, utilizando-se a massa do polímero de 25 mg, onde a porcentagem de retenção do MMIP foi aproximadamente de 50% e a do MNIP de 20%. Desta forma, é possível afirmar que o GSH se ligou especificamente às cavidades moleculares do MMIP.

Figura 52 - Estudo de ligação em entre GSH o polímero sintetizado com o monômero funcional acrilamida em água e proporções de metanol: 90, 70 e 50%.

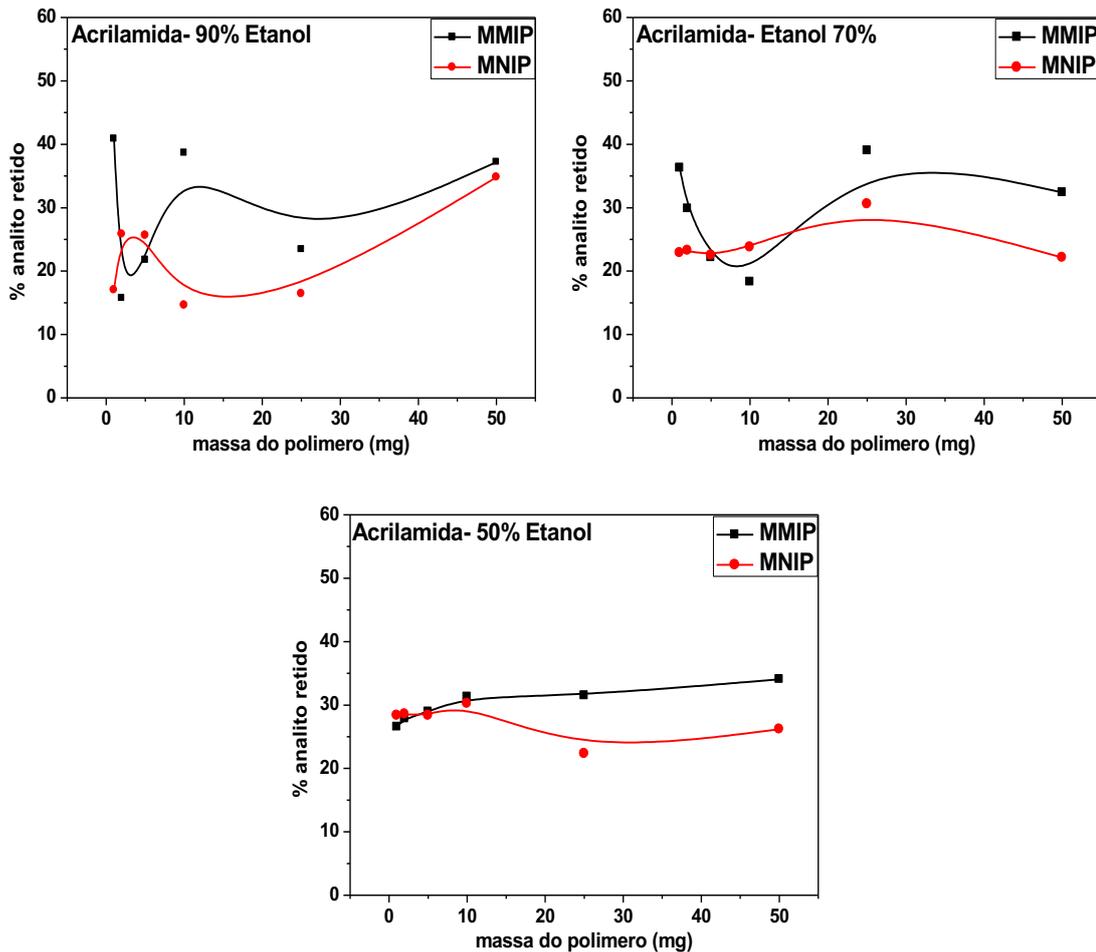


Fonte: Autora do trabalho.

Nos estudos realizados com proporções do solvente etanol, pode-se observar, na Figura 53, que em 90% de etanol, a maior diferença entre MMIP e MNIP foi obtida com a massa de 10 mg, no entanto o perfil não apresentou linearidade, para as porcentagens de 70 e

50% de etanol GSH retida, observou-se alta ligação com GSH para ambos os polímeros e sem diferenciação significativa entre eles, o que mostra que não existe ligação preferencial do GSH às cavidades específicas do MMIP. Nesse sentido, para estudos posteriores, usando o monômero funcional acrilamida, foi fixada a massa de 25 mg de MMIP e MNIP em 50% metanol.

Figura 53 - Estudo de ligação em entre GSH e o polímero sintetizado com o monômero funcional acrilamida em proporções de etanol: 90, 70 e 50%.

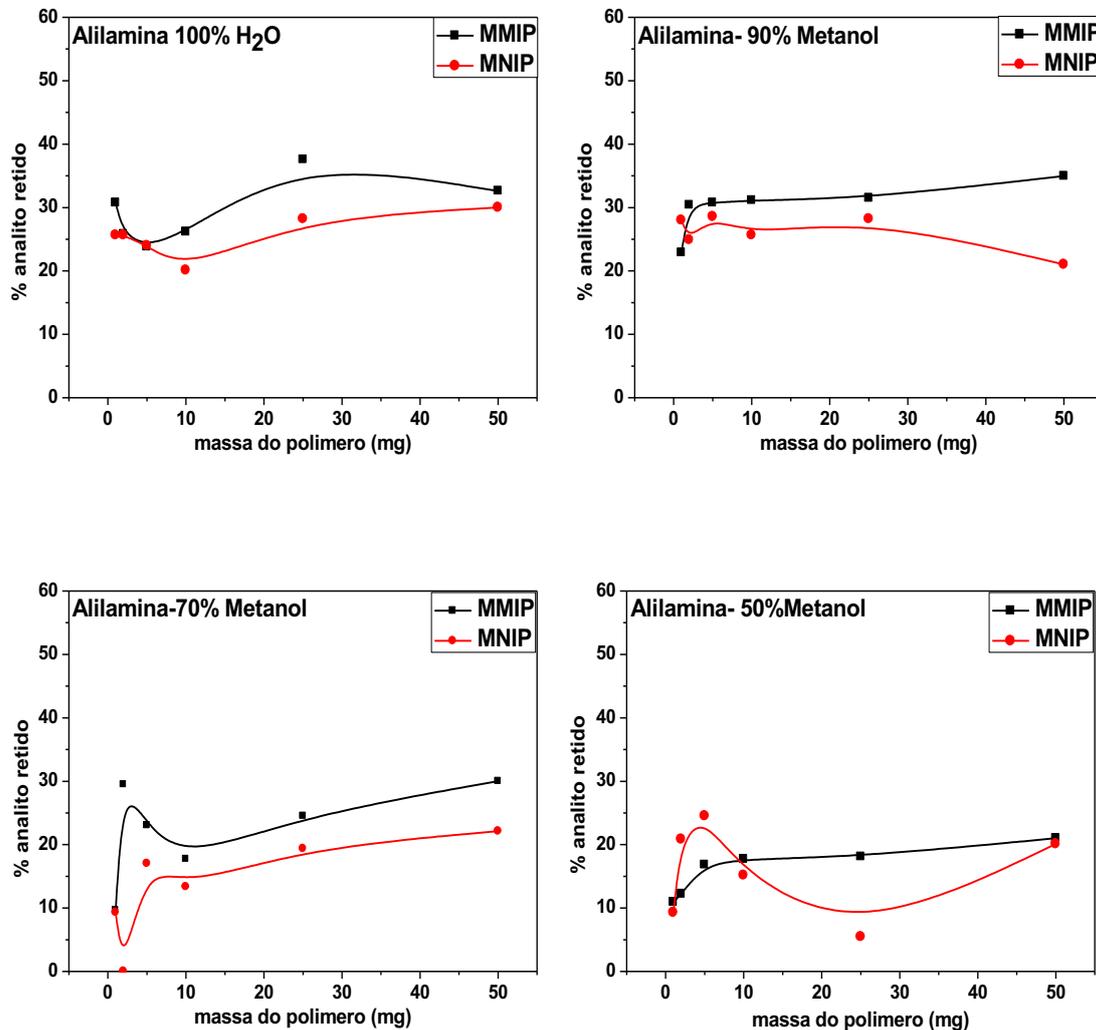


Fonte: Autora do trabalho.

Para a investigação da religação de GSH com o polímero sintetizado com o monômero alilamina foram utilizados os mesmos solventes com intuito de comparar em qual polímero ocorre maior absorção com maior diferença entre MMIP e MNIP. Conforme observado na Figura 54, em água, a diferença MMIP e MNIP foi muito pequena em quantidade de massa do polímero mais alta (50 mg) tivemos praticamente uma equivalência de absorção, o que era esperado. Com o aumento, há um maior número de ligações inespecíficas e adsorção

de GSH à superfície do polímero. Nas proporções de metanol 90, 70 e 50%, nota-se uma pequena diferença MMIPs e MNIPs, indicando alta ligação de GSH para ambos os polímeros e que não existe ligação preferencial de GSH às cavidades específicas do MMIP.

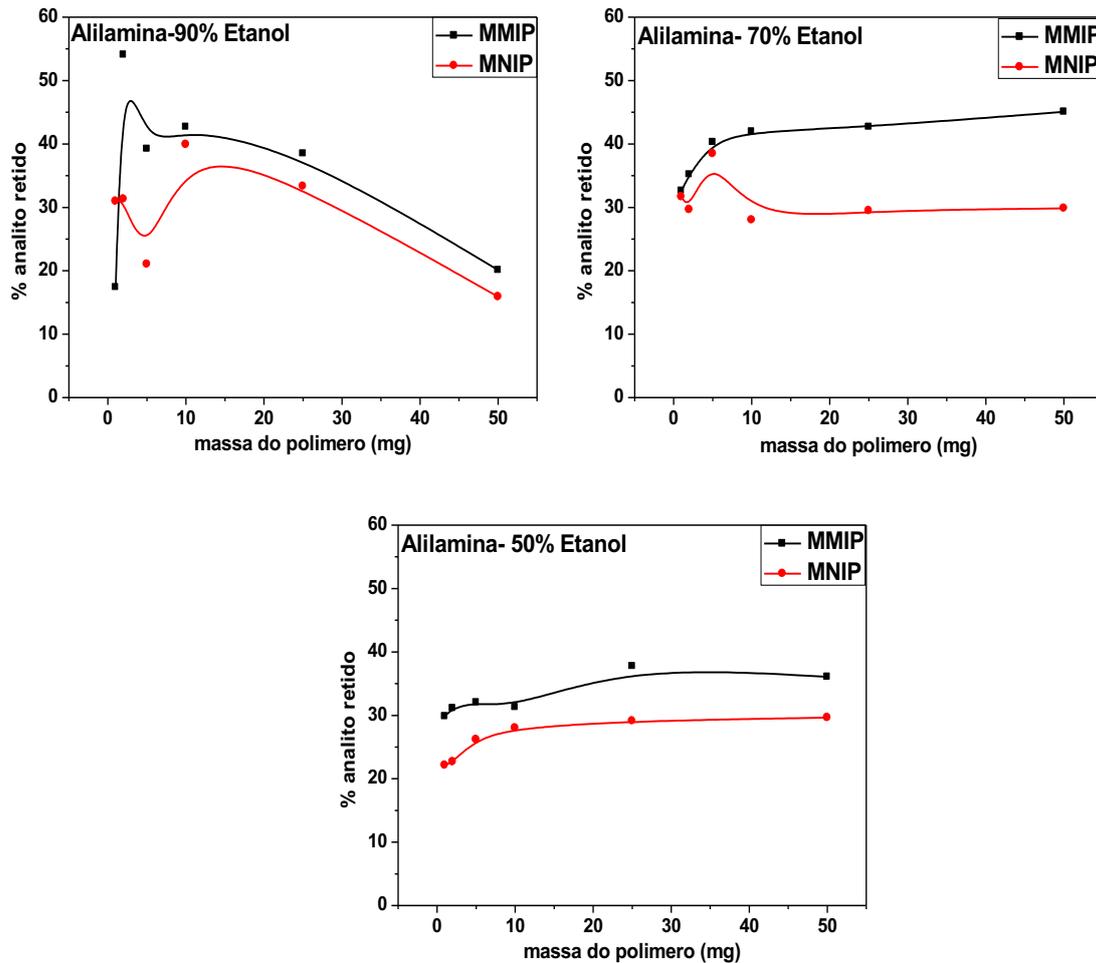
Figura 54 - Estudo de ligação entre GSH e o polímero sintetizado com o monômero funcional alilamina em água e proporções de metanol: 90, 70 e 50%.



Fonte: Autora do trabalho.

Nas soluções de etanol a 90, 70 e 50% (Figura 55), a maior diferença entre os polímeros impressos e não impressos foi obtida, utilizando-se a solução de etanol a 70%, em proporção maior ou menor do solvente, não obtivemos diferença significativa entre os dois, para 90 e 50% a diferença de absorção entre os polímeros foi inferior a 10%, para 70% de etanol a porcentagem de religação aos polímeros apresentou uma boa diferença, de aproximadamente 20%, entre MMIP e MNIP, além disso apresentou um perfil de ligação linear. Desta forma, 10 mg e 70% etanol foram, respectivamente, a massa e o solvente empregados para religação de GSH nos demais experimento para o monômero Alilamina.

Figura 55 - Estudo de ligação em entre GSH e polímero sintetizado com o monômero funcional alilamina em de etanol: 90, 70 e 50%.

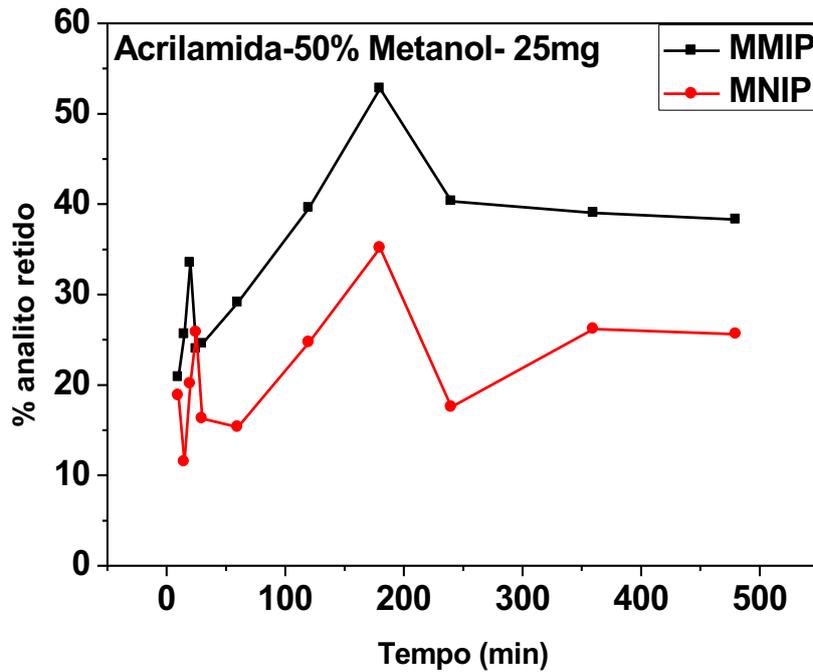


Fonte: Autora do trabalho.

O terceiro parâmetro estudado foi o tempo de interação entre o analito e o polímero (tempo de equilíbrio), tempo foi variado entre 10 e 480 min, a concentração GSH fixada em $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e a massa do polímero como o monômero acrilamida foi fixada em 25mg.

A maior retenção de GSH pelo polímero ocorreu entre 120 e 180 min (Figura 56). Após esse tempo, observa-se a dessorção de GSH até os 240 min de interação. Em tempos maiores que 240 min, a quantidade adsorvida de GSH permanece constante. Mesmo com o tempo de 180 min apresentando a maior retenção do GSH, o tempo de interação adotado nas etapas subsequentes foi de 360 min, devido, ao percentual de retenção de GSH ter se mantido constante, indicando que o sistema estava em equilíbrio e apresentando uma diferença satisfatória entre a porcentagem de religação de GSH ao MMIP e MNIP.

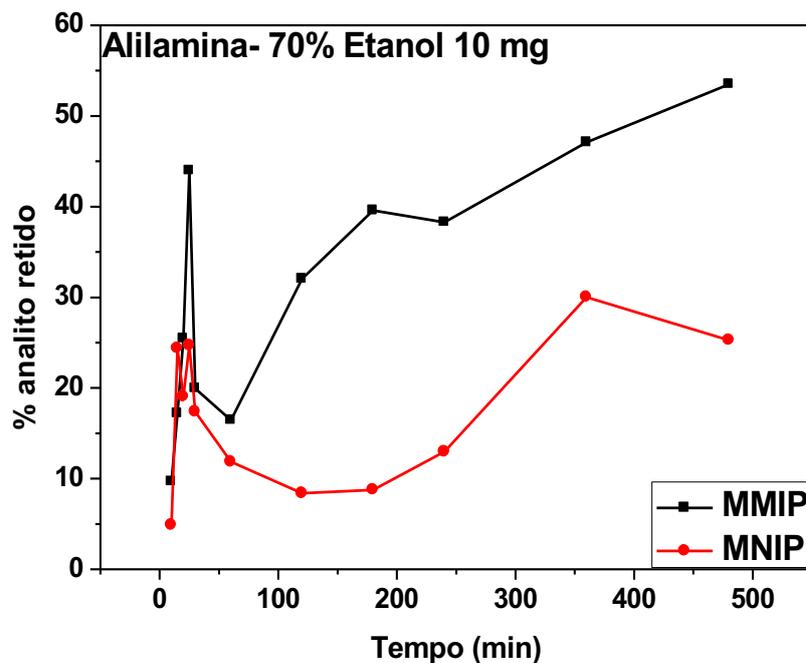
Figura 56 - Análise do tempo de interação entre GSH e os polímeros obtidos nas sínteses usando o monômero funcional acrilamida.



Fonte: Autora do trabalho.

O tempo de interação entre o analito e o polímero usando o monômero funcional alilamina foi avaliado no intervalo entre 10 e 480 min, com concentração de GSH fixada em $20 \mu\text{mol L}^{-1}$ e concentração da suspensão polimérica de 10 mg mL^{-1} . Podemos observar na Figura 57 que até 50 min a diferença entre MMIP e MNIP foi pequena, depois dos 100 min obtivemos uma diferença significativa entre os polímeros. Com o tempo de 240 min de interação, houve uma diferença satisfatória entre a porcentagem de religação de GSH ao MNIP e MMIP.

Figura 57 - Análise do tempo de interação entre GSH e os polímeros obtidos nas sínteses usando o monômero funcional alilamina.



Fonte: Autora do trabalho.

Os materiais sintetizados apresentaram uma diferença significativa entre o MMIPs e MNIPs, indicando que no MMIPs, ocorrem ligações específicas, sendo material promissor para captura e detecção de GSH.

6 CONCLUSÕES

Os estudos realizados no presente trabalho demonstram que a reação redox entre tióis de baixa massa molecular estudados e dissulfetos, em fase homogênea, é uma ferramenta analítica promissora para determinação de tióis. A principal vantagem deste método é a capacidade de aumentar a sensibilidade e a seletividade de tióis pela presença de LipS₂, em solução. Foram empregados dois tipos de eletrodos de trabalho CV e DDB, onde cada um apresentam suas vantagens, o eletrodo de para CV possui menor sensibilidade quando comparada ao eletrodo DDB, no entanto, possui um menor custo, não é necessário realizar pré-tratamento e responde aos tióis no mesmo potencial de oxidação, facilitando, dessa forma a determinação de tióis totais. O eletrodo DDB, compensa a desvantagem da necessidade de pré-tratamento com uma alta sensibilidade e grande faixa linear de trabalho. Dessa forma, sob condições otimizadas, os dois eletrodos apresentaram excelentes resultados, o eletrodo CV foi aplicado na determinação de NAC e GSH em amostras de urina e saliva e eletrodo DDB foi empregado na determinação de NAC em amostras farmacêuticas, ambos foram aplicados com sucesso, apresentando boa recuperação e baixos desvios padrão para as amostras analisadas, indicando que esta metodologia não sofre efeito de matriz, ou seja, é possível a detecção desses tióis sem a necessidade de pré-tratamento das amostras.

Metodologias reportadas na literatura para a determinação desses analitos, indicaram limites de detecção semelhantes, no entanto, normalmente utilizam eletrodos modificados, que exigem gasto de tempo e reagente no preparo do eletrodo, falta da reprodutibilidade do sinal e a necessidade de renovação da superfície. Portanto, a metodologia adotada no trabalho, utiliza um sistema simples com boa sensibilidade, alta seletividade, baixos limites de detecção e com baixo custo, com amplas possibilidades de portabilidade e estudos *in situ*. É importante ressaltar que devido ao entendimento das reações redox em solução, essa metodologia pode ser aplicada na determinação de uma grande variedade de tióis, ampliando desta forma o alcance deste trabalho.

As reações redox em solução, que acabamos de descrever, podem imitar ambientes biológicos, em meios hidrofílicos, como no citoplasma. A co-administração terapêutica de vários tióis (terapia combinada) mostra, por vezes, efeitos prejudiciais em vez de sinérgicos. Portanto as reações, no presente método pode ser utilizado na clarificação de interações entre tióis e dissulfetos, com resultados controversos apresentados na literatura e este também é um resultado vantajoso deste trabalho.

A metodologia aplicada sofre de algumas limitações, responde a uma classe de moléculas e não pode ser aplicada em amostras mais complexas como o sangue, por exemplo, pois algumas substâncias são facilmente adsorvidas no eletrodo, dificultando assim a interação LipS₂+NAC, para solucionar essas limitações foi realizado a síntese de MMIPs.

A síntese dos MMIPs foi realizada com sucesso para a determinação de GSH, onde as nanopaticulas foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, posteriormente recobertas pelos MIPs, que foram sintetizados pelo método de precipitação, usando acrilamida e alilamina como monômeros funcionais, GSH como molécula molde, TRIM como reagente de ligação cruzada, AIBN como iniciador radicalar e acetonitrila/ tolueno como solvente porogênico. Todos os polímeros obtidos foram caracterizados através das técnicas de FT-IR, VSM e MEV-FEG. Os polímeros molecularmente impressos apresentaram grande eficiência, uma vez que o MIP sintetizado para GSH apresentou uma diferença significativa em relação aos MNIPs, indicando uma boa relação do analito às cavidades seletivas do MIP.

7 PERSPECTIVAS

Considerando as etapas realizadas até então, as perspectivas de desenvolvimento e continuidade da pesquisa abrangem os seguintes tópicos:

- Avaliar outros dissulfetos em relação aos tióis;
- Avaliação da seletividade dos polímeros impressos na presença de outros tióis;
- Aplicação dos MMIPs em amostras de sangue;
- Aplicação do material obtido como fase sensora na construção de magneto-sensores para determinação eletroquímica seletiva de GSH;

REFERÊNCIAS

- ABT, B. et al. Electrochemical Determination of Sulphur-containing Pharmaceuticals Using Boron-doped Diamond Electrodes. **Electroanalysis**, v. 28, p. 1641–1646, 2016.
- AGGARWAL, N. et al. Structural Biology and Crystallization Communications Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of carbonyl reductase from *Candida parapsilosis* ATCC 7330. **Acta Crystallographica Section F**, v. 69, p. 313–315, 2013.
- ALARFAJ, N. A. Adsorptive Stripping Anodic Voltammetric Determination of Thiocetic Acid in Bulk and Pharmaceutical Formulations. **International Journal of Biomedical Science**, v. 5, p. 54–58, 2009.
- ALI, M. Y. et al. Myosin V and Kinesin act as tethers to enhance each others' processivity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, p. 4691–4696, 2008.
- AMROUCHE-MEKKIOUI, I.; DJERDJOURI, B. N-acetylcysteine improves redox status, mitochondrial dysfunction, mucin-depleted crypts and epithelial hyperplasia in dextran sulfate sodium-induced oxidative colitis in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 691, p. 209–217, 2012.
- ANCHA, H. R. et al. Effects of N-Acetylcysteine Plus Mesalamine on Prostaglandin Synthesis and Nitric Oxide Generation in TNBS-Induced Colitis in Rats. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 54, p. 758–766, 2009.
- AOUACHERI, O. et al. The Investigation of the Oxidative Stress-Related Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 39, p. 44–49, 2015.
- ARABALI, V. et al. A nanostructure-based electrochemical sensor for square wave voltammetric determination of N-acetylcysteine in pharmaceutical and biological samples. **Ionics**, v. 21, p. 1153–1161, 2015.
- ATKURI, K. R. et al. N-acetylcysteine -a safe antidote for cysteine/glutathione deficiency. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p. 355–359, 2007.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods : fundamentals and applications**. 2. ed. New York: Wiley, 2001.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113–123, 2006.
- BASZCZUK, A.; KOPCZYŃSKI, Z. Hyperhomocysteinemia in patients with cardiovascular disease. **Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej**, v. 68, p. 579–589, 2014.
- BEITOLLAHI, H. et al. Electrochemical behavior of a carbon paste electrode modified with 5-amino-3',4'-dimethyl-biphenyl-2-ol/carbon nanotube and its application for simultaneous determination of isoproterenol, acetaminophen and N-acetylcysteine. **Electrochimica Acta**, v. 68, p. 220–226, 2012.
- BIEWENGA, G. P.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. **An overview of lipolate chemistry**. New York: Marcel Dekker, Inc., 1997.

- BILSKA, A.; WŁODEK, L. Lipoic acid - the drug of the future? **Pharmacological reports : PR**, v. 57, p. 570–577, 2005.
- BONANOMI, L.; GAZZANIGA, A. Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine. **European journal of respiratory diseases. Supplement**, v. 111, p. 45–51, 1980.
- BREITKREUTZ, R. et al. Improvement of immune functions in HIV infection by sulfur supplementation: two randomized trials. **Journal of molecular medicine**, v. 78, p. 55–62, 2000.
- CAMATARI, F. O. DOS S. **Determinação de curcuminoides e avaliação da capacidade antioxidante contra espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de extratos de curcuma longa e constituintes isolados**. [s.l.] Universidade Federal de Alagoas, 2017.
- CAO, L. et al. Ratios of biliary glutathione disulfide (GSSG) to glutathione (GSH): a potential index to screen drug-induced hepatic oxidative stress in rats and mice. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 405, p. 2635–2642, 2013.
- CARDOSO DE SÁ, A. et al. Determination of N-Acetylcysteine by Cyclic Voltammetry Using Modified Carbon Paste Electrode with Copper Nitroprusside Adsorbed on the 3–Aminopropylsilica. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, p. 3754–3767, 2011.
- CERQUEIRA, F. M.; GENNARI DE MEDEIROS, M. H.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova Nova**, v. 30, p. 441–449, 2007.
- CHEN, W.-W. W.; ZHANG, X.; HUANG, W.-J. J. Role of neuroinflammation in neurodegenerative diseases (Review). **Molecular Medicine Reports**, v. 13, p. 3391–3396, 2016.
- COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **International immunopharmacology**, v. 1, p. 1397–406, 2001.
- CONCHA-HERRERA, V.; TORRES-LAPASÍO, J. R.; GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. C. Chromatographic Determination of Thiols After Pre-column Derivatization with o - Phthalaldehyde and Isoleucine. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 27, p. 1593–1609, 2004.
- CORDUNEANU, O.; GARNETT, M.; BRETT, A. M. O. Anodic Oxidation of α -Lipoic Acid at a Glassy Carbon Electrode and Its Determination in Dietary Supplements. **Analytical Letters**, v. 40, p. 1763–1778, 2007.
- CORMACK, P. A. ; ELORZA, A. Z. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. **Journal of Chromatography B**, v. 804, p. 173–182, 2004.
- COŞKUN, G.; ZİHNİOĞLU, F. Effect of Some Biocides on Glutathione-s-transferase in Barley, Wheat, Lentil and Chickpea Plants. **Turkish Journal of Biology** , v. 26, p. 89–94, 2002.
- DE ROSA, S. C. et al. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, p. 915–929, 2000.

DRÖGE, W. et al. Glutathione augments the activation of cytotoxic T lymphocytes in vivo. **Immunobiology**, v. 172, p. 151–156, 1986.

DUCROS, V. et al. Methods for homocysteine analysis and biological relevance of the results. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 781, p. 207–226, 2002.

EKSIN, E.; ERDEM, A. Electrochemical Determination of Homocysteine at Disposable Graphite Electrodes. **Electroanalysis**, v. 26, p. 1945–1951, 2014.

ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 82, p. 70–7, 1959.

ENSAFI, A. A. et al. Voltammetric measurement of trace amount of glutathione using multiwall carbon nanotubes as a sensor and chlorpromazine as a mediator. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 14, p. 1415–1423, 2010.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239–247, 2000.

FORMAN, H. J.; FUKUTO, J. M.; TORRES, M. Redox signaling: thiol chemistry defines which reactive oxygen and nitrogen species can act as second messengers. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 287, p. 246–256, 2004.

FOULADGAR, M.; MOHAMMADZADEH, S.; NAYERI, H. Electrochemical determination of homocysteine using carbon nanotubes modified paste electrode and isoprenaline as a mediator. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 50, p. 981–988, 2014.

FREITAS, M.; LIMA, J. L. F. C.; FERNANDES, E. Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 649, p. 8–23, 2009.

GARAGUSO, I.; NARDINI, M. Polyphenols content, phenolics profile and antioxidant activity of organic red wines produced without sulfur dioxide/sulfites addition in comparison to conventional red wines. **Food Chemistry**, v. 179, p. 336–342, 2015.

GHIBU, S. et al. Antioxidant properties of alpha-lipoic acid: effects on red blood membrane permeability and adaptation of isolated rat heart to reversible ischemia. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 320, p. 141–148, 2009.

GILBERT, H. F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, v. 63, p. 69–172, 1990.

GO, Y.-M.; JONES, D. P. Thiol/disulfide redox states in signaling and sensing. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 48, p. 173–182, 2013.

GROITL, B.; JAKOB, U. Thiol-Based Redox Switches. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 8, p. 1335–1343, 2014.

GUO, H. et al. Influence of folic acid on plasma homocysteine levels & arterial endothelial function in patients with unstable angina. **The Indian journal of medical research**, v. 129, p. 279–84, 2009.

- GURER, H. et al. Antioxidant role of alpha-lipoic acid in lead toxicity. **Free radical biology & medicine**, v. 27, p. 75–81, 1999.
- HADDAD, J. J. Oxygen homeostasis, thiol equilibrium and redox regulation of signalling transcription factors in the alveolar epithelium. **Cell Signaling Technology**, v. 14, p. 799–810, 2002.
- HANKEY, G. J.; EIKELBOOM, J. W. Homocysteine and vascular disease. **The Lancet**, v. 354, p. 407–413, 1999.
- HANSEN, R. E. et al. Quantifying the global cellular thiol– disulfide status. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 422–427, 2009.
- HAUPT, K. et al. Molecularly Imprinted Polymers. **Topics in Current Chemistry**, v. 325, p. 1–28, 2011.
- HAYAKAWA, M. et al. Evidence that reactive oxygen species do not mediate NF- κ B activation. **The EMBO Journal**, v. 22, p. 3356–3366, 2003.
- HOLMQUIST, L. et al. Lipoic acid as a novel treatment for Alzheimer’s disease and related dementias. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, p. 154–164, 2007.
- HUANG, D.-L. et al. Application of molecularly imprinted polymers in wastewater treatment: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 963–977, 2015.
- HUSSAIN, S. et al. A novel core@shell magnetic molecular imprinted nanoparticles for selective determination of folic acid in different food samples. **Reactive and Functional Polymers**, v. 106, p. 51–56, 2016.
- INOUE, T.; KIRCHHOFF, J. R. Electrochemical detection of thiols with a coenzyme pyrroloquinoline quinone modified electrode. **Analytical chemistry**, v. 72, p. 5755–5760, 2000.
- IWASAKI, Y. et al. Separation technique for the determination of highly polar metabolites in biological samples. **Metabolites**, v. 2, p. 496–515, 2012.
- JAHANSHAH, B. et al. Simultaneous voltammetric determination of N-Acetyl-L-Cysteine, uric acid and tryptophan at surface of glassy carbon electrode in the presence of 4-Chlorocatechol as a homogeneous electrochemical catalyst. **Journal of the Chilean Chemical Society**, v. 59, p. 2692–2696, 2014.
- JENA, G.; TRIVEDI, P. P.; SANDALA, B. Oxidative stress in ulcerative colitis: an old concept but a new concern. **Free Radical Research**, v. 46, p. 1339–1345, 2012.
- JONES, C. M. et al. Kinetics of superoxide scavenging by glutathione: an evaluation of its role in the removal of mitochondrial superoxide. **Biochemical Society transactions**, v. 31, p. 1337–1339, 2003.
- KALCHER, K. et al. Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: A review with particular emphasis on the period 1990-1993. **Electroanalysis**, v. 7, p. 5–22, 1995.

- KALYANARAMAN, B. Teaching the basics of redox biology to medical and graduate students: Oxidants, antioxidants and disease mechanisms. **Redox Biology**, v. 1, p. 244–257, 2013.
- KAND'ÁR, R. et al. Determination of reduced and oxidized glutathione in biological samples using liquid chromatography with fluorimetric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 43, p. 1382–1387, 2007.
- KAPLOWITZ, N.; AW, T. Y.; OOKHTENS, M. The Regulation of Hepatic Glutathione. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 25, p. 715–744, 1985.
- KASPERCZYK, S. et al. Effect of N-acetylcysteine administration on the expression and activities of antioxidant enzymes and the malondialdehyde level in the blood of lead-exposed workers. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 37, p. 638–647, 2014.
- KLATT, P.; LAMAS, S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. **European journal of biochemistry**, v. 267, p. 4928–4944, 2000.
- KOLGAZI, M. et al. Alpha-Lipoic acid modulates gut inflammation induced by trinitrobenzene sulfonic acid in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 22, p. 1859–1865, 2007.
- KONG, X. et al. Synthesis and characterization of the core-shell magnetic molecularly imprinted polymers ($\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MIPs) adsorbents for effective extraction and determination of sulfonamides in the poultry feed. **Journal of chromatography. A**, v. 1245, p. 8–16, 2012.
- KRUMOVA, K.; COSA, G. Chapter 1 Overview of Reactive Oxygen Species. In: NONELL, S.; FLORS, C. (Eds.). **Singlet Oxygen: Applications in Biosciences and Nanosciences, Volume 1**. [s.l.] The Royal Society of Chemistry, 2016. v. 1p. 1–21.
- LANG, A. E. The progression of Parkinson disease: a hypothesis. **Neurology**, v. 68, p. 948–952, 2007.
- LARKIN, P. **Infrared and raman spectroscopy : principles and spectral interpretation**. 1. ed. San Diego: Elsevier, 2011.
- LASRAM, M. M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of N-acetylcysteine against malathion-induced liver damages and immunotoxicity in rats. **Life sciences**, v. 107, p. 50–58, 2014.
- LAVIRON, E. General expression of the linear potential sweep voltammogram in the case of diffusionless electrochemical systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 101, p. 19–28, 1979.
- LEE, P. T.; GONCALVES, L. M.; COMPTON, R. G. Electrochemical determination of free and total glutathione in human saliva samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 221, p. 962–968, 2015.
- LI, H. et al. Synthesis of magnetic molecularly imprinted polymer particles for selective adsorption and separation of dibenzothiophene. **Microchimica Acta**, v. 179, p. 123–130, 2012.

- LIN, Z. et al. Application of magnetic molecularly imprinted polymers in the detection of malachite green in fish samples. **Reactive and Functional Polymers**, v. 98, p. 24–30, 2016.
- LIU, H. et al. Glutathione Metabolism during Aging and in Alzheimer Disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1019, p. 346–349, 2004.
- LIU, X. et al. Magnetic molecularly imprinted polymers for spectrophotometric quantification of curcumin in food. **Food Chemistry**, v. 202, p. 309–315, 2016.
- LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, p. 670–673, 2004.
- LUSHCHAK, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. **Chemico-Biological Interactions**, v. 224, p. 164–175, 2014.
- MAETZLER, W. et al. Reduced but not oxidized cerebrospinal fluid glutathione levels are lowered in Lewy body diseases. **Movement Disorders**, v. 26, p. 176–181, 2011.
- MAYER, E. L.; JACOBSEN, D. W.; ROBINSON, K. Homocysteine and coronary atherosclerosis. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 27, p. 517–27, 1996.
- MCNEIL, N. et al. Oxidation of Disulfides to Thiolsulfinates with Hydrogen Peroxide and a Cyclic Seleninate Ester Catalyst. **Molecules**, v. 20, p. 10748–10762, 2015.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p. 711–760, 1983.
- MELONI, M.; NICOLAY, J. F. Dynamic monitoring of glutathione redox status in UV-B irradiated reconstituted epidermis: effect of antioxidant activity on skin homeostasis. **Toxicology in vitro**, v. 17, p. 609–613, 2003.
- MIRANDA, M. P. et al. Use of fluorine-doped tin oxide electrodes for lipoic acid determination in dietary supplements. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 668, p. 1–6, 2012.
- MORIKAWA, T.; YASUNO, R.; WADA, H. Do mammalian cells synthesize lipoic acid? **FEBS Letters**, v. 498, p. 16–21, 2001.
- MOURA, F. et al. Lipoic Acid: Its Antioxidant and Anti-Inflammatory Role and Clinical Applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 458–483, 2015a.
- MOURA, F. A. et al. Antioxidant therapy for treatment of inflammatory bowel disease: Does it work? **Redox biology**, v. 6, p. 617–639, 2015b.
- MOURA, F. A. et al. Colonic and Hepatic Modulation by Lipoic Acid and/or N-Acetylcysteine Supplementation in Mild Ulcerative Colitis Induced by Dextran Sodium Sulfate in Rats. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2016, p. 1–18, 2016.
- NING, F. et al. Preparation and Characterization of Superparamagnetic Molecularly Imprinted Polymers for Selective Adsorption and Separation of Vanillin in Food Samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 11138–11145, 2014.

NOSZÁL, B.; VISKY, D.; KRASZNI, M. Population, Acid–Base, and Redox Properties of N-Acetylcysteine Conformers. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 2176–2182, 2000.

NWOSE, E. U. et al. Changes in the erythrocyte glutathione concentration in the course of diabetes mellitus. **Redox Report**, v. 11, p. 99–104, 2006.

PARASASSI, T. et al. Differentiation of normal and cancer cells induced by sulfhydryl reduction: biochemical and molecular mechanisms. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, p. 1285–1296, 2005.

PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v. 333, p. 19–39, 2003.

PATRICK, L. Nutrients and HIV: part three - N-acetylcysteine, alpha-lipoic acid, L-glutamine, and L-carnitine. **Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic**, v. 5, p. 290–305, 2000.

PAULING, L. A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies *. **Journal of the American Chemical Society**, v. 62, p. 2643–2657, 1940.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à espectroscopia**. 2. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2015.

PINNEN, F. et al. Ibuprofen and Glutathione Conjugate as a Potential Therapeutic Agent for Treating Alzheimer's Disease. **Archiv der Pharmazie**, v. 344, p. 139–148, 2011.

POLYAKOV, M. V. Adsorption properties and structure of silica gel. **Zhurnal Fizicheskoi Khimii**, v. 2, p. 799–805, 1931.

POOLE, L. B. The Basics of Thiols and Cysteines in Redox Biology and Chemistry. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 80, p. 148–157, 2015.

PORTO BARBOSA, J. H. et al. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGEs) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. **Química Nova Nova**, v. 39, p. 608–620, 2016.

POURNAGHI-AZAR, M. H.; AHOUR, F. Palladized aluminum electrode covered by Prussian blue film as an effective transducer for electrocatalytic oxidation and hydrodynamic amperometry of N-acetyl-cysteine and glutathione. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 622, p. 22–28, 2008.

PRAVDA, J. Radical induction theory of ulcerative colitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 11, p. 2371, 2005.

PRIOR, R. L. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC): New horizons in relating dietary antioxidants/bioactives and health benefits. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 797–810, 2015.

PUPIN, R. R. et al. **Molecularly Imprinted Polymers (MIP): From the Bulk Synthesis to Hybrid Material to Classic and New Applications**. In: *Molecularly Imprinted Polymers (MIPs): Challenges, Uses and Prospects*. 1 ed. Hauppauge: Nova Science Publishers, p. 43–118, 2016.

QUEIROZ DE ANDRADE, K. et al. Oxidative Stress and Inflammation in Hepatic Diseases: Therapeutic Possibilities of N-Acetylcysteine. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 30269–30308, 2015.

RAOOF, J. B. et al. Catechol as an electrochemical indicator for voltammetric determination of N-acetyl-l-cysteine in aqueous media at the surface of carbon paste electrode. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 40, p. 1357–1363, 2010.

RAOOF, J. B. et al. Multi-wall carbon nanotubes as a sensor and ferrocene dicarboxylic acid as a mediator for voltammetric determination of glutathione in hemolysed erythrocyte. **Analytical Methods**, v. 3, p. 2637–2643, 2011.

RAOOF, J. B.; OJANI, R.; KARIMI-MALEH, H. Electrocatalytic oxidation of glutathione at carbon paste electrode modified with 2,7-bis (ferrocenyl ethyl) fluoren-9-one: application as a voltammetric sensor. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 39, p. 1169–1175, 2009.

REFSUM, H.; WESENBERG, F.; UELAND, P. M. Plasma homocysteine in children with acute lymphoblastic leukemia: changes during a chemotherapeutic regimen including methotrexate. **CANCER RESEARCH**, v. 51, p. 828–835, 1991.

RIDDLES, P. W.; BLAKELEY, R. L.; ZERNER, B. Reassessment of Ellman's reagent. **Methods in enzymology**, v. 91, p. 49–60, 1983.

SAMUNI, Y. et al. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 4117–4129, 2013.

SELLERGRÉN, B.; ALLENDER, C. J. Molecularly imprinted polymers: a bridge to advanced drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 57, p. 1733–41, 2005.

SHAHAR, T.; TAL, N.; MANDLER, D. Molecularly imprinted polymer particles: Formation, characterization and application. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 495, p. 11–19, 2016.

SIANGPROH, W.; NGAMUKOT, P.; CHAILAPAKUL, O. Electrochemical determination of captopril at boron-doped diamond thin film electrode applied to a flow injection system. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 91, p. 60–66, 2003.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free radical biology & medicine**, v. 27, n. 9–10, p. 916–21, nov. 1999.

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 4, p. 180–183, 2015.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, v. 11, p. 613–619, 2017.

SIES, H.; BERNDT, C.; JONES, D. P. Oxidative Stress. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, p. 715–748, 2017.

SILVERSTEIN, R. M. et al. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. ed. [s.l.] Livros Técnicos e Científicos, 2000.

SMITH, D. O. Development of a Vibrating-Coil Magnetometer. **Review of Scientific Instruments**, v. 27, p. 261–268, 1956.

SODIPO, B. K.; AZIZ, A. A. Recent advances in synthesis and surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with silica. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 416, p. 275–291, 2016.

STANKOVIĆ, D. M.; MEHMETI, E.; KALCHER, K. Electrochemical oxidation of phenanthrenequinone dioxime and its quantification using sensing at boron doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 770, p. 84–89, 2016.

SUAREZ, T. W.; MARCOLINO, L. H.; FATIBELLO-FILHO, O. Voltammetric determination of N-acetylcysteine using a carbon paste electrode modified with copper(II) hexacyanoferrate(III). **Microchemical Journal**, v. 82, p. 163–167, 2006.

SUBRAMANIAN, R.; SUBBRAMANIYAN, P.; RAJ, V. Antioxidant activity of the stem bark of *Shorea roxburghii* and its silver reducing power. **Springerplus**, v. 2, p. 1–11, 2013.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. P. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em técnicas de extração e separação. **Química Nova**, v. 28, p. 1076–1086, 2005.

THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 279, p. 1005–1028, 2000.

TIROUVANZIAM, R. et al. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 4628–4633, 2006.

TRUJILLO, M.; ALVAREZ, B.; RADI, R. One- and two-electron oxidation of thiols: mechanisms, kinetics and biological fates. **Free Radical Research**, v. 50, p. 150–171, 2016.

UZURIAGA-SÁNCHEZ, R. J. et al. Magnetically separable polymer (Mag-MIP) for selective analysis of biotin in food samples. **Food chemistry**, v. 190, p. 460–467, 2016.

VLATAKIS, G. et al. Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting. **Nature**, v. 361, p. 645–647, 1993.

WACKERLIG, J.; LIEBERZEIT, P. A. Molecularly imprinted polymer nanoparticles in chemical sensing – Synthesis, characterisation and application. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 207, p. 144–157, 2015.

WANG, H.-S. Development of fluorescent and luminescent probes for reactive oxygen species. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 181–202, 1 dez. 2016.

WANG, W. et al. Detection of Homocysteine and Cysteine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, p. 15949–15958, 2005.

WHILLIER, S.; RAFTOS, J. E.; KUCHEL, P. W. Glutathione synthesis by red blood cells in type 2 diabetes mellitus. **Redox Report**, v. 13, p. 277–282, 2008.

- WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 25, p. 434–456, 1998.
- WINTHER, J. R.; THORPE, C. Quantification of thiols and disulfides. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1840, p. 838–846, 2014.
- WONDRAK, G. T. et al. Identification of α -dicarbonyl scavengers for cellular protection against carbonyl stress. **Biochemical Pharmacology**, v. 63, p. 361–373, 2002.
- WONG, A. et al. DEVELOPMENT OF AN ELECTROCHEMICAL SENSOR MODIFIED WITH MWCNT-COOH AND MIP FOR DETECTION OF DIURON. **Electrochimica Acta**, v. 182, p. 122–130, 2015.
- WONG, D. Y. et al. Glutathione concentration in oral cancer tissues. **Cancer letters**, v. 81, p. 111–116, 1994.
- WU, G. et al. Improved activity of the Cel5A endoglucanase in *Saccharomyces cerevisiae* deletion mutants defective in oxidative stress defense mechanisms. **Biotechnology Letters**, v. 37, p. 1081–1089, 2015.
- WULFF, G.; SARHAN, A. Use of polymers with enzyme-analogous structures for resolution of racemates. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 11, p. 341–342, 1972.
- YEH, C.-C. et al. A study of glutathione status in the blood and tissues of patients with breast cancer. **Cell Biochemistry and Function**, v. 24, p. 555–559, 2006.
- ZHANG, J.; HU, Z.; CHEN, X. Quantification of glutathione and glutathione disulfide in human plasma and tobacco leaves by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Talanta**, v. 65, p. 986–990, 2005.
- ZHANG, Y. et al. Preparation of magnetic indole-3-acetic acid imprinted polymer beads with 4-vinylpyridine and β -cyclodextrin as binary monomer via microwave heating initiated polymerization and their application to trace analysis of auxins in plant tissues. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7337–7344, 2010.
- ZHAO, J. et al. Development of Electrochemical Sensor for Homocysteine Determination as a Cerebrovascular Disease Biomarker. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 12, p. 8642–8650, 2017.
- ZIEGLER, D. et al. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7-month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III Study). ALADIN III Study Group. Alpha-Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. **Diabetes care**, v. 22, p. 1296–301, 1999.