

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

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

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO PARA ELETROANÁLISE DE
HOMOCISTEÍNA VIA ELETRODO MAGNÉTICO MODIFICADO COM POLÍMEROS IMPRESSOS
MOLECULARMENTE.

POLIANA DA CONCEIÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

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

POLIANA DA CONCEIÇÃO

DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO PARA ELETROANÁLISE DE
HOMOCISTEÍNA VIA ELETRODO MAGNÉTICO MODIFICADO COM POLÍMEROS IMPRESSOS
MOLECULARMENTE.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Mestra em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Marília O. F. Goulart

Coorientadora: Dr.^a Ana Caroline F. Santos

Maceió – AL

2022

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

Bibliotecária: Taciana Sousa dos Santos – CRB-4 – 2062

C744d Conceição, Poliana da.

Desenvolvimento de sensor eletroquímico para eletroanálise de homocisteína via eletrodo magnético modificado com polímeros impressos molecularmente / Poliana da Conceição. – 2022

76 f. : il. color.

Orientadora: Marília O. F. Goulart.

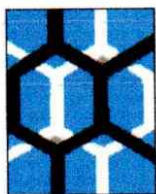
Coorientadora: Ana Caroline F. Santos.

Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 68-76.

1. Homocisteína. 2. Eletroanálise. 3. Polímeros molecularmente impressos. 4. Sensor eletroquímico. I. Título.

CDU: 543.55



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 dissertação da mestranda **POLIANA DA CONCEIÇÃO** intitulada: “**DESENVOLVIMENTO DE SENSOR ELETROQUÍMICO PARA ELETROANÁLISE DE HOMOCISTEÍNA VIA ELETRODO MAGNÉTICO MODIFICADO COM POLÍMEROS IMPRESSOS MOLECULARMENTE**”, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 28 de março de 2022, às 9h, por meio de videoconferência.

Maceió, 28 de março de 2022.


Comissão Examinadora:

Ana Caroline Ferreira Santos
Dra. ANA CAROLINE FERREIRA SANTOS, UFAL
Examinadora Externa à Instituição


Andresa K. A. de Almeida
Dra. ANDRESA KATHERINNE ALBUQUERQUE DE ALMEIDA, UFAL
Examinadora Externa à Instituição

Documento assinado digitalmente
 AURO ATSUSHI TANAKA
Data: 29/03/2022 18:23:25-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Dr. AURO ATSUSHI TANAKA, UFMA
Examinador Externo à Instituição

Documento assinado digitalmente
 VINICIUS DEL COLLE
Data: 30/03/2022 10:57:30-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Dr. VINICIUS DEL COLLE, UFAL
Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
 MARILIA OLIVEIRA FONSECA GOULART
Data: 28/03/2022 19:54:22-0300
Verifique em <https://verificador.itl.br>

Dra. MARILIA OLIVEIRA FONSECA GOULART, UFAL
Presidente

Com amor e carinho, dedico esse trabalho a minha mãe Rosivete da Conceição, ao meu irmão Samuel D. C. da Silva e a minha querida avó Besinha M. C. Nasário (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha família, em especial a minha mãe **Rosivete** e meu irmão **Samuel**, pelo amor, carinho e dedicação incondicional ao longo de toda a minha trajetória acadêmica e pessoal.

Ao meu namorado **Nelson D. C. Oliveira** pelo companheirismo, paciência, amor e apoio, sempre disposto a ajudar sem medir esforços.

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Marília Oliveira Fonseca Goulart** pela paciência, confiança, ensinamentos e pelo exemplo de dedicação e amor à pesquisa.

À **Dr^a. Ana Caroline F. Santos** pela coorientação, disponibilidade, paciência e atenção. Pois sem seu auxílio, o desenvolvimento deste trabalho não seria possível.

À **Dr^a. Andresa Katherinne A. de Almeida** pela amizade, sugestões, críticas e momentos de aprendizado, bem como apoio e motivação nas horas difíceis.

A todos os professores do IQB/PPGQB pela partilha de conhecimentos e ensinamentos. Em especial, ao professor **Prof. Dr. Vinícius Del Colle** pelas interessantes discussões sobre eletroquímica, as quais possibilitaram a compreensão de tópicos importantes desta dissertação.

Aos meus amigos **Ricardo, Victor, Richard e Rose** pela parceria, conversas divertidas e momentos de aprendizagem que levarei por toda a vida.

Ao **Prof. Dr. Auro Atsushi Tanaka** e a todos do laboratório de eletroquímica da UFMA pela recepção, ensinamentos compartilhados e contribuições importantes para a finalização deste trabalho.

A todos do Laboratório de Eletroquímica e Estresse Oxidativo (LEEO) pelo acolhimento e momentos de descontração.

À **Prof^a. Dr^a. Maria del Pilar** e ao grupo de eletroanalítica de Araraquara (GEAr) pelo apoio e colaboração.

À **Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Pividori** da Universidade Autônoma de Barcelona pela gentil doação do eletrodo magnético de epóxi-grafite.

À **Dr^a. Rosane Melo** do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás (UFG) pelas medidas de VSM.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Bioanalítica (INCTBio) pelo apoio financeiro.

Enfim, sou eternamente grata a todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“Aqueles que passam por nós, não
vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um
pouco de nós.”

O Pequeno Príncipe.

RESUMO

A homocisteína (ácido 2-amino-4-mercaptoputírico; Hcy), um aminoácido contendo enxofre, é produzida no processo de metabolismo do aminoácido essencial metionina. Os níveis normais de Hcy no plasma de indivíduos saudáveis estão entre 5 e 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Concentrações mais altas de Hcy dá origem a hiper-homocisteinemia (com Hcy até 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) que está associada a diferentes doenças. Em níveis elevados no plasma, a Hcy é um fator de risco para Alzheimer e doenças cardiovasculares. Portanto, a detecção rápida, sensível e seletiva desse composto é muito importante para a investigação do diagnóstico de doenças. Assim, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento de estratégias eletroanalíticas para a determinação de Hcy juntamente com uma abordagem seletiva baseada em polímeros molecularmente impressos magnéticos (mag-MIP). O mag-MIP foi sintetizado via polimerização por precipitação, usando Hcy como molécula molde, 2-hidroxietil metacrilato como monômero funcional e trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM) como monômero estrutural. As características morfológicas e físicas desses materiais foram investigadas por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e magnetometria de amostra vibrante (VSM). Posteriormente, o comportamento eletroquímico da Hcy foi investigado no eletrodo magnético de compósito de grafite (m-GCE) pela técnica de voltametria cíclica (VC) para a otimização dos parâmetros experimentais a partir da avaliação de diferentes condições reacionais, quantidade de massa de adsorvente, tempo, pH e natureza do tampão. As propriedades físico-químicas também foram analisadas e comparadas com os respectivos mag-NIPs – polímeros controle sem cavidade seletiva. Ademais, foi obtido por meio da curva analítica duas faixas lineares para o sensor m-GEC/MIP: 0,1–1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 2–70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com limites de detecção 0,030 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 0,186 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. A determinação da Hcy pelo m-GEC/MIP apresentou ótimo desempenho frente aos possíveis interferentes comumente encontrados em amostras biológicas. Finalmente, o método foi validado por meio do ensaio de recuperação, com valores de recuperações médias de 100,7 e 105,2% para o plasma sintético e 98,4 e 102,5% para a urina sintética, indicando boa exatidão para o sensor proposto. Portanto, através desses resultados pode-se inferir que o sensor eletroquímico desenvolvido demonstra ser um dispositivo promissor para a determinação de Hcy.

Palavras-Chave: Homocisteína. Polímeros com impressão molecular. Eletroanálise. Sensor eletroquímico.

ABSTRACT

Homocysteine (2-amino-4-mercaptopbutyric acid; Hcy), a thiolated amino acid, is produced in the metabolism process of the essential amino acid methionine. Normal levels of Hcy in plasma of healthy individuals are between 5 and 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Higher concentrations of Hcy give rise to hyperhomocysteinemia (with Hcy up to 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) which is associated with different diseases. At high plasma levels, Hcy is a risk factor for Alzheimer's and cardiovascular diseases. Therefore, the rapid, sensitive and selective detection of this compound is very important for the diagnosis of diseases. Thus, the present work presents the development of electroanalytical strategies for the determination of Hcy together with a selective approach based on molecularly imprinted magnetic polymers (mag-MIP). Mag-MIP was synthesized via precipitate polymerization, using Hcy as a model molecule, 2-hydroxyethyl methacrylate as a functional monomer and trimethacrylate of trimethylolpropane (TRIM) as a structural monomer. The morphological and physical characteristics of these materials were investigated by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared (FTIR), electrochemical impedance spectroscopy (EIS) and vibrant sample magnetometry (VSM). Subsequently, the electrochemical behavior of Hcy was investigated on the magnetic electrode of graphite composite (m-GCE) by cyclic voltametry (VC) for the optimization of experimental parameters, from the evaluation of different reaction conditions, amount of adsorbent mass, time, pH and buffer nature. The physical-chemical properties were also analyzed and compared with the respective mag-NIPs – control polymers without selective cavity. In addition, two linear ranges for the m-GEC/MIP sensor were obtained through the analytical curve: 0.1–1 $\mu\text{mol L}^{-1}$, and 2–70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ with detection limits of 0.030 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and 0.186 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The determination of Hcy by m-GEC/MIP showed excellent performance in relation to the possible interferences commonly found in biological samples. Finally, the recovery test was performed, with mean recovery values of 100.7 and 105.2% for synthetic plasma and 98.4 and 102.5% for synthetic urine, indicating good accuracy for the proposed sensor. Therefore, through these results it can be inferred that the electrochemical sensor developed is a promising device for the determination of Hcy.

Keywords: Homocysteine. Polymers with molecular printing. Electroanalysis. Electrochemical sensor.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática de sensor eletroquímico: eletrodo de trabalho como transdutor mais o elemento de reconhecimento (modificação).....	17
Figura 2 – Estrutura molecular da (S)-homocisteína.....	19
Figura 3 – Vias do metabolismo da Hcy: remetilação e transulfuração.....	20
Figura 4 – Esquema geral da síntese de polímeros com impressão molecular.	22
Figura 5 – Representação esquemática da etapa de modificação das nanopartículas magnéticas e síntese dos polímeros magnéticos com impressão molecular (mag-MIP).....	24
Figura 6 – A estrutura de espinélio inverso da magnetita, Fe_3O_4	25
Figura 7 – Ordenação de íons magnéticos em uma rede ferrimagnética.....	26
Figura 8 – Representação esquemáticas das principais etapas metodológicas.....	29
Figura 9 – Esquema ilustrativo das etapas referente a síntese e funcionalização das nanopartículas magnéticas.....	32
Figura 10 - Representação esquemática da síntese dos mag-MIPs.	34
Figura 11 – Representação esquemática da fabricação do sensor magnético, m-GEC.....	35
Figura 12 – Valores de energia de pares de ligação entre a molécula molde Hcy e seis monômeros funcionais: 1-vinilimidazol, 2-vinilpiridina, 4-imidazol acrílico, 1,4-divinilbenzeno, 4-vinilpiridina e 2-hidroxietil metacrilato.....	37
Figura 13 – Espectro de FTIR das Fe_3O_4 ; $Fe_3O_4@TEOS$; $Fe_3O_4@MPS$	38
Figura 14 – Espectros de FTIR do monômero estrutural TRIM, dos polímeros magnéticos impressos (mag-MIP) e dos polímeros magnéticos não-impressos (mag-NIP).	39
Figura 15 – Curva M-H da interação do momento magnético M com o campo magnético externo H de material superparamagnético.	41

Figura 16 – Curvas de histerese magnética para Fe ₃ O ₄ (magnetita), Fe ₃ O ₄ @TEOS e Fe ₃ O ₄ @MPS.....	41
Figura 17 – Curvas de histerese magnética para o mag-MIP e mag-NIP.	42
Figura 18 – Espectros de impedância eletroquímica para o eletrodo m-GEC, mag-MIP e mag-NIP em 0,5 M KCl contendo 5 mM Fe(CN) ₆ ^{3-/4-} em circuito aberto.	43
Figura 19 – Circuitos equivalentes para o m-GEC, mag-MIP e mag-NIP.....	43
Figura 20 – Imagens de MEV-FEG com ampliação de 50.000 X para (a) Fe ₃ O ₄ (magnetita), (b) Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ e (c) Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ -C=C	45
Figura 21 – Imagens de MEV-FEG com ampliação de 5.000 X para (a) mag-MIP e (b) mag-NIP.....	47
Figura 22 – Comparação da adsorção entre o mag-MIP e mag-NIP, Hcy: 0,1 mmol L ⁻¹ (polímero com monômero funcional 2-hidroxietil metacrilato).....	49
Figura 23 – Comparação da adsorção entre o mag-MIP e mag-NIP, Hcy 0,1 mmol L ⁻¹ (polímero com monômero funcional 2-hidroxietil metacrilato) em diferentes tempos.	49
Figura 24 – Voltamogramas cíclicos utilizando o eletrodo de (a) m-GEC/MIP e (b) m-GEC/NIP na presença de 0,1 mmol L ⁻¹ de Hcy em tampão Britton – Robinson 0,1 mol L ⁻¹ em diferentes pH, v = 20 mV s ⁻¹	50
Figura 25 - Valores de pK _a para a homocisteína.	50
Figura 26 – Voltamogramas cíclicos utilizando o eletrodo de (a) m-GEC/MIP e (b) m-GEC/NIP na presença de 0,1 mmol L ⁻¹ Hcy em diferentes tampões de concentração 0,1 mol L ⁻¹ e pH 7,4: Britton - Robinson, McIlvaine, Sorensen e Fosfato, v = 20 mV s ⁻¹	52
Figura 27 – Voltamogramas cíclicos utilizando o eletrodo de (a) m-GEC/MIP e (b) m-GEC/NIP em diferentes concentrações do tampão fosfato: 0,05 mol L ⁻¹ , 0,1 mol L ⁻¹ , 0,2 mol L ⁻¹ e 0,3 mol L ⁻¹ , pH 7,4; na presença de 0,1 mmol L ⁻¹ de Hcy, v = 20 mV s ⁻¹	53
Figura 28 – Voltamogramas cíclicos sobre o eletrodo m-GEC/MIP e m-GEC/NIP registrados na ausência (branco) e na presença de 0,5 mmol L ⁻¹ de Hcy, em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4, v = 20 mV s ⁻¹	54

Figura 29 – Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de Hcy variando de 0,1–70 $\mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato pH 7,4, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$. Inserção: curva analítica para as primeiras concentrações de Hcy (0,1–1 $\mu\text{mol L}^{-1}$).	55
Figura 30 – Curva analítica para o sensor m-GEC/MIP para determinação diferentes concentrações de Hcy variando de 0,1–70 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Inserção: curva analítica para as primeiras concentrações de Hcy (0,1–1 $\mu\text{mol L}^{-1}$).	56
Figura 31 – Representação estrutural das moléculas de Hcy, Cys, NAC, GSH, AU, Cys-Cys e GSSG.....	63
Figura 32 – Intensidades de corrente obtidas para avaliação da seletividade dos sensores m-GCE/MIP e m-GCE/NIP para a Hcy em relação aos possíveis interferentes.	64

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades gerais da magnetita.	26
Tabela 2 – Relação dos reagentes utilizados.	29
Tabela 3 – Atribuição das bandas do espectro de FTIR do monômero estrutural TRIM para comparação com os mag-MIPs e mag-NIPs.....	39
Tabela 4 – Detecção eletroquímica de Hcy por diferentes eletrodos descrito na literatura. ...	58

LISTAS DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
AIBN	2,2-Azobisisobutironitrila
AU	Ácido úrico
CFC	Cúbico de faces centradas
Cys	Cisteína
Cys-Cys	Cistina
Fe ₃ O ₄	Magnetita
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GSH	Glutathiona oxidada
GSSG	Glutathiona reduzida
H	Campo magnético
H _C	Campo coercitivo
Hcy	Homocisteína
mag-MIPs	Polímero magnéticos de impressão molecular
mag-NIPs	Polímeros magnéticos não impressos
MEV-FEG	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
m-GEC	Eletrodo magnético compósito grafite-epóxi
M	Magnetização
MIPs	Polímeros com impressão molecular
NIPs	Polímeros não impressos

MNPs	Nanopartículas magnéticas
MPS	3-(trimetoxisilil) propil metacrilato
M_R	Retentividade magnética
M_S	Magnetização de saturação
$mV s^{-1}$	Milivolt por segundo
$mol L^{-1}$	Mol por litro
NAC	N-Acetil-L-cisteína
RSH	Homocisteína reduzida
RSSR	Homocisteína oxidada
RSSR'	Homocisteína como um dissulfeto com tióis de baixo peso molecular
TEOS	Tetraetilortossilicato
TRIM	Trimetacrilato de trimetilolpropano
VC	Voltametria cíclica
VPD	Voltametria de pulso diferencial
VSM	Magnetometria de amostra vibrante
v	Velocidade de varredura
δ	Deformação angular simétrica
μmol	Micromol
v	Deformação axial
ω	Deformação angular fora do plano

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Sensores eletroquímicos	17
2.2	Homocisteína (Hcy)	19
2.3	Polímeros com impressão molecular magnéticos	21
2.4	Nanopartículas magnéticas: magnetita	25
3	OBJETIVOS	28
3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	METODOLOGIA	29
4.1	Reagentes e soluções	29
4.2	Instrumentação	31
4.3	Preparo dos mag-MIPS e mag-NIPS	32
4.3.1	Síntese e modificação das nanopartículas de Fe ₃ O ₄	32
4.3.2	Simulação computacional	33
4.3.3	Síntese dos mag-MIPs e mag-NIPs	33
4.3.4	Preparação do eletrodo magnético compósito grafite-epóxi (m-GEC)	34
4.3.5	Experimentos de adsorção de ligação dos mag-MIPs e mag-NIPs	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1	Otimização da síntese dos mag-MIPs empregando ferramentas computacionais	36

5.2	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	37
5.3	Magnetometria de amostra vibrante (VSM).....	39
5.4	Espectroscopia de impedância eletroquímica.....	42
5.5	Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG)	44
5.6	Estudos eletroquímicos.....	48
5.6.1	Estudo da influência da massa do polímero e o tempo de interação.	48
5.6.2	Efeitos do pH e do tampão na resposta eletroquímica dos mag-MIPs e mag-NIPs ...	50
5.6.3	Estudo da concentração do tampão fosfato e sua influência na resposta eletroquímica dos mag-MIPs e mag-NIPs.....	52
5.6.4	Estudo do comportamento voltamétrico para m-GEC/MIP e m-GEC/NIP na oxidação de Hcy.....	54
5.6.5	Determinação da curva analítica	55
5.6.6	Estudo de interferentes	62
5.6.7	Aplicações em amostras sintéticas	64
6	CONCLUSÕES	66
7	PERSPECTIVAS.....	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de metodologias analíticas seletivas e sensíveis são de extrema relevância para a determinação de um dado composto, ou misturas de compostos, seja nos setores alimentícios, farmacêuticos, ambientais, tecnológicos e outros. Devido à complexidade de algumas amostras, à baixa concentração do composto e à presença de interferentes, o uso de polímeros com impressão molecular (MIPs) é descrito na literatura como uma abordagem analítica eficiente para a separação, quantificação e detecção de analitos (BERGAMIN et al., 2019).

Os MIPs são amplamente utilizados devido às suas características relevantes como a morfologia, propriedades químicas e físicas que, análogo ao comportamento de reconhecimento dos receptores biológicos, chamados muitas vezes de polímeros biomiméticos, contribuem para a alta seletividade do material e potenciais aplicações para uma extensa gama de moléculas-alvo (ANSARI; KARIMI, 2017). Por conseguinte, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos empregando as características vantajosas dos MIPs em conjunto com as nanopartículas magnéticas, formando os mag-MIPs, permitem a fácil separação da homocisteína (Hcy) de matrizes complexas a partir de uma fonte magnética externa. A magnetita, Fe_3O_4 , apresenta propriedades importantes além da magnetização, como baixa toxicidade, fácil preparação, encapsulação e modificação superficial que a protege da degradação e permite boa compatibilidade com diversos compostos (BERGAMIN et al., 2019). Uma plataforma com todas essas características, possibilita simplificar os procedimentos experimentais, bem como aumentar a estabilidade do sensor e à amplificação do sinal para a determinação de Hcy – um biomarcador importante em doenças cardiometabólicas (RUIZ-CÓRDOVA et al., 2018).

Na literatura, reporta-se que a Hcy desde a década de 90 já era reconhecida como um biomarcador para doenças cardiovasculares, os quais compreende doenças do coração e dos vasos sanguíneos, principal causa de mortalidade em todo o mundo, cerca de um terço da população mundial (GANGULY; ALAM, 2015). Essa relação foi observada através de danos endotelial associados à hiper-homocisteinemia, isto é, aos níveis elevados de concentração de Hcy no organismo humano (acima de $\sim 15 \mu\text{mol L}^{-1}$). Existe também o aumento do risco de desenvolvimento de eventos isquêmicos do coração relacionados à variação de concentrações para cada $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ a mais de Hcy, comparável a 20 mg/dL de colesterol no plasma sanguíneo (GANGULY; ALAM, 2015; AGUILAR; ROJAS; COLLADOS, 2004; ANDREOTTI, 2000).

A Hcy também é considerada um biomarcador para mais de 100 doenças e síndromes, descritas por vários estudos transversais e prospectivos, e que, as taxas elevadas de Hcy estão relacionadas ao aumento da mortalidade por todas essas causas (SMITH; REFSUM, 2021).

Assim, a determinação da Hcy é importante para o prognóstico e diagnóstico de doenças cardiovasculares que afetam milhares de pacientes, com o objetivo de favorecer a escolha do tratamento mais adequado para aquela condição, aumentando a sobrevida e o bem-estar desses indivíduos. (AGUILAR; ROJAS; COLLADOS, 2004; PONTI; RUINI; TOMASI, 2020). Por esse motivo a detecção de Hcy já pertence à prática clínica e métodos variados são empregados para identificação desse composto, dentre eles, a cromatografia líquida com matriz de fotodiodos e detecção de fluorescência, detecção visível no ultravioleta e espectrometria de massa (ŞAYLAN et al., 2020).

Apesar disso, esses métodos convencionais utilizados apresentam algumas desvantagens, tais como: dificuldade de operacionalização dos equipamentos, os quais demandam profissionais especializados, o longo tempo de análise e a necessidade de purificação de amostra ou separação do analito de interesse a partir de métodos e reagentes caros (KUHN et al., 2020). Diante disso, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos magnéticos, proposto neste trabalho, torna-se uma alternativa viável e interessante para a superação desses problemas (BERGAMIN et al., 2019; KHAN et al., 2019, RUIZ-CÓRDOVA et al., 2018). Pois esses dispositivos traz as vantagens de fácil manuseio de equipamento, bom custo-benefício, separação seletiva e rápida determinação de Hcy, quando comparados aos métodos convencionais.

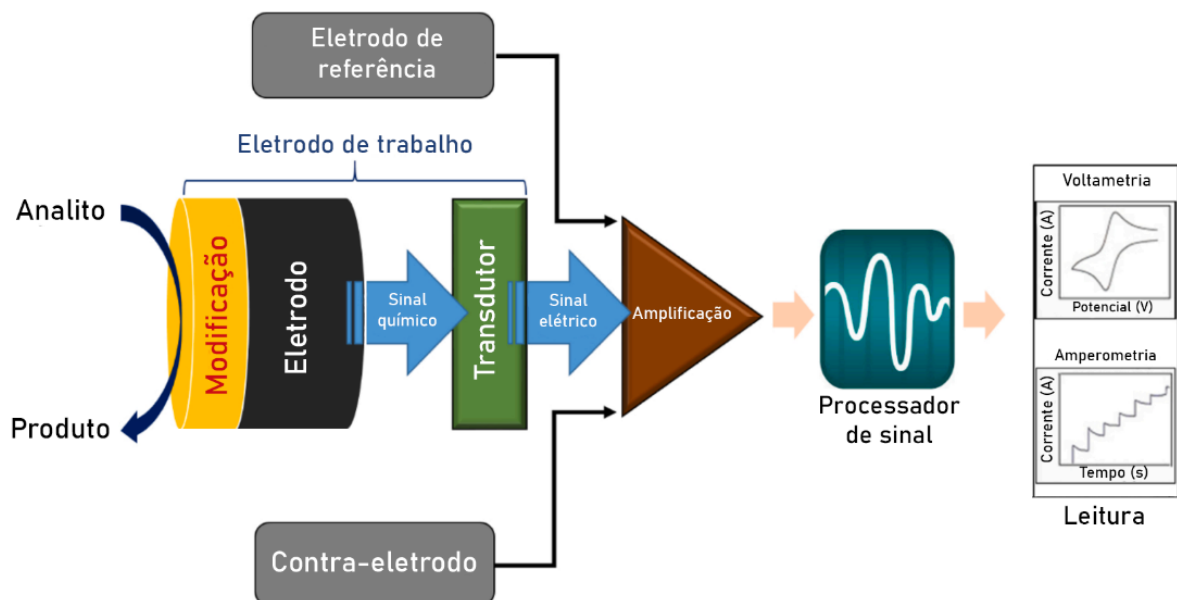
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Sensores eletroquímicos

Os sensores eletroquímicos têm sido utilizados amplamente como técnica analítica para a determinação de uma gama de componentes de diversas áreas do conhecimento (ZHANG et al., 2021). Pois eles fornecem uma alternativa econômica, seletiva e sensível para análise de amostras complexas comparado aos métodos convencionais. (SARVESTANI; MADRAKIAN; AFKHAMI, 2021; IFTIKHAR et al., 2021).

Os sensores eletroquímicos consistem basicamente em um dispositivo que emprega um elemento de reconhecimento (a modificação efetuada no eletrodo) integrado a um transdutor (eletrodo). O papel do elemento de reconhecimento é interagir de maneira seletiva com uma espécie específica, fornecendo ao transdutor um sinal químico que é traduzido em um sinal elétrico detectável por um equipamento (AMALI et al., 2021; ZHANG; JU; WANG, 2008). A Figura 1 apresenta um sensor eletroquímico, no qual o eletrodo de trabalho é o elemento de transdução combinado com o elemento de reconhecimento – a modificação da superfície do eletrodo.

Figura 1 – Representação esquemática de sensor eletroquímico: eletrodo de trabalho como transdutor mais o elemento de reconhecimento (modificação).



Fonte: Adaptado de (AMALI et al., 2021).

O funcionamento desse sistema se baseia inicialmente pela aplicação de uma tensão externa ao eletrodo de trabalho, então o analito com atividade eletroquímica reage em uma reação redox próxima ao eletrodo de trabalho, o que acarreta na transferência de cargas elétricas e, conseqüentemente, em uma corrente elétrica. A corrente será transportada através do eletrodo de trabalho que será enviado ao sistema de processamento do sinal elétrico, que é amplificado, e o sinal analítico é traduzido e interpretado a partir de uma determinada técnica eletroquímica (CHEN et al., 2019)

Esses sensores podem ser classificados em cinco tipos principais: potenciométrico, impedimétrico, amperométrico, voltamétrico e condutimétrico. Os sensores potenciométricos fundamentam-se na medida de um potencial elétrico gerado na interface eletrodo/solução da célula que é sensível à espécie iônica particular dissolvida. Tal potencial gerado é proporcional ao logaritmo da concentração do analito em solução (IDA, 2014); os sensores impedimétricos utilizam como método de transdução a espectroscopia de impedância eletroquímica, que através da aplicação de potencial de variação senoidal é possível medir a impedância elétrica de uma amostra, isto é, obter a resposta de corrente resultante que depende de vários processos desse sistema; os amperométricos baseiam-se nos registros de fluxo de corrente do comportamento redox de um analito que ocorre na superfície do eletrodo a partir da aplicação de um potencial sobre o eletrodo de trabalho. Neste caso, a corrente gerada é proporcional à concentração das espécies eletroativas em estudo; os sensores voltamétricos fornecem a corrente de um sistema conforme um potencial inicialmente predefinido é deslocado para outro valor, ou seja, é a medida da corrente em função do potencial aplicado no eletrodo de trabalho. As medidas voltamétricas, bem como as amperométricas descrevem a transferência de elétrons referentes à oxidação ou redução da espécie eletroativa, onde a corrente resultante é medida; e, por último, os sensores condutimétricos são empregados para mensurar a condutividade de espécies iônicas. Muitas reações químicas alteram a quantidade de íons consumidos e produzidos, conseqüentemente, a condutividade geral da solução também sofrerá alteração. Desta forma, como parâmetros analíticos pode-se ter a condutância ou resistência elétrica de um dado sistema eletroquímico (CIUCU, 2014; STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

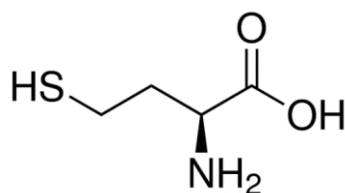
Os sensores eletroquímicos, dependem dos agentes de reconhecimento, dos transdutores e da técnica empregada para a determinação de uma espécie. Portanto, deve-se analisar de maneira minuciosa qual eletrodo escolher, pois fatores como o tipo de material, a microestrutura da superfície, a química da superfície e aspectos eletrônicos predizem propriedades importantes

do material para as reações eletroquímicas. Escolhido o eletrodo, os quais podem ser de vários tipos – eletrodo de carbono vítreo, diamante dopado com boro, compósito grafite-epóxi, entre outros –, pode-se também modificar a superfície desses eletrodos para otimizar o reconhecimento da molécula alvo, a fim de modular as propriedades físico-químicas do material e, assim, detectar com maior seletividade e sensibilidade o analito pretendido (ZOSKI, 2007). Além disso, características como acurácia e precisão na determinação de uma espécie são aspectos importantes para o desenvolvimento confiável desses dispositivos (GOULART, 2020).

2.2 Homocisteína (Hcy)

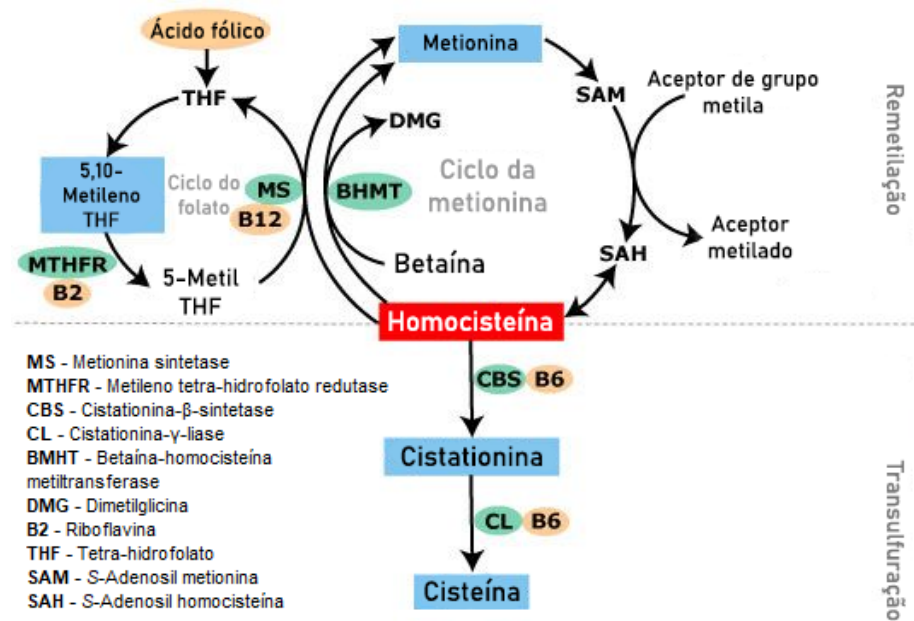
A homocisteína, ácido 2-amino-4-mercaptobutírico, apresentado na Figura 2, é um aminoácido que contém em sua estrutura um grupo tiol livre, –SH, e desempenha papéis importantes em processos fisiológicos. Esse aminoácido não é encontrado diretamente na alimentação, ele é formado a partir e unicamente da desmetilação da metionina, um aminoácido essencial derivado de proteínas dietéticas (BREMNER; GOLDBERG; VACCARINO, 2021; NEKRASSOVA; LAWRENCE; COMPTON, 2003). A Hcy pode ser metabolizada por duas vias: a remetilação e a transulfuração. Na via de remetilação, que ocorre principalmente no fígado, a Hcy remetila para formar a metionina por meio de captura de um grupo metila proveniente da etapa do catabolismo da colina ou de um composto do ciclo do folato, este último tem o papel de reciclar os folatos vitais para muitas reações metabólicas importantes em humanos. Por sua vez, a via de transulfuração é a síntese da cisteína a partir da metionina, no qual a Hcy é um intermediário importante e faz parte de uma etapa crítica da rota de transulfuração, pois em condições fisiológicas, a condensação da Hcy pela enzima cistationina β -sintase à cistationina é irreversível. A transulfuração ocorre preferencialmente no fígado e nos rins, processo responsável por metabolizar o excesso de Hcy que circula no organismo (AGUILAR; ROJAS; COLLADOS, 2004; ANDREOTTI et al., 2000). As principais vias do metabolismo estão apresentadas na Figura 3.

Figura 2 – Estrutura molecular da (S)-homocisteína.



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

Figura 3 – Vias do metabolismo da Hcy: remetilização e transulfuração.



Fonte: Adaptado de (SOMEPOMED, 2011).

A Hcy nos diferentes tecidos – celular e intracelular – está presente na forma livre (RSH e RSSR), como um dissulfeto misto com outros tióis de baixo peso molecular (homocisteína-cisteína e dissulfetos mistos de glutatona reduzida com homocisteína, RSSR') e como dissulfeto de homocisteína reticulado com proteínas (RSS- Proteína). Em indivíduos saudáveis (no jejum), a disposição de homocisteína total no plasma (todas as quatro formas de homocisteína), tem uma faixa de concentração relativamente fixa, cerca de 5 a 15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (GANGULY; ALAM, 2015; NEKRASSOVA; LAWRENCE; COMPTON, 2003).

Se houver um aumento considerável da concentração total de Hcy plasmática, haverá implicações negativas à saúde humana. Os níveis elevados de Hcy no plasma sanguíneo leva a um quadro clínico denominado de hiper-homocisteinemia, o qual é classificado como moderado (16-30 $\mu\text{mol L}^{-1}$), intermediário (31-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e grave (> 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Então, considerando a variação da concentração de Hcy, é possível identificar parâmetros que predizem doenças decorrentes dessa alteração, visto que a alta taxa desse aminoácido no plasma acarreta um maior risco de dano vascular dos vasos sanguíneos pequenos e grandes. Além disso, Hcy é um fator de risco para o desenvolvimento degenerativo e aterosclerótico no sistema circulatório coronário, cerebral e periférico. É também um possível responsável pelo desenvolvimento de outras doenças, como o tromboembolismo e risco cardiovascular, bem

como causa aumento do risco de doença de Alzheimer, defeitos do tubo neural, complicações durante a gravidez, doenças inflamatórias intestinais e osteoporose. (PONTI; RUINI; TOMASI, 2020; WANG et al., 2005).

As principais causas que elevam a concentração de Hcy são os defeitos genéticos no metabolismo desse composto (cistationa- β -sintetase, metileno tetra-hidrofolato redutase, metionina sintase), deficiências nutricionais em cofatores de vitaminas (folato, vitamina B12, vitamina B6), transtornos sistêmicos (anemia perniciosa, insuficiência renal, hipotireoidismo), aspectos fisiológicos (idade, sexo), drogas (antagonistas de folato, antagonistas da vitamina B6) e estilo de vida da população (dieta, tabagismo) (BOLANDER-GOUAILLE; BOTTIGLIERI, 2007 HANKEY; EIKELBOOM, 1999). Portanto, compreender e determinar as causas da concentração anormal e os mecanismos envolvidos referentes à Hcy são relevantes, visto que, a partir dessas informações é possível obter dados de um determinado estado biológico para fins clínicos e médicos.

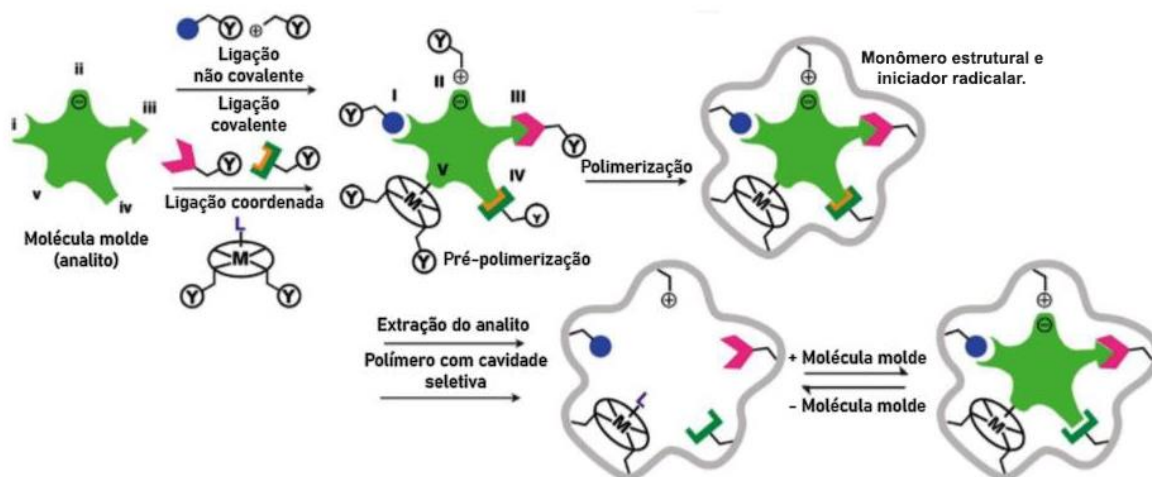
2.3 Polímeros com impressão molecular magnéticos

Os polímeros com impressão molecular (MIPs) são polímeros sintéticos com a capacidade de simular as interações biológicas tais como o anticorpo-antígeno e enzima-substrato, por isso, muitas vezes, eles são denominados de polímeros biomiméticos. A síntese eficaz dos MIPs permite utilizá-los em técnicas eletroanalíticas de reconhecimento molecular, devido às suas propriedades seletivas caracterizadas por sítios de reconhecimento complementar à molécula de interesse (YÁÑEZ-SEDEÑO; CAMPUZANO; PINGARRÓN, 2017). Esse fato permite a substituição de moléculas biológicas em metodologias analíticas pelos MIPs, o qual desempenham as mesmas funções dos receptores biológicos, com as vantagens de serem mais estáveis quimicamente (pH, pressão e temperatura) e ter o melhor custo benefício (ALI; OMER, 2021).

Os MIPs são sintetizados, de maneira geral, por polimerização na presença de monômeros funcionais, monômeros estruturais, iniciador radical, solvente porogênico e a molécula molde. Inicialmente, a molécula molde forma um complexo covalente ou não covalente com os grupos funcionais dos monômeros em um solvente porogênico adequado, essa etapa é denominada pré-polimerização. O monômero funcional, por sua vez, tem uma porção polimerizável que em conjunto com os demais reagentes citados acima forma uma matriz polimérica rígida ao redor do analito. Por fim, a molécula molde é removida deixando um

polímero com cavidades impressas de reconhecimento, isto é, os MIPs (LAMAOU I et al., 2021; ZHANG, 2013). Esse procedimento simplificado está esquematizado na Figura 4.

Figura 4 – Esquema geral da síntese de polímeros com impressão molecular.



Fonte: Adaptado de (KUTNER; SHARMA, 2018).

A escolha do analito, molécula molde, é de extrema relevância quando se pretende utilizar a metodologia de impressão molecular. Essa abordagem, diferente dos receptores biológicos, pode ser aplicada a uma variedade de compostos, com interesse em diversas áreas do conhecimento – medicinal, alimentício, ambiental etc. Apesar disso, não são quaisquer moléculas que podem ser empregadas como moldes. Esses compostos têm de ter grupos funcionais capazes de interagir com o monômero funcional, a fim de que a impressão molecular seja realizada. Além disso, moléculas com extensão muito grande podem comprometer a seletividade do polímero devido à maior cavidade dos sítios ativos que favorecem a interação com outros compostos diferentes daquele que se pretende determinar (KUTNER; SHARMA, 2018).

As principais interações entre o analito e os monômeros funcionais estão subdivididas em cinco grupos importantes: (I) não covalente, (II) eletrostática ou iônica, (III) covalente, (IV) semicovalente e (V) coordenação de centro de metal. A polimerização via ligação não covalente (ligações de hidrogênio, van der Waals, empilhamento π - π e interações hidrofóbicas) são as mais utilizadas, devido à simplicidade experimental e à eficiência de impressão para uma gama de analitos, mas quando comparada às demais abordagens, o fator de homogeneidade é menor devido às fracas interações entre a molécula molde e os monômeros. Quanto à abordagem

eletrostática ou iônica (íons carregados positivamente ou negativamente), são interações fortes que geram MIPs mais seletivos. Apesar disso, esses MIPs podem ter sua eficiência comprometida devido a impurezas – produtos não reagidos da síntese dos MIPs ou íons de amostras a serem analisadas – carregadas pela força eletrostática. Já a impressão covalente se caracteriza pela formação de ligações entre o modelo e os monômeros funcionais. Os MIPs produzidos detêm sítios mais seletivos por causa da homogeneidade dos locais de reconhecimento formados. Outro tipo de abordagem diz respeito à ligação semicovalente, isto é, na síntese dos MIPs a ligação entre o analito e os monômeros funcionais são de natureza covalente, mas na etapa de religação dos MIPs ao analito em amostras de estudos, é utilizada a ligação não covalente. Por fim, tem-se a impressão via coordenação metal-ligante que visa gerar polímeros impressos com íons a partir de moléculas que têm a capacidade de coordenação. Essas interações vão determinar o arranjo espacial dos monômeros funcionais ao redor da molécula e a força de ligação dos MIPs, fatores importantes para a seletividade da estrutura final da matriz polimérica (KUTNER; SHARMA, 2018).

Outro aspecto importante na síntese dos MIPs, diz respeito à utilização do solvente porogênico adequado, pois ele deve fornecer um meio ideal para a interação dos reagentes sem prejudicar a reação. Além disso, ele é responsável por influenciar as características morfológicas dos MIPs (KUTNER; SHARMA, 2018).

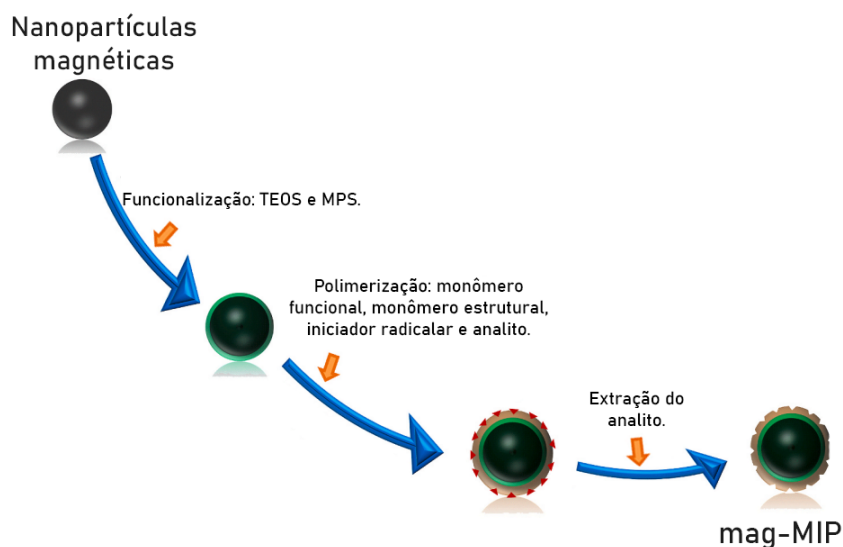
A impressão molecular é uma abordagem analítica eficiente, mas que ainda tem limitações, apesar de esses materiais terem morfologia porosa, suas cavidades de reconhecimento ficam confinadas à matriz polimérica, o que aumenta a barreira dimensional e dificulta a aplicação dessa metodologia em sensores (KHAN et al., 2019). Para contornar esse problema, vários artigos na literatura relatam a utilização da metodologia de impressão molecular juntamente com as nanopartículas magnéticas (mag-MIPs). Pois, as nanopartículas aumentam a área superficial otimizando a cinética e a capacidade de ligação, que melhora a estabilidade do material (KUHN et al., 2020). Além disso, as propriedades magnéticas permitem a separação rápida e fácil dos analitos adsorvidos em amostras complexas a partir de um campo magnético externo (RUIZ-CÓRDOVA et al., 2018).

Os mag-MIPs são polímeros com impressão molecular magnéticos que tem um núcleo metálico denominado *core* envolto pelo material biomimético *shell*, o qual é representado por *core@shell* (HUSSAIN et al., 2016). A modificação das nanopartículas magnéticas é de fácil execução, bem como protege a degradação do material, preservando suas propriedades

magnéticas, além de permitir boa compatibilidade com diversos analitos. A funcionalização acontece, simplificadamente, a partir de duas etapas: modifica-se a nanopartícula com tetraetilortossilicato (TEOS) para fornecer grupo –OH e, depois, o material é tratado com 3-(trimetoxisilil) propil metacrilato (MPS) para fornecer grupos C=C ativados importantes para a etapa de polimerização dos mag-MIPs, Figura 5. Ademais, um polímero de controle, polímero não impresso magnético (mag-NIP) é sintetizado de maneira análoga ao procedimento dos mag-MIPs, mas na ausência da molécula molde (BERGAMIN et al., 2019).

A última etapa da síntese de mag-MIPs caracteriza-se pela extração da molécula molde da matriz polimérica que pode ser realizada a partir de solventes orgânicos ou aquosos. Este método utiliza-se do processo de separação por extração através de um aparelho Soxhlet para a remoção de um material de outro por meio da lavagem com um solvente (NAWAZ et al, 2021, BELBRUNO, 2018). A depender do tipo de impressão dos polímeros formados, necessita-se de outros meios para auxiliar a extração do analito, como por exemplo, aumento da temperatura do sistema, uso de ácido ou base para enfraquecer a interação entre os MIPs e o analito. Essa etapa não é trivial, visto que a remoção eficaz da molécula molde disponibilizará o tamanho e formato adequado das cavidades dos mag-MIPs, influenciando a posição e orientação dos sítios de reconhecimento para a religação do analito, fatores importantes para a seletividade do material (KUTNER; SHARMA, 2018).

Figura 5 – Representação esquemática da etapa de modificação das nanopartículas magnéticas e síntese dos polímeros magnéticos com impressão molecular (mag-MIP).



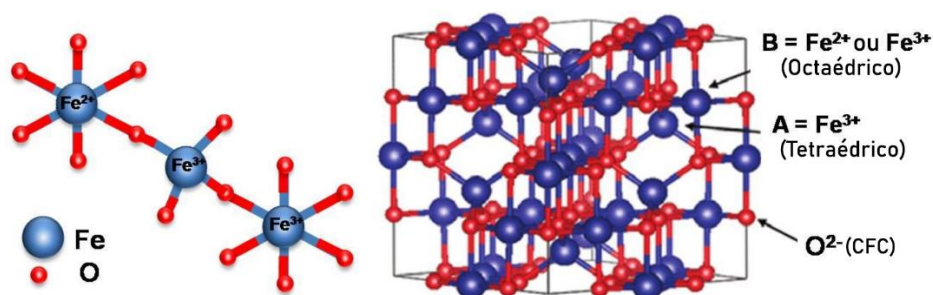
Fonte: Adaptado de (LAMAOUUI et al., 2021).

2.4 Nanopartículas magnéticas: magnetita

A magnetita, Fe_3O_4 ou $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$, é um dos materiais magnéticos mais antigos já conhecidos pelo homem, este composto faz parte das classificações de química inorgânica de materiais denominados óxidos de ferros, foi descoberto no distrito de Magnésia, na Grécia antiga, e seu nome é derivada do local onde foi encontrada (BUSCHOW, 2005). Tem-se registro que a magnetita, também denominada Lodestone, era utilizada em bússolas pelos navegadores antigos por volta de 85 d.C. (depois de Cristo). Esse material magnético tem diversas aplicações tecnológicas, seja como nanopartículas ou na forma de filmes para utilização em biomedicina, armazenamento de informações, armazenamento magnético, bioimagem, biossensores e liberação de fármacos (RIVANI et al., 2019; ZHANG; ZHAO, 2017; KRISHNAN, 2016).

A magnetita possui um arranjo cúbico que se cristaliza na estrutura de espinélio invertido, análogo ao espinélio mineral $\text{MgO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$. Os ânions de oxigênio, O^{2-} , são arranjos em cubos de face centradas (CFC) de tal forma que existem dois tipos de sítios de coordenação: (A) sítios tetraédricos e (B) sítios octaédricos, como demonstrado na Figura 6. Quanto aos cátions, os íons Fe^{2+} estão situados nos sítios octaédricos e os íons Fe^{3+} estão divididos de maneira igual nos sítios octaédricos e tetraédricos, ocupando 1/8 dos espaços tetraédricos e 1/2 dos espaços octaédricos (RIVANI et al., 2019; SPALDIN, 2010). Para mais, os íons Fe^{3+} nos sítios octaédricos estão alinhados paralelamente, mas estão situados de forma oposta com os de Fe^{3+} que estão nos sítios octaédricos, como resultado os momentos magnéticos se cancelam. Assim, os únicos íons contribuintes para a magnetização da magnetita são os íons Fe^{2+} , que têm todos os seus íons paralelos entre si, o que dá origem à propriedade de ferrimagnetismo desse composto (BUSCHOW, 2005). Algumas das propriedades gerais da magnetita estão dispostas na Tabela 1.

Figura 6 – A estrutura de espinélio inverso da magnetita, Fe_3O_4 .



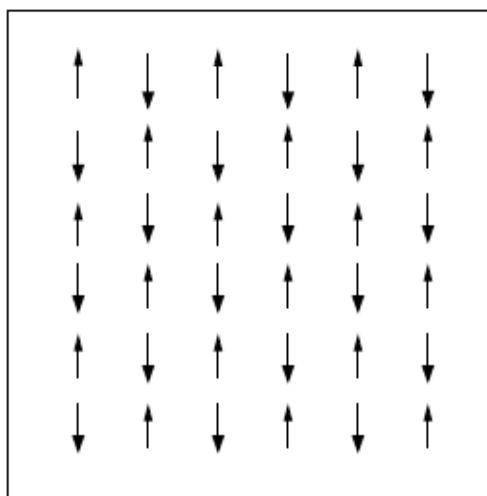
Fonte: Adaptado de (RIVANI et al., 2019).

Tabela 1 – Propriedades gerais da magnetita.

Propriedades	Magnetita
Formato da célula	cúbico
Dimensões da célula (nm)	0.896
Densidade (g cm ⁻³)	5.18
Cor	preto
Tipo de magnetismo	ferrimagnético
Tipo de estrutura	Espinélio inverso

Fonte: Adaptado de (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003).

Os materiais ferrimagnéticos possuem propriedade de magnetização espontânea à temperatura ambiente, até na ausência de um campo aplicado, semelhante aos ferromagnéticos. A magnetização geral observada nesses compostos é decorrente do alinhamento antiparalelo das espécies que possuem diferentes magnitudes do momento magnético no material, resultando em um momento magnético líquido diferente de zero. A representação de um composto ferrimagnético é mostrada na Figura 7. Como resultado, em nível macroscópico, os ferrimagnéticos se comportam como ferromagnéticos apresentando grande suscetibilidade e histerese (SPALDIN, 2010). Essas características estão associadas com a natureza do composto e sua estrutura atômica e molecular.

Figura 7 – Ordenação de íons magnéticos em uma rede ferrimagnética.

Fonte: SPALDIN, 2010.

As nanopartículas magnéticas são consideradas uma ferramenta importante para diversas aplicações biotecnológicas de separação magnética, inclusive os procedimentos eletroanalíticos que utilizam, por exemplo, a magnetita em magneto-sensores (RUIZ-CÓRDOVA et al., 2018). Isso acontece devido às suas excelentes propriedades magnéticas, alta estabilidade, baixa toxicidade, boa biocompatibilidade, rapidez e fácil operação. Além disso, a magnetita permite modificação e funcionalização da superfície, sem perdas significativas de suas propriedades (BERGAMIN et al., 2019). Dessa forma, o referido material demonstra ser um composto promissor para a separação eficiente de um dado analito em diferentes matrizes complexas, tais como os sistemas biológicos empregando um sensor eletroquímico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver um sensor eletroquímico magnético baseado na metodologia de polímeros impressos molecularmente (mag-MIPs), constituído de nanopartículas magnéticas modificadas (*core*) com MIPs (*shell*), no formato *core@shell*, para a determinação de Hcy em amostras sintéticas, miméticas de matrizes biológicas.

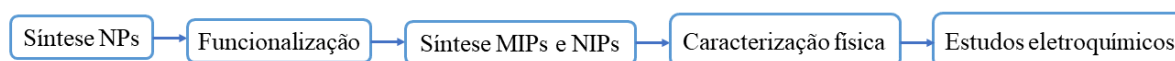
3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar as nanopartículas magnéticas e funcionalizá-las;
- Avaliar as propriedades morfológicas das nanopartículas magnéticas;
- Polimerizar as nanopartículas magnéticas na presença e na ausência de Hcy, (mag-MIPs) e (mag-NIPs) respectivamente;
- Caracterizar os mag-MIPs e o mag-NIPs;
- Otimizar os parâmetros experimentais: massa do polímero, tempo de interação, pH, natureza tampão;
- Avaliar o desempenho dos mag-MIPs em relação ao mag-NIPs sintetizados aplicando técnicas eletroquímicas;
- Determinar os parâmetros analíticos tais como: limite de detecção, limite de quantificação, sensibilidade e faixa linear de resposta para a determinação de Hcy;
- Aplicação dos mag-MIPs em amostras sintéticas.

4 METODOLOGIA

Inicialmente realizou-se a síntese das nanopartículas magnéticas e sua posterior funcionalização. Em seguida, o polímero com impressão molecular foi formado na presença das nanopartículas magnéticas funcionalizadas juntamente com o monômero funcional (2-hidroxietil metacrilato), o monômero estrutural trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM), o iniciador radicalar 2,2-azobisisobutironitrila (AIBN) e a molécula molde (Hcy) – a síntese do polímero não impresso também foi realizada, repetindo o mesmo procedimento, mas na ausência do analito (Hcy). Após a polimerização, o analito foi extraído das cavidades dos polímeros impressos. Os mag-MIPs foram então caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) e Magnetometria de Amostra Vibrante (VSM), bem como um estudo de massa e tempo para otimização dos experimentos eletroquímicos. Por fim, o desempenho dos mag-MIPs foi avaliado em comparação aos mag-NIPs por meio de técnicas eletroanalíticas. Esse processo metodológico está exemplificado na Figura 8.

Figura 8 – Representação esquemática das principais etapas metodológicas.



Fonte: Autora, 2022.

4.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados foram de grau analítico, Tabela 2. Todas as soluções foram preparadas em água deionizada (resistividade 18,2 M Ω .cm a 25 °C) obtida do sistema de purificação Millipore Direct-Q 3 e os valores de pH medidos foram realizados num pHmetro Quimis Q400MT. As soluções estoques de Hcy foram preparadas utilizando-se etanol/água 50% (v/v).

Tabela 2 – Relação dos reagentes utilizados.

REAGENTES	PROCEDÊNCIA
2-Hidroxietil Metacrilato	Sigma-Aldrich
2,2-azobisisobutironitrila	Sigma-Aldrich

Acetonitrila	Panreac
Ácido acético	Quimex
Ácido bórico	Merk
Ácido cítrico	Merk
Ácido fosfórico	Isofar
Ácido úrico	Merk
Bicarbonato de sódio	Mallinckrodt
Cisteína	Sigma-Aldrich
Cistina	Sigma-Aldrich
Cloreto de amônio	Mallinckrodt
Cloreto de cálcio dihidratado	Vetec
Cloreto de ferro (III) hexahidratado	Sigma-Aldrich
Cloreto de ferro tetra-hidratado	Sigma-Aldrich
Cloreto de magnésio	Dinâmica
Cloreto de potássio	Isofar
Cloreto de sódio	Merk
Etanol	Synth
Fosfato de potássio monobásico	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio dibásico	Sigma-Aldrich
Fosfato de sódio monobásico	Sigma-Aldrich
Glutaciona oxidada	Sigma-Aldrich
Glutaciona reduzida	Sigma-Aldrich
Hidróxido de amônio	Synth
Homocisteína	Sigma-Aldrich
Metacrilato de 3-(trimetoxissilil) propil	Sigma-Aldrich
Metanol	Panreac
N-Acetil-L-cisteína	Merk

Sulfato de sódio anidro	Isofar
Tetraetilortossilicato	Acrós
Tiocianato de potássio	Dinâmica
Tolueno	Synth
Trimetacrilato de trimetilolpropano	Sigma-Aldrich
Ureia	Merck

4.2 Instrumentação

As análises eletroquímicas foram realizadas com um potenciostato modelo PGSTAT30 da AUTOLAB acoplado a um microcomputador dirigido pelo programa GPES (*General Purpose Electrochemical Software*), para controle de potencial e aquisição de dados. O sistema eletroquímico constituiu-se de uma célula eletroquímica de três eletrodos: o eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl saturado), o contra-eletrodo de platina espiralado e o eletrodo magnético como eletrodo de trabalho. Para o estudo de temperatura, utilizou-se um banho ultra-termostático (Solab, modelo SL-152/10), em célula de vidro dividida, encamisada, adquirida da Labsolution.

A Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE) foi realizada em 0,5 M KCl contendo 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em uma faixa de frequência de 0,1 Hz a 100 kHz com um Autolab PGSTAT302N equipado com um módulo FRA2 (Metrohm, Holanda) dirigido pelo programa NOVA 2.0.

As medidas magnéticas foram realizadas pela Dra. Rosane Melo, no Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás, Brasil. Foi usado o equipamento ADE magnetics (modelo EV9). As medidas das curvas de histerese magnéticas foram realizadas em temperatura ambiente variando o campo magnético de -20000 Oe a +20000 Oe. O porta amostra utilizado nas medidas foi construído com material polimérico de acrílico, para evitar interferências magnéticas e a vareta que sustenta o porta amostra foi construída de quartzo.

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos, empregando-se um espectrômetro FTIR 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

4.3.2 Simulação computacional

O estudo de simulação computacional foi realizado pelo doutorando Lucas Neres do grupo de pesquisa de eletroanalítica de Araraquara (GEAr/UNESP). A metodologia de modelagem molecular computacional foi utilizada para a otimização da síntese dos MIPs, a fim de identificar qual o monômero seria mais adequado em relação à molécula molde Hcy. Portanto, os seguintes programas foram utilizados (WONG et al, 2015): (i) HyperChem® 8.0.5 usado para modelagem das moléculas a serem utilizadas na síntese dos MIPs. (ii) OpenEye® (pacote de softwares) contendo VIDA 3.0.0, Omega2 e Szybki 1.2.2. O VIDA 3.0.0 permitia visualizar as moléculas modeladas identificando possíveis erros de ligações entre átomos, enquanto o Omega2 gerou diversos confôrmeros das moléculas, o que tornou possível levar em consideração os prováveis impedimentos espaciais. Por padrão, são gerados 10 confôrmeros do analito, sendo escolhidos 3 ao acaso para realizar os testes simulatórios. O Szybki 1.2.2 leva a molécula ao seu estado de menor energia permitindo identificar o seu estado mais estável. (iii) O AutoIt 3.3.6.0, aplicativo que utiliza linhas de comandos (scripts) para automatizar processos repetitivos durante a modelagem molecular, elimina erros humanos durante os procedimentos. (iv) O Multiple Minima Hypersurfaces (MMH) com MOPAC (Molecular Orbital PACKage) 2009 permite fazer simulações da Hcy e monômero funcional (2-hidroxiethyl metacrilato). Ou seja, este programa faz a aproximação dos monômeros com a molécula que será usada como molde, calculando a energia liberada para verificar a afinidade entre eles. Já o MOPAC é um utilitário que emprega química quântica semi-empírica para os cálculos de aproximação.

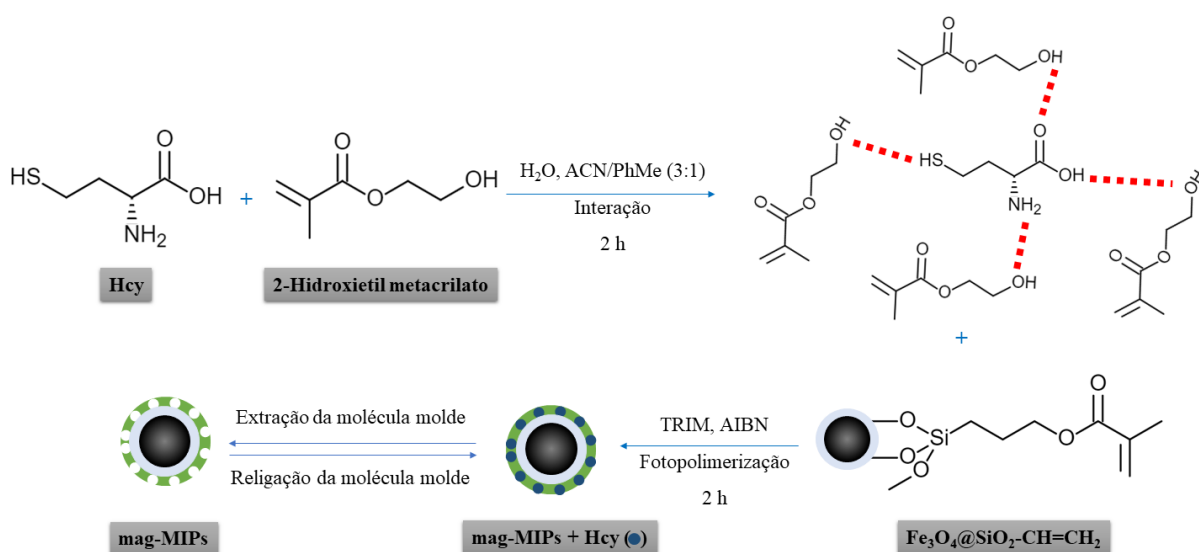
4.3.3 Síntese dos mag-MIPs e mag-NIPs

Os polímeros impressos (MIPs) e não impressos (NIPs) foram sintetizados sobre as nanopartículas magnéticas funcionalizadas, gerando mag-MIPs e mag-NIPs para a Hcy. Realizou-se o procedimento pelo método de precipitação. Para isso, 1,5 mmol de Hcy (como molécula molde) foi dissolvido em 8 mL de água e adicionados a 3 mmol de 2-hidroxiethyl metacrilato (como monômero funcional) e 100 mL de 3:1 acetonitrila (ACN)/tolueno (usado como solvente porogênico). Deixou-se a mistura interagir por 2 h, sob agitação constante. Em seguida, 200 mg de nanopartículas de magnetita funcionalizadas foi adicionada a essa solução e acrescentou-se à mistura 10 mmol de TRIM (monômero estrutural) e 1 mmol de AIBN (iniciador radicalar), sob atmosfera inerte (N₂ borbulhado à solução continuamente em baixo fluxo), de maneira a impedir que o oxigênio interfira na polimerização. No processo de fotopolimerização foi utilizado um reator a 5°C e acionado a lâmpada de vapor de Hg de alta

pressão (125 W) em tubo de quartzo sob nitrogênio por 2 h. Os mag-NIPs correspondentes foram preparados de maneira análoga, mas na ausência da molécula molde, isto é, Hcy.

Em seguida, o polímero obtido foi colocado para lavagem no sistema Soxhlet. Nas primeiras 24 h, foram lavadas com água deionizada 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 Hcy do polímero, as soluções do solvente de lavagem foram analisadas por espectrofotometria UV-Vis a cada 12 h. As principais etapas da síntese dos mag-MIPs estão dispostas na Figura 10.

Figura 10 - Representação esquemática da síntese dos mag-MIPs.

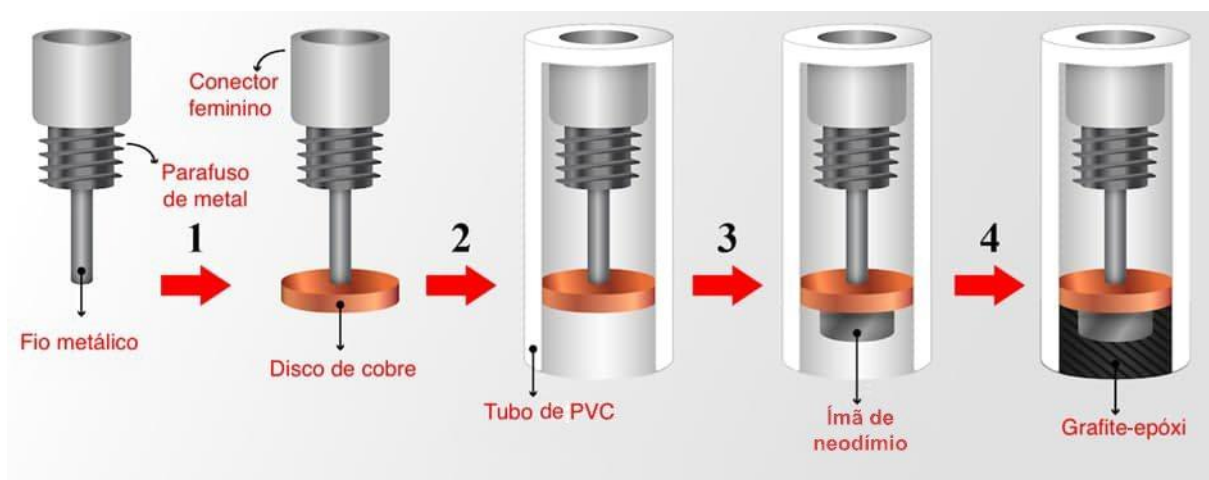


Fonte: Autora, 2022.

4.3.4 Preparação do eletrodo magnético compósito grafite-epóxi (m-GEC)

O eletrodo de trabalho foi cedido pela Profa. Dra. Maria Isabel Pividori da Universidade Autônoma de Barcelona e preparado de acordo com Pividori e Alegret (PIVIDORI; ALEGRET, 2003). O processo de fabricação foi realizado em quatro etapas, ilustradas na Figura 11. A primeira etapa consiste na junção de um conector feminino a um parafuso, seguida da conexão do fio metálico a um disco de cobre. Na terceira etapa um pequeno ímã de neodímio (3 mm) foi colocado no corpo da luva de PVC (6 mm), com um contato elétrico, por fim, a pasta resultante da mistura de pó de grafite e a resina Epotek H77 na proporção de 1:4 (m/ m) foi preenchida até a profundidade de 3 mm, cobrindo um ímã de neodímio.

Figura 11 – Representação esquemática da fabricação do sensor magnético, m-GEC.



Fonte: Adaptado de (SANTOS, 2021).

4.3.5 Experimentos de adsorção de ligação dos mag-MIPs e mag-NIPs

A detecção eletroquímica Hcy foi obtida por pré-concentração no mag-MIP ou mag-NIP. Inicialmente, 3,0 mg de cada um dos polímeros (mag-MIP e mag-NIP) foram dispersos em 1,0 mL de solução 50% etanólica contendo 0,1 mmol L⁻¹ de Hcy, foram agitados em um shaker rotativo por 90 min. Após a dispersão, foi realizada a separação dos materiais através da atração do polímero pelo campo magnético externo (eletrodo m-GEC).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após polimerização e retirada do analito da cavidade dos produtos de cada etapa da síntese, eles foram caracterizados por MEV-FEG, FTIR, EIE e VSM. Após as caracterizações, os mag-MIP e mag-NIP foram atraídos pelo eletrodo (m-GEC) e avaliada sua capacidade de adsorção e otimização da metodologia aplicada (tempo de interação, massa, pH, natureza do tampão e força iônica).

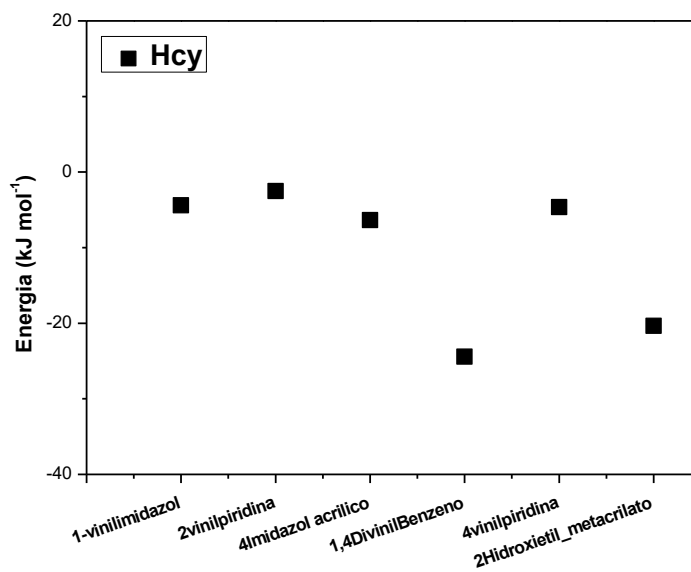
5.1 Otimização da síntese dos mag-MIPs empregando ferramentas computacionais

Para a síntese de mag-MIPs e de mag-NIPs, 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 mag-MIPs 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 Hcy com os monômeros funcionais. Foram, então, escolhidos 6 monômeros comumente utilizados para a síntese dos MIPs, levando em consideração também os reagentes disponíveis no laboratório (KUTNER; SHARMA, 2018; MARTIN-ESTEBAN, 2001).

A Figura 12 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 Hcy, sendo que quanto maior a energia liberada (maior estabilidade), maior a afinidade entre eles, e teoricamente mais seletivo o polímero resultante. Observando os resultados obtidos, nota-se que os monômeros de maior energia liberada para a Hcy foi o 1,4-divinil benzeno e o 2-hidroxietil metacrilato. Descartou-se o monômero de maior energia liberada, 4-divinil benzeno, devido a maior afinidade de ligação com o analito, visto que a remoção da Hcy das cavidades do polímero poderia ser dificultada. Assim, o 2-hidroxietil metacrilato, com energia intermediária, foi escolhido para realizar as sínteses e avaliar o comportamento frente ao reconhecimento da Hcy.

Figura 12 – Valores de energia de pares de ligação entre a molécula molde Hcy e seis monômeros funcionais: 1-vinilimidazol, 2-vinilpiridina, 4-imidazol acrílico, 1,4-divinilbenzeno, 4-vinilpiridina e 2-hidroxietil metacrilato.

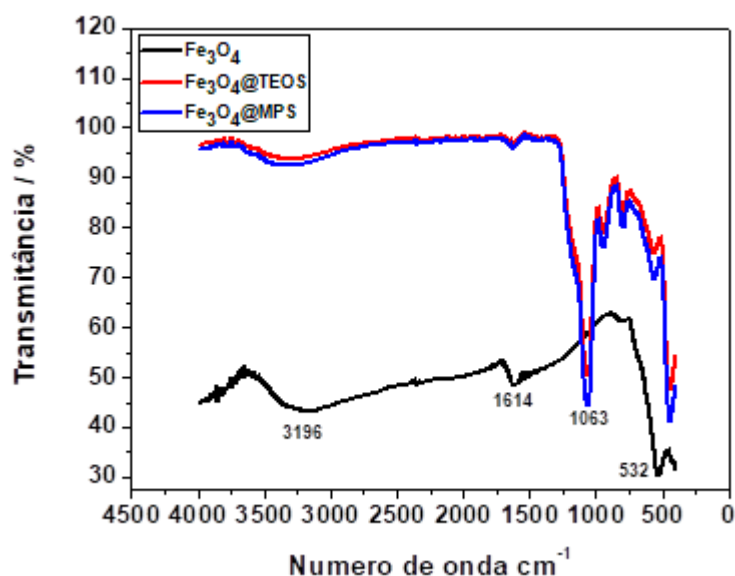


Fonte: Autora, 2021.

5.2 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 13 apresenta os espectros no infravermelho da magnetita e após a sua funcionalização com TEOS e MPS. No espectro da F_3O_4 , em preto, observa-se uma banda em 532 cm^{-1} que é atribuída à ligação Fe-O desse composto. Além disso, os picos em 1614 cm^{-1} e 3196 cm^{-1} estão associados respectivamente à vibração de deformação e estiramento dos grupos -OH provenientes, possivelmente, da adsorção da água na superfície da magnetita (PIOVESANA et al., 2020; HEMMATI; SAHRAEI; GHAEMY, 2016). Já nos espectros da segunda e terceira etapa referentes aos compostos $F_3O_4@TEOS$ (em vermelho) $F_3O_4@MPS$ (em azul), verifica-se em ambos uma banda em 1063 cm^{-1} , que é atribuída à vibração de alongamento assimétrico de Si-O-Si (MA et al, 2021). Esses resultados indicam que a síntese foi bem-sucedida da magnetita, bem como a funcionalização deste composto das nanopartículas magnéticas, os quais são compatíveis com os resultados do MEV-FEG e VSM.

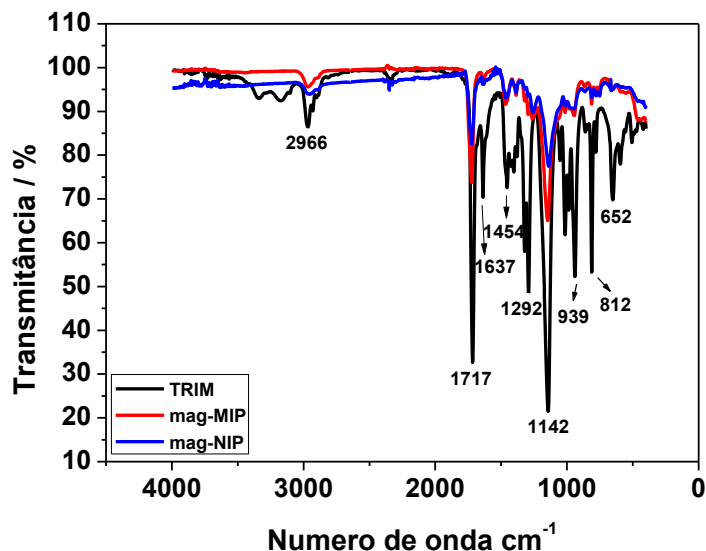
Figura 13 – Espectro de FTIR das Fe_3O_4 ; $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS; $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MPS.



Fonte: Autora, 2021.

A Figura 14 apresenta os espectros do mag-MIP, mag-NIP e do monômero estrutural utilizado na síntese. As bandas atribuídas ao monômero estrutural trimetacrilato de trimetilolpropano (TRIM) estão listadas e atribuídas na Tabela 3. Podemos observar que a estrutura do mag-MIP e mag-NIP 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. Comparando-se os espectros mag-MIP e mag-NIP observa-se que o analito foi removido da cavidade seletiva do mag-MIP e os polímeros, apresentaram bandas semelhantes, como esperado. Outra observação interessante obtida no espectro do mag-MIP é a ausência do sinal referente à ligação dupla entre os carbonos ($\text{C}=\text{C}$) 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 14 – Espectros de FTIR do monômero estrutural TRIM, dos polímeros magnéticos impressos (mag-MIP) e dos polímeros magnéticos não-impressos (mag-NIP).



Fonte: Autora, 2021.

Tabela 3 – Atribuição das bandas do espectro de FTIR do monômero estrutural TRIM para comparação com os mag-MIPs e mag-NIPs.

Principais bandas (cm ⁻¹)	2966	1717	1637	1454	1292 e 1142	939, 812 e 652
Atribuições	ν C-H sp ³	ν C=O	ν C=C	δ CH ₂	ν C-O	ω C-O

ν = deformação axial; δ = deformação angular simétrica; ω = deformação angular fora do plano.

Fonte: Autora, 2021.

5.3 Magnetometria de amostra vibrante (VSM)

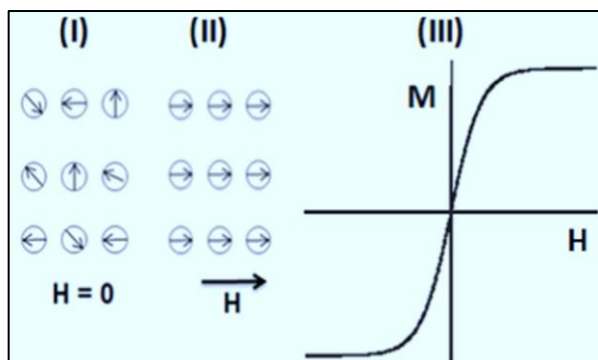
A VSM é uma técnica importante para a caracterização de compostos magnéticos, pois por meio dela é possível mensurar as propriedades fundamentais das MNPs como magnetização, retentividade e histerese. Essa técnica baseia-se na alteração de fluxo magnético, ocasionado por um campo uniforme, em torno de um material. Essa vibração induz uma corrente alternada nas bobinas detectoras do magnetômetro que é proporcional à magnetização

da amostra, por sua vez, essa grandeza pode ser medida quantitativamente por meio de um amplificador (SANKHI; TURGUT, 2020)

Assim, quando um composto magnético é submetido a um campo magnético, H , pode-se observar que a magnetização, M , do material chega a um limite, denominada magnetização de saturação (M_S), que é gerada pelo alinhamento de quase todos os domínios magnéticos da amostra. Com a variação do campo magnético para um valor nulo, a magnetização diminui para um valor diferente de zero, chamado de retentividade (M_R). A retentividade consiste na remanência de magnetismo no material mesmo após o campo aplicado ser anulado. Quando o campo é aplicado em valores inferiores, ocorre a desmagnetização do material, este ponto do gráfico é chamado de campo coercitivo (H_C). Se continuarmos a aplicar o campo no sentido inverso o material voltará novamente à região de saturação magnética. Ao atingir o M_S em valores negativos do campo, repetindo o mesmo processo no sentido inverso, obtém-se um ciclo denominado histerese (SODIPO; AZIZ, 2016; BENZ, 2012; PANKHURST et al., 2003). O fenômeno de histerese, portanto, está associado ao comportamento irreversível da densidade de fluxo magnético quando um campo é aplicado e então removido (CALLISTER JR; RETHWISCH, 2018)

Assim, para os materiais ferrimagnéticos como a Fe_3O_4 as curvas de histerese são estreitas apresentando características superparamagnéticas devido à influência do tamanho das nanopartículas (da ordem de nanômetros) (CHENG et al., 2021). Isso porque, o momento magnético das nanopartículas tem um único domínio, isto é, o momento magnético de todos os átomos está bem alinhado, Figura 15 (SODIPO; AZIZ, 2016). Verifica-se, portanto, a ausência de loop de histerese, retentividade e coercividade. Neste caso, as nanopartículas com características superparamagnéticas podem ser controladas e separadas a partir da aplicação de um campo externo.

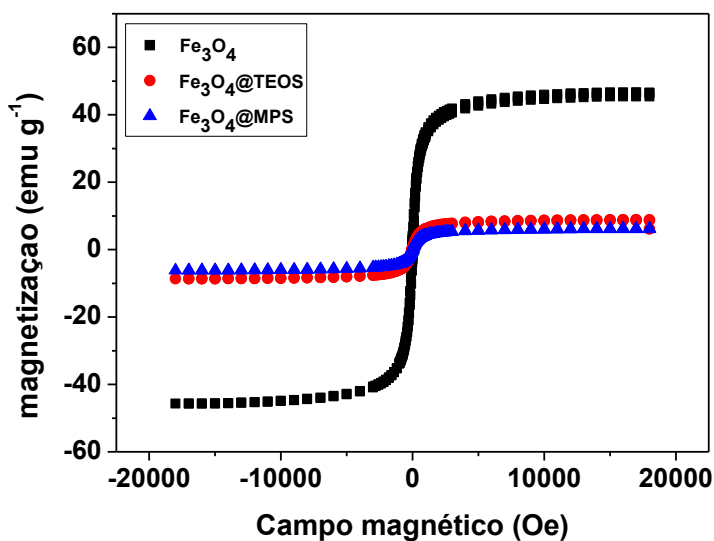
Figura 15 – Curva M-H da interação do momento magnético M com o campo magnético externo H de material superparamagnético.



Fonte: Adaptado de (SODIPO; AZIZ, 2016).

Na Figura 16, observam-se as curvas de histerese das nanopartículas magnéticas e após a sua modificação com TEOS e MPS – Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS, $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MPS, respectivamente –, nota-se que a Fe_3O_4 possui valor positivo de M_S igual $42,50 \text{ eumg}^{-1}$, enquanto que a magnetita funcionalizada na primeira e segunda etapa tem valores significativamente inferiores, com valores positivos de M_S $8,81 \text{ eumg}^{-1}$ para a $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS e $6,14 \text{ eumg}^{-1}$ para $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MPS. Isso indica que o recobrimento da nanopartícula magnética diminui o M_S e, conseqüentemente, em valores menores o aumento de um campo externo não fará efeito sobre as MNPs funcionalizadas.

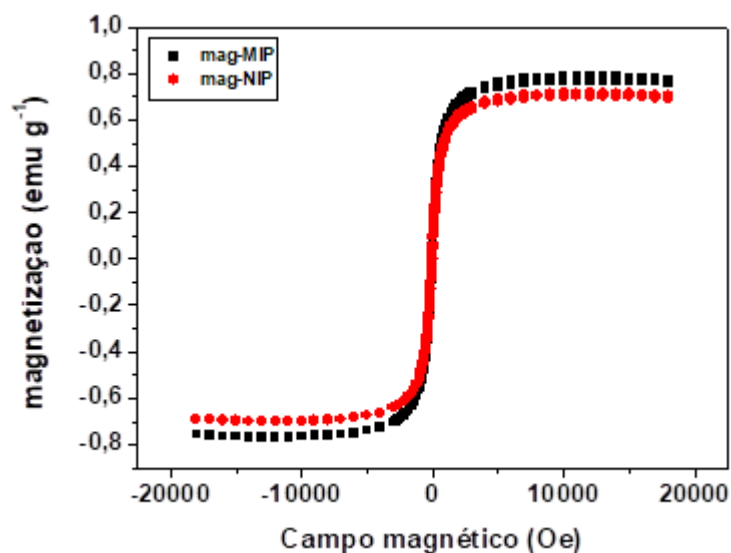
Figura 16 – Curvas de histerese magnética para Fe_3O_4 (magnetita), $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ TEOS e $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ MPS.



Fonte: Autora, 2021.

Esse comportamento de diminuição de M_S do composto também é observado nos polímeros com impressão molecular magnético vs. polímero magnético não impresso. Percebe-se pela Figura 17 que a magnetização do mag-MIP para valores positivos equivale aproximadamente a $0,8 \text{ eumg}^{-1}$ enquanto que o mag-NIP, $0,7 \text{ eumg}^{-1}$. Isso acontece porque as propriedades magnéticas são sensíveis a variáveis estruturais. Logo, o polímero não impresso com morfologia irregular favorece uma resposta menor ao campo magnético externo.

Figura 17 – Curvas de histerese magnética para o mag-MIP e mag-NIP.



Fonte: Autora, 2021.

De maneira geral, mediante a análise dos gráficos obtidos por VSM, nota-se pouca magnetização remanente, nenhuma coercitividade e/ou loop amplo de histerese, característica de materiais superparamagnéticos. Assim, pode-se afirmar que as propriedades magnéticas foram mantidas nos polímeros com impressão molecular, apesar da redução M_S dos compostos à medida que eram funcionalizados. Tais considerações são importantes nos processos de separação magnética em técnicas eletroanalíticas.

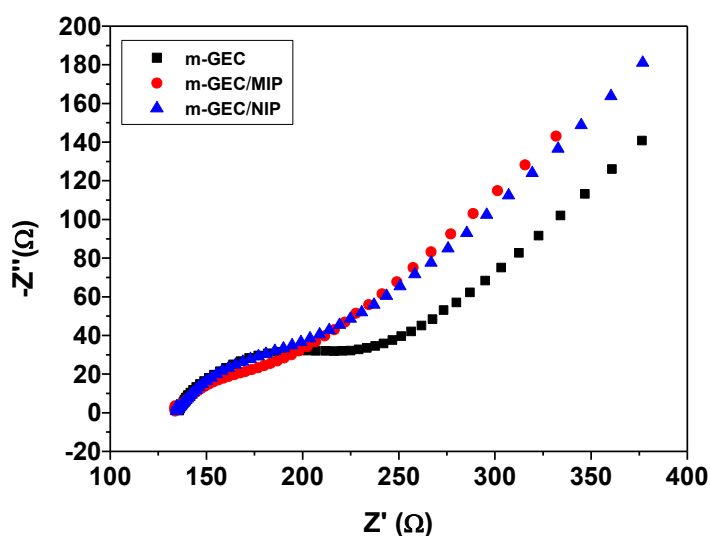
5.4 Espectroscopia de impedância eletroquímica

Realizou-se a caracterização eletroquímica através da técnica de EIE, a fim de analisar a resistência de transferência de carga para o sensor mag-GEC/MIP desenvolvido.

Os estudos foram realizados com uma faixa de frequência de 0,1 Hz a 100 kHz para os eletrodos de m-GEC (branco), mag-GEC/MIP e mag-GEC/NIP em solução de 0,5 M KCl

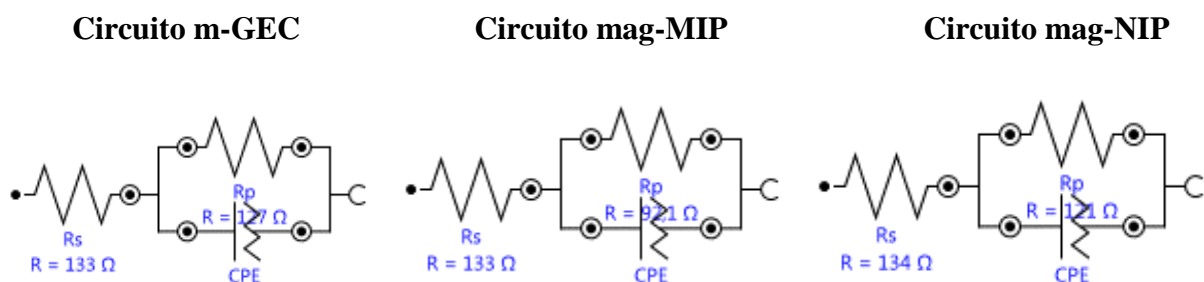
contendo 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ – para os dois últimos eletrodos, 3 mg dos polímeros correspondente foram concentrados previamente na superfície do m-GEC. Os espectros obtidos nessas condições estão apresentados na Figura 18 mais os seus respectivos circuitos, Figura 19.

Figura 18 – Espectros de impedância eletroquímica para o eletrodo m-GEC, mag-MIP e mag-NIP em 0,5 M KCl contendo 5 mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em circuito aberto.



Fonte: Autora, 2021.

Figura 19 – Circuitos equivalentes para o m-GEC, mag-MIP e mag-NIP.



Fonte: Autora, 2021.

A impedância abrange as contribuições de capacitância, resistência e indutância (ou combinações de algumas delas) que um material tem de opor-se ao fluxo de corrente através de um circuito. Para células eletroquímicas, geralmente são analisados a capacitância e a resistência do sistema, o qual pode ser mostrado por um circuito equivalente simples, denominado circuito de Randles. Então, características importantes dos sistemas eletroquímicos podem ser obtidas.

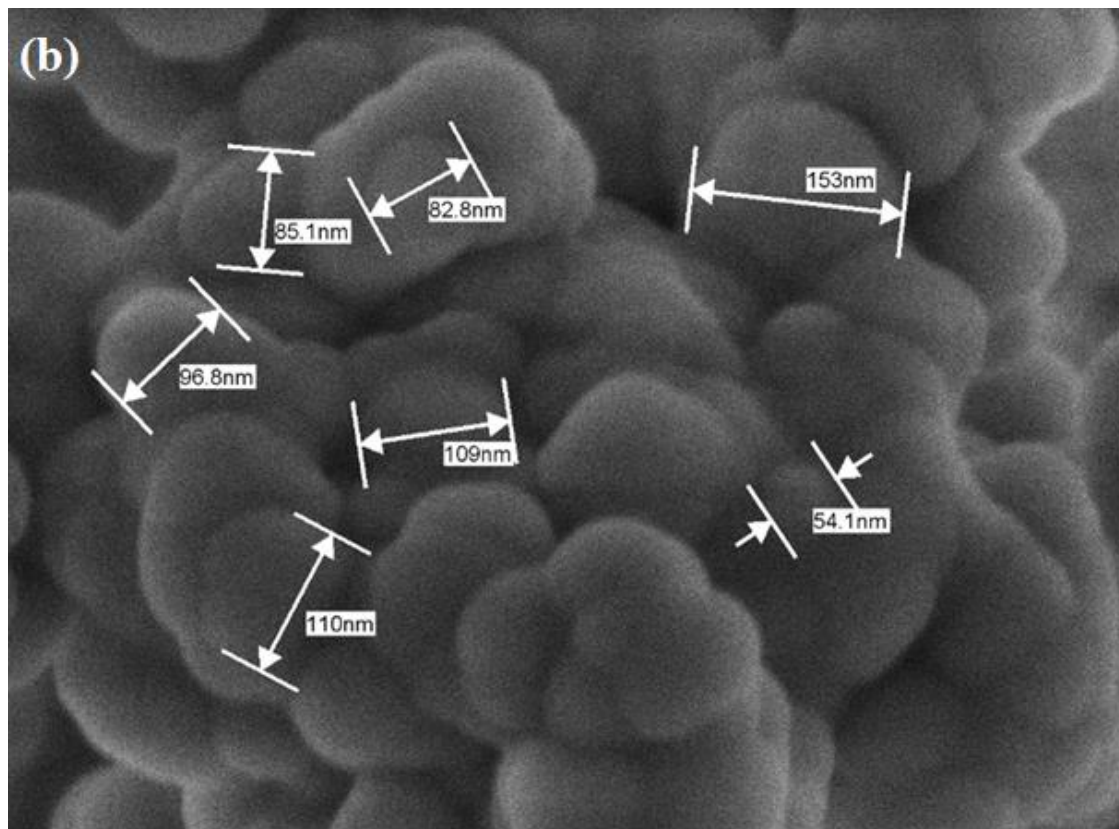
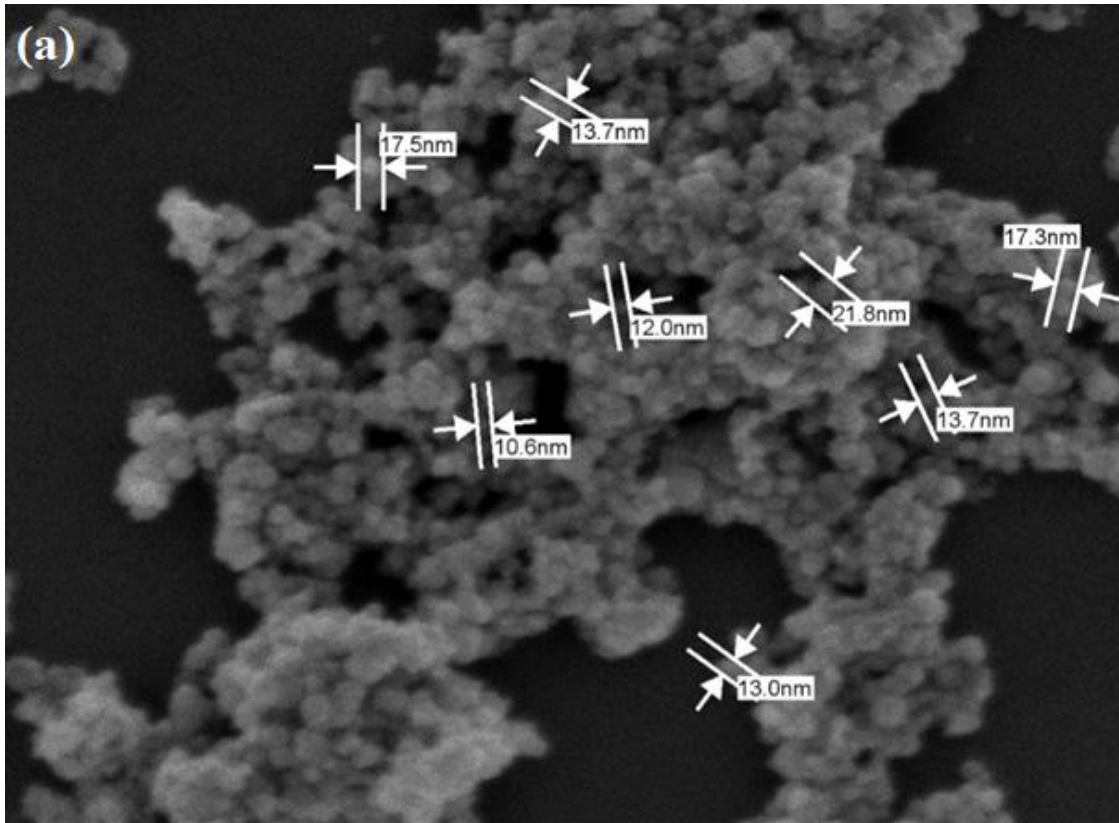
Portanto, através da Figura 18, pelo gráfico de Nyquist para os referidos eletrodos, é possível observar nos espectros uma semicircunferência na região de altas frequências e uma parte linear para regiões de baixas frequências, representados pela relação dos componentes real (Z') e imaginário ($-Z''$). Os circuitos equivalentes para cada eletrodo mostram um valor de R_s , que se refere a resistência da solução, conectada em série com o elemento de fase constante (CPE) e a resistência de transferência de carga, R_p . A CPE diz respeito a capacitância da dupla camada do sistema, de acordo com o modelo de célula sugerido por Randles. Enquanto que, R_p está associada com o diâmetro da semicircunferência dos espectros de impedância, a qual é controlada pela cinética de transferência de carga. Portanto, para maiores semicircunferências tem-se maior resistência de carga e vice-versa.

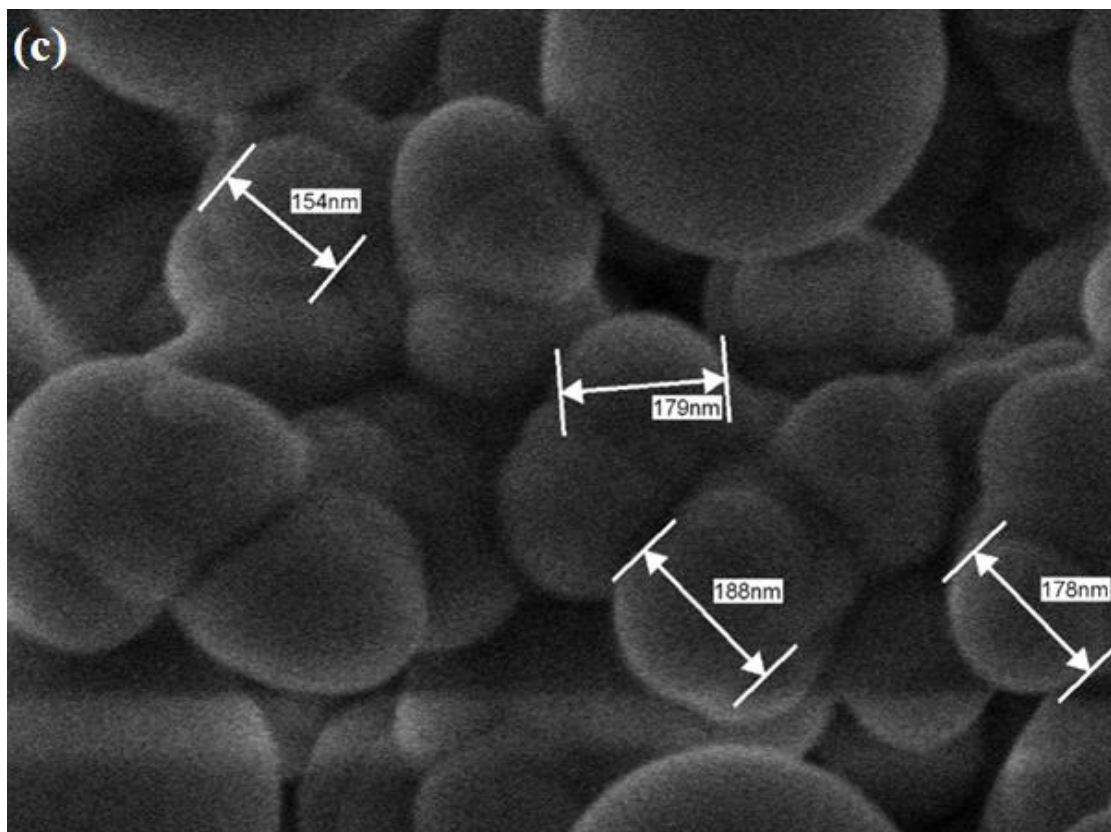
Nos termos de R_p , comparando esses valores na Figura 18, percebe-se que m-GEC/MIP tem melhor desempenho pois possui menor valor de diâmetro de semicircunferência em Z' , isto é, mostra menor resistência de transferência de carga na interface eletrodo/solução. Isso pode ser verificado com os valores de R_p de 127, 92,1 e 121 Ω dos circuitos equivalente de m-GEC, m-GEC/MIP e m-GEC/NIP, respectivamente da Figura 19. Considerando essas informações, pode-se inferir que, possivelmente, as cavidades de interações seletivas para Hcy m-GEC/MIP diminui a resistência de transferência de carga na superfície do eletrodo, facilitando a reação de oxidação dessa espécie eletroativa. Isso mostra que a baixa resistência do eletrodo empregando o polímero com impressão molecular magnético mostra-se promissora, uma vez que através da técnica de EIE pode-se observar melhor condutividade elétrica para o m-GEC/MIP comparado aos demais eletrodos avaliados.

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

Com o propósito de observar as diferenças na morfologia, distribuição e características superficiais em cada etapa da síntese foi empregada técnica MEV-FEG. As imagens na Figura 20 apresenta as nanopartículas magnéticas obtidas com ampliação de 50.000 X nas três primeiras etapas da síntese, antes da obtenção do mag-MIP. Na primeira etapa (a), as partículas estão um pouco aglomeradas e seus tamanhos variam de 10 a 22 nm. Na segunda etapa de síntese, ocorreu o recobrimento das nanopartículas com o TEOS ($Fe_3O_4@SiO_2$), onde pode-se observar o aumento no tamanho das nanopartículas que possuem a variação de 54 a 153 nm (b), e na terceira etapa (c), ao serem tratadas com MPS ($Fe_3O_4@SiO_2-C=C$) aumenta ainda mais o tamanho devido ao processo de silanização (inserção de um grupo metacrílico), com a variação no tamanho das nanopartículas de 154 a 190 nm.

Figura 20 – Imagens de MEV-FEG com ampliação de 50.000 X para (a) Fe_3O_4 (magnetita), (b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ e (c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2\text{-C}=\text{C}$

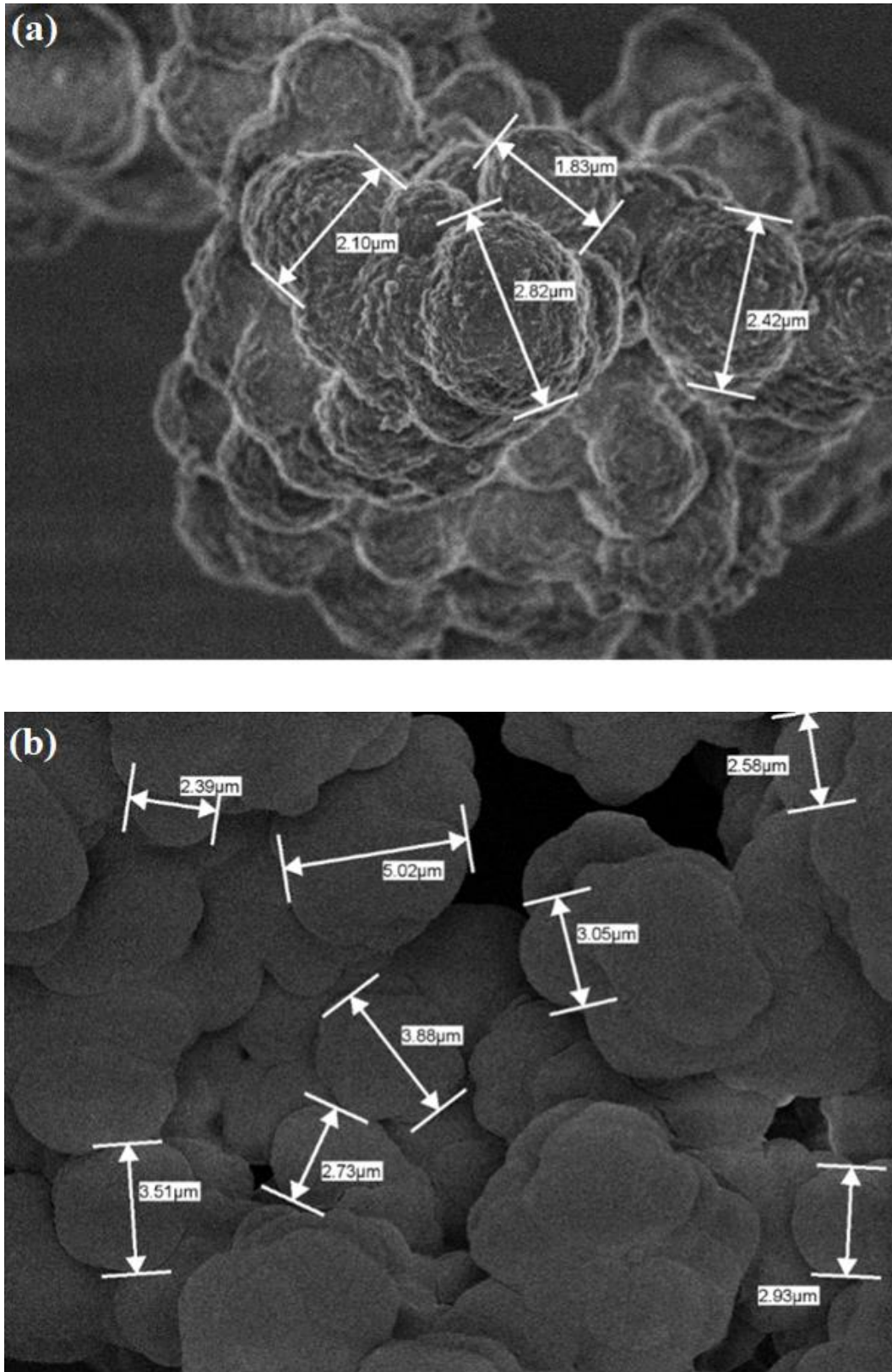




Fonte: Autora, 2021.

As imagens na Figura 21 referem-se ao mag-MIP(a) e mag-NIP (b) com ampliação de 5.000 X. Pode-se observar que as partículas obtidas têm um formato esférico e uniforme, com uma ligeira aglomeração. Possuem tamanhos maiores que a magnetita (e magnetita funcionalizada), com variação de diâmetro de $\sim 2\text{-}3\ \mu\text{m}$ para os MIPs e $\sim 2\text{-}5\ \mu\text{m}$ para os NIPs, este último tem maior diferença de diâmetro devido a sua síntese ter ocorrido na ausência da Hcy dispondo uma morfologia irregular no polímero. É possível também verificar uma diferença na morfologia das partículas do mag-MIP, que apresentam uma superfície aparentemente mais porosa em relação ao mag-NIP.

Figura 21 – Imagens de MEV-FEG com ampliação de 5.000 X para (a) mag-MIP e (b) mag-NIP.



5.6 Estudos eletroquímicos

Depois de caracterizados, os mag-MIPs e mag-NIPs tiveram suas eficiências avaliadas pela capacidade de se religar a Hcy, ou seja, foi avaliada a especificidade do mag-MIP frente ao mag-NIP, em função de sua cavidade. Assim, com o intuito de maximizar a retenção da Hcy e obter maior sensibilidade, foram avaliadas previamente diferentes condições reacionais, quantidade de massa de adsorvente, tempo, pH e natureza do tampão.

5.6.1 Estudo da influência da massa do polímero e o tempo de interação.

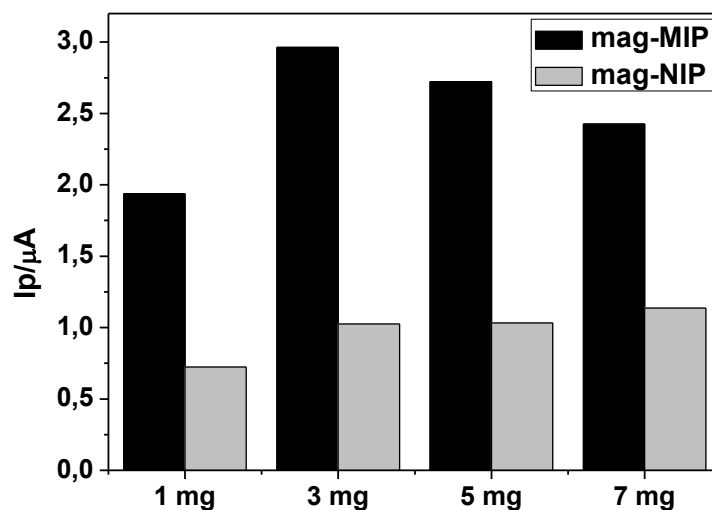
Estudos de adsorção foram realizados a fim de obter parâmetros importantes sobre o sistema estudado. Essas informações possibilitam a adequação das condições experimentais para a eletroanálise da Hcy via eletrodo m-GEC/MIP, minimizando a obtenção de resultados incoerentes.

Assim, fez-se inicialmente uma análise das massas (1, 3, 5 e 7 mg) dos polímeros com impressão molecular e o polímero não impresso, constituídos pelo monômero funcional 2-hidroxietil metacrilato em relação a um tempo fixado de 30 min. A Figura 22 demonstra que os polímeros impressos detêm maior retenção do analito em comparação aos mag-NIPs. Mais especificamente, nota-se que a diferença de massa do mag-MIP vs. mag-NIP equivalente a 3 mg acarreta numa maior adsorção de Hcy, visto que a corrente é maior nessa quantidade específica comparada às demais. Além disso, não há aumento de corrente para as massas superiores.

Os intervalos de duração do experimento também foram investigados, considerando o tempo de 15, 30, 60, 90 e 120 min. Pelo estudo anterior referente ao polímero de massa igual a 3 mg com maior adsorção de analito, fez-se a otimização do experimento com essa quantidade para avaliar o tempo de equilíbrio para a retenção da Hcy. Como pode ser observado pela Figura 23, o maior tempo de retenção diz respeito aos 90 min. para o mag-MIP vs. mag-NIP, visto que após esse tempo não houve aumento significativo da corrente, pois o platô de saturação é alcançado.

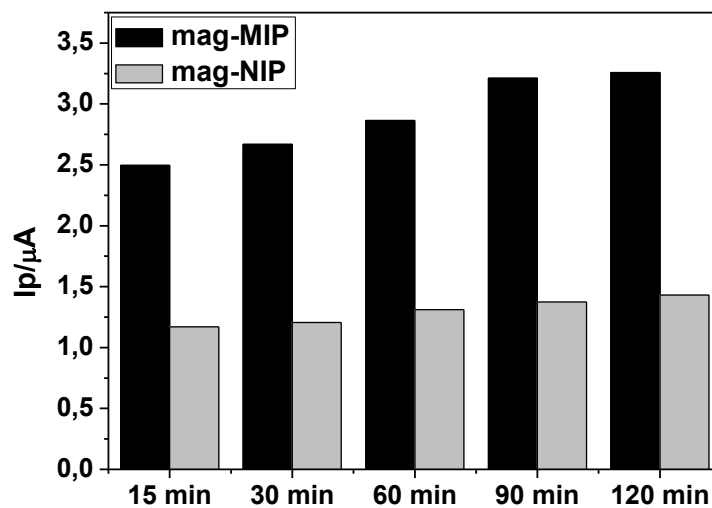
Esses resultados demonstram que a massa do polímero e o tempo de equilíbrio do experimento influenciam diretamente o desempenho dos mag-MIPs na presença da Hcy. Por isso, para se ter resultados contundentes com a realidade e de maneira eficiente, é necessário levar em consideração esses aspectos.

Figura 22 – Comparação da adsorção entre o mag-MIP e mag-NIP, Hcy: 0,1 mmol L⁻¹ (polímero com monômero funcional 2-hidroxietil metacrilato).



Fonte: Autora, 2021.

Figura 23 – Comparação da adsorção entre o mag-MIP e mag-NIP, Hcy 0,1 mmol L⁻¹ (polímero com monômero funcional 2-hidroxietil metacrilato) em diferentes tempos.

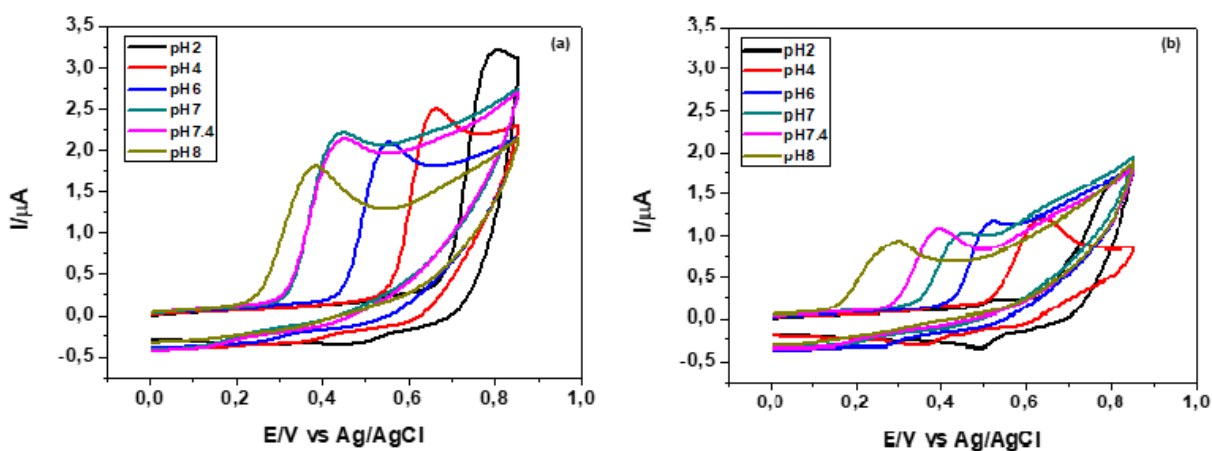


Fonte: Autora, 2021.

5.6.2 Efeitos do pH e do tampão na resposta eletroquímica dos mag-MIPs e mag-NIPs

Para o estudo de pH, as medidas de VC foram feitas em uma solução tampão Britton - Robinson, em diferentes valores de pH, contendo 3 mg de mag-MIP e mag-NIP que foram pré-concentrados em uma solução contendo $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de Hcy na superfície do m-GEC. A Figura 24 apresenta os voltamogramas cíclicos para o mag-MIP e mag-NIP. Pode-se observar a dependência do potencial de pico em relação ao valor de pH, bem como o potencial de oxidação de Hcy que foi deslocado para valores menos positivos com o aumento do pH com uma pequena diminuição das correntes anódicas.

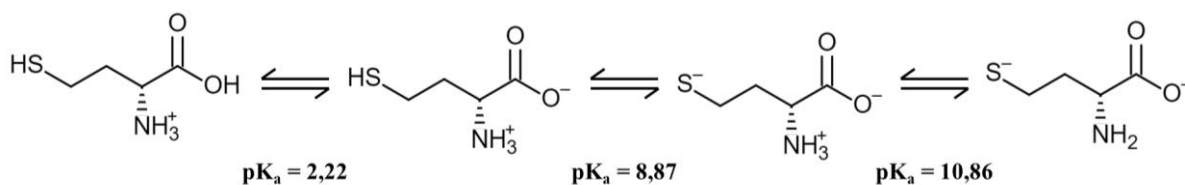
Figura 24 – Voltamogramas cíclicos utilizando o eletrodo de (a) m-GEC/MIP e (b) m-GEC/NIP na presença de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de Hcy em tampão Britton – Robinson $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em diferentes pH, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.



Fonte: Autora, 2021.

Portanto, percebe-se que o pH é um parâmetro importante que pode favorecer ou desfavorecer a reação da Hcy. Pois, a depender da protonação ou desprotonação do composto, ele pode interagir de maneira diferente com o monômero 2-hidroxietil metacrilato constituinte dos polímeros. A Figura 25 apresenta os valores de pK_a da Hcy.

Figura 25 - Valores de pK_a para a homocisteína.



Fonte: Adaptado de (NEKRASSOVA; LAWRENCE; COMPTON, 2003).

Pode-se concluir pela Figura 24 que os melhores pHs são 7 e 7,4, devido à melhor definição de pico de corrente e potencial de oxidação da Hcy. Isso porque, em pHs mais elevados quanto maior a densidade eletrônica no grupo responsável pela transferência de elétrons na Hcy mais fácil a oxidação desse aminoácido, logo a energia dos elétrons do eletrodo é diminuída para potenciais menos positivos para que os elétrons da Hcy migrem para o eletrodo de trabalho, produzindo a corrente de oxidação (BARD; FAULKNER, 2001). Além disso, é razoável supor que, esses cátions interagem eletrostaticamente entre si próximo ao eletrodo ou na sua superfície, o que pode alterar os valores de corrente. Pois, segundo o modelo básico de Frumkin, que leva em consideração a interação entre as partículas e de que essas partículas não são pontuais, as espécies que estão sendo adsorvidas no eletrodo de trabalho podem influenciar o comportamento redox de um dado composto (TICIANELLI; GONZALEZ, 2013). Portanto, o pH ideal para estudos posteriores estabelecido foi o de 7,4, uma vez que possui um valor de corrente elevado e é o pH fisiológico, o que facilita a aplicação e o estudo de interação, em amostras biológicas. Para os NIPs, observa-se pelo gráfico uma tendência semelhante ao MIPS, no entanto, com valores de corrente de pico inferiores devido, possivelmente, a morfologia irregular do polímero.

De acordo com Agostinho et al. (2004), o eletrólito de suporte tem a capacidade de manter o coeficiente de difusão das espécies eletroativas praticamente constante, se a viscosidade dinâmica da solução também for constante. Pois, considerando o modelo de Stokes-Einstein, Equação 1, observa-se que o coeficiente de difusão de uma determinada espécie i está relacionado com a viscosidade dinâmica da solução, η :

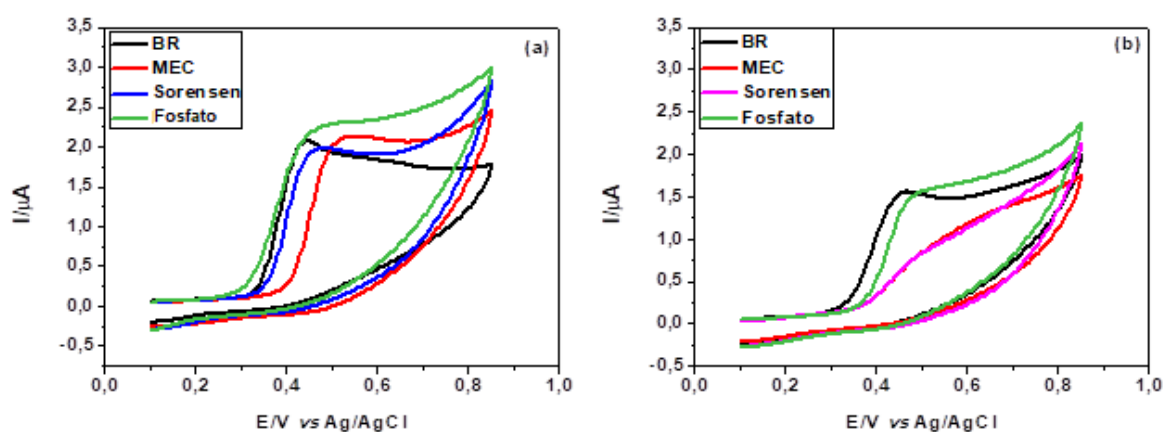
$$D_i = \frac{RT}{6r_i\eta N} \quad (1)$$

onde r_i é o raio do íon ou molécula, assumindo que é um formato esférico; η , a viscosidade dinâmica da solução, N a constante de Avogadro; R a constante de Rydberg e T , a temperatura absoluta. Define-se por viscosidade a propriedade de um líquido que causa resistência ao fluxo, o qual depende da natureza dos compostos moleculares e iônicos que o constitui. Basicamente, a viscosidade é a força de adesão das moléculas de um solvente e pode fornecer informações importantes sobre a estrutura de um líquido (BELESSIOTIS; KALOGIROU; DELYANNIS, 2016). Então, levando em consideração essa propriedade intrínseca do sistema, pode-se entender que diferentes eletrólitos de suporte estão relacionados com diferentes viscosidades

dinâmica do solvente em estudo, o que, por conseguinte, podem alterar a resposta eletroquímica da espécie eletroativa considerando o fator difusão.

Assim, a fim de se identificar um eletrólito de suporte adequado para o sensor proposto investigou-se, por meio da VC, a influência do tipo de solução tampão na resposta eletroanalítica, que foi analisada com quatro tipos diferentes de soluções tampão: Britton - Robinson, McIlvaine, Sorensen e Fosfato em concentrações de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 7,4, Figura 26. Com base na Figura 26a verifica-se que a solução tampão fosfato é a melhor escolha para ser o eletrólito de suporte, pois ele forneceu uma melhor resposta, ou seja, a maior intensidade de corrente de pico, além de melhor representar o meio biológico para os estudos eletroanalíticos. Na Figura 26b, a menor corrente de oxidação da Hcy está relacionada, possivelmente, à morfologia irregular dos NIPs.

Figura 26 – Voltamogramas cíclicos utilizando o eletrodo de (a) m-GEC/MIP e (b) m-GEC/NIP na presença de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ Hcy em diferentes tampões de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e pH 7,4: Britton - Robinson, McIlvaine, Sorensen e Fosfato, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.



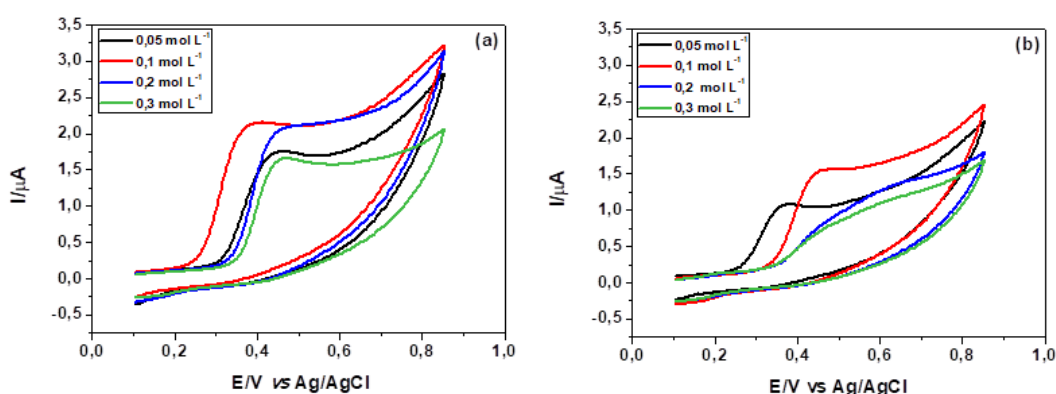
Fonte: Autora, 2021.

5.6.3 Estudo da concentração do tampão fosfato e sua influência na resposta eletroquímica dos mag-MIPs e mag-NIPs

A força iônica, I , está relacionada com a intensidade do campo elétrico criado a partir da atividade das espécies iônicas em uma solução eletrolítica, parâmetro que pode influenciar os processos de oxidação e redução de uma espécie eletroativa (BELESSIOTIS; KALOGIROU; DELYANNIS, 2016).

Por esse motivo, realizou-se o estudo de força iônica por VC para as concentrações: 0,05 mol L⁻¹ (voltamograma preto); 0,1 mol L⁻¹ (voltamograma vermelho); 0,2 mol L⁻¹ (voltamograma azul) e 0,3 mol L⁻¹ (voltamograma ciano) do tampão fosfato em pH 7,4, Figura 27, visando investigar qual dessas concentrações proporcionaria melhor resposta para o mag-MIP. Pelos resultados dispostos abaixo observa-se uma tendência decrescente dos valores de corrente à medida que se aumenta a concentração da solução, 0,1 mol L⁻¹, 0,2 mol L⁻¹ e 0,3 mol L⁻¹, respectivamente. Isso está relacionado, possivelmente, a atração eletrostática entre a molécula molde e os constituintes da solução eletrolítica que facilita a dispersão da molécula molde para o seio da solução à medida que a força iônica aumenta, o que diminui a quantidade de Hcy nas cavidades do polímero e, conseqüentemente, diminui a corrente de oxidação, como observado no gráfico abaixo. Ademais, o eletrólito de suporte é responsável por manter constante a alta condutividade da solução, além de diminuir a espessura da dupla camada elétrica e favorecer a condução de carga por difusão (RABÓCZKAY, 2020). Tudo isso pode influenciar o comportamento redox do analito de interesse, neste caso, a Hcy. Portanto, escolheu-se o eletrólito de concentração igual a 0,1 mol L⁻¹ devido ao menor potencial de oxidação de Hcy e maior corrente, o qual não é observado para as demais concentrações.

Figura 27 – Voltamogramas cíclicos utilizando o eletrodo de (a) m-GEC/MIP e (b) m-GEC/NIP em diferente concentrações do tampão fosfato: 0,05 mol L⁻¹, 0,1 mol L⁻¹, 0,2 mol L⁻¹ e 0,3 mol L⁻¹, pH 7,4; na presença de 0,1 mmol L⁻¹ de Hcy, $v = 20 \text{ mV s}^{-1}$.

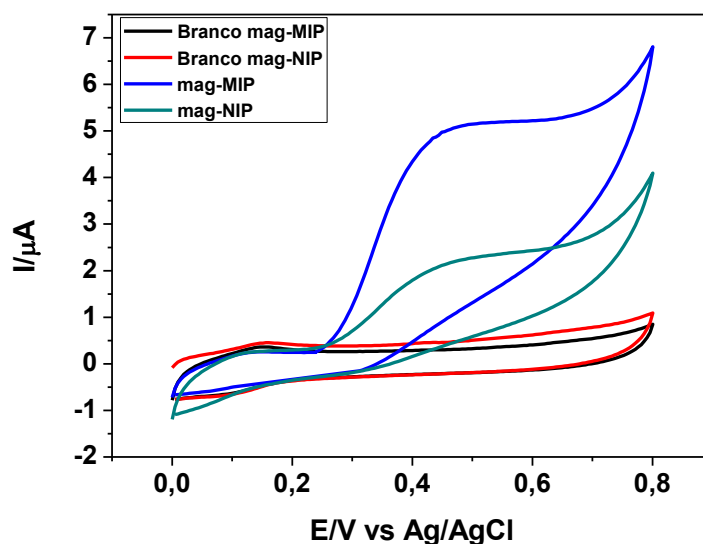


Fonte: Autora, 2021.

5.6.4 Estudo do comportamento voltamétrico para m-GEC/MIP e m-GEC/NIP na oxidação de Hcy

Após as otimizações, os perfis de oxidação de Hcy, foram investigadas por voltametria cíclica no eletrodo magnético m-GEC, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, na faixa de potencial de 0–0,8 V vs. Ag/AgCl e velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹. A Figura 28 apresenta os voltamogramas cíclicos registrados, na ausência do analito, para o mag-MIP (preto) e para o mag-NIP (vermelho) o qual não apresenta qualquer pico voltamétrico (processo faradaico). Quando realizada a pré-concentração de 0,5 mmol L⁻¹ de Hcy o mag-MIP (azul) e mag-NIP (verde) apresenta um pico de oxidação bem definido. Pode-se observar que nos eletrodos m-GEC/MIP, a retenção de Hcy é maior do que no m-GEC/NIP, já que no m-GEC/MIP, possui um pico de oxidação em torno de 0,4 V vs. Ag/AgCl, com uma corrente aproximada de 5,5 µA, e no eletrodo m-GEC/NIP a corrente é de aproximadamente 2 µA. Ou seja, os resultados demonstram melhor definição de pico e maior intensidade de corrente para o mag-MIP em comparação com o mag-NIP.

Figura 28 – Voltamogramas cíclicos sobre o eletrodo m-GEC/MIP e m-GEC/NIP registrados na ausência (branco) e na presença de 0,5 mmol L⁻¹ de Hcy, em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4, v = 20 mV s⁻¹.



Fonte: Autora, 2021.

5.6.5 Determinação da curva analítica

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. Diferentes concentrações de Hcy ($0,1$ a $70 \mu\text{mol L}^{-1}$) foram analisadas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4, na faixa de $-0,10$ a $+0,70 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, com a taxa de varredura 10 mV s^{-1} e amplitude de pulso 50 mV . Na Figura 29, é possível observar que a corrente de pico anódica aumenta com a concentração do analito em torno de $0,35 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. Nessas condições, foram obtidas duas faixas lineares de $0,1$ – $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ com $R^2 = 0,9916$ e 2 – $70 \mu\text{mol L}^{-1}$, $R^2 = 0,9945$, Figura 30. O limite de detecção (LD) para a primeira faixa linear encontrado foi de $0,030 \mu\text{mol L}^{-1}$ e de quantificação (LQ) $0,099 \mu\text{mol L}^{-1}$; para a segunda faixa linear o LD foi de $0,186 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ $0,619 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os limites de detecção foram calculados usando a razão $3 \cdot \sigma/b$ e para a quantificação $10 \cdot \sigma/b$, onde σ é o desvio padrão do valor médio para 10 voltamogramas do branco e b é o coeficiente angular da curva analítica, esses valores foram determinados de acordo com as recomendações da IUPAC (Analytical Methods Committee, 1987).

Figura 29 – Voltamogramas de pulso diferencial para diferentes concentrações de Hcy variando de $0,1$ – $70 \mu\text{mol L}^{-1}$, em tampão fosfato pH 7,4, $v = 10 \text{ mV s}^{-1}$. Inserção: curva analítica para as primeiras concentrações de Hcy ($0,1$ – $1 \mu\text{mol L}^{-1}$).

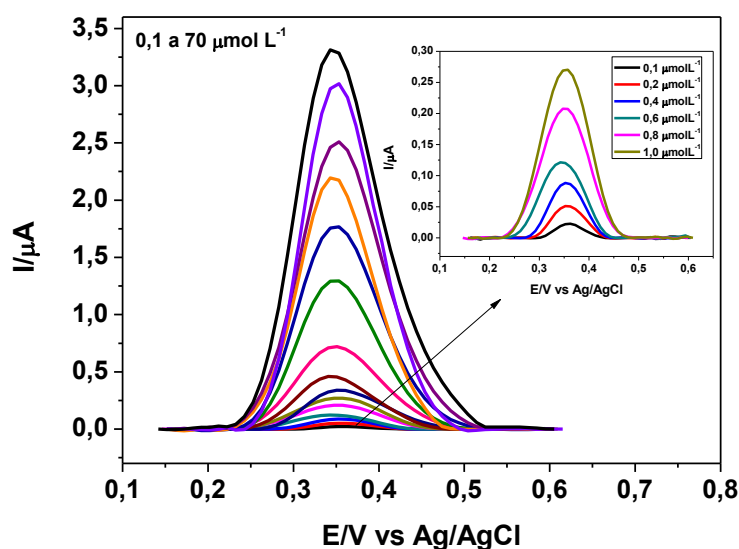
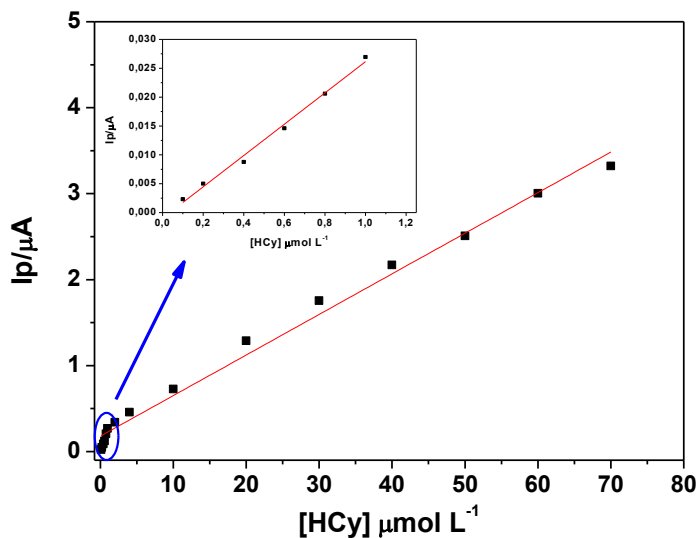


Figura 30 – Curva analítica para o sensor m-GEC/MIP para determinação diferentes concentrações de Hcy variando de 0,1–70 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Inserção: curva analítica para as primeiras concentrações de Hcy (0,1–1 $\mu\text{mol L}^{-1}$).



Fonte: Autora, 2021.

Considerando os resultados de LD referentes ao sensor m-GEC/MIP é possível dizer que, a metodologia empregada demonstra ser uma ferramenta promissora para a detecção e quantificação da Hcy. Isso porque, os limites de detecção encontrados estão abaixo dos valores de detecção do plasma sanguíneo para indivíduos saudáveis, isto é, $< 5\text{--}15 \mu\text{mol L}^{-1}$. Importante lembrar que pacientes com hiperhomocisteinemia, a concentração de Hcy no plasma pode ultrapassar $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, condição importante relatada neste trabalho para a determinação do referido aminoácido.

A tabela 4 mostra o desempenho analítico do m-GEC/MIP em relação a outros métodos eletroquímicos relatados na literatura. Como pode ser observado, há diversas metodologias para a modificação do eletrodo que podem ser empregados para a determinação de Hcy e muitas apresentam potencial de oxidação e limite de detecção menores quando comparados a metodologia proposta neste trabalho. No entanto, essas diferentes abordagens demonstram algumas desvantagens quanto a separação do analito de interesse, isto é, geralmente precisam de etapas de pré-concentração complexas utilizando reagentes caros para precipitação e derivação, além de etapas demoradas de separação como eluição e centrifugação de amostras. Outro ponto importante diz respeito ao estudo de interferentes, pois muitos trabalhos não incluem em suas análises os biotóxicos comumente encontrados em amostras biológicas,

compostos esses que podem potencialmente comprometer os resultados finais. Soltani et al., 2014, por exemplo, inclui diversos compostos importantes, no entanto a L-cisteína, N-acetilcisteína e glutatona apresentaram interferências para a determinação de Hcy; diferente da abordagem proposta neste trabalho com o m-GEC/MIP. Ademais, algumas metodologias são realizadas em meio ácido ou básico, dificultando assim a sua aplicação em meios biológicos. Portanto, a plataforma m-GEC/MIP apresenta uma estratégia promissora para o reconhecimento biomimético de Hcy, com várias vantagens comparados aos sensores descritos na tabela abaixo, são elas: separação magnética rápida e fácil, sensibilidade, alta estabilidade química (pH, temperatura e pressão), durabilidade e custo benefício através de uma metodologia inovadora para detecção desse aminoácido.

Tabela 4 – Detecção eletroquímica de Hcy por diferentes eletrodos descrito na literatura.

Eletrodo modificado	Técnica	pH	E _p	Faixa linear	LD	Sensibilidade	Interferentes	Ref.
Aptâmero para Hcy/NPs Au /EG	VPD	7,4	-0,14 V vs. Ag/AgCl	1 – 100 µM	1 µM	0,63 µA/µM	Metionina e cisteína	(WEN et al., 2021)
DP/OG/EI	VPD	7,0	0,22 V vs. pseudo referência-Ag	0,5 – 50 µM	0,15 µM	0,381 µA/µM	–	(HOSSEINZADEH et al., 2021)
Aptâmero para Hcy/G/ECV	VPD	7,0	~ 0,85 V vs. SCE	0,05 – 20 µM	0,005 µM	–	Cl ⁻ , Na ⁺ , K ⁺ , Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , ácido ascórbico e ácido úrico	(WANG et al., 2021)
Aptâmero para Hcy/Au/ECV	VPD	7,0	~ 0,80 V vs. Ag/AgCl	0,05 – 20 µM	0,009 µM	–	Metionina e cisteína	(BEITOLLAHI et al., 2020)
NPs Au/OGR/ECV	Amp.	7,0	0,12 V vs. Ag/AgCl	2 000 – 1,4×10 ⁴ µM	6,90 µM	0,014 µA/µM	H ₂ O ₂	(RAJARAM; MATHIYARASU, 2018)
OGR-TiO ₂ /ECV	Amp.	8,0	~ 0,35 V vs. Ag/AgCl	0,1 – 80 µM	0,024 µM	–	–	(ZHAO et al., 2017)
DAAO/NTs TiO ₂	VC	7,0	~ - 0,27 V vs. Ag/AgCl	10 – 70 µM	1,5 µM	0,0534 µA/µM	–	(HUNG; LIN, 2017)
Aptâmero para Hcy/Eletrodo de Au	VPD	7,4	1,07 V vs. Ag/AgCl	0,2 – 10 µM	0,01 µM	–	Metionina e cisteína	(SAEED; MIRZAEI; TORKZADEH-MAHANI, 2016)

TBC/ECV	VC	8,0	0,17 V vs. Ag/AgCl	10 – 3000 μM	1,0 μM	–	Glutaciona reduzida, cisteína, alanina, glicina, lisina, fenilalanina, prolina, triptofano e tirosina	(SALEHZADEH; NEMATOLLAHI; ALIZADEH, 2015)
MWCNT/EI	VC	7,3	~ 0,28 V vs. pseudo referência-Ag.	5 – 20 μM	0,9 μM	0,0132 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	–	(LEE; COMPTON, 2015)
BF/SWCNT/EPC	VOQ	7,0	0,645 V vs. Ag/AgCl	0,10 – 10 μM	0,05 μM	0,14 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	Mg ²⁺ , Al ³⁺ , NH ₄ ⁺ , Fe ²⁺ , Fe ³⁺ , F ⁻ e SO ₄ ²⁻ , lactose, sacarose, frutose, ácido benzóico, metanol, etanol e ureia, L-lisina, glicose, NADH, acetaminofeno, ácido úrico, ácido ascórbico, dopamina, epinefrina, norepinefrina, L-asparagina, L-serina, L-treonina, L-prolina, histidina, glicina, triptofano, fenilalanina, L-cisteína, N-acetilcisteína e glutaciona	(SOLTANI et al., 2014)
Catecol/MWCNT/ECV	VOQ	7,0	0,20 V vs. SCE	0 – 10 μM	0,66 μM	0,20 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	Glutaciona reduzida, cisteína e ácido ascórbico	(LEE; LOWINSOHN; COMPTON, 2014)
3,5-Di-terc-butilcatecol/MWCNT/ECV	VVL	7,5	0,06 V vs. Ag/AgCl	2,5 – 1000 μM	0,89 μM	–	Cisteína e glutaciona reduzida	(SALEHZADEH; MOKHTARI;

								NEMATOLLAHI, 2014)
ISP/PNTC	VVL	3,5	0,64 V vs. Ag/AgCl	5,0 – 800 μM	3,35 μM	–	Ni^{2+} , SO_4^{2-} , Ba^{2+} , Cl^- , Pb^{2+} , NO_3^{2-} , glucose, frutose, lactose, sacarose, ureia, ácido cítrico, Fe^{2+} , ácido ascórbico, ácido úrico e L-cisteína	(FOULADGAR; MOHAMMADZADE; NAYERI, 2014)
EG	VPD	7,4	~ 0,46 V vs. Ag/AgCl	2 – 20 μM	1,21 μM	–	L-Cisteína, L-metionina, glutathiona reduzida, ácido ascórbico e ácido úrico	(EKSIN; ERDEM, 2014)
N-NsG/NPs Pt	VPD	7,2	0,50 V vs. Ag/AgCl	10 – 70 μM	0,0002 μM	0,60 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	Glicose, ureia, ácido úrico, serotonina e oxalato	(KANNAN et al., 2013)
DP/PNTC	VOQ	5,0	0,53 V vs. Ag/AgCl	3,0 – 600 μM	2,08 μM	–	Ni^{2+} , SO_4^{2-} , Ba^{2+} , Cl^- , Pb^{2+} , NO_3^{2-} , Ca^{2+} , glucose, metionina, etanol, fenilalanina, frutose, lactose, sacarose, ureia, ácido cítrico, Fe^{2+} , ácido ascórbico, ácido úrico e L-cisteína	(MOHAMMADZADE H; FOULADGAR, 2013)
CPZ/PNTC	VOQ	4,0	0,72 V vs. Ag/AgCl	0,1 – 210 μM	0,08 μM	–	Glicose, frutose, lactose, sacarose, Li^+ , Cl^- , ácido fólico, histidina, alanina, fenilalanina, metionina, glicina, metanol, etanol, ureia, SCN^- , SO_4^{2-} e ácido ascórbico	(GHOLAMI-ORIMI et al., 2012)
FTO	VOQ	3,4	0,28 V vs. Ag/AgCl	100 – 1000 μM	50 μM	–	Ácido ascórbico e ácido úrico	(ROJAS et al., 2011)

ATD/ECV	Amp.	7,2	0,55 V vs. Ag/AgCl	0,1 – 1,4 μM	$5,1 \times 10^{-5}$ μM	0,24 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	Glicose, ureia, ácido ascórbico e oxalato	(KALIMUTHU; JOHN, 2010)
Au _{col} /Cist/EPC	Amp.	2,0	1,04 V vs. Ag/AgCl	0,1 – 5 μM	0,03 μM	–	–	(AGÜÍ et al., 2007)
VM/Pt	Amp.	3,0	–	0,0002 – 0,1 μM	0,0001 μM	–	–	(XU et al., 2005)
PNTC	Amp.	7,4	0,64 V vs. Ag/AgCl	5 – 200 μM	4,60 μM .	–	–	(LAWRENCE; DEO; WANG, 2004)
MWCNT/Nafion/ ECV	Amp.	7,0	~ 0,07 V vs. Ag/AgCl	0,10 – 60 μM	0,06 μM	–	Cu ²⁺ e cisteína	(GONG et al., 2004)
m-GEC/MIP	VPD	7,4	0,35 V vs. Ag/AgCl	0,1–1,0 μM 2,0–70,0 μM	0,030 μM 0,186 μM	0,044 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$	Cisteína, N- acetilcisteína, glutatona reduzida, ácido úrico, cistina, glutatona reduzida	Este trabalho.

Au: ouro; Au_{col}: ouro coloidal; ATD: 2-amino-1,3,4-tiadiazol; BF: benzoilferroceno; Cist: cisteamina; CPZ: clorpromazina; ISP: isoprenalina; DA: dopamina; NPs Au: nanopartículas de ouro; TBC: 4-terc-butyl catecol; TiO₂: dióxido de titânio; VM: poli-(violeta de vetila).

DAAO: D-aminoácido oxidase; DP: dopamina; EG: Esponja de Grafeno; G: grafeno; MIP: polímeros com impressão molecular; MWCNT: nanotubos de carbono de paredes múltiplas; NTs: nanotubos; OG: óxido de grafeno; OGR: óxido de grafeno reduzido; SWCNT: nanotubos de carbono de paredes simples. ECV: eletrodo de carbono vítreo; EG: eletrodo de grafite; EPC: eletrodo de pasta de carbono; EI: eletrodo impresso; FTO: eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor; m-GEC: eletrodo magnético epóxi-grafite; NPs Pt: nanopartículas de platina; N-NsG: nanofolhas de grafeno dopadas com nitrogênio; PNTC: pasta de nanotubos de carbono; Pt: platina.

SCE: eletrodo saturado de calomelano.

Amp.: amperometria; VC: voltametria cíclica; VPD: voltametria de pulso diferencial; VOQ: voltametria de onda quadrada; VVL: voltametria de varredura linear.

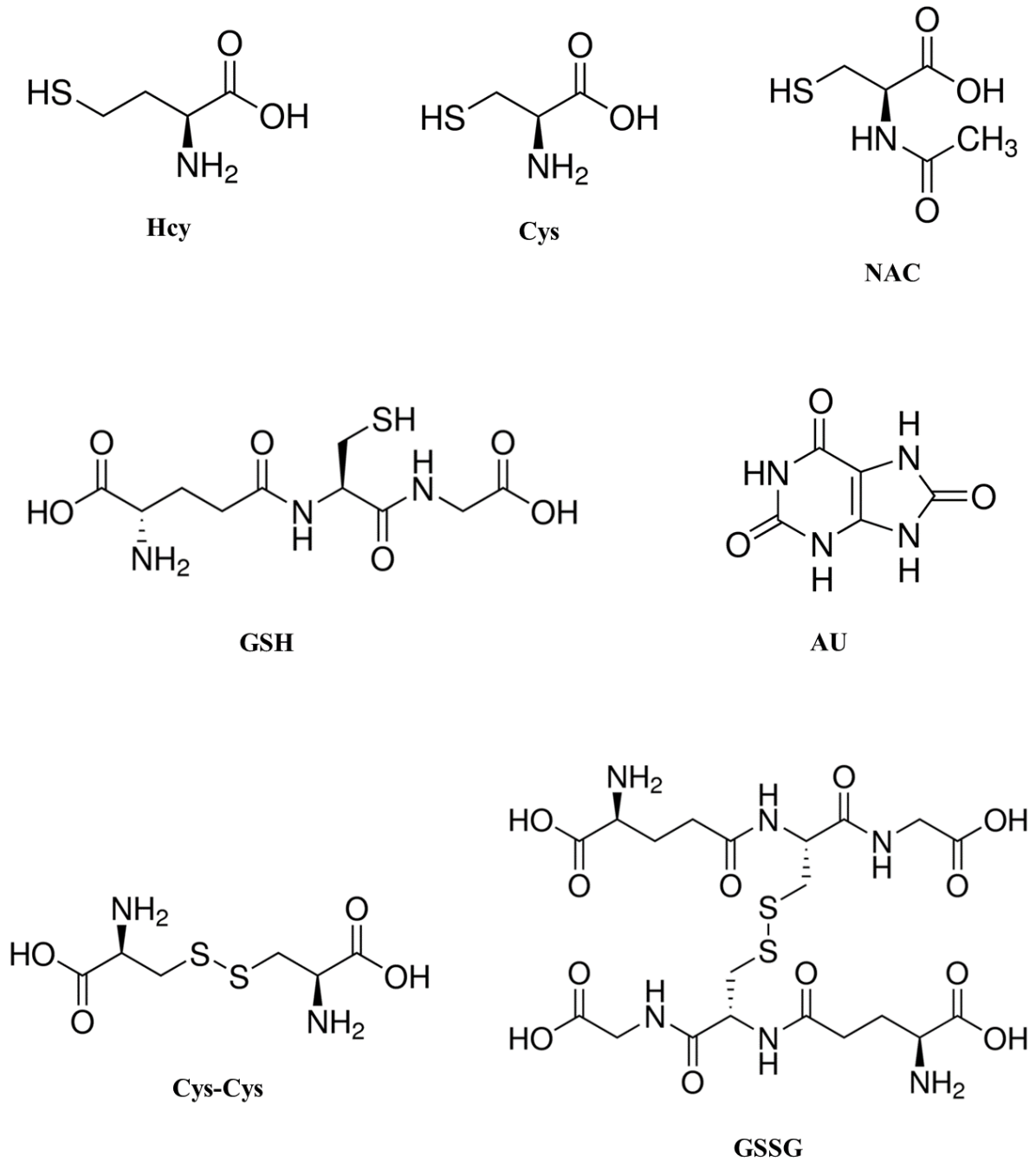
5.6.6 Estudo de interferentes

Para avaliar o grau de seletividade do sensor m-GEC/MIP para a Hcy utilizou-se o m-GEC/NIP como controle, avaliando diversos analitos que comumente estão presentes em amostras biológicas e que podem interferir na resposta do eletrodo construído. A seletividade do m-GEC/MIP foram examinadas na presença Cys, NAC, GSH, AU, Cys-Cys e GSSG em concentrações $100 \mu\text{mol L}^{-1}$, duas vezes maior que a concentração de Hcy ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$). As estruturas de Lewis desses possíveis interferentes e da Hcy estão apresentadas na Figura 31.

É sabido que, a seletividade dos polímeros com impressão molecular está relacionada com suas cavidades impressas complementar à molécula alvo. Este reconhecimento específico se deve principalmente à forma e tamanho dessas cavidades impressas, bem como a interação do polímero com os grupos funcionais da molécula utilizada como molde. Portanto, compostos análogos ao analito de interesse podem interferir na análise final.

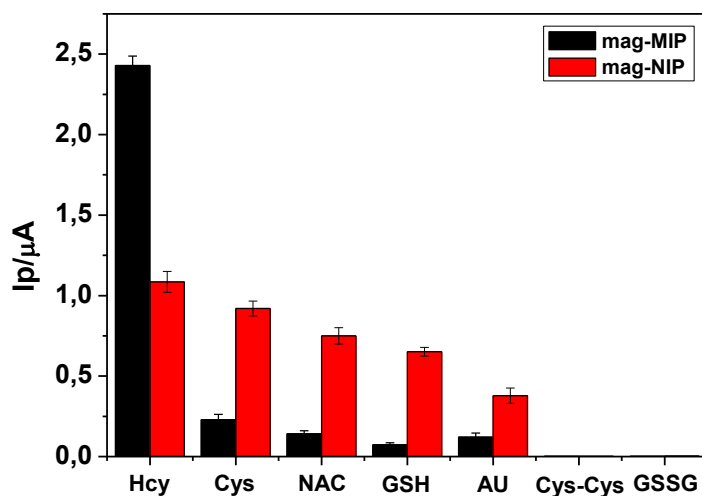
Assim, considerando-se esses aspectos para o m-GEC/MIP, pode-se observar na Figura 32 que os compostos com forma e tamanho mais parecidos com a Hcy – Cys, NAC e AU – apresentam maior interferência, isso porque eles conseguem penetrar nas cavidades impressas comparados ao demais. Apesar de a Cys e o NAC conterem grupos funcionais importante para o reconhecimento molecular como o grupo tiol e o carboxílico, sua estrutura molecular, considerando a cadeia carbônica mais longa, tem um grupo metileno a menos, interferindo na interação deles com o polímero. Assim, essas moléculas pequenas com forças de interações mais fracas comparados à Hcy não conseguem permanecer de maneira estável nos sítios de interação, voltando para o seio da solução. Isso pode ser confirmado com a menor resposta para esses analitos em relação à Hcy. Ademais, parece razoável dizer que a pequena interferência de GSH e quase inexistência de resposta para os dímeros Cys-Cys e GSSG estão associados com o impedimento estérico dessas moléculas volumosas, fator que impede a interação efetiva nas cavidades impressas. Para mais, o m-GEC/NIP tem maior interferência para as moléculas pequenas pois seus polímeros têm cavidades irregulares que não é seletivo para a Hcy. Enquanto para Cys-Cys e GSSG a resposta quase nula para o m-GEC/NIP possivelmente está relacionado com o tamanho das moléculas, como explicitado anteriormente.

Figura 31 – Representação estrutural das moléculas de Hcy, Cys, NAC, GSH, AU, Cys-Cys e GSSG.



Fonte: Estruturas baseadas no site da empresa Sigma-Aldrich.

Figura 32 – Intensidades de corrente obtidas para avaliação da seletividade dos sensores m-GCE/MIP e m-GCE/NIP para a Hcy em relação aos possíveis interferentes.



Fonte: Autora, 2021.

5.6.7 Aplicações em amostras sintéticas

Com o intuito de avaliar o desempenho do método analítico proposto para a determinação de Hcy em matrizes complexas, utilizou-se o procedimento de ensaio de recuperação para amostras sintéticas de plasma sanguíneo e urina. Essas amostras foram “fortificadas” com concentrações de 1,0 e 10,0 de Hcy, realizadas em triplicatas, apresentadas na Tabela 5. Os trabalhos de Liu et al., 2006, e Laube, Mohr e Hesse, 2001, foram utilizados como referência para a preparação do plasma e urina sintética, respectivamente.

Tabela 5 - Determinação de HCy em amostras artificiais de plasma e urina (n = 3).

Amostras	[Hcy]		
	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado %
Plasma	1,00	1,05 ($\pm 0,06$)	105,2
	10,00	10,07 ($\pm 0,12$)	100,7
Urina	1,00	0,98 ($\pm 0,04$)	98,4
	10,00	10,25 ($\pm 0,22$)	102,5

Fonte: Autora, 2021.

Os valores encontrados de Hcy foi calculado a partir do método adições de padrão e os valores de recuperação percentual foram determinados pela razão de valor encontrado pelo valor real, multiplicado por 100. Os dados de recuperação refletem à exatidão do método, pois ele relaciona a quantidade recuperada com a quantidade do analito da amostra. Portanto, observando a tabela acima, com recuperações médias de Hcy de 100,7 e 105,2 % para o plasma sintético e 98,4 e 102,5 % para urina sintética, pode-se inferir que o método proposto possui boa exatidão para as amostras avaliadas. Isso, por sua vez, indica que o sensor para m-GEC/MIP pode ser aplicado efetivamente para a determinação de Hcy em matrizes biológicas complexas com boa seletividade e estabilidade.

6 CONCLUSÕES

O presente trabalho apresentou uma proposta de otimização bem-sucedida da síntese dos MIPs via modelagem computacional para a Hcy, bem como a otimização dos parâmetros eletroquímicos para obtenção de melhor resposta analítica para esse aminoácido. Além disso, os MIPs juntamente com as nanopartículas magnéticas preparadas possibilitaram a separação rápida e fácil da molécula alvo de matrizes complexas. Os estudos de interferentes mostraram que as cavidades impressas desses polímeros são seletivas para a Hcy e, que, em amostras sintéticas de plasma sanguíneo e urina, o sensor desenvolvido demonstrou boa exatidão para o referido analito.

Portanto, os resultados experimentais juntamente com os aspectos teóricos apresentadas neste trabalho fornece uma metodologia promissora para a reconhecimento seletivo de Hcy. Pois é sabido que a detecção e a quantificação da Hcy pela aplicação de métodos e técnicas confiáveis e simples contribuem significativamente para a diagnóstico precoce de aspectos importantes para a saúde humana.

7 PERSPECTIVAS

Considerando a plataforma desenvolvida neste trabalho visando a construção de um sensor eletroquímico, pretende-se dar continuidade à pesquisa do seguinte modo:

- Realizar a caracterização de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X para nanopartículas magnéticas obtidas;
- Desenvolvimento de outros eletrodos para a determinação de Hcy;
- Determinar a Hcy em amostras reais (sangue e urina) via sensor m-GEC/MIP.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, S. M. et al. O eletrólito suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Química nova**, v. 27, p. 813-817, 2004.
- AGÜÍ, L. et al. Electrochemical determination of homocysteine at a gold nanoparticle-modified electrode. **Talanta**, v. 74, n. 3, p. 412-420, 2007.
- AGUILAR, B.; ROJAS, J. C.; COLLADOS, M. T. Metabolism of homocysteine and its relationship with cardiovascular disease. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 18, n. 2, p. 75-87, 2004.
- ALI, G. K.; OMER, K. M. Molecular imprinted polymer combined with aptamer (MIP-aptamer) as a hybrid dual recognition element for Bio (chemical) sensing applications. Review. **Talanta**, p. 122878, 2021.
- AMALI, R. K. A. et al. Significance of nanomaterials in electrochemical sensors for nitrate detection: A review. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, p. e00135, 2021.
- ANDREOTTI, F. et al. Homocysteine and risk of cardiovascular disease. 2. ed. **Journal of thrombosis and thrombolysis**, v. 9, n. 1, p. 13-21, 2000.
- ANSARI, S.; KARIMI, M. Novel developments and trends of analytical methods for drug analysis in biological and environmental samples by molecularly imprinted polymers. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 89, p. 146-162, 2017.
- BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. New York: John wiley & sons, inc., 2001.
- BEITOLLAHI, H. et al. A label-free aptasensor for highly sensitive detection of homocysteine based on gold nanoparticles. **Bioelectrochemistry**, v. 134, p. 107497, 2020.
- BELBRUNO, J. J. Molecularly imprinted polymers. **Chemical reviews**, v. 119, n. 1, p. 94-119, 2018.
- BELESSIOTIS, V.; KALOGIROU, S.; DELYANNIS, E. **Thermal solar desalination: Methods and systems**. Elsevier, 2016.

BENZ, M. Superparamagnetism: theory and applications. **Superparamagnetism Theory Appl**, p. 1-27, 2012.

BERGAMIN, B. et al. A new electrochemical platform based on a polyurethane composite electrode modified with magnetic nanoparticles coated with molecularly imprinted polymer for the determination of estradiol valerate in different matrices. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 2344-2354, 2019.

BOLANDER-GOUAILLE, C.; BOTTIGLIERI, T. Homocysteine, related vitamins and neuropsychiatric disorders. 2. ed. France: Springer-Verlag, 2007.

BREMNER, J. D.; GOLDBERG, J.; VACCARINO, V. Plasma homocysteine concentrations and depression: A twin study. **Journal of Affective Disorders Reports**, v. 4, p. 100087, 2021.

BUSCHOW, K. H, J. Concise encyclopedia of magnetic and superconducting materials. Elsevier, 2005.

CALLISTER JR, W. D.; RETHWISCH, D. G. Ciência e Engenharia de Materiais: Uma introdução, 9. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2018.

CHEN, K. et al. Electrochemical sensors fabricated by electrospinning technology: An overview. **sensors**, v. 19, n. 17, p. 3676, 2019.

CHENG, X. et al. Enabling contactless rapid on-demand debonding and rebonding using hysteresis heating of ferrimagnetic nanoparticles. **Materials & Design**, v. 210, p. 110076, 2021.

CIUCU, A. A. Chemically modified electrodes in biosensing. **Journal of Biosensors & Bioelectronics**, v. 5, n. 3, p. 1, 2014.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses. John Wiley & Sons, 2003.

EKSIN, E.; ERDEM, A. Electrochemical determination of homocysteine at disposable graphite electrodes. **Electroanalysis**, v. 26, n. 9, p. 1945-1951, 2014.

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, n. 10, p. 981-988, 2014.

GANGULY, P.; ALAM, S. F. Role of homocysteine in the development of cardiovascular disease. **Nutrition journal**, v. 14, n. 1, p. 1-10, 2015.

GHOLAMI-ORIMI, F. et al. Voltammetric determination of homocysteine using multiwall carbon nanotube paste electrode in the presence of chlorpromazine as a mediator. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2012, 2012.

GONG, K. et al. Novel electrochemical method for sensitive determination of homocysteine with carbon nanotube-based electrodes. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, n. 2, p. 253-259, 2004.

GOULART, M. O. F. et al. Bioeletroquímica - Faces e interfaces de uma ciência interdisciplinar. *Revista Ciência Hoje*, edição 364, 2020.

HANKEY, G. J.; EIKELBOOM, J. W. Homocysteine and vascular disease. **The lancet**, v. 354, n. 9176, p. 407-413, 1999.

HEMMATI, K.; SAHRAEI, R.; GHAEMY, M. Synthesis and characterization of a novel magnetic molecularly imprinted polymer with incorporated graphene oxide for drug delivery. **Polymer**, v. 101, p. 257-268, 2016.

HOSSEINZADEH, L. et al. Determination of homocysteine using a dopamine-functionalized graphene composite. **Microchemical Journal**, v. 165, p. 106124, 2021.

HUNG, T. T. Y.; LIN, J. L. A study on homocysteine biosensors completely constructed on anodized titania nanotubes. **IEEE sensors letters**, v. 1, n. 3, p. 1-3, 2017.

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.

IDA, N. *Sensors, actuators, and their interfaces: A multidisciplinary introduction*. 2. ed. IET, 2014.

IFTIKHAR, T. et al. Topical advances in nanomaterials based electrochemical sensors for resorcinol detection. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, p. e00138, 2021.

KALIMUTHU, P.; JOHN, S. A. Selective determination of homocysteine at physiological pH using nanostructured film of aminothiadiazole modified electrode. **Bioelectrochemistry**, v. 79, n. 2, p. 168-172, 2010.

KANNAN, P. et al. Nitrogen doped graphene nanosheet supported platinum nanoparticles as high performance electrochemical homocysteine biosensors. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 36, p. 4655-4666, 2013.

KHAN, S. et al. Electrochemical sensors based on biomimetic magnetic molecularly imprinted polymer for selective quantification of methyl green in environmental samples. **Materials Science and Engineering: C**, v. 103, p. 109825, 2019.

KRISHNAN, K. M. **Fundamentals and applications of magnetic materials**. United Kingdom: Oxford University Press, 2016.

KUHN, J. et al. Selective binding of antibiotics using magnetic molecular imprint polymer (MMIP) networks prepared from vinyl-functionalized magnetic nanoparticles. **Journal of hazardous materials**, v. 387, p. 121709, 2020.

KONG, X. et al. Synthesis and characterization of the core-shell magnetic molecularly imprinted polymers (Fe_3O_4 @MIPs) adsorbents for effective extraction and determination of sulfonamides in the poultry feed. *Journal of chromatography. A*, v. 1245, p. 8–16, 2012.

KUTNER, W.; SHARMA, P. S. **Molecularly imprinted polymers for analytical chemistry applications**. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2018.

LAMAQUI, A. et al. Fast microwave-assisted synthesis of magnetic molecularly imprinted polymer for sulfamethoxazole. **Talanta**, v. 232, p. 122430, 2021.

LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, n. 1-2, p. 367-374, 2001.

LAWRENCE, N. S.; DEO, R. P.; WANG, J. Detection of homocysteine at carbon nanotube paste electrodes. **Talanta**, v. 63, n. 2, p. 443-449, 2004.

LEE, P. T.; COMPTON, R. G. Selective electrochemical detection of thiol biomarkers in saliva using multiwalled carbon nanotube screen-printed electrodes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 209, p. 983-988, 2015.

LEE, P. T.; LOWINSOHN, D.; COMPTON, R. G. The selective electrochemical detection of homocysteine in the presence of glutathione, cysteine, and ascorbic acid using carbon electrodes. **Analyst**, v. 139, n. 15, p. 3755-3762, 2014.

LIU, L. et al. Corrosion behavior of Zr-based bulk metallic glasses in different artificial body fluids. **Journal of alloys and compounds**, v. 425, n. 1-2, p. 268-273, 2006.

MA, J. et al. A novel enrichment and sensitive method for simultaneous determination of 15 phthalate esters in milk powder samples. **LWT**, p. 112426, 2021.

MARTIN-ESTEBAN, A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. **Fresenius' journal of analytical chemistry**, v. 370, n. 7, p. 795-802, 2001.

MOHAMMADZADEH, S.; FOULADGAR, M. Electrocatalytic oxidation and determination of homocysteine at carbon nanotubes modified paste electrode using dopamine as a mediator. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 78, n. 10, p. 1595-1607, 2013.

MORRIN, A. Sensors | Chemically modified electrodes. *Encyclopedia of Analytical Science*, v. 9, p. 161–171, 2018. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14546-9>.

NEKRASSOVA, O.; LAWRENCE, N. S.; COMPTON, R. G. Analytical determination of homocysteine: a review. *Talanta*, v. 60, p. 1085-1095, 2003.

NAWAZ, N. et al. Molecularly imprinted polymers-based DNA biosensors. **Analytical biochemistry**, p. 114328, 2021.

PANKHURST, Q. A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of physics D: Applied physics**, v. 36, n. 13, p. R167, 2003.

PIOVESANA, S. et al. Magnetic molecularly imprinted multishell particles for zearalenone recognition. **Polymer**, v. 188, p. 122102, 2020.

PIVIDORI, M. I.; ALEGRET, S. Graphite-epoxy platforms for electrochemical genosensing. **Analytical letters**, v. 36, n. 9, p. 1669-1695, 2003.

PONTI, G.; RUINI, C.; TOMASI, A. Homocysteine as a potential predictor of cardiovascular risk in patients with COVID-19. **Medical Hypotheses**, v. 143, 2020.

RABÓCZKAY, T. Iniciação à eletroquímica. 1. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2020.

RAJARAM, R.; MATHIYARASU, J. An electrochemical sensor for homocysteine detection using gold nanoparticle incorporated reduced graphene oxide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 170, p. 109-114, 2018.

RIVANI, D. A. et al. Influence of TiO₂ addition on the magnetic properties of carbon-based iron oxide nanocomposites synthesized using submerged arc-discharge. In: **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**. IOP Publishing, p. 012034, 2019.

ROJAS, L. et al. Electrochemistry behavior of endogenous thiols on fluorine doped tin oxide electrodes. **Electrochimica acta**, v. 56, n. 24, p. 8711-8717, 2011.

RUIZ-CÓRDOVA, G. A. et al. Electrochemical sensing using magnetic molecularly imprinted polymer particles previously captured by a magneto-sensor. **Talanta**, v. 181, p. 19-23, 2018.

ROSCA, I. D. et al. Oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. **Carbon**, v. 43, n. 15, p. 3124–3131, 2005.

SAEED, J.; MIRZAEI, M.; TORKZADEH-MAHANI, Masoud. A selective and regenerable voltammetric aptasensor for determination of homocysteine. **Microchimica Acta**, v. 183, n. 7, p. 2205-2210, 2016.

SALEHZADEH, H.; MOKHTARI, B.; NEMATOLLAHI, D. Selective electrochemical determination of homocysteine in the presence of cysteine and glutathione. **Electrochimica Acta**, v. 123, p. 353-361, 2014.

SALEHZADEH, H.; NEMATOLLAHI, D.; ALIZADEH, S. Electrografting of 4-tert-Butylcatechol on GC Electrode. Selective Electrochemical Determination of Homocysteine. **Electroanalysis**, v. 27, n. 12, p. 2738-2744, 2015.

SANKHI, B. R.; TURGUT, E. A low-cost vibrating sample magnetometry based on audio components. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 502, p. 166560, 2020.

SANTOS, A. C. F. et al. Development of magnetic nanoparticles modified with new molecularly imprinted polymer (MIPs) for selective analysis of glutathione. **Sensors and Actuators B: Chemical**, p. 130171, 2021.

SARVESTANI, M. R. J.; MADRAKIAN, T.; AFKHAMI, A. Developed Electrochemical Sensors for the Determination of Beta-Blockers: A Comprehensive Review. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, p. 115666, 2021.

ŞAYLAN, M. et al. An accurate and sensitive analytical method for the simultaneous determination of glycine, methionine and homocysteine in biological matrices by matrix matching strategy and LC–quadrupole-time-of-flight-MS/MS. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 239, 2020

SILVA, L. V. et al. Desenvolvimento de sensores eletroquímicos baseados em nanotubos de carbono e polímeros de ácido ferúlico e capsaicina para detecção e quantificação de 3-nitro-L-tirosina, epinefrina e dopamina. 2017.

SMITH, A. D.; REFSUM, H. Homocysteine—from disease biomarker to disease prevention. **J. Intern. Med**, 2021.

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.

SOLTANI, H. et al. Nanostructured base electrochemical sensor for voltammetric determination of homocysteine using a modified single-walled carbon nanotubes paste electrode. **Ionics**, v. 20, n. 10, p. 1481-1488, 2014.

SOMEPOMED – Sociedade Mexicana de Podología Médica AC, 2011. Disponível em: <<https://somepomed.org/articulos/contents/mobipreview.htm?19/52/20294>>.

SPALDIN, N. A. **Magnetic materials: fundamentals and applications**. Cambridge university press, 2010.

STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. 2003.

TICIANELLI, E. A. GONZALEZ, E. R. Eletroquímica: Princípios e Aplicações. 2. ed. São Paulo: Edusp, 2013.

WANG, S. et al. Assembly of a Nanogold-Assisted Aptamer Sensor for Highly Sensitive Detection of Homocysteine. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 16, n. 211129, p. 2, 2021.

WANG, W. et al. Detection of homocysteine and cysteine. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, n. 45, p. 15949-15958, 2005.

WEN, X. et al. Facile preparation of an electrochemical aptasensor based on Au NPs/graphene sponge for detection of homocysteine. **Applied Surface Science**, v. 556, p. 149735, 2021.

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.

XU, H. et al. Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine and methionine in hypothyroid patients' plasma by liquid chromatography using platinum/poly (methyl violet) modified electrode. **Analytica chimica acta**, v. 545, n. 2, p. 182-188, 2005.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; CAMPUZANO, S.; PINGARRÓN, J. M. Electrochemical sensors based on magnetic molecularly imprinted polymers: A review. **Analytica chimica acta**, v. 960, p. 1-17, 2017.

YANG, Q.; HE, G. Imbalance of Homocysteine and H₂S: Significance, Mechanisms, and Therapeutic Promise in Vascular Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.

ZHANG, S.; ZHAO, D. Advances in magnetic materials: processing, properties, and performance. New York: CRC press, 2017.

ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. (Ed.). **Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications**. Academic Press, 2008.

ZHANG, Z. et al. A novel electrochemical sensor based on process-formed laccase-like catalyst to degrade polyhydroquinone for tumor marker. **Talanta**, v. 235, p. 122736, 2021.

ZHANG, Z. et al. A sensitive and selective molecularly imprinted sensor combined with magnetic molecularly imprinted solid phase extraction for determination of dibutyl phthalate. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 49, p. 367-373, 2013.

ZHAO, J. et al. Development of Electrochemical Sensor for Homocysteine Determination as a Cerebrovascular Disease Biomarker. **Int. J. Electrochem. Sci**, v. 12, p. 8642-8650, 2017.

ZOSKI, C. G. **Handbook of electrochemistry**. 1. ed. Elsevier, 2007.