

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**DESENVOLVIMENTO DE UM ELETRODO  
AMPEROMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DE  
GLUTATIONA EM ERITRÓCITOS**

**Tese de Doutorado apresentada à Comissão de Pós-graduação  
do Instituto de Química como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Doutor em Ciências.**

***Aluno: Percy Calvo Marzal***

***Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota***

***Co-orientadora: Prof. Dra. Nelci Fenalti Höehr***

**Campinas – SP**

**Agosto / 2005**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA  
UNICAMP**

M369d Marzal, Percy Calvo.  
Desenvolvimento de um eletrodo amperométrico para a determinação de glutathione em eritrócitos / Percy Calvo Marzal. -- Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.

Tese - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Tetrathiafulvaleno – Tetracianoquinodimetano.  
2. Eritrócitos. 3. Eletrodo de pasta de carbono.  
4. Glutathione. I. Kubota, Lauro Tatsuo. II. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Development of an Amperometric Electrode for Determination of Glutathione in Erythrocytes

**Palavras-chave em inglês:** Tetrathiafulvalene-Tetracyanoquinodimethane, Erythrocytes, Carbon paste electrode, Glutathione

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Doutor em Química Analítica

**Banca examinadora:** Lauro Tatsuo Kubota (Orientador), Lúcia Helena Mascaro Sales, Marília Oliveira Fonseca Goulart, Pedro Luiz Onófrío Volpe, Nelson Eduardo Duran Caballero

**Data de defesa:** 08/08/2005

O segredo de progredir é começar. O segredo de começar é dividir as tarefas árduas e complicadas em tarefas pequenas e fáceis de executar, e depois começar pela primeira.

*A minha esposa Karin, companheira  
carinhosa e paciente, que soube compreender-me  
em vários momentos, com amor.....*

*A minha mãe Maria V. Marzal e meus irmãos  
Célia e Jhonny, pela ajuda, esforço, paciência e  
dedicação neste período, mesmo separados pela distância.....*

*...dedico esta Tese  
Obrigado pelo amor de vocês.*

## ***AGRADECIMENTOS***

Ao Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota, pela confiança, dedicação, orientação competente e constante incentivo desde os tempos de mestrado e por todo apoio com que acompanhou o desenvolvimento desta tese de doutorado.

À Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr, pela co-orientação no desenvolvimento desta tese.

Ao Paulo e os companheiros do Laboratório LABEX do Instituto de Biologia, pelas amostras de sangue fornecidas e discussões.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido, sem o qual este trabalho não poderia ser concluído.

Aos funcionários do Instituto de Química - UNICAMP em especial a CPG pela eficiência em suas funções e apoio constante desde minha chegada ao Brasil, a todos da Biblioteca do IQ por estarem sempre disponíveis e ao Sr. Mario da mecânica fina pela confecção das celas e eletrodos.

A todos os colegas do Laboratório “LEEDS”, especialmente a Antonio e Arnaldo pela amizade e discussões do trabalho desde o mestrado.

A todos os amigos que encontrei durante estes anos: Maria C., Pascual, Maria A., Ruben, José, Pilar, Gliseida, Rodolfo pela amizade, motivação e convívio amistoso.

A meus tios, Adriana, Alejandrina, Elena, Fermina, Felicita e Luis, e a todos meus primos.

## CURRICULUM VITAE

**PERCY CALVO MARZAL**

### ***I. FORMAÇÃO***

#### **Bacharelado em Química**

Faculdade de Química, Universidad Nacional Mayor de San Marcos - UNMSM,  
Lima - Perú, 1995.

#### **Mestrado em Química**

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP,  
Campinas - Brasil, 2000.

### ***II. PUBLICAÇÕES***

Calvo-Marzal, P., Chumbimuni-Torres, K. Y., Fenalti Höehr, N., Kubota, L. T. Determination of glutathione in erythrocyte hemolysate using amperometric sensor based on TTF-TCNQ. *Clin. Chim. Acta*, submetido (2005).

Chumbimuni-Torres, K. Y., Calvo-Marzal, P., Kubota, L. T. Avanços e novas perspectivas dos eletrodos íon-seletivos. *Quím. Nova*, submetido (2005).

Calvo-Marzal, P., Chumbimuni-Torres, K. Y., Fenalti Höehr, N., Oliveira Neto, G., Kubota, L. T. Determination of reduced glutathione using an amperometric carbon paste electrode chemically modified with TTF-TCNQ. *Sens. Actuators B 100* (2004) 333-340.

Calvo-Marzal, P., Rath, S., Trivelin, L. A., Imbrunito, T. R., Tomazela, D. M., Jesús, M. N. Antimoniais empregados no tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. *Quím. Nova* 26 (4) (2003) 550-555.

Calvo-Marzal, P., Kubota, L. T., Aoyama, H., Rosatto, S. S., Granjeiro, P. A. Electroanalytical determination of acid phosphatase activity by monitoring p-nitrophenol. *Anal. Chim. Acta* 444 (2001) 207-214.

### **III. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS**

Calvo-Marzal, P., Ichihara, D. Kubota, L. T. Desenvolvimento de um Sensor Amperométrico para Determinação de Cisteína. 28° REUNIÃO ANNUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA - SBQ. Poços de Caldas, Minas Gerais, 2005.

Calvo-Marzal, P., Höehr Fenalti, N., Oliveira Neto, G., Kubota, L. T. Determinação Amperométrica de Glutathione em Sangue usando Eletrodo de Pasta de Carbono Quimicamente Modificado com TTF-TCNQ. XIV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA, Teresópolis, Rio de Janeiro, 2004.

Chumbimuni-Torres, K. Y., Calvo-Marzal, P., Kubota, L. T. Determinação Simultânea de Cálcio, Potássio e Cloreto em amostras de sucos usando eletrodo tubular íon-seletivo acoplado a sistema de injeção em fluxo. XIV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA, Teresópolis, Rio de Janeiro, 2004

Calvo-Marzal, P., Höehr Fenalti, N., Kubota, L. T. Desenvolvimento de um Sensor Amperométrico para a Determinação de Glutathione usando o Complexo TTF-TCNQ. 12° ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA - ENQA. Maranhão, São Luis, 2003.

Calvo-Marzal, P., Kubota, L. T., Aoyama, H. Determinação da Atividade da Fosfatase Ácida Mediante o Monitoramento de pNF com Eletrodo Modificado. In: XII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ELETROQUÍMICA E ELETROANALÍTICA. Gramado, Rios Grande do Sul, 2001.

Calvo-Marzal, P., Kubota, L. T. Aoyama, H. Estudo Cinético da Redução Eletroquímica de p-nitrofenol sobre a Superfície do Eletrodo de Carbono Vítreo Recoberto com Membrana de Nafion. 23 REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA - SBQ. Poços de Caldas, Minas Gerais, 2000.

Calvo-Marzal, P., Kubota, L. T. Aoyama, H. Determinação Seletiva de p-nitrofenol com Eletrodo de Carbono Vítreo Recoberto com Membrana de Nafion. 10 ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA - ENQA. Santa Maria, Rio Grande do Sul, 1999.

## RESUMO

**Título: Desenvolvimento de um Eletrodo Amperométrico para a Determinação de Glutaciona em Eritrócitos.**

Autor: Percy Calvo Marzal

Orientador: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Co-orientadora: Prof. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Palavras Chave: Tetratiofulvaleno-tetracianoquinodimetano, eritrócitos, eletrodo de pasta de carbono, determinação de glutaciona.

O presente trabalho refere-se ao desenvolvimento de um novo método para determinação de glutaciona em eritrócitos, utilizando o método amperométrico. Para isto um eletrodo a base de pasta de carbono modificado com o complexo tetratiofulvaleno-tetracianoquinodimetano (TTF-TCNQ) foi desenvolvido, com o intuito de possibilitar a transferência de elétrons entre a glutaciona e o eletrodo a baixos potenciais. O eletrodo modificado apresentou boas características em termos de seletividade, sensibilidade e tempo de resposta, facilitando sua operacionalidade para a detecção de glutaciona. Com a modificação do eletrodo foi possível obter uma resposta bastante sensível para glutaciona num potencial de 200 mV *vs* ECS. As melhores condições foram verificadas com 20% (m/m) de TTF-TCNQ incorporado na pasta de carbono e 0,5% de Nafion (m/v). As medidas foram realizadas em tampão fosfato pH 8,0 contendo KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup> e EDTA 0,5 mmol L<sup>-1</sup>. Nessas condições, o eletrodo modificado apresentou um intervalo de resposta linear entre 5 a 340 μmol L<sup>-1</sup> de glutaciona ajustado pela equação

$\Delta j = 0,7(\pm 0,1) + 90,1(\pm 0,4)[\text{GSH}]$  com um coeficiente de correlação de 0.9998 para  $n = 20$ , onde a densidade de corrente  $\Delta j$  é dada em  $\mu\text{A cm}^{-2}$  e a concentração da GSH em  $\text{mmol L}^{-1}$ . O tempo de resposta do eletrodo foi de 0,5 s. A aplicação do eletrodo permitiu a determinação direta de glutathione em eritrócitos após lisados sem uso de reagentes adicionais. O eletrodo desenvolvido apresentou um bom limite de detecção, alta seletividade e rapidez. Quando comparado com o método espectrofotométrico este apresentou boa correlação. Os testes de recuperação mostraram que o método amperométrico teve melhor desempenho (98 - 102%) que o método espectrofotométrico (90 - 92%).

## ABSTRACT

**Title: Development of an Amperometric Electrode for Determination of Glutathione in Erythrocytes.**

Author: Percy Calvo Marzal

Supervisor: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Co-supervisor: Prof. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Key words: Tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane, erythrocytes, modified carbon paste electrode, glutathione.

This work describes the development of a new amperometric method for glutathione determination in erythrocytes. For this task, a carbon paste electrode modified with tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane (TTF-TCNQ) complex was developed. The modified electrode improved the transference of electrons between the glutathione and electrode being very sensitive for glutathione at an applied potential of 200 mV *vs* SCE. The modified electrode presented good characteristics in terms of selectivity, sensitivity and fast response, for glutathione detection. The best performance was verified using 20% (m/m) of TTF-TCNQ incorporated in the carbon paste and 0.5% of Nafion (m/v). The measurements were performed in phosphate buffer at pH 8.0 containing 0.1 mol L<sup>-1</sup> KCl and 0.5 mmol L<sup>-1</sup> EDTA. In these conditions, the modified electrode presented a linear response range from 5 to 340 μmol L<sup>-1</sup> for glutathione adjusted by the equation  $\Delta j = 0.7(\pm 0.1) + 90.1(\pm 0.4)[\text{GSH}]$  with a correlation coefficient of 0.9998 for n=20, where the current density is given in μA cm<sup>-2</sup> and the

concentration of GSH in  $\text{mmol L}^{-1}$ . The response time of the electrode was 0.5 s. Applying this electrode was possible to determine glutathione in erythrocytes after lyses without additional reagents. And comparing the results obtained with the electrode and a spectrophotometric method a good correlation was observed. The recovery tests showed that the amperometric method was better (98 - 102%) than the spectrophotometric one (90 - 92%).

# ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	xix
LISTA DE TABELAS	xxi
LISTA DE FIGURAS	xxiii
I. INTRODUÇÃO	3
I.1. Glutationa	4
I.1.1. Definição e Estrutura da Glutationa	4
I.1.2. Esquema da Bioquímica da Glutationa	6
I.1.3. Concentração da Glutationa nas Células	7
I.1.4. Funções da Glutationa	8
I.1.5. Importância da Glutationa	11
I.2. Determinação de Glutationa	15
I.2.1. Métodos de Determinação de Glutationa	16
I.2.1.1. Método Espectrofotométrico	16
I.2.1.2. Método Fluorimétrico	17
I.2.1.3. Método de Bioluminescência	18
I.2.1.4. Eletroforese Capilar	18
I.2.1.5. Método HPLC	19
I.2.1.6. Método de Cromatografia Gasosa acoplado a espectrofotometria de massa	21
I.2.1.7. Métodos Eletroquímicos	21
I.2.2. Eletrodos Quimicamente Modificados	23
I.2.3. Tetratiofulvaleno-Tetracianoquinodimetano	28
II. OBJETIVO	35
III. PARTE EXPERIMENTAL	39
III.1. Reagentes e Materiais	39
III.2. Preparação do Complexo TTF-TCNQ	40
III.3. Preparação do Eletrodo de Pasta de Carbono Quimicamente Modificado com TTF-TCNQ	42
III.4. Instrumentação e Célula Eletroquímica	43
III.5. Tratamento da Amostra de Sangue	45
III.6. Avaliação e Otimização do EPC/TTF-TCNQ	47

III.6.1.	Avaliação da Estabilidade e o tempo de Vida do Eletrodo	49
III.7.	Aplicação do Eletrodo para determinação de GSH em eritrócitos	49
III.8.	Determinação espectrofotométrica da GSH em eritrócitos	50
III.9.	Estudos de Recuperação	52
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
IV.1.	Síntese do Complexo TTF-TCNQ	55
IV.2.	Propriedades Eletroquímicas do EPC/TTF-TCNQ	59
IV.3.	Otimização do EPC/TTF-TCNQ	63
IV.3.1.	Avaliação da Influência da Quantidade do Complexo TTF-TCNQ na Composição da Pasta	63
IV.3.2.	Estudo da incorporação e otimização da quantidade do Nafion no Eletrodo	64
IV.3.3.	Influência da velocidade de varredura no Comportamento Eletroquímico do EPC/TTF-TCNQ	66
IV.3.4.	Influência da Natureza e Concentração do Eletrólito de Suporte no Comportamento Eletroquímico do EPC/TTF-TCNQ	68
IV.3.5.	Influência do pH e natureza do Tampão no Comportamento Eletroquímico do EPC/TTF-TCNQ	73
IV.4.	Resposta Eletrocatalítica do EPC/TTF-TCNQ para GSH	76
IV.5.	Influência do Potencial Aplicado do EPC/TTF-TCNQ na Resposta para GSH	80
IV.6.	Efeito da Solução Tampão e pH na Resposta do EPC/TTF-TCNQ	81
IV.7.	Tempo de Resposta do Eletrodo	83
IV.8.	Curva Analítica para GSH	85
IV.9.	Estudo de Interferentes para GSH	88
IV.10.	Estabilidade e Tempo de Vida do EPC/TTF-TCNQ	89
IV.11.	Determinação Amperométrica da GSH em Eritrócitos	91
IV.12.	Estudos de Recuperação	98
V.	CONCLUSÕES	103
VI.	REFERÊNCIAS	107
VII.	PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	121

## LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	Catalase
CE	Eletroforese capilar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTNB	Ácido 5,5' ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
ERO	Espécies reativas de oxigênio
E	Potencial (mV)
$E_m$	Potencial médio (mV)
$E_{ap}$	Potencial aplicado
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
EQM	Eletrodo quimicamente modificado
FTIV	Espectroscopia de Infra vermelho com transformada de fourier
FMN	Flavina mononucleotídeo
GSH	Glutationa
GSSG	Glutationa oxidada
GR	Glutationa Redutase
GSH-Px	Glutationa Peroxidase
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de masa
HPCE	Eletroforese capilar de alta performance
HEPES	N-(2-hidroxietil) piperazina-N,N'-bis(2-ácido etanossulfônico)
HMTTeF	Hexametilenotetratelurofulvaleno
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
I	Corrente ( $\mu\text{A}$ )
$j$	Densidade de corrente ( $\mu\text{A cm}^{-2}$ )
NAC	N-acetil-cisteína
NMP <sup>+</sup>	Íon N-metil-fenazínio
NEP	N-etil-fenazínio
OPA	o-ftdialdeido
PIPES	Piperazina-N,N'-bis-(2-ácido etanossulfônico)
SOD	Superóxido dismutase
TRIS	Tris(hidroximetil) aminometano
TTF-TCNQ	Tetratiofulvaleno-tetracianoquinodimetano
$\Delta E_p$	Separação de pico
$\Delta j$	Densidade de corrente descontado o valor do branco

## LISTA DE TABELAS

Tabela I.1.	Concentração de GSH ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no sangue em diferentes quadros clínicos.	14
Tabela III.1.	Quantidades utilizadas na preparação das cubetas de medida espectrofotométrica para a determinação de glutatona	52
Tabela IV.1.	Valores das bandas de absorção dos espectros de IV dos compostos TTF, TCNQ em KBr.	56
Tabela IV.2.	Valores das bandas de absorção dos espectros de IV do complexo TTF-TCNQ em KBr.	57
Tabela IV.3.	Influência dos cátions sobre a separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e o potencial médio ( $E_m$ ). Concentração dos cátions $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0, obtido para EPC/TTF-TCNQ a velocidade de varredura de $20 \text{ mV s}^{-1}$ .	69
Tabela IV.4.	Influência dos ânions sobre a separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e o potencial médio ( $E_m$ ). Concentração dos ânions $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0, obtido para EPC/TTF-TCNQ a velocidade de varredura de $20 \text{ mV s}^{-1}$ .	70
Tabela IV.5.	Influência da concentração da solução do eletrólito de suporte no eletrodo. Experimento em solução de KCl, pH 7,0, e velocidade de varredura de $20 \text{ mV s}^{-1}$ .	72
Tabela IV.6.	Efeito da solução tampão (pH 7,0) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl sobre a resposta do sensor obtido num potencial de 200 mV vs. ECS e concentração de GSH de $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ . A concentração da solução tampão foi $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .	82
Tabela IV.7.	Parâmetros analíticos para diferentes eletrodos para determinação de GSH e o eletrodo desenvolvido (EPC/TTF-TCNQ).	87
Tabela IV.8.	Valores de recuperação obtidos com o sensor desenvolvido, para soluções de GSH contendo compostos interferentes na concentração de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,0. $E_{ap} = 200 \text{ mV vs. ECS}$ .	89
Tabela IV.9.	Valores de concentração obtidos pelo método proposto e de referência para análises de GSH em eritrócitos, com os respectivos desvios para 3 determinações.	96
Tabela IV.10.	Valores de recuperação em porcentagem para três amostras diferentes obtidas pelo método amperométrico.	99
Tabela IV.11.	Valores de recuperação em porcentagem para três amostras diferentes obtidas pelo método espectrofotométrico.	99

## LISTA DE FIGURAS

Figura I.1.	Estrutura da Glutationa.	5
Figura I.2.	Esquema da bioquímica da glutaciona.	6
Figura I.3.	Transporte do aminoácido pela glutaciona.	8
Figura I.4.	Vias de formação de ERO (azul) e mecanismo enzimático de defesa antioxidante (vermelho). $O_2^-$ (ânion-radical superóxido); $OH^\cdot$ (radical hidroxila); $H_2O_2$ (peróxido de hidrogênio); $NO^\cdot$ (óxido nítrico); $ONOO^-$ (ânion peroxinitrito).	11
Figura I.5.	Estruturas de algumas moléculas receptoras e doadoras de elétrons. Tetracianoquinodimetano (TCNQ), Tetracianoaftoquinodimetano (TNAP), Tetratiofulvaleno (TTF) e N-metil-fenazínio ( $NMP^+$ ).	27
Figura III.1.	(a) Tetratiofulvaleno (TTF), (b) Tetracianoquinodimetano (TCNQ) e (c) complexo TTF-TCNQ.	41
Figura III.2.	Eletrodo de pasta de carbono modificado com o complexo TTF-TCNQ.	43
Figura III.3.	Aparelhagem utilizada para as medidas eletroquímicas.	44
Figura III.4.	Célula de três eletrodos utilizada nas medidas eletroquímicas. ER = eletrodo de referência - ECS, ET = eletrodo de trabalho, EA = eletrodo auxiliar - espiral de Pt.	45
Figura III.5.	Resposta ( $\Delta j$ ) do sensor num cronoamperograma em função da concentração, $E_{ap} = 200$ mV vs. ECS.	48
Figura III.6.	Reação entre a Glutationa e o DTNB originando o TNB que é monitorado a 412 nm.	51
Figura IV.1.	Estrutura do complexo TTF-TCNQ.	55
Figura IV.2.	Espectros de absorção UV - visível dos compostos TTF, TCNQ e TTF-TCNQ dissolvidos em dimetilsulfóxido.	58
Figura IV.3.	Voltamogramas cíclicos do eletrodo de pasta de carbono não modificado ( <b>A</b> ) e modificado com o complexo TTF-TCNQ ( <b>B</b> ). Em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, pH 7,0, velocidade de varredura de $20 \text{ mV s}^{-1}$ .	61
Figura IV.4.	Resposta do eletrodo para diferentes porcentagens de TTF-TCNQ na pasta de carbono. Em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, pH 7,0 velocidade de varredura de $20 \text{ mV s}^{-1}$ .	63
Figura IV.5.	Resposta do eletrodo para diferentes concentrações de Nafion no eletrodo de pasta de carbono modificado com TTF-TCNQ. Em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, pH 7,0 velocidade de varredura de $20 \text{ mV s}^{-1}$ .	65

Figura IV.6.	(A) Voltamogramas cíclicos do EPC/TTF-TCNQ a diferentes velocidades de varredura. (B) Densidade de corrente de pico anódico vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura. Em 0,1 mol L <sup>-1</sup> KCl, pH 7,0.	67
Figura IV.7.	Voltamogramas cíclicos do EPC/TTF-TCNQ em diferentes concentrações de KCl. (A) 0,01, (B) 0,05, (C) 0,1 e (D) 0,5 mol L <sup>-1</sup> . Em pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s <sup>-1</sup> .	71
Figura IV.8.	Dependência do potencial médio (E <sub>m</sub> ) com o logaritmo da concentração do eletrólito de suporte (log[K <sup>+</sup> ]).	73
Figura IV.9.	(A) Efeito do pH da solução (KCl) sobre a resposta do eletrodo EPC/TTF-TCNQ. (B) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes pH. Velocidade de varredura de 20 mV s <sup>-1</sup> .	74
Figura IV.10.	Voltamogramas cíclicos do EPC/TTF-TCNQ obtidos em diferentes soluções tampão: (A) 0,1 mol L <sup>-1</sup> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , (B) 0,1 mol L <sup>-1</sup> HEPES, (C) 0,1 mol L <sup>-1</sup> PIPES, (D) 0,1 mol L <sup>-1</sup> TRIS. Velocidade de varredura 20 mV s <sup>-1</sup> .	75
Figura IV.11.	Voltamogramas cíclicos obtidos para EPC/TTF-TCNQ em ausência (A) e presença de 1,0 mmol L <sup>-1</sup> GSH (B), em 0,1 mol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato contendo 0,1 mol L <sup>-1</sup> KCl e 0,5 mmol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA (pH 7,0), com velocidade de varredura de 20 mV s <sup>-1</sup> .	78
Figura IV.12.	Resposta do eletrodo para 1,0 mmol L <sup>-1</sup> GHS em diferentes proporções de Nafion (0 a 5% (m/m)) no eletrodo modificado com TTF-TCNQ. Em 0,1 mol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato contendo 0,1 mol L <sup>-1</sup> KCl e 0,5 mmol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA (pH 7,0), com velocidade de varredura de 20 mV s <sup>-1</sup> .	79
Figura IV.13.	Influência do potencial aplicado do EPC/TTF-TCNQ sobre a GHS (750 μmol L <sup>-1</sup> GSH) em 0,1 mol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato contendo 0,1 mol L <sup>-1</sup> KCl e 0,5 mmol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA (pH 7,0).	80
Figura IV.14.	Dependência da densidade de corrente com o pH da solução para a eletrooxidação da GHS empregando o EPC/TTF-TCNQ em 750 μmol L <sup>-1</sup> GHS, tampão fosfato contendo 0,1 mol L <sup>-1</sup> KCl e 0,5 mmol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA, E <sub>ap</sub> =200 mV vs. ECS.	83
Figura IV.15.	Dependência do tempo de resposta para a oxidação de 30 μmol L <sup>-1</sup> GSH aplicando um potencial de 200 mV vs. ECS. Medidas realizadas em 0,1 mol L <sup>-1</sup> de tampão fosfato contendo 0,1 mol L <sup>-1</sup> KCl e 0,5 mmol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA (pH 8,0).	84
Figura IV.16.	(A) Resposta amperométrica do sensor para GSH. (B) Curva analítica obtida para GSH. Aplicando um potencial de 200 mV vs. ECS em tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , (pH 8,0) contendo 0,1 mol L <sup>-1</sup> KCl e 0,5 mmol L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> EDTA.	86

Figura IV.17.	Estabilidade operacional do eletrodo modificado com TTF-TCNQ. Concentração de GSH $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0) contendo $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ , com potencial aplicado de $200 \text{ mV vs. ECS}$ .	90
Figura IV.18.	Tempo de vida do eletrodo desenvolvido. Concentração de GSH $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 8,0), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ , com potencial aplicado de $200 \text{ mV vs. ECS}$ .	91
Figura IV.19.	Cronoamperograma obtido para a determinação da GSH em eritrócitos lisados pelo método de adição padrão. Em tampão fosfato (pH 8,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ EDTA. $E_{\text{ap}} = 200 \text{ mV vs. ECS}$ .	93
Figura IV.20.	Curva de calibração obtida para a determinação da GSH em eritrócitos lisados pelo método de adição padrão. Em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de tampão fosfato (pH 8,0), $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl e $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ EDTA. $E_{\text{ap}} = 200 \text{ mV vs. ECS}$ .	94
Figura IV.21.	Curva de adição padrão para o método espectrofotométrico, para a determinação de GSH no eritrócito.	95
Figura IV.22.	Correlação entre as medidas obtidas com o método espectrofotométrico e amperométrico.	97



# **Introdução**

## I. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos métodos de análises é uma tarefa contínua para todo químico analítico, sendo que métodos que conduzam a resultados mais rápidos, exatos e reprodutíveis são requeridos com objetivo de substituir ou melhorar os já existentes.

Métodos de análises são desenvolvidos para serem aplicados nas mais diversas áreas, tais como em análises clínicas, ambientais, alimentos, entre outras. Métodos analíticos aplicados na área clínica são de grande importância, já que endobioticos devem ser encontrados em uma concentração adequada e necessária para nosso organismo, assim a dosagem de compostos tais como: açúcares, neurotransmissores, antioxidantes, entre outros, são de especial interesse.

Os compostos antioxidantes têm alcançado um importante interesse dentro da comunidade biomédica, devido às várias funções que estes apresentam dentro do nosso organismo. Entre estes compostos antioxidantes podemos encontrar os tióis, cujo monitoramento em fluidos fisiológicos é muito importante.

Dentre os mais diversos tióis a glutathiona apresenta um grande interesse devido à participação desta de maneira direta ou indireta em muitos fenômenos importantes, incluindo a síntese de proteínas e DNA, transporte de aminoácidos, atividade enzimática, metabolismo e proteção das células. As propriedades multifuncionais da glutathiona são refletidas no crescente interesse nesta molécula por parte dos pesquisadores nos mais diversos temas, tais como: mecanismo enzimático, biossíntese de macromoléculas, metabolismo intermediário, metabolismo de drogas, radiação, câncer,

---

toxicidade de oxigênio, fenômeno imune, endocrinologia, toxinas ambientais e envelhecimento.

Sua utilização como um biomarcador para diferentes estados clínicos, desperta um interesse considerável pelo desenvolvimento de metodologias analíticas utilizando as mais diversas técnicas tais como: espectrofotometria, espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear, cromatografia gasosa, eletroforese capilar, assim como técnicas eletroquímicas que nos permitam fazer a determinação de forma rápida.

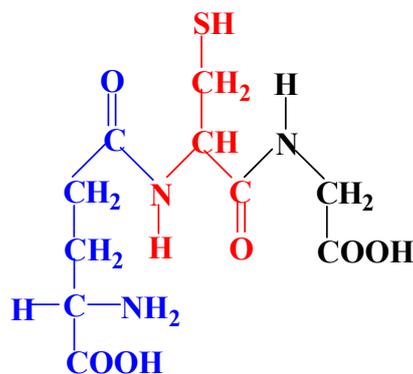
## **I.1. Glutationa**

Em 1888 J. de Rey-Pailhade isolou um composto contendo enxofre, extraído de células de fermento, ao qual ele chamou de *philothion*. Na aquela época foi observado que o *philothion* continha um átomo de hidrogênio reativo como parte de um grupo –SH. Rey-Pailhade disse: o “*philothion* realiza uma função análoga ao da hemoglobina em relação ao oxigênio”. Em seu tempo isto causou pouco interesse, até que em 1921 Hopkins redescobriu esta molécula e a renomeou de glutaciona [1].

### **I.1.1. Definição e Estrutura da Glutationa**

A glutaciona é o principal e mais abundante tiol (-SH) intracelular não protéico de baixo peso molecular encontrado em células do ser humano, animais e plantas [2].

Com respeito a sua estrutura a GSH é um tripeptídeo composto de três aminoácidos: cisteína (vermelho), glicina (preto) e ácido glutâmico (azul), ligados peptidicamente ( $\gamma$ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH presente na cisteína (**Figura I.1**) [3].



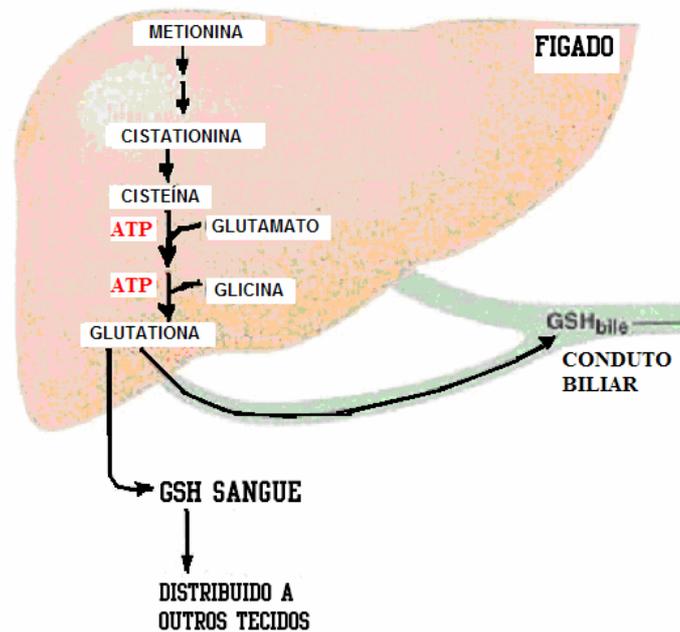
**Figura I.1.** Estrutura da Glutathiona

A glutathiona é uma das moléculas mais importantes encontradas no organismo, a qual atua como um tampão redox quando presente em altos níveis de concentração (aproximadamente  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ ), protegendo as células sanguíneas do prejuízo oxidativo devido também a suas propriedades redutoras e nucleofílicas [4, 5].

A glutathiona também participa na eliminação de xenobióticos (compostos estranhos ao organismo) e sua capacidade antioxidante é um fator chave na manutenção da saúde.

## I.1.2. Síntese Bioquímica da Glutathiona

A glutathiona é uma molécula que é produzida especialmente no fígado e está presente em todos os órgãos do nosso corpo. O fígado cumpre uma função importante na síntese de glutathiona a partir de glutamato, cisteína e glicina, como observado na **Figura I.2**. A síntese é limitada pela disponibilidade de cisteína. Como a cisteína do plasma não é absorvida pelo fígado, então este utiliza metionina, obtida da dieta diária, para formar cisteína via a rota da cistationina. A glutathiona logo é liberado para o fluxo sanguíneo e para a bÍlis [6].



**Figura I.2.** Esquema da bioquímica da glutathiona.

### I.1.3. Concentração da Glutathiona nas Células

A glutathiona pode ser encontrada dentro das células em nível de milimolar. A concentração intracelular da GSH é muito maior que a da cisteína e cistina, assim a glutathiona serve como uma forma de estocagem de cisteína [7].

Nas células, a glutathiona pode ser encontrada na forma livre ou ligada a proteínas, permitindo a formação de proteínas glutathioniladas. A GSH livre está presente principalmente em sua forma reduzida, a qual pode ser convertida à forma oxidada (GSSG) durante o estresse oxidativo, e pode ser revertido para a forma reduzida pela ação da enzima glutathiona redutase (GR).

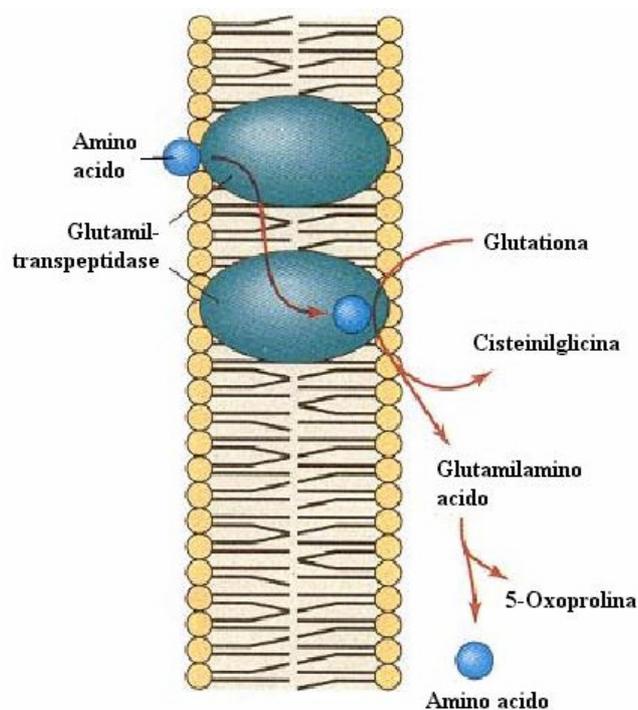
O estado redox depende das quantidades relativas das formas reduzidas e oxidadas da glutathiona (GSH/GSSG) e parece ser um parâmetro crítico e determinante na célula. A proporção de GSH/GSSG em células é usualmente mantida acima de 100, no entanto em vários quadros clínicos de estresse oxidativo, esta proporção diminui para valores entre 10 e 1 [8]. Em condições normais a glutathiona está presente nas células dos mamíferos em concentrações na faixa de 0,5 a 10 mmol L<sup>-1</sup> [9].

No sangue, mais de 99% da GSH encontra-se nas células sanguíneas vermelhas (eritrócitos), sendo que 16% encontra-se ligada a proteínas. Somente 0,5% da GSH encontra-se no plasma [10].

### I.1.4. Funções da Glutaciona

A glutaciona tem duas importantes características na sua estrutura: a  $\gamma$ -glutamil e o grupo sulfidrila. Esses compostos facilitam sua participação num grande número e variedade de funções.

Uma importante função da glutaciona é a participação no transporte de aminoácidos (especialmente cistina e alguns outros aminoácidos neutros) e também de peptídeos e amins [7]. O mecanismo de transporte dos aminoácidos ao interior da parede celular, envolve a enzima  $\gamma$ -glutamil transpeptidase, uma enzima ligada à membrana. O grupo  $\gamma$ -glutamil da glutaciona se liga ao respectivo aminoácido liberando cisteinilglicina, transportando desta forma o aminoácido ao interior da célula como mostrado na **Figura I.3**.



**Figura I.3.** Transporte do aminoácido pela glutaciona.

Outra função importante da glutathiona é a de participar em reações de trans-hidrogenação que estão envolvidas na formação e manutenção dos grupos sulfidrilos de outras moléculas tais como: coenzima A, várias enzimas e proteínas [11].

A glutathiona também tem uma função importante no sistema nervoso central, onde foi registrado que a maioria dos pacientes com defeitos no ciclo  $\gamma$ -glutamil podem sofrer de retardamento mental ou exibir outros defeitos cerebrais [7].

Outra importante função da glutathiona é a de eliminar peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos e radicais livres, assim também como eliminar uma variedade de compostos xenobióticos que interagem com a glutathiona, sendo excretados pela urina ou fezes na forma de ácidos mercaptúricos.

A glutathiona também tem a função de proteger a membrana celular do estresse eletrofílico, estresse oxidativo e da radiação [2, 12, 13]. O **estresse eletrofílico** é definido como o efeito de compostos altamente reativos que atuam em centros nucleofílicos presentes em biomoléculas, o qual conduz à formação de novas ligações químicas. Devido à alta potência nucleofílica do grupo tiol da glutathiona, esta pode funcionar como um excelente agente nucleofílico eliminando muitos eletrófilos reativos. Já que compostos químicos eletrofílicos podem reagir com macromoléculas biológicas como DNA, apresentando um risco genotóxico, sua conjugação com glutathiona, fornece um importante mecanismo de proteção [14].

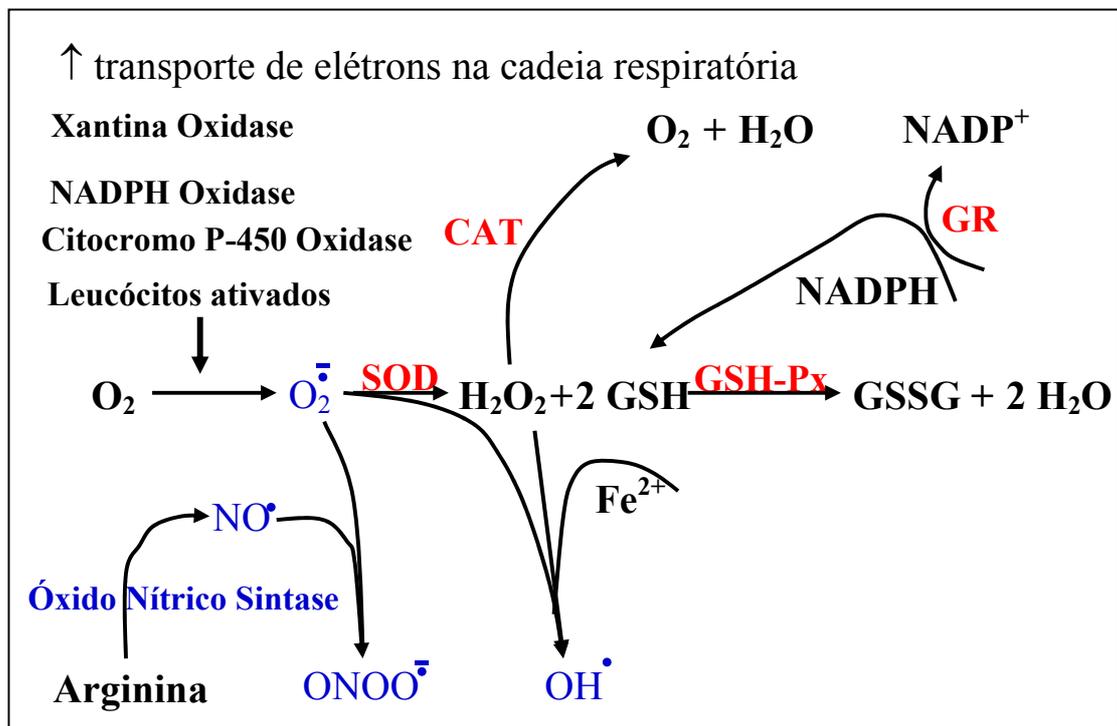
O **estresse oxidativo** é referido a um aumento na formação de radicais livres de oxigênio, originada pelo desequilíbrio entre o sistema antioxidante e oxidante no organismo.

---

O termo *radical livre* refere-se ao átomo ou molécula altamente reativa, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica [15, 16]. Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, isto é, ou cedem o elétron desemparelhado, oxidando-se, ou recebem outro, reduzindo-se. Assim, por exemplo, quando no metabolismo normal do oxigênio ocorrer uma redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ), este ganha um elétron, formando o ânion-radical superóxido ( $O_2^-$ ), considerado instável por possuir número ímpar de elétrons (13) na última camada (L).

O radical livre é só uma parte dos agentes patogênicos que provocam o estresse oxidativo, pois alguns deles não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. Na maioria são espécies derivadas do metabolismo do oxigênio (**Figura I.4**), estes agentes patogênicos são chamados de ERO (espécies reativas de oxigênio) [17].

Para se proteger, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como eliminador de agentes patogênicos ou radicais livres antes que estes causem lesões. Esta linha é constituída por glutathione, superóxido-dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar as lesões ocorridas, sendo constituídas pelo ácido ascórbico, glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase, entre outros [17].



**Figura I.4.** Vias de formação de ERO (azul) e mecanismo enzimático de defesa antioxidante (vermelho).  $O_2^{\cdot-}$  (ânion-radical superóxido);  $OH^{\cdot}$  (radical hidroxila);  $H_2O_2$  (peróxido de hidrogênio);  $NO^{\cdot}$  (óxido nítrico);  $ONOO^{\cdot-}$  (ânion peroxinitrito).

### I.1.5. Importância da Glutathiona no Organismo

A glutathiona é um antioxidante hidrofílico fisiologicamente importante, capaz de eliminar espécies reativas de oxigênio, tais como  $O_2^{\cdot-}$  e  $OH^{\cdot}$ , assim como também previne a formação destes radicais, protegendo a célula contra a lesão resultante da exposição a agentes como íons ferro [18], oxigênio hiperbárico, ozônio e radiação ultravioleta [19].

A proteção da GSH contra os íons metálicos é realizada da seguinte forma. A glutathiona se liga a íons metálicos endógenos tais como cobre, selênio, crômio e zinco via reações não enzimáticas. A ligação da GSH a estes íons metálicos cumpre importantes funções, como: (1) serve para limitar e regular a atividade dos íons metálicos, (2) facilita o transporte destes íons na membrana e sua eliminação da célula e do organismo (3) conduz à formação de mediadores biológicos essenciais [20].

Existe uma importante correlação entre os níveis de glutathiona em sua forma reduzida e os mecanismos enzimáticos de defesa antioxidante. Esta observação tem promovido uma série de estudos clínicos sobre a interdependência entre o aumento dos níveis de glutathiona no plasma sanguíneo e doenças cancerígenas em determinados órgãos vitais como rins e pulmões [21, 22].

O poder antioxidante da glutathiona foi demonstrado pelo aumento da sobrevivência de 90% de ratos submetidos a hiperoxia e tratados com instilação de eritrócitos na traquéia. Este resultado foi atribuído a GSH intra-eritrocitária, que protege contra o “choque pulmonar” induzido pelo estresse oxidativo resultante da hiperoxia [23].

Mudanças na concentração de glutathiona podem ser um indicador útil em certas desordens fisiológicas como anemias causadas por infecção ou seguidas pela administração de algumas drogas oxidantes [24], no monitoramento da eficácia de alguns tratamentos usando N-acetil-L-cisteína (NAC) durante o metabolismo do paracetamol [25], no tratamento de pacientes com artrite reumatoide [26], etc.

Com respeito a HIV, Roederer *et al.* [27] sugeriram que a diminuição observada nos níveis de glutathiona correlacionava-se com a progressão da

---

HIV devido ao tratamento com drogas oxidantes como o NAC, inibindo a replicação do vírus.

Dado a função da glutathione na proteção contra o estresse oxidativo e eliminação de xenobióticos, sua disponibilidade na forma reduzida pode ser um fator chave na manutenção da saúde. Tem sido estabelecido que uma diminuição na concentração da glutathione pode estar associado com envelhecimento e a patologias de muitas doenças, incluindo artrites, ataque cardíaco, distrofia muscular, esclerose amiotrófica lateral, doença de Alzheimer, doença do fígado por álcool, síndrome de angústia respiratória e o síndrome de Werner [28-36], atribuindo-se a este tripeptídeo um papel importante como indicador do estresse oxidativo [37], e cuja concentração no organismo pode ser relevante para o diagnóstico clínico.

Já que as concentrações de glutathione no sangue podem refletir o nível desta molécula em outros tecidos menos acessíveis, determinações de glutathione e dissulfeto de glutathione (GSSG) no sangue têm sido consideradas essenciais como marcador do nível da glutathione no corpo e um indicador útil do risco de doenças. Por outro lado, determinações da glutathione são importantes para o diagnóstico de distúrbios do ciclo  $\gamma$ -glutamil. Pacientes que exibem deficiência na síntese da glutathione são em geral de três tipos [7]: (1) aqueles com deficiência da glutathione sintetase, onde os defeitos parecem estar restritos aos eritrócitos; (2) aqueles onde a deficiência da glutathione sintetase é generalizada; estes pacientes exibem um incremento de 5-oxoprolina na urina excretada. (3) aqueles com deficiência da  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetase. É interessante notar que, embora os três grupos de pacientes listados acima sejam deficientes das enzimas requeridas para síntese de glutathione e exibem uma diminuição marcante nos níveis de

glutathiona em eritrócitos, eles diferem substancialmente com respeito a outros resultados bioquímicos e em suas manifestações clínicas [7].

O estado de óxido-redução da glutathiona no sangue é fundamental para muitas pesquisas envolvendo estresse oxidativo e patologias de radicais livres [38]. Baixos níveis de glutathiona têm sido encontrados em sangue de pacientes com várias doenças. A **Tabela I.1** resume alguns destes resultados obtidos.

**Tabela I.1.** Concentração de GSH ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) no sangue em diferentes quadros clínicos.

Valores de Referência	Valores em Pacientes	Condição	Referência
1100	180*	HIV	[39]
1100	870**	HIV	[40]
950	700	Diabetes	[41]
1200	980	Obstrução do ducto biliar	[42]
1080	630***	HIV	[43]
1110	1005	Câncer de mama	[44]
1380	900	Rinite prematura	[45]

\* Pacientes tratados com selênio e/ou  $\beta$ -caroteno.

\*\* Pacientes tratados com drogas como N-acetilcisteína e/ou acetaminofeno.

\*\*\* Pacientes tratados com HIV avançado.

## **I.2. Determinação de Glutathione**

Nas células, a glutathione e dissulfeto de glutathione constituem as formas livres e, junto à fração ligada com a proteína representam a glutathione total. O primeiro passo na análise da glutathione livre é usualmente a precipitação da proteína por acidificação (ácido tricloroacético, ácido perclórico ou ácido sulfosalicílico) produzindo um sobrenadante límpido livre de proteína após centrifugação, logo a glutathione e dissulfetos podem ser determinados.

Acidificação é geralmente requerida na maioria dos procedimentos para a determinação de tiol e/ou dissulfetos. Somente alguns métodos (por exemplo: ressonância magnética nuclear) são apropriados para a obtenção de medidas em amostras de células intactas ou não desproteinizadas [46, 47].

Vários métodos têm sido descritos na literatura para a determinação de GSH. Entre eles podemos encontrar: cromatografia líquida de alta eficiência [48-50], espectrofluorimetria [51], espectrofotometria [52, 53], potenciometria [54], entre outros.

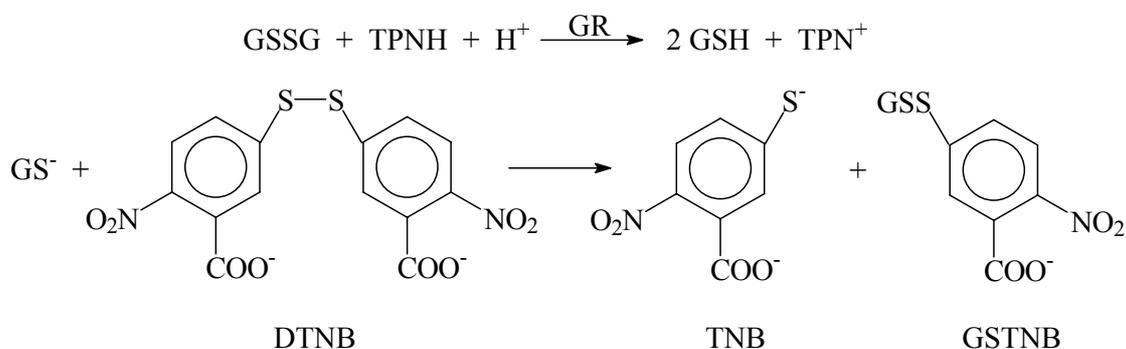
## I.2.1. Métodos de Determinação de Glutathiona

### I.2.1.1. Método Espectrofotométrico

Desde os trabalhos pioneiros, realizados por Ellman em 1959 [55] vários artigos têm sido publicados sobre a determinação de compostos sulfidrilas e glutathiona em amostras biológicas [52, 53, 56, 57].

Em amostras biológicas, o método mais utilizado é o espectrofotométrico, onde o método utilizando o reagente de Ellman's [55] é o ensaio mais comum. Este se baseia na reação entre GSH e o ácido 5,5`ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), conhecido como reagente de Ellman, gerando o composto ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB), o qual desenvolve uma coloração amarela, e é monitorado espectrofotometricamente a 412 nm.

Entre outras determinações espectrofotométricas, também podemos encontrar o método baseado na reação de ciclagem enzimática descoberta por Owens e Belcher [56] e desenvolvido por Tietze [57] onde a GSSG reage com o nucleotídeo trifosfopiridina (TPNH) e a GSH gerada reage com o DTNB como mostrado na seguinte equação:



Este método permite a determinação de glutathiona total e é mais sensível que aqueles obtidos com o método espectrofotométrico usando reagente de Ellman e não está sujeito a interferência por outros tióis [57].

### **I.2.1.2. Método Fluorimétrico**

O método fluorimétrico também tem sido aplicado para a determinação da glutathiona em amostras biológicas [58, 59].

Este método inicialmente proposto por Cohn e Lyle [58] foi desenvolvido baseando-se na reação entre *o*-ftaldialdeído (OPA) e aminoácidos. Cohn e Lyle modificaram o procedimento da reação com OPA para determinação de GSH em sangue e tecidos de ratos por simples precipitação das proteínas com ácido metafosfórico a 25% (m/v). A glutathiona reage com OPA a pH 8,0 produzindo um produto altamente fluorescente após 15 minutos de reação a temperatura ambiente, o qual é estável durante 30 minutos. A banda de absorção ocorre a 350  $\mu\text{m}$  e a banda de emissão de fluorescência a 420  $\mu\text{m}$ . A faixa de resposta linear foi de 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$  a 32,5  $\text{mmol L}^{-1}$ .

A maior desvantagem deste método é a pobre seletividade devido à interferência significativa de aminoácidos que também reagem com o OPA, tais como glutamine, asparagine, histamine, entre outros.

Além do OPA outros reagentes fluoróforos são também usados para determinação de glutathiona, como: Monobromobimano (BrB) o qual é um reagente específico para grupos funcionais tiólicos formando adutos BrB-tiol com alta fluorescência [60].

### **I.2.1.3. Método de Bioluminescência**

O método de bioluminescência para a determinação de glutathiona reduzida foi desenvolvido por Romero e Mueller-Klieser [61]. O princípio bioquímico é a quimiluminescência da bactéria luciferase. A glutathiona está ligada ao sistema redox NADP/NADPH+H<sup>+</sup> através de enzimas específicas (glutathiona redutase). O sistema redox pode ser acoplado numa forma quantitativa à bactéria luciferase via flavina mononucleotídeo (FMN). A acumulação de NADPH é medida via reação de bioluminescência da flavina mononucleotídeo (FMN) e a bactéria luciferase. Uma correlação linear é obtida entre a intensidade de bioluminescência da reação da luciferase e o conteúdo de GSH em amostras líquidas. Este processo enzimático oferece flexibilidade, desde que cada substância possa ser ligada quantitativamente ao sistema redox.

Este ensaio requer pequenas amostras líquidas e pode ser usado numa ampla faixa de concentrações de glutathiona. Por outro lado, isto pode ser apropriado para uso em microtituladores. A desvantagem deste método é ser semiquantitativo.

### **I.2.1.4. Eletroforese Capilar**

A Eletroforese Capilar (CE) foi introduzida como uma técnica de separação analítica altamente eficiente, de volume ultrapequeno para as análises de espécies carregadas mesmo numa única célula. Piccoli *et al.* [62] descreveram pela primeira vez um método de eletroforese capilar de alta

---

performance (HPCE) com detecção UV, que permitia a determinação simultânea de glutatona reduzida e oxidada em células vermelhas em níveis de fentomoles com um simples procedimento de extração com o uso de uma membrana Microcon-10.

Recentemente Jin *et al.* [63] desenvolveram um método de eletroforese capilar com detecção eletroquímica para a determinação de glutatona numa única célula vermelha. A detecção eletroquímica foi realizada com eletrodo de amalgama Ouro/Mercúrio, aplicando-se um potencial de 60 mV vs. ECS. Neste trabalho foi observada através do microscópio a lise de um eritrócito por vez.

Por outro lado Carru *et al.* [64] modificaram o método de Piccoli, e descreveram a determinação direta da GSH e GSSG em células vermelhas em um tempo de 2 minutos, usando o método de eletroforese capilar com detecção espectrofotométrica. Carru *et al.* apresentaram o método como sendo o mais rápido conseguido até então, o que foi alcançado por um ajuste na composição e força iônica do tampão.

### **1.2.1.5. Método HPLC**

O método de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) tornou-se recentemente o método de preferência para medidas de glutatona e tióis relacionados em amostras biológicas. A determinação simultânea da glutatona e outros tióis em um só ensaio pode ser conseguido pela escolha apropriada da coluna, derivatização e protocolos de eluição e sistema de detecção.

---

O método de HPLC com detecção eletroquímica representa uma ferramenta importante para a análise de compostos reativos redox, tais como tióis e dissulfetos, incluindo glutathiona. Inicialmente, eletrodos de mercúrio foram usados como detector para determinação de glutathiona e outros tióis [65]. Este método foi mais tarde simplificado e expandido por Allison, pelo desenvolvimento de um eletrodo duplo de camada fina de amalgama Au/Hg para a determinação simultânea de glutathiona e cisteína, e seus respectivos dissulfetos [66]. Richie e Lang [67] modificaram o método de Allison, permitindo a determinação de uma ampla variedade de tióis e dissulfetos biologicamente importantes, e sua aplicação em amostras biológicas. A preparação das amostras envolve precipitação da proteína com ácido metafosfórico e uma diluição de 20 vezes com a fase móvel.

Recentemente Hiraku *et al.* [68] registraram um ensaio HPLC com detecção eletroquímica para glutathiona reduzida e oxidada e tióis relacionados. A determinação em níveis de fentomoles de glutathiona é conseguida num sistema incluindo um eletrodo de ouro com uma ampla área superficial, obtendo uma sensibilidade extremamente alta para glutathiona.

Usando eletrodos de ouro, alguns cuidados devem ser tomados para assegurar que o oxigênio seja rigorosamente excluído do sistema; de qualquer forma, os eletrodos Au/Hg perdem sensibilidade após algumas centenas de injeções e deveriam ser recondicionados. Mais recentemente estudos detalharam o uso de eletrodos de grafite poroso em procedimentos em linha para monitoramento dos níveis de GSH e GSSG com sensibilidades na faixa de 4,9 a 325 pmol [69, 70].

O método eletroquímico acoplado a HPLC oferece várias características atrativas: fácil processamento da amostra, especificidade,

---

auto-injeção, tempo de análise curto e a possibilidade de determinação de outros tióis.

### **I.2.1.6. Método de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa**

No método de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa (GC-MS) para análises de glutathione em amostras biológicas, descrito por Capitan *et al.* [71], a glutathione do sangue ou plasma foi reduzida com ditioneitol, desproteinizada com ácido sulfosalicílico, derivatizada com cloroformato etílico e extraída com éter etílico. Derivados do N,S-etoxicarbonil metil éster de glutathione e outros tióis foram separados e quantificados por GC-MS.

O custo relativamente alto do equipamento é a maior desvantagem deste método. Características atrativas são: a alta sensibilidade e especificidade, e a co-determinação de outros tióis.

### **I.2.1.7. Métodos Eletroquímicos**

As técnicas eletroquímicas apresentam-se particularmente apropriadas para determinação de compostos tiólicos, dado a flexibilidade da química redox que caracteriza a maioria dos compostos orgânicos de enxofre.

Procedimentos simples, tempo de resposta rápida e o avanço da micro-engenharia e de sistemas de eletrodos descartáveis favorecem o uso de dispositivos eletroquímicos.

Entre os métodos eletroquímicos desenvolvidos para a determinação de glutatona podemos mencionar primeiramente o método potenciométrico, onde apenas um sensor potenciométrico foi registrado na literatura. Este método registrado por Compagnone *et al.* [72] está baseado na determinação do íon  $F^-$  (com eletrodo íon seletivo) produzido da reação entre a GSH e 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno catalisado pela enzima Glutaciona Transferase.

Outros métodos eletroanalíticos para determinação de glutatona baseados na oxidação direta do grupo tiol em eletrodos sólidos como carbono vítreo [73], grafite pirolítico [74] e ouro [75], são amplamente explorados. Estes eletrodos foram muito usados acoplados a técnicas de separação, devido à falta de seletividade dos mesmos. Uma grande desvantagem deste método, é que os tióis requerem alto potencial para a oxidação.

Assim, só para citar alguns exemplos, no método baseado na oxidação direta de tióis, podemos encontrar a oxidação da glutatona no eletrodo de mercúrio conforme registrado por Allison [76], na qual foi necessária uma prévia separação utilizando a técnica de cromatografia líquida. Após esta separação os tióis foram detectados por oxidação catalítica na superfície de mercúrio em 150 mV *vs.* Ag/AgCl.

A oxidação direta em eletrodos de carbono também tem sido reportada, como a descrita por Zhang *et al.* [77] onde o eletrodo de carbono foi colocado no final da coluna capilar da cromatografia líquida. O eletrodo

mostrou boa sensibilidade a compostos tióicos tais como: cisteína, glutathiona, entre outros, para um potencial aplicado de 900 mV.

Moore *et al.* [74], utilizaram o eletrodo de grafite pirolítico de plano perpendicular ao plano basal para a detecção de tióis, entre eles a GSH. Com este eletrodo conseguiu-se diminuir o potencial de oxidação da glutathiona para 650 mV quando comparado com eletrodos de grafite pirolítico de plano basal, eletrodo de diamante dopado com boro, eletrodo de grafite pirolítico de plano basal modificado com filme de nanotubos de carbono e eletrodo de carbono vítreo que apresentaram potenciais de oxidação para GSH superiores a 900 mV.

Como observado nestes exemplos citados acima, os eletrodos sólidos geralmente apresentam um alto potencial de oxidação para a glutathiona, devido a isto, modificações químicas das superfícies destes eletrodos vêm sendo investigadas, com o objetivo de diminuir o alto potencial de oxidação, obtendo-se, em muitos casos, uma melhor resposta eletroquímica (eletrocatalise), alta sensibilidade e eliminação de interferentes para análise em amostras complexas.

## **1.2.2. Eletrodos Quimicamente Modificados**

Os eletrodos quimicamente modificados (EQMs) têm atraído considerável interesse nas últimas duas décadas, da mesma forma que os pesquisadores têm procurado exercer um controle mais direto sobre a natureza fisico-química do eletrodo. A terminologia, definições e métodos

---

de preparação dos EQMs têm sido descritos e classificados pela IUPAC [78].

Os EQMs têm numerosas aplicações, como por exemplo:

(1) um amplo espectro de pesquisas eletroquímicas básicas, incluindo a relação de transferência de elétron heterogênea e reatividade química da superfície do eletrodo, fenômeno eletrostático na superfície do eletrodo e fenômeno de transporte de elétrons e íons em polímeros.

(2) no desenho de dispositivos eletroquímicos e sistemas para aplicações em sensores químicos, conversão de energia e armazenagem, eletrônica molecular, dispositivos eletrocromáticos, proteção à corrosão e síntese eletro-orgânica.

A capacidade de manipular a arquitetura molecular do corpo da matriz do eletrodo e sua superfície, em particular tem conduzido a uma ampla extensão de aplicações analíticas dos EQMs e criadas poderosas oportunidades para eletroanálises.

Desta forma podemos definir o eletrodo quimicamente modificado, como um eletrodo produzido de um material condutor ou semicondutor que é coberto por um filme molecular ou multimolecular, iônico, ou polimérico que contém um modificador químico, e que por meio de reações redox (transferência de carga) ou na diferença de potencial interfacial (não há transferência de carga líquida) exibem propriedades químicas, eletroquímicas e/ou ópticas do filme [78].

Pela suas grandes vantagens, o desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados vem sendo amplamente estudado, com o objetivo de melhorar a transferência de elétrons entre o analito e o eletrodo,

aumentando sua sensibilidade, diminuindo o potencial de oxidação ou redução e melhorando a estabilidade e reprodutibilidade do eletrodo.

Neste sentido, muitos pesquisadores têm utilizado compostos a base de ftalocianina de cobalto para modificar superfícies de eletrodos em diferentes modos, pois o íon cobalto apresenta atividade catalítica para a oxidação da glutatona, composto que é de nosso principal interesse, permitindo a diminuição dos altos potenciais de oxidação deste.

Assim podemos encontrar o trabalho descrito por Halbert *et al.* [79], que prepararam um eletrodo misturando ftalocianina de cobalto tetrasulfonada com grafite em pó e nujol. O eletrodo apresentou resposta electrocatalítica para muitos tióis na faixa de potencial de 750 a 850 mV *vs.* Ag/AgCl, esta faixa de potencial foi similar a aquelas observadas para a oxidação da ftalocianina de cobalto em solução após a adição desta na pasta de grafite. Devido ao alto potencial e a falta de seletividade, o eletrodo foi aplicado como detector electroquímico acoplado a cromatografia líquida.

Por outro lado, Wring *et al.* [80] também utilizaram a ftalocianina de cobalto na construção de eletrodos a base de grafite e resina epóxi, para o monitoramento de GSH. A determinação de GSH foi realizada por técnica amperométrica aplicando-se um potencial de 450 mV *vs.* Ag/AgCl encontrando uma faixa de trabalho de  $0,1 \cdot 10^{-6}$  a  $5,5 \cdot 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, com um limite de detecção de  $3,25 \cdot 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>.

Seguindo com o uso da ftalocianina de cobalto, encontramos o trabalho descrito por Griveau *et al.* [81], os quais usaram tetra-aminoftalocianina de cobalto adsorvida na forma do monômero e eletropolimerizada como poli-tetra-aminoftalocianina sobre a superfície do eletrodo de carbono vítreo. A atividade electrocatalítica da oxidação dos tióis

aumenta ligeiramente com a espessura do filme, mas esta atividade foi similar ao do eletrodo com o monômero adsorvido. A determinação de GSH foi realizada por técnica amperométrica, aplicando-se um potencial de -130 mV *vs.* ECS, com uma sensibilidade de  $0,12 \mu\text{A mol}^{-1} \text{L}$  e limite de detecção de  $1,6 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

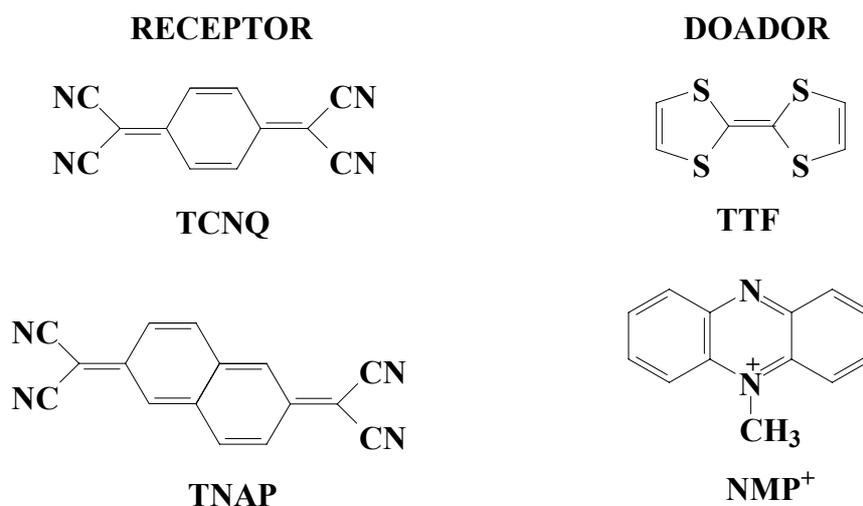
Outros compostos a base de cobalto foram também estudados. Assim, Shankaran *et al.* [82] utilizaram o hexacianoferrato de cobalto como mediador, e imobilizaram este composto com parafina sobre um eletrodo de grafite. O eletrodo assim construído apresentou resposta eletrocatalítica para GSH num potencial de 750 mV *vs.* Ag/AgCl, encontrado-se uma resposta na faixa de 40 a  $520 \mu\text{mol L}^{-1}$ , com um limite de detecção de  $2,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Além dos compostos a base de cobalto existentes na literatura, compostos derivados de rutênio (III) [83, 84] também foram utilizados como mediadores, com objetivo de diminuir o alto potencial de oxidação da GSH. Assim podemos encontrar o trabalho descrito por Nalini *et al.* [84], os quais utilizaram como mediador redox o difenilditiocarbamato de rutênio, composto insolúvel em solução aquosa, para preparar um eletrodo com pasta de carbono. O eletrodo a base de rutênio mostrou uma resposta eletrocatalítica para a oxidação de GSH num potencial de oxidação de 360 mV *vs.* ECS, o eletrodo desenvolvido apresentou uma ampla faixa de trabalho de 20 a  $200 \mu\text{mol L}^{-1}$  com um limite de detecção de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Uma outra classe de materiais utilizados como mediadores, são os complexos de transferência de carga, os quais foram introduzidas em 1979 por Jaeger *et al.* [85].

Complexos de transferência de carga são preparados pela combinação de um doador e um receptor de elétrons. Essas espécies são tipicamente

moléculas planares com uma densidade eletrônica- $\pi$  deslocalizada acima e abaixo do plano molecular. Exemplos típicos são: o tetratiofulvaleno (TTF) como doador e o tetracianoquinodimetano (TCNQ) como receptor [86]. Estes e outros exemplos são mostrados na **Figura I.5**.



**Figura I.5.** Estruturas de algumas moléculas receptoras e doadoras de elétrons. Tetracianoquinodimetano (TCNQ), Tetracyanonafthoquinodimetano (TNAP), Tetratiofulvaleno (TTF) e N-metil-fenazínio (NMP<sup>+</sup>).

Assim os complexos de transferência formados são utilizados em forma direta de seus cristais e/ou misturados com grafite para a preparação de eletrodos, e estes têm sido utilizados para a detecção de alguns compostos de interesse biológico e enzimas redox [87-89].

Quando comparados com outros eletrodos quimicamente modificados, as superfícies dos eletrodos a base de complexos de transferência de carga, apresentam as vantagens de serem mais estáveis, mais reprodutíveis, além de

serem de fácil preparo. Devido a isto, estes eletrodos ocupam um importante lugar em bioeletroanálises [90].

Uma característica muito importante para a construção de eletrodos a base de complexos de transferência de carga é sua condutividade. Assim, por exemplo, o N-metil-fenazínio tetracianoquinodimetano (NMP-TCNQ) é um bom condutor elétrico ( $\sigma = 143 \text{ S cm}^{-1}$ ), mas sem o grupo metila trocado por um grupo etila o correspondente composto N-etil-fenazínio tetracianoquinodimetano (NEP-TCNQ) é um isolante ( $\sigma = 10^{-9} \text{ S cm}^{-1}$ ). Desta forma entre a ampla variedade de complexos de transferência de carga podemos encontrar ao TTF-TCNQ como o mais usado para a preparação de eletrodos devido a sua alta condutividade ( $\sigma = 500 \text{ S cm}^{-1}$ ).

### **I.2.3. Tetratiofulvaleno-Tetracianoquinodimetano (TTF-TCNQ)**

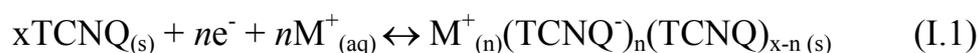
O complexo TTF-TCNQ apresenta alta condutividade e baixa solubilidade em potenciais controlados. A presença de quatro grupos cianos e a conjugação relativamente extensa de seu sistema de elétrons  $\pi$  fazem deste complexo um excelente doador e receptor de elétrons [85, 91].

Estudos com os complexos de TTF e TCNQ têm sido bastante extensos. Os primeiros estudos eletroquímicos empregando estes tipos de complexos foram registrados na literatura por Jaeger e Bard [92]. Estudos voltamétricos têm sido realizados com o objetivo de elucidar os processos eletroquímicos que ocorrem com as micropartículas de TTF e TCNQ

confinadas em superfícies. Quando submergidos em soluções aquosas contendo íons monovalentes, os voltamogramas destes eletrodos modificados são caracterizados por picos estreitos separados por uma ampla zona inerte [93, 94].

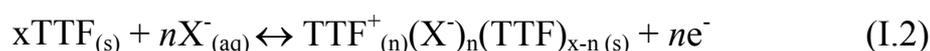
O processo redox deste complexo (TTF-TCNQ) está associado com a inclusão/exclusão de íons dentro da rede cristalina [95, 96]. O processo da inclusão de íons é fundamental para a neutralização da carga da rede cristalina formada durante o processo de redução [97]. E o processo de exclusão de íons é essencial durante a oxidação da rede cristalina.

Para o sistema TCNQ<sup>0/-</sup>, a transformação do par redox resulta da incorporação de cátions durante a redução e a exclusão destes durante a oxidação como mostrado na equação I.1:



Onde para cátions do grupo I ( $M = \text{Na}^{+}, \text{K}^{+}, \text{e Rb}^{+}$ )  $x=1, n=1$ , embora outras estequiometrias possam ser observadas ( $\text{Cs}^{+}, x=3, n=2$ ).

Para o sistema TTF<sup>0/+</sup>, a transformação do par redox resulta na incorporação de ânions da solução durante a oxidação e a exclusão destes ânions durante a redução, como na equação I.2:



No caso do TTF aproximadamente 75% do sólido é oxidado resultando num produto de valência misturada, assim, para haletos  $x=1, n=0,71-0,76$  [98].

Atualmente os sais de condução orgânica vêm obtendo grande interesse devido a suas importantes propriedades características. Um importante complexo de transferência de carga é sintetizado entre o TTF e o TCNQ originando o complexo orgânico TTF-TCNQ com propriedades de alta condução. Este complexo tem propriedades como de um metal, o qual suporta ampla faixa de temperatura, assim como apresenta a mais alta condutividade dos compostos orgânicos ( $\sigma = 500 \text{ S cm}^{-1}$ ) [99].

Este complexo de transferência de carga (TTF-TCNQ) é intrinsecamente condutor à temperatura ambiente. Assim, é possível sua utilização para a construção de eletrodos modificados. Além disso, cristais de TTF-TCNQ são insolúveis em água, no entanto outras espécies eletroativas como:  $\text{TTF}^+$ ,  $\text{TTF}^0$ ,  $\text{TCNQ}^0$ ,  $\text{TCNQ}^-$ , ou  $\text{TCNQ}^{2-}$  liberadas após a destruição da rede cristalina na superfície do eletrodo por processos catódicos ou anódicos, os quais contribuem como mediadores, apresentam certa solubilidade em meio aquoso [89, 100].

Estas espécies eletroativas chamadas de “mediadores” podem transportar elétrons entre o analito ou enzimas redox e a superfície do eletrodo. Assim o complexo de transferência de carga TTF-TCNQ apresenta-se como um mediador potencial com grandes vantagens. O comportamento eletroquímico do complexo TTF-TCNQ tem sido estudado amplamente, com a análise de parâmetros importantes como: a faixa de potencial, potencial aplicado, eletrólito utilizado [100].

Desta forma, citaremos alguns exemplos onde são utilizados os compostos de transferência de carga, para o desenvolvimento de eletrodos.

Pesquisadores como Pandey [101] e Kulys [102] entre muitos outros, utilizaram como mediador o composto TCNQ para o desenvolvimento de

eletrodos quimicamente modificados a base de grafite. Kulys *et al.* [102] prepararam um sensor eletroquímico descartável a base de TCNQ, usando a técnica “*screen printing*” para a determinação de ácido ascórbico. O sensor desenvolvido apresentou um baixo potencial de oxidação para o ácido ascórbico (50 mV a pH 7,0 *vs.* Ag/AgCl) quando comparado com eletrodos não modificados como eletrodos de platina ou carbono vítreo onde o potencial de oxidação para ácido ascórbico ocorre em 500 mV *vs.* ECS [103-105]. O sensor apresentou uma sensibilidade de 3,5  $\mu\text{A mmol}^{-1} \text{L}$ , com tempo de resposta de 30 segundos, utilizando 30  $\mu\text{L}$  de amostra, o limite de detecção foi de 22  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Um outro trabalho utilizando o composto TCNQ é o proposto por Murthy *et al.* [106] para a determinação de NADH. Neste trabalho, o TCNQ previamente dissolvido em acetonitrila foi imobilizado eletroquimicamente sobre o eletrodo de grafite pirolítico de plano perpendicular ao plano basal, aplicando-se um potencial de 1,0 V *vs.* Ag/AgCl por 25 minutos. O eletrodo modificado mostrou resposta catalítica para a oxidação de NADH em tampão fosfato pH 7,0, com um potencial de oxidação de 380 mV *vs.* ECS, o qual foi menor ao comparado com eletrodos metálicos onde o potencial de oxidação é de 1,1 V. Já em eletrodos de grafite pirolítico de plano perpendicular ao plano basal a eletrooxidação do NADH ocorre em 380 mV mas o pico de oxidação é pouco definido. No entanto a oxidação em eletrodo de grafite pirolítico de plano basal a oxidação ocorre em 450 mV [107]. Assim, este eletrodo apresenta uso potencial para substratos a base de enzimas desidrogenase.

A desvantagem de usar somente o composto de TCNQ no eletrodo é a falta de estabilidade e reprodutibilidade, devido este composto apresentar

---

certa solubilidade em solução aquosa. Por esta razão, complexos de TTF-TCNQ ou outros complexos derivados têm sido utilizados na construção de eletrodos, por apresentarem uma alta insolubilidade em solução aquosa.

O complexo TTF-TCNQ tem sido utilizado na preparação de biosensores para a determinação de colina e acetilcolina [76], lactose [87], glicose [89], e formaldeído [107], entre outros. Assim também têm sido preparados sensores a base hexametenotetratelurofulvaleno-TCNQ HMTTeF-TCNQ sem o uso de enzima, para a oxidação direta e determinação de compostos como NADH [90], ácido ascórbico, dopamina, e tióis [101].

Na literatura, não se tem registrado o uso do complexo TTF-TCNQ para a determinação de GSH, assim neste trabalho foi utilizado este complexo no desenvolvimento de um eletrodo para a determinação deste analito, já que este complexo de transferência de carga apresenta alta condutividade, baixa solubilidade em meio aquoso a potenciais controlados e propriedades eletrocatalíticas.

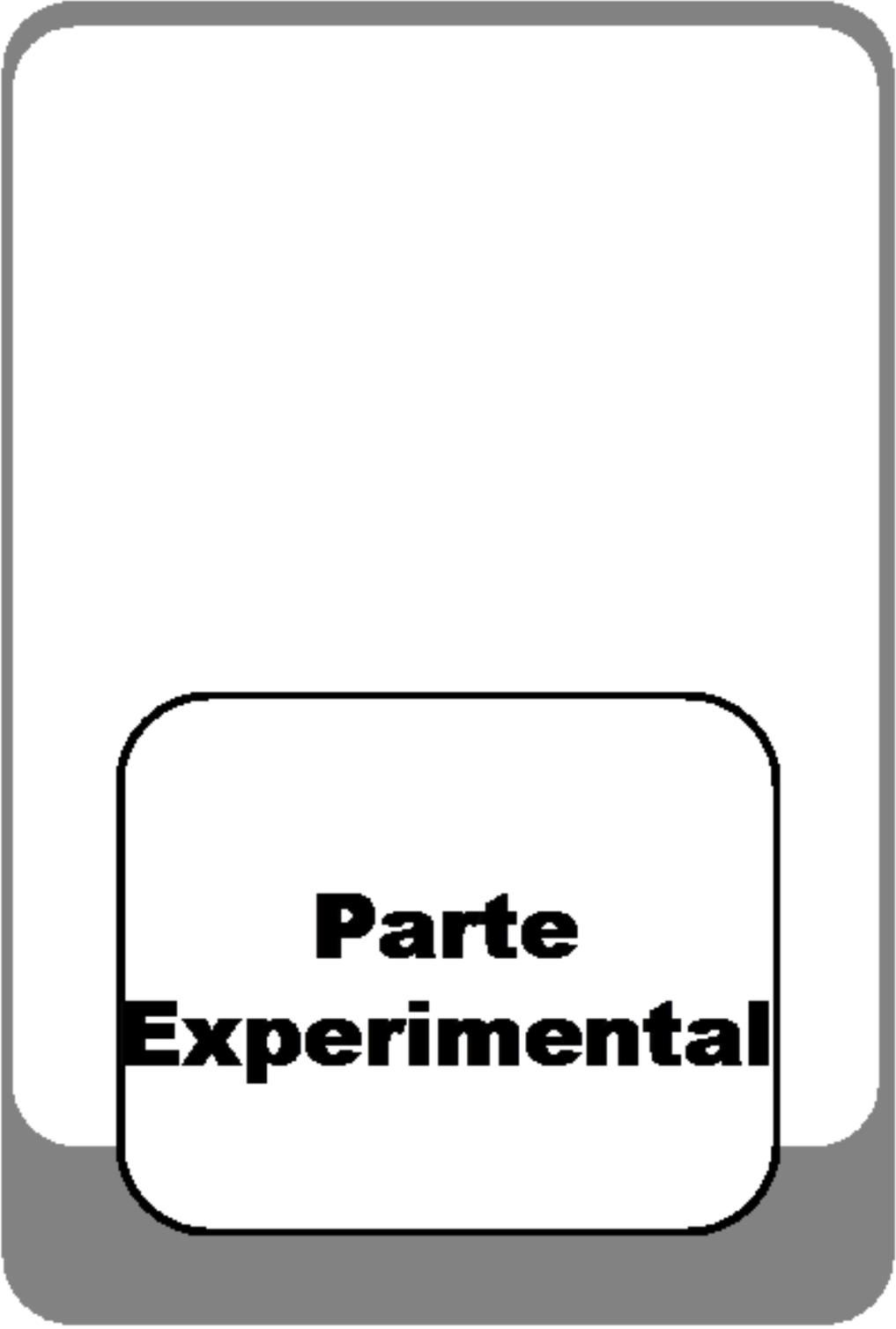


---

## II. OBJETIVO

O objetivo da presente tese foi o desenvolvimento de um sensor amperométrico sensível a glutatona para a determinação desta em eritrócitos. Para alcançar este objetivo foi necessário realizar os seguintes estudos:

- a) Desenvolver um eletrodo a base de pasta de carbono modificado com o complexo tetratiofulvaleno-tetracianoquinodimetano (TTF-TCNQ).
- b) Avaliar as propriedades eletrocatalíticas do eletrodo modificado e as condições ótimas de resposta para GSH, tais como: pH, influência do eletrólito suporte, potencial aplicado, tampões e faixa de resposta linear.
- c) Aplicar o sensor otimizado na determinação de GSH em amostras de eritrócitos após a lise dos mesmos.
- d) Comparar o método amperométrico desenvolvido com o método espectrofotométrico.



**Parte  
Experimental**

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### III.1. Reagentes e Materiais

Glutationa (GSH), Tris(hidroximetil) aminometano (TRIS), N-(2-hidroxietil) Piperazina-N,N'-bis(2-ácido etanossulfônico) (HEPES), Piperazina-N,N'-bis-(2-ácido etanossulfônico) (PIPES) e ácido 5-sulfosalicílico foram adquiridos da Sigma (St. Louis, USA), Tetracianoquinodimetano (TCNQ), Tetratiofulvaleno (TTF) e ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DNTB) foram adquiridos da Acros Organics (New Jersey, USA). Acetonitrila foi adquirido da Nuclear (São Paulo, Brasil) e destilado antes de ser usado [108].

Pó de grafite 99,9% e solução de Nafion<sup>®</sup> 5% (m/v) foram adquiridos da Aldrich (Millwaukee, USA) e o Nujol (óleo mineral) foi adquirido da Schering-Plough (São Paulo, Brasil). Estes foram utilizados na preparação do eletrodo de pasta de carbono (EPC).

Sais como KCl, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> foram adquiridos da Labsynth, (São Paulo, Brasil) e Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>EDTA adquirido da Nuclear (São Paulo, Brasil).

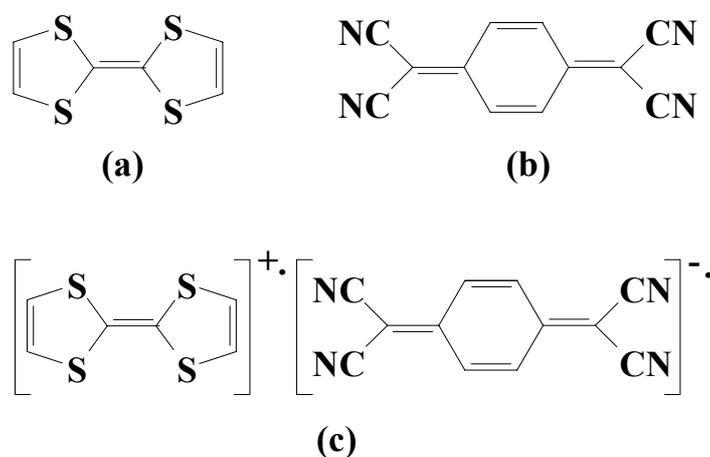
Para os estudos de interferência foram utilizados: ácido ascórbico da J. T. Baker (New York, USA), glicina, cisteína e β-D-glicose foram obtidos da Sigma (St. Louis, USA), ácido glutâmico da Fisher Scientific Company (USA).

Todos os demais reagentes foram de grau analítico e preparados em água deionizada (> 18MΩ) pelo sistema Milli-Q da Millipore.

A eliminação de oxigênio ( $O_2$ ) dissolvido foi feita pelo burbulhamento de nitrogênio nas soluções durante 10 minutos antes das medidas.

### III.2. Preparação do Complexo TTF-TCNQ

O complexo TTF-TCNQ foi obtido seguindo o procedimento descrito por Jaeger *et al.* [85]. Num balão de duas bocas de 10 mL equipado com barra magnética e condensador, foram colocados sob atmosfera de Nitrogênio 0,12 mmol de TTF (**Figura III.1(a)**) e 0,12 mmol de TCNQ (**Figura III.1(b)**), os quais foram dissolvidos em 2,5 mL de acetonitrila anidro (previamente destilada). Em seguida foi aquecido até 60 °C sob banho de água por 40 minutos. Um precipitado preto do complexo TTF-TCNQ (**Figura III.1(c)**) foi formado imediatamente como um pó microcristalino. Estes cristais foram lavados com acetonitrila fria a temperatura ambiente e em seguida com éter etílico frio para eliminar os materiais de partida que não reagiram.



**Figura III.1.** (a) Tetratiofulvaleno (TTF), (b) Tetracianoquinodimetano (TCNQ) e (c) complexo TTF-TCNQ.

O complexo obtido foi caracterizado por três técnicas:

- Por análise elementar, utilizando-se um Analisador Elementar CHSN da Perkin-Elmer (modelo 2400).
- Por Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIV), para isto um espectrofotômetro FTIV Bomem modelo B100 foi utilizado. Os espectros de infravermelho foram obtidos a partir de pastilhas de KBr, contendo o complexo TTF-TCNQ disperso na proporção de 100 partes de KBr para uma do complexo. Os espectros foram obtidos no intervalo de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com 20 varreduras  $\text{min}^{-1}$  e com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .
- Por Espectroscopia UV-visível, utilizando cela de quartzo. Os espectros UV-visível foram obtidos a partir das soluções de TTF, TCNQ e do complexo TTF-TCNQ dissolvidos em dimetilsulfóxido numa

concentração de  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Os espectros foram obtidos na faixa de 200 a 1000 nm.

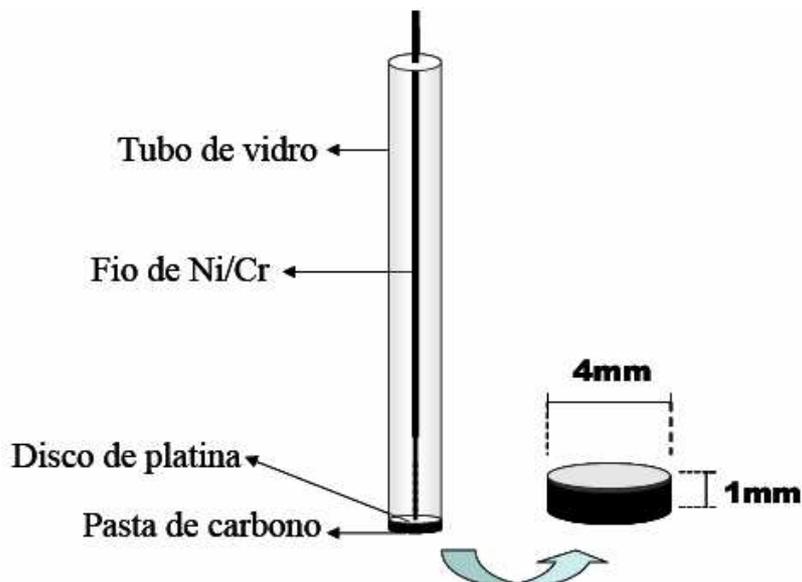
### **III.3. Preparação do Eletrodo de Pasta de Carbono Quimicamente Modificado com TTF-TCNQ**

O eletrodo de trabalho inicialmente foi preparado misturando-se 40 mg de grafite em pó com o complexo TTF-TCNQ. Após homogeneização, foram adicionadas duas gotas de Nujol e 30  $\mu\text{L}$  de solução de Nafion 0,5% (m/v), homogeneizando novamente até obter uma pasta consistente.

Com o objetivo de verificar o efeito da concentração do complexo TTF-TCNQ na pasta, diferentes proporções deste (5, 10, 20 e 30% (m/m)) foram testadas. Estudos para verificar a influência de Nafion na resposta do sensor também foram realizados, assim diferentes diluições deste (0, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4 e 5% (m/v)) foram testadas na preparação do eletrodo de trabalho.

O eletrodo de trabalho foi preparado no laboratório, constituído de um tubo de vidro de 12 cm de comprimento com um diâmetro interno de 4,0 mm. No qual foi colocada uma lamina de Pt a uma profundidade de 1 mm, como mostrado na **Figura III.2**.

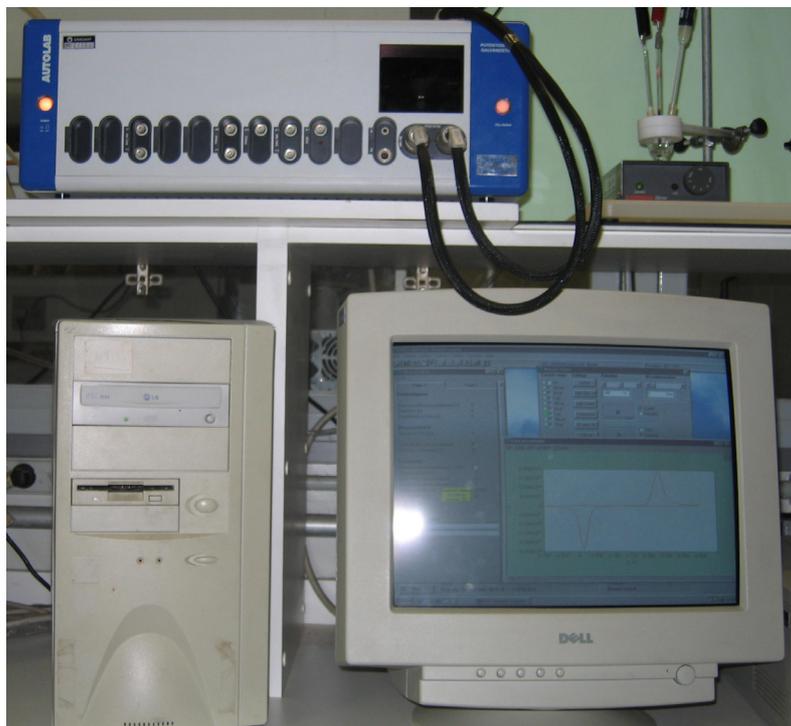
Finalmente, a pasta foi transferida para a cavidade da extremidade inferior do tubo de vidro e logo foi polida sobre papel sulfite apoiado em placa de vidro lisa. Obtendo-se desta forma o eletrodo de pasta de carbono modificado, o qual foi denotado como EPC/TTF-TCNQ.



**Figura III.2.** Eletrodo de pasta de carbono modificado com o complexo TTF-TCNQ.

### III.4. Instrumentação e Célula Eletroquímica

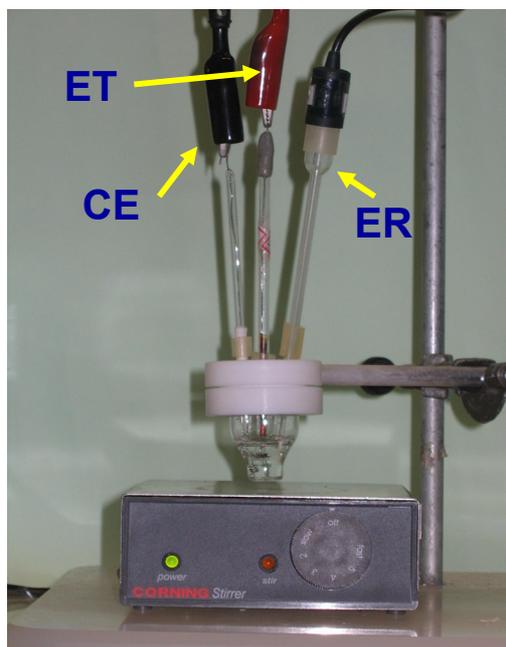
As medidas voltamétricas e amperométricas foram realizadas com auxílio de um potenciostato da *Eco Chemie* (Autolab<sup>®</sup> modelo PGSTAT 30), Utrecht, Netherlands; interfaciado a um microcomputador com software GPES 4.9 para controle de potencial, aquisição e tratamento de dados como mostrado na **Figura III.3**.



**Figura III.3.** Aparelhagem utilizada para as medidas eletroquímicas.

O sistema utilizado foi constituído de uma célula eletroquímica de três eletrodos com 2,5 mL de capacidade (**Figura III.4**), como eletrodo de referência utilizou-se o eletrodo de calomelano saturado (ECS); como eletrodo auxiliar uma espiral de platina e como eletrodo de trabalho o eletrodo de pasta de carbono modificado. Empregou-se um pH/Analisador de íons da *Corning* modelo 350 com eletrodo combinado de vidro também da *Corning* para as medidas de pH.

Um frasco lavador contendo amalgama de Zn(Hg) em solução ácida ( $\text{HCl } 2 \text{ mol L}^{-1}$ ) contendo  $\text{Cr}^{2+}$  foi utilizado para remoção de eventual  $\text{O}_2$  presente no nitrogênio.



**Figura III.4.** Célula de três eletrodos utilizada nas medidas eletroquímicas. ER = eletrodo de referência - ECS, ET = eletrodo de trabalho, CE = contra eletrodo - espiral de Pt.

### III.5. Tratamento da Amostra de Sangue

Para o tratamento do sangue foi seguido o procedimento proposto por Habib *et al.* [109]. O sangue foi coletado em tubos contendo heparina para evitar a coagulação, em seguida foi centrifugado a 1000 g por 10 minutos a uma temperatura de 4 °C. O plasma e os ácidos graxos foram eliminados, e os eritrócitos separados foram lavados com uma solução gelada de tampão fosfato de sódio 0,2 mol L<sup>-1</sup> contendo 0,9% de NaCl a pH 7,4 (esta é uma solução isotônica similar ao plasma sanguíneo, o qual evita que a forma e estrutura dos eritrócitos se alterem e se litem). Em seguida a solução de

---

lavagem foi separada e descartada dos eritrócitos por centrifugação a 1000 g durante 10 minutos a 4 °C. Este procedimento foi realizado três vezes, até que a solução de lavagem ficasse límpida.

O processo de lise dos eritrócitos foi realizado misturando-se proporções iguais de eritrócitos e água gelada (1:1 (v/v)), e logo foram deixados em gelo por 10 minutos produzindo-se a hemólise [110]. Em seguida o hemolisado obtido foi desproteínizado pela adição de uma solução de ácido 5-sulfosalicílico a 10% (m/v), numa proporção de hemolisado e ácido de 2:1 (v/v) [111]. Finalmente, o sobrenadante livre de proteína obtido após centrifugação a 1000 g por 5 minutos, foi colocado em tubos Eppendorf e armazenado em biofreezer a -70 °C até a realização das análises.

A utilização de amostras de sangue foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP (Parecer Projeto N<sup>o</sup> 302/2000).

Na manipulação da coleta de amostras de sangue, foram utilizadas luvas como prevenção de infecção para o coletador e o paciente. As agulhas devem ser manipuladas de forma extremamente cuidadosa, e descartadas em um recipiente rígido, resistente a perfuração dotado de tampa. Estes recipientes devem ser preenchidos somente até cerca de 3/4 do volume e podem conter uma solução de hipoclorito de sódio a 2% (m/v).

As amostras de sangue podem ser descartadas no esgoto sanitário caso a legislação local o permita, e extremo cuidado deve ser usado neste descarte para evitar respingos.

### III.6. Avaliação e Otimização do EPC/TTF-TCNQ

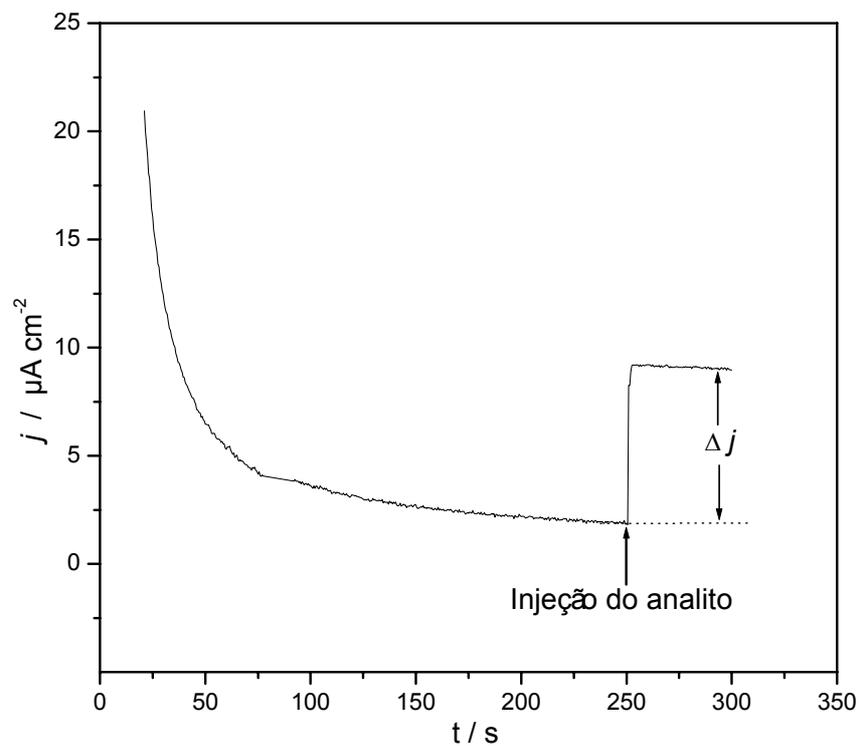
O comportamento eletroquímico do EPC/TTF-TCNQ foi avaliado por técnica voltamétrica e amperométrica. Os parâmetros que influenciam na estabilidade, sensibilidade e resposta do eletrodo modificado foram avaliados, tais como: a faixa de potencial, tipo do eletrólito de suporte (KCl, NaCl, LiCl, NH<sub>4</sub>Cl, CaCl<sub>2</sub>, KNO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), concentração do eletrólito de suporte, pH e composição do tampão. A resposta para a determinação da glutatona no eletrodo foi otimizada, para isto parâmetros tais como: pH, tampões, e potencial aplicado, também foram estudados.

Conhecendo-se as condições ótimas de trabalho do eletrodo, partiu-se para a obtenção da curva analítica (concentração *vs.* resposta), a qual fornece informações importantes, tais como: sensibilidade, intervalo de resposta linear, limite de detecção e tempo de resposta [86].

A curva de calibração do eletrodo modificado foi feita por adições sucessivas da solução padrão de glutatona na célula eletroquímica e medindo-se a corrente como resposta. O experimento foi iniciado com o registro da corrente em função do tempo, num dado potencial aplicado, na presença da solução tampão sem o analito, até a corrente alcançar um valor constante, o qual é chamada de corrente de fundo ou corrente residual. Uma vez alcançado uma corrente constante, uma concentração do analito foi adicionada e com o auxílio de um agitador magnético fez-se a homogeneização da solução por 5 segundos, após esse tempo registrou-se o aumento da corrente em função do tempo.

As respostas foram calculadas em função da variação da densidade de corrente obtida quando adicionado o analito na célula eletroquímica, como se mostra na **Figura III.5**.

A curva de calibração foi obtida por adições sucessivas de concentrações conhecidas de glutatona na célula eletroquímica, o qual fornece um valor de  $\Delta j$  para cada concentração. Desta forma, somando-se as variações em densidade de corrente para as demais adições, foram construídos os gráficos de  $\Delta j$  vs. Concentração.



**Figura III.5.** Resposta ( $\Delta j$ ) do sensor num cronoamperograma em função da concentração [86],  $E_{\text{ap}} = 200$  mV vs. ECS.

### **III.6.1. Avaliação da Estabilidade e o Tempo de Vida do Eletrodo**

Para avaliar a estabilidade do sensor, realizaram-se várias medidas consecutivas com o mesmo eletrodo, e as respostas foram comparadas ao longo das medidas. Os valores de resposta obtidos inicialmente foram considerados como 100%.

Já para o tempo de vida do eletrodo, foram realizadas medidas com este durante vários meses. Durante o período de avaliação do tempo de vida do sensor, este foi armazenado em temperatura ambiente a seco.

### **III.7. Aplicação do Eletrodo para Determinação de GSH em Eritrócitos**

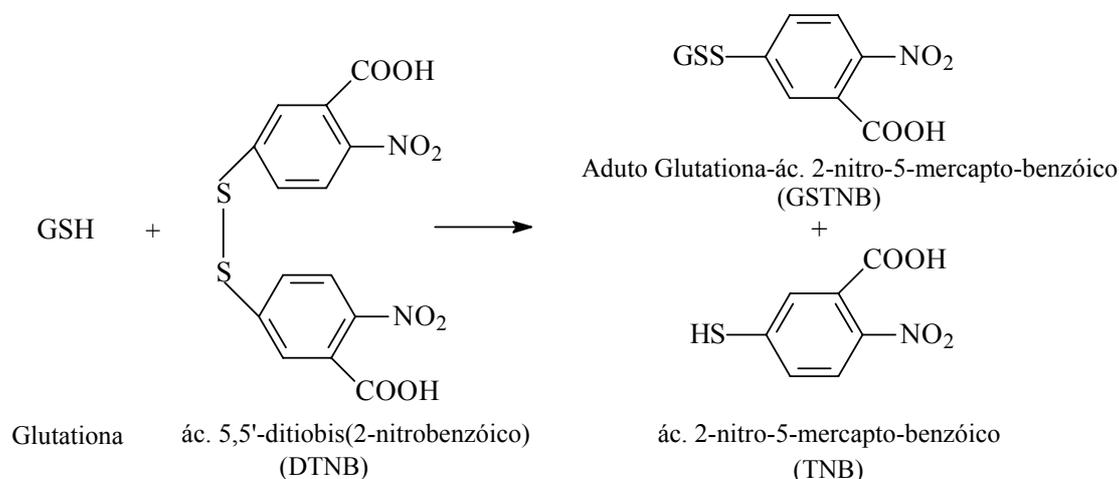
A concentração de GSH em lisado de eritrócitos foi determinada pelo método de adição padrão. Para isto um volume de hemolisado desproteinizado (obtidos no item III.5) de 20 $\mu$ L foi adicionado à célula de medida e registrada a corrente, seguidamente foram realizadas três adições sucessivas de padrão (20  $\mu$ L) e registrados os respectivos valores de corrente.

A célula eletroquímica de medida contém 2,5 mL de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0), 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>EDTA. Um potencial de 200 mV vs. ECS foi aplicado durante as medidas e as correntes de oxidação foram registradas.

### **III.8. Determinação Espectrofotométrica da GSH em Eritrócitos**

O método espectrofotométrico foi utilizado como método de comparação para a determinação de GSH em lisado de eritrócitos. As medidas espectrofotométricas foram efetuadas em um espectrofotômetro UV/Visível da *Pharmacia Biotech*, modelo Ultrospec 2000, usando-se cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico e 4,5 mL de capacidade total.

O princípio do método espectrofotométrico para a determinação de glutathiona consiste na reação entre o ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) chamado de reagente de Ellman's como substância cromogênica [55], e a glutathiona. O DTNB é específico para oxidar a glutathiona, o qual gera o composto ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB), de coloração amarela, como é mostrado na **Figura III.6**, e a absorbância do TNB é medida a 412 nm, sendo a variação na coloração proporcional à concentração da glutathiona.



**Figura III.6.** Reação entre a Glutathiona e o DTNB originando o TNB que é monitorado a 412 nm.

A determinação espectrofotométrica de GSH em lisado de eritrócitos foi realizada seguindo o procedimento proposto por Anderson [111]. Os reagentes utilizados para este procedimento foram: tampão fosfato de sódio  $143 \text{ mmol L}^{-1}$  contendo  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$   $6,3 \text{ mmol L}^{-1}$ , ajustado a pH 7,5; solução de DTNB na concentração de  $6 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato pH 7,5; soluções estoque de GSH nas concentrações de  $P_1 = 0,35$ ,  $P_2 = 0,7$ ,  $P_3 = 1,05$ ,  $P_4 = 1,4$  e  $P_5 = 1,75 \text{ mmol L}^{-1}$  dissolvidos em solução de ácido 5-sulfosalicílico 10% (m/v).

Para a obtenção da curva analítica foram colocadas na cubeta espectrofotométrica: solução tampão (2,45 mL), solução de DTNB (350  $\mu\text{L}$ ), água (600  $\mu\text{L}$ ) e 100  $\mu\text{L}$  de cada solução estoque de GSH ( $P_1$  a  $P_5$ ) as mesmas representam concentrações de 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{mol L}^{-1}$  na cubeta. A determinação de GSH na amostra foi realizada por adição padrão e

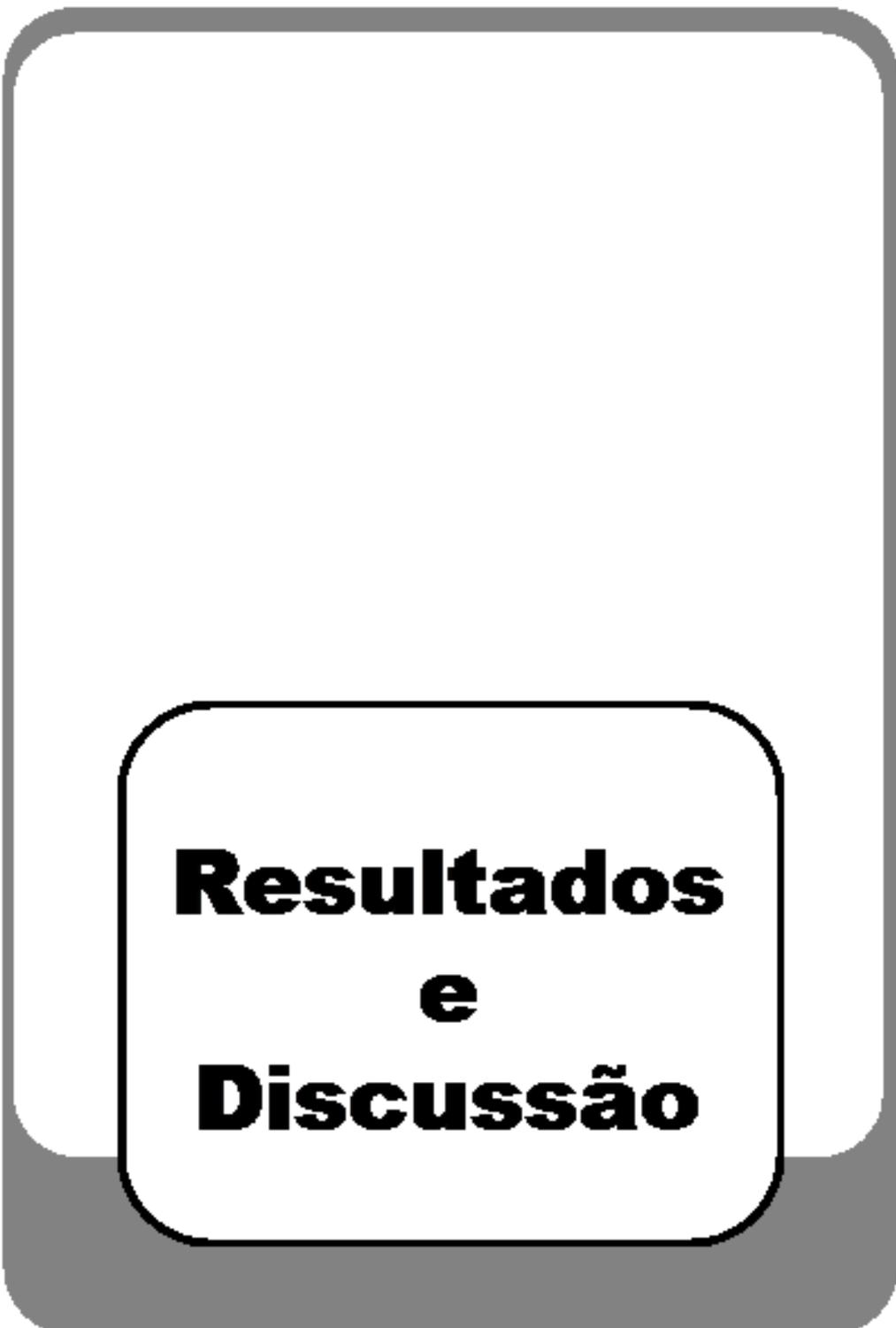
as quantidades para a preparação das cubetas estão indicadas na **Tabela III.1**.

**Tabela III.1.** Quantidades utilizadas na preparação das cubetas de medida espectrofotométrica para a determinação de glutathiona.

	Branco	P <sub>0</sub>	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	P <sub>5</sub>
Tampão (mL)	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45	2,45
Água (μL)	700	675	575	575	575	575	575
Padrão (μL)	---	---	100	100	100	100	100
Amostra (μL)	---	25	25	25	25	25	25
DTNB (μL)	350	350	350	350	350	350	350

### III.9. Estudos de Recuperação

Testes de recuperação para três diferentes amostras foram realizados em triplicata da seguinte forma: Quantidades iguais do eritrócito obtido após a centrifugação do sangue foram colocadas em tubos diferentes, o primeiro tubo de cada amostra foi utilizado como controle e nos outros tubos foram colocadas quantidades conhecidas de glutathiona. Os processos de hemólise e precipitação protéica foram realizados como descrito anteriormente no item III.5. Uma vez finalizada a etapa de tratamento da amostra, as medidas espectrofotométricas e amperométricas foram realizadas.



**Resultados  
e  
Discussão**

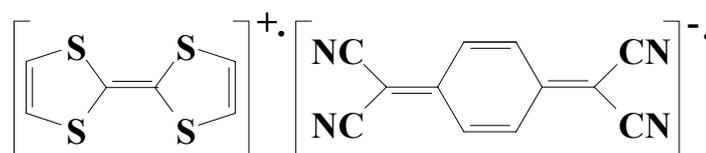
## IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.

### IV.1. Síntese do Complexo TTF-TCNQ

O complexo TTF-TCNQ obtido, sintetizado como indicado na parte experimental seguindo o procedimento descrito por Jaeger *et al.* [85], resultou na formação de um pó microcristalino preto.

Os compostos iniciais de TTF e TCNQ que não reagiram foram eliminados na lavagem, já que eles são altamente solúveis na solução de acetonitrila a frio. O rendimento da síntese do complexo foi de 92%.

O complexo sintetizado foi caracterizado por análise elementar, Infravermelho e UV/Visível. Os resultados experimentais obtidos por análise elementar foram: C = 51,77%, H = 1,74%, N = 13,26% e S = 33,23%. Estes resultados são muito próximos aos valores teóricos do complexo TTF-TCNQ ((C<sub>18</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>S<sub>4</sub>), C = 52,92%, H = 1,97%, N = 13,71% e S = 31,39%), o qual confirma a obtenção do complexo numa proporção molar de 1:1 como mostrado na **Figura IV.1** [112].



**Figura IV.1.** Estrutura do complexo TTF-TCNQ.

Com objetivo de caracterizar o produto, espectros de infravermelho foram obtidos para os compostos de partida TTF e TCNQ e para o complexo

TTF-TCNQ, em KBr. Os valores das bandas mais importantes para o TTF e TCNQ são apresentados na **Tabela IV.1** e os do complexo TTF-TCNQ são apresentados na **Tabela IV.2**. Observa-se que os valores das bandas registrados para o complexo TTF-TCNQ estão em concordância como os registrados na literatura por Wheland e Gillson [113], assim também muito próximo dos valores registrados para os compostos de partida, do qual podemos confirmar a obtenção do complexo TTF-TCNQ.

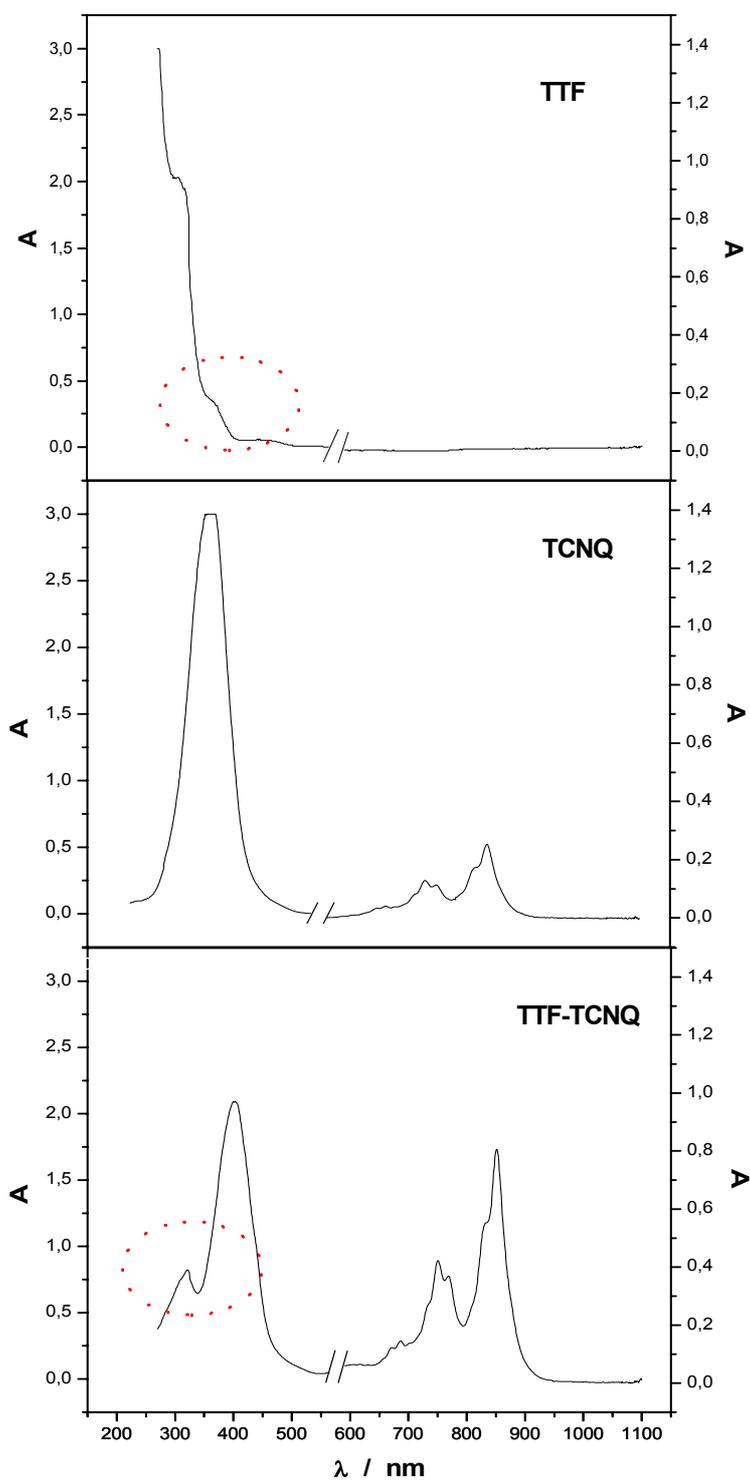
**Tabela IV.1.** Valores das bandas dos espectros de FTIV dos compostos TTF, TCNQ em KBr.

Composto	Ligação	Valores Obtidos	Valores da Literatura [114]
TCNQ	$C \equiv N$	2.223	2.260 - 2.240
	$C - H$	861	900 - 675
	$C = C - H$	3.052; 1.542	3.000 e 1.600
	$C - C$	1.352; 1.115	1.300 - 800
TTF	$C - S$	631	700 - 600
	$C - H$	778	900 - 675
	$C = C - H$	3.062; 1.660	3.000 e 1.600

**Tabela IV.2.** Valores das bandas dos espectros de FTIV do complexo TTF-TCNQ em KBr.

Composto	Ligação	Valores Obtidos	Valores da Literatura [113]
TTF-TCNQ	$C \equiv N$	2.204	2.250
	$C-H$	811	825
	$C=C-H$	3.073	---
	$C-C$	1.100	1.089
	$C-S$	703	725

Espectros de UV/Vis foram obtidos para o complexo TTF-TCNQ e os compostos de partida TTF e TCNQ, dissolvidos em dimetilsulfóxido grau espectroscópico (**Figura IV.2**). Observam-se quatro bandas de absorção para o complexo TTF-TCNQ em 320, 400, 750 e 850 nm, as mesmas que também foram observadas nos compostos de partida, TTF (370 nm) e TCNQ (360, 740 e 840 nm). Indicando por tanto a presença do TTF e TCNQ na formação do complexo.



**Figura IV.2.** Espectros de absorção UV-visível das soluções de TTF, TCNQ e TTF-TCNQ dissolvidos em dimetilsulfóxido.

## IV.2. Propriedades Eletroquímicas do EPC/TTF-TCNQ

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica muito utilizada para caracterizar os eletrodos modificados, fornecendo informações sobre as reações de óxido/redução nos eletrodos. Assim, voltamogramas cíclicos foram registrados para os eletrodos de pasta de carbono sem modificar e modificado com o complexo TTF-TCNQ (com 10% TTF-TCNQ).

Estudos de voltametria cíclica foram realizados em diferentes intervalos de potencial em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0 a uma velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>. Foi encontrado que na faixa de potencial de -150 a 350 mV, o eletrodo apresentou picos de óxido/redução que se mostraram estáveis em varreduras cíclicas sucessivas.

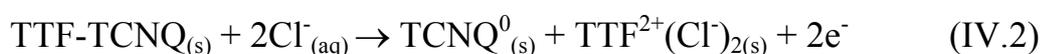
Em seguida foi ampliada a faixa de varredura para potenciais mais negativos e mais positivos, encontrando-se outros picos de oxidação e redução que não foram estáveis a sucessivos ciclos. O aparecimento destes picos para eletrodos constituídos de cristais de TTF-TCNQ tem sido descrito na literatura [85, 115]. Assim, quando a faixa de potencial é iniciada em potenciais catódicos mais negativos que -300 mV, origina-se a redução do complexo TTF-TCNQ na superfície do eletrodo, formando os compostos TTF<sup>0</sup> e TCNQ<sup>-</sup>, como indicado na equação IV.1:



uma vez formados estes compostos (TTF<sup>0</sup> e TCNQ<sup>-</sup>) na superfície do eletrodo e seguindo com a varredura do potencial na direção positiva, dois

picos de oxidação são observados, os quais são devidos à oxidação do  $\text{TTF}^0$  a  $\text{TTF}^+$  e  $\text{TCNQ}^-$  a  $\text{TCNQ}^0$ .

Por outro lado, quando a faixa de potencial é iniciada em potenciais anódicos mais positivos que 490 mV, ocorre a oxidação do complexo TTF-TCNQ na superfície do eletrodo, formando-se os compostos  $\text{TCNQ}^0$  e  $\text{TTF}^{2+}$ , como mostrado na seguinte equação IV.2:



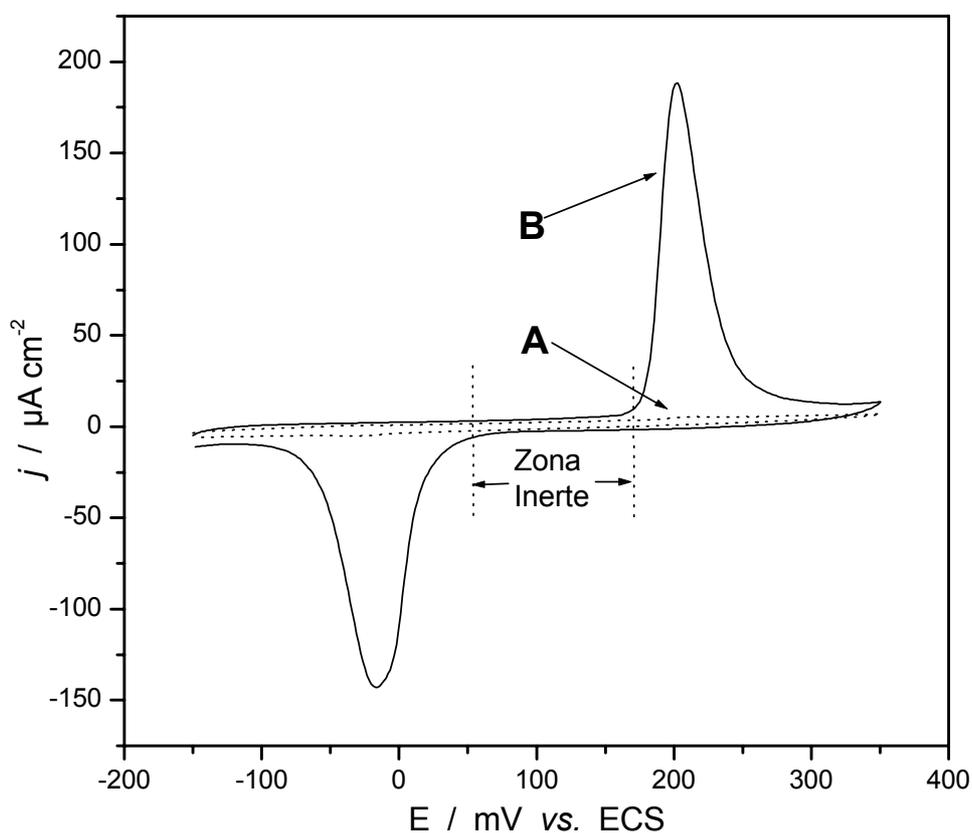
assim, quando formados os compostos  $\text{TCNQ}^0$  e  $\text{TTF}^{2+}$  na superfície do eletrodo e seguindo com a varredura do potencial na direção negativa, picos de redução também são observados, devido à redução do  $\text{TCNQ}^0$  a  $\text{TCNQ}^-$ , do  $\text{TTF}^{2+}$  a  $\text{TTF}^+$  e do  $\text{TTF}^+$  a  $\text{TTF}^0$ .

No presente trabalho o eletrodo de pasta de carbono modificado com o complexo TTF-TCNQ apresentou um comportamento similar ao descrito acima, isto é, quando a faixa de varredura de potencial foi ampliada para valores mais negativos que -150 mV e mais positivos que 350 mV, os picos resultantes apresentaram alta instabilidade quando mais de uma varredura cíclica foi realizada, além de se observar a lixiviação do complexo para a solução.

Desta forma a faixa de potencial onde o eletrodo apresentou-se altamente estável foi entre -150 a 350 mV vs. ECS, e somente um pico de oxidação e um pico de redução foram observados, correspondentes ao par redox  $\text{TCNQ}^-/\text{TCNQ}^0$ , sendo que o  $\text{TTF}^0$  não é formado na superfície do eletrodo nessa faixa de potencial de trabalho, conseqüentemente nenhum pico de oxidação e redução correspondente ao par redox  $\text{TTF}^0/\text{TTF}^+$  é

verificado, e nenhuma lixiviação do complexo foi observada. Estes resultados estão em concordância com os estudos realizados por Scaboo *et al.* [95], quando o potencial é fixado numa faixa de potencial onde o eletrodo é estável.

Assim, na **Figura IV.3** são apresentados os voltamogramas cíclicos para os eletrodos de pasta de carbono modificado com o complexo TTF-TCNQ e sem modificar, na faixa de potencial de -150 mV a 350 mV *vs.* ECS.



**Figura IV.3.** Voltamogramas cíclicos do eletrodo de pasta de carbono não modificado (**A**) e modificado com o complexo TTF-TCNQ (**B**). Em 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  KCl, pH 7,0, velocidade de varredura de 20  $\text{mV s}^{-1}$ .

Para o eletrodo de pasta de carbono sem modificar (**Figura IV.3(A)**) nenhum pico é observado naquela região de potencial, já para o eletrodo de pasta de carbono modificado, o voltamograma cíclico apresentou um par redox correspondente à oxidação ( $E_{pa} = 205$  mV) e redução ( $E_{pc} = -15$  mV) do complexo TTF-TCNQ como mostrado na **Figura IV.3(B)**, com potencial médio ( $E_m$ ) de 95 mV vs. ECS. Onde  $E_m = (E_{pa} + E_{pc})/2$ , sendo que  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$  são os potenciais de pico anódico e catódico, respectivamente. Estes resultados são similares aos descritos na literatura [85].

Observa-se também no voltamograma da **Figura IV.3(B)**, que existe uma zona entre os picos de redução e oxidação chamada de “zona inerte”, isto é, uma faixa de varredura de potencial onde nenhuma reação redox ocorre. Este comportamento é característico para o cristal de TCNQ imobilizado na superfície do eletrodo e isto não ocorre quando o TCNQ esta em solução [93, 116]. Esta zona inerte é explicada pela necessidade de um sobrepotencial crítico (nucleação) [93], embora esta zona inerte seja um pouco ampla as correntes de pico ( $I_{red}$  e  $I_{ox}$ ) apresentam cargas similares, indicando um alto grau de reversibilidade química [93].

Na **Figura IV.3 (B)** observa-se também a formação de dois picos: o pico de redução que é acompanhado pela inserção de cátions na rede cristalina, e o pico de oxidação que é acompanhado pela exclusão destes cátions [97], como descrito na seguinte equação (IV.3):

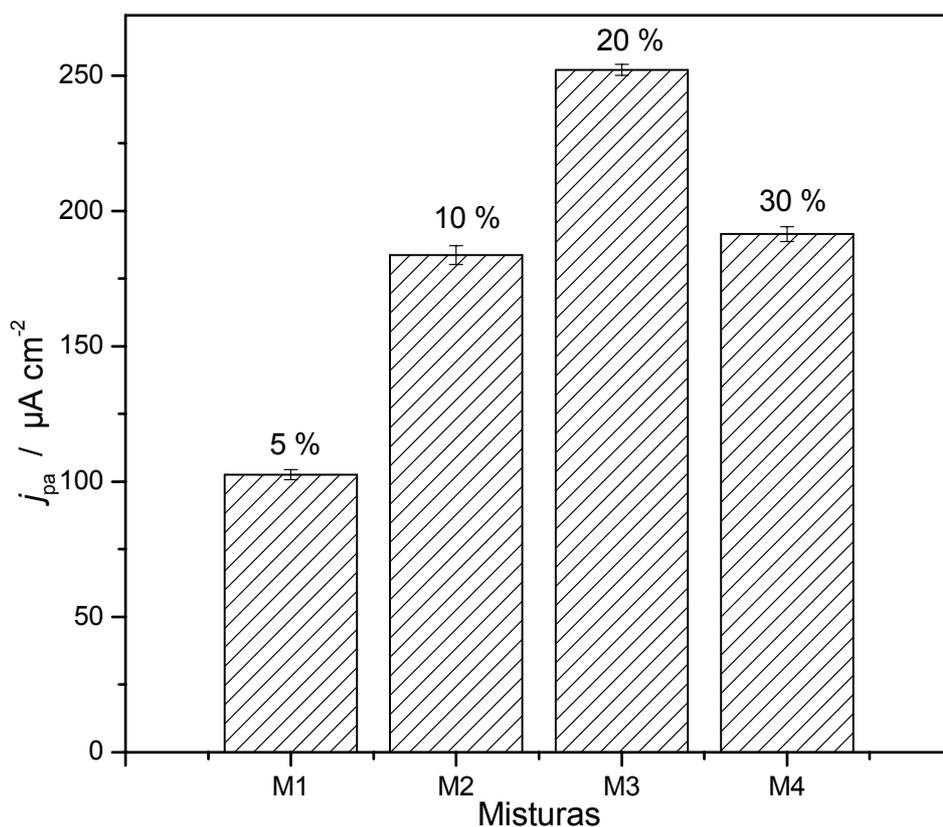


Portanto, a presença de cátions na solução é fundamental para o desenvolvimento do processo redox.

### IV.3. Otimização do EPC/TTF-TCNQ

#### IV.3.1. Avaliação da Influência da Quantidade do Complexo TTF-TCNQ na Composição da Pasta

Com o objetivo de otimizar a preparação do eletrodo, a quantidade do complexo TTF-TCNQ na pasta foi estudada, e os resultados obtidos são mostrados na **Figura IV.4**.



**Figura IV.4.** Resposta do eletrodo para diferentes porcentagens de TTF-TCNQ na pasta de carbono. Em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl, pH 7,0 velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Pode-se observar que há um aumento da corrente de pico quando a quantidade do TTF-TCNQ é acrescentado na pasta até atingir um máximo de corrente para uma proporção de 20% (m/m) de TTF-TCNQ (10 mg do complexo TTF-TCNQ com 40 mg de grafite) na pasta. No entanto a **Figura IV.4** também mostra que após atingir este máximo a corrente diminui. Esta diminuição da corrente nos indica uma menor condutividade elétrica da pasta, pois há um compromisso entre as quantidades do complexo TTF-TCNQ e o grafite, este mesmo comportamento foi observado por Martorell *et al.* [117] no desenvolvimento de um biossensor a base de grafite e TCNQ, assim como por Gunasingham *et al.* [118] no desenvolvimento de um biossensor a base de grafite e TTF.

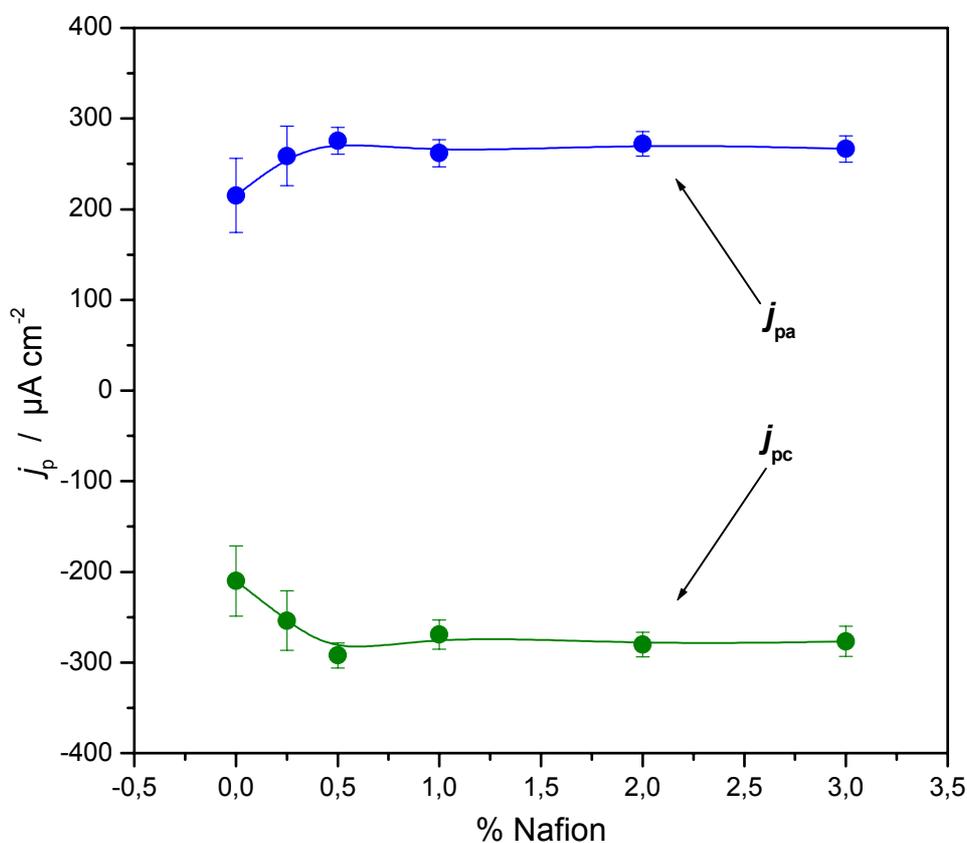
### **IV.3.2. Estudo da incorporação e otimização da quantidade do Nafion no Eletrodo**

O Nafion foi utilizado na preparação da pasta de carbono junto ao complexo TTF-TCNQ e nujol, com o objetivo de obter uma melhor estabilidade do eletrodo, isto porque durante contínuas varreduras cíclicas foi observado um pequeno decréscimo das correntes de oxidação e redução. Provavelmente porque os sais do TCNQ têm uma pequena solubilidade em água [119, 120].

Assim, quando o Nafion foi colocado na pasta, observou-se uma maior estabilidade do eletrodo. Provavelmente isto se deva a que os grupos sulfônicos do Nafion segurem o composto TTF<sup>+</sup> liberado durante a oxidação do complexo TTF-TCNQ na qual o TCNQ é formado. Durante o processo

de redução quando novamente o TCNQ<sup>-</sup> é formado, este é estabilizado pelo TTF<sup>+</sup> segurado pelo Nafion, desta forma não há perda de material para a solução.

Assim, também foi otimizada a concentração do Nafion na pasta. Na **Figura IV.5** é apresentada a variação das correntes de oxidação e redução em função das diferentes concentrações de Nafion após 50 ciclos.



**Figura IV.5.** Resposta do eletrodo para diferentes concentrações de Nafion no eletrodo de pasta de carbono modificado com TTF-TCNQ. Em 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>.

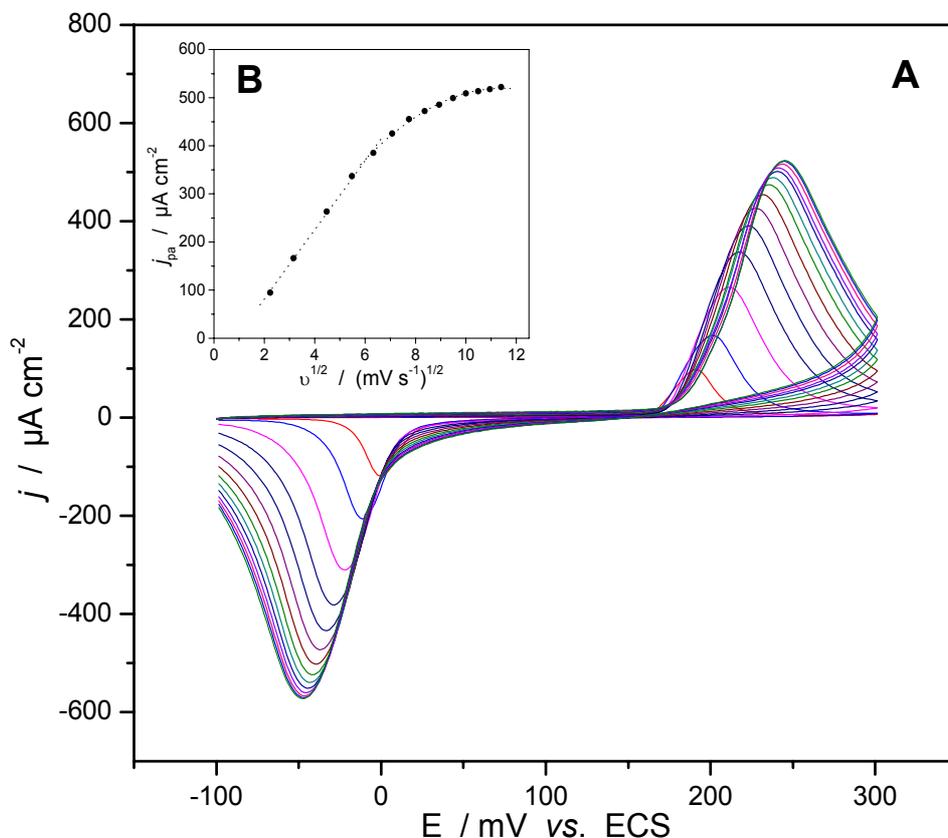
---

Pode-se observar que em concentrações menores que 0,5%, correntes menores são registradas e além disso o desvio padrão das medidas é alto, indicando instabilidade do eletrodo. Já para concentrações acima de 0,5% a corrente se manteve constante e a estabilidade é verificada pelo baixo valor do desvio padrão relativo das medidas.

Desta forma na preparação do eletrodo foi escolhida uma quantidade de 0,5% (m/v) de Nafion na pasta.

### **IV.3.3. Influência da Velocidade de Varredura no Comportamento Eletroquímico do EPC/TTF-TCNQ**

O efeito da velocidade de varredura foi estudado em solução de KCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,0. Assim, na **Figura IV.6(A)** mostram-se os voltamogramas cíclicos obtidos com o eletrodo modificado em diferentes velocidades de varredura (5 a 130 mV s<sup>-1</sup>).



**Figura IV.6.** (A) Voltamogramas cíclicos do EPC/TTF-TCNQ a diferentes velocidades de varredura. (B) Densidade de corrente de pico anódico vs. a raiz quadrada da velocidade de varredura. Em  $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ , pH 7,0.

Observa-se nos voltamogramas que com o aumento da velocidade de varredura há um aumento na separação de pico ( $\Delta E_p$ ). Fazendo-se o gráfico da corrente de pico em função da raiz quadrada da velocidade de varredura ( $v^{1/2}$ ), observou-se uma correlação linear para velocidades abaixo de  $50 \text{ mV s}^{-1}$  (**Figura IV.6(B)**) indicando que o processo é controlado por difusão. Já para velocidades de varredura maiores que  $50 \text{ mV s}^{-1}$ , os valores da corrente foram praticamente constantes. Este comportamento a baixas velocidades de

varredura é provavelmente devido à difusão de íons do eletrólito de suporte ( $K^+$ ) através da rede cristalina do complexo TTF-TCNQ, o qual deve ser a responsável pela manutenção da eletroneutralidade [116]. Porém, em velocidades de varredura maiores que  $50 \text{ mV s}^{-1}$  este comportamento não é observado, pois o eletrólito não tem tempo suficiente para difundir-se através da rede cristalina. Este comportamento também pode ser verificado pelo aumento na separação dos picos, o que indica a dificuldade da entrada e saída do eletrólito durante o processo redox.

#### **IV.3.4. Influência da Natureza e Concentração do Eletrólito de Suporte no Comportamento Eletroquímico do EPC/TTF-TCNQ**

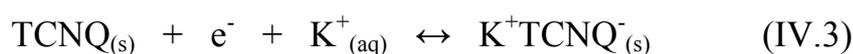
A influência do eletrólito suporte também foi estudada em relação a separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e o potencial médio ( $E_m$ ). Na **Tabela IV.3** pode-se observar que os parâmetros  $\Delta E_p$  e  $E_m$  dependem do tipo de cátion. Com o íon  $Li^+$  nenhuma corrente de pico foi observada, mostrando que este íon bloqueia a resposta do eletrodo [85], isto pode ser devido a sua dificuldade de interagir com o  $TCNQ^-$  por estar fortemente hidratado, limitando sua capacidade de entrada e saída no retículo cristalino e conseqüentemente nenhuma corrente foi observada. Com o íon  $Ca^{2+}$  observou-se uma diminuição da corrente quando sucessivas varreduras cíclicas foram realizadas, indicando uma solubilização parcial do complexo TTF-TCNQ [93].

**Tabela IV.3.** Influência dos cátions sobre a separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e o potencial médio ( $E_m$ ). Concentração dos cátions  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 7,0, obtido para EPC/TTF-TCNQ a velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Eletrólito de suporte	$\Delta E_p / \text{mV}$	$E_m / \text{mV}$	$I_{pa} / \mu\text{A}$	$I_{pc} / \mu\text{A}$
$\text{K}^+$	220	90	$32,2 \pm 0,2$	$31,6 \pm 0,2$
$\text{Na}^+$	240	90	$29,3 \pm 0,1$	$30,8 \pm 0,2$
$\text{Li}^+$	----	----	----	----
$\text{NH}_4^+$	200	50	$23,7 \pm 0,5$	$25,2 \pm 0,6$
$\text{Ca}^{2+}$	170	35	$8,7 \pm 0,3$	$9,6 \pm 0,4$

A influência do ânion na resposta do eletrodo também foi avaliada, para isto ânions dos sais de potássio foram utilizados. Assim pode-se observar pelos valores da **Tabela IV.4** que os ânions não tem influência na separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e no potencial médio ( $E_m$ ), este resultado mostrou-se concordante com os obtidos por Bond *et al.* [93].

Estes resultados sugerem que os ânions não participam do processo redox, e isto justifica sua omissão na equação (IV.3).

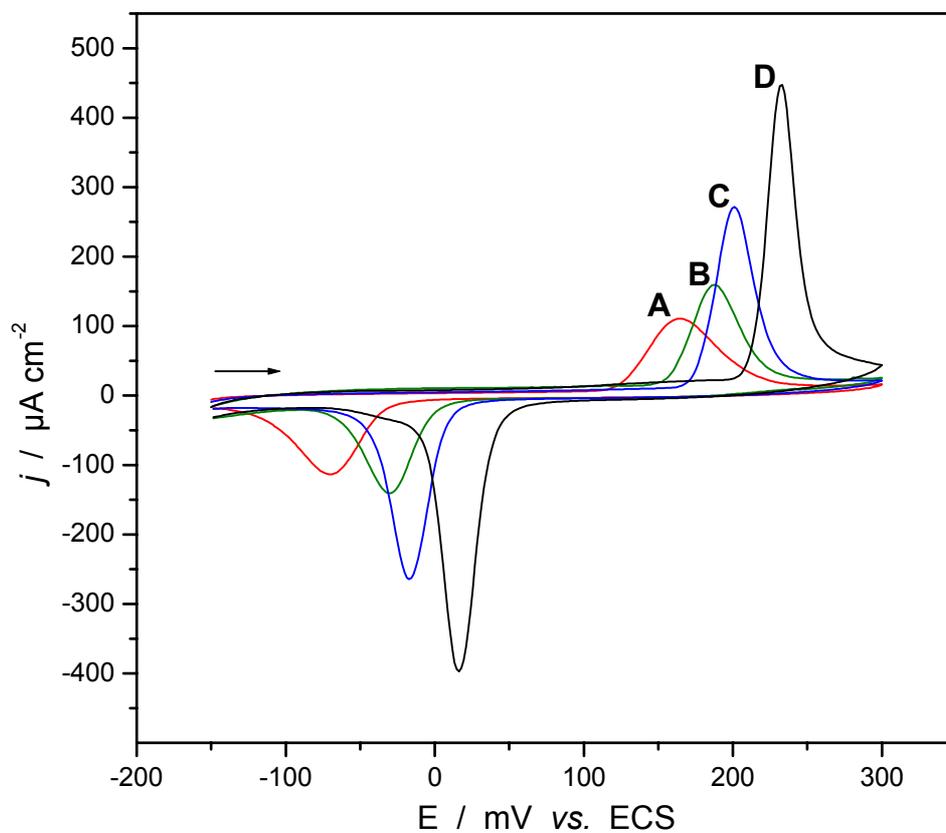


**Tabela IV.4.** Influência dos ânions sobre a separação de pico ( $\Delta E_p$ ) e o potencial médio ( $E_m$ ). Concentração dos ânions  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 7,0, obtido para EPC/TTF-TCNQ a velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Eletrólito de suporte	$\Delta E_p / \text{mV}$	$E_m / \text{mV}$	$I_{pa} / \mu\text{A}$	$I_{pc} / \mu\text{A}$
$\text{Cl}^-$	220	90	$32,2 \pm 0,2$	$31,6 \pm 0,2$
$\text{NO}_3^-$	220	90	$32,8 \pm 0,6$	$32,4 \pm 0,1$
$\text{SO}_4^{2-}$	220	100	$37,6 \pm 0,4$	$38,8 \pm 0,5$

A influência da concentração do eletrólito de suporte na performance do eletrodo também foi investigada, para concentrações de 0,01, 0,05, 0,1 e  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  de KCl a pH 7,0.

Dos resultados obtidos observou-se uma forte dependência da concentração do íon potássio com a corrente de pico (**Figura IV.7**), e os voltamogramas registrados mostraram uma mudança no potencial médio ( $E_m$ ) do processo redox (**Tabela IV.5**).

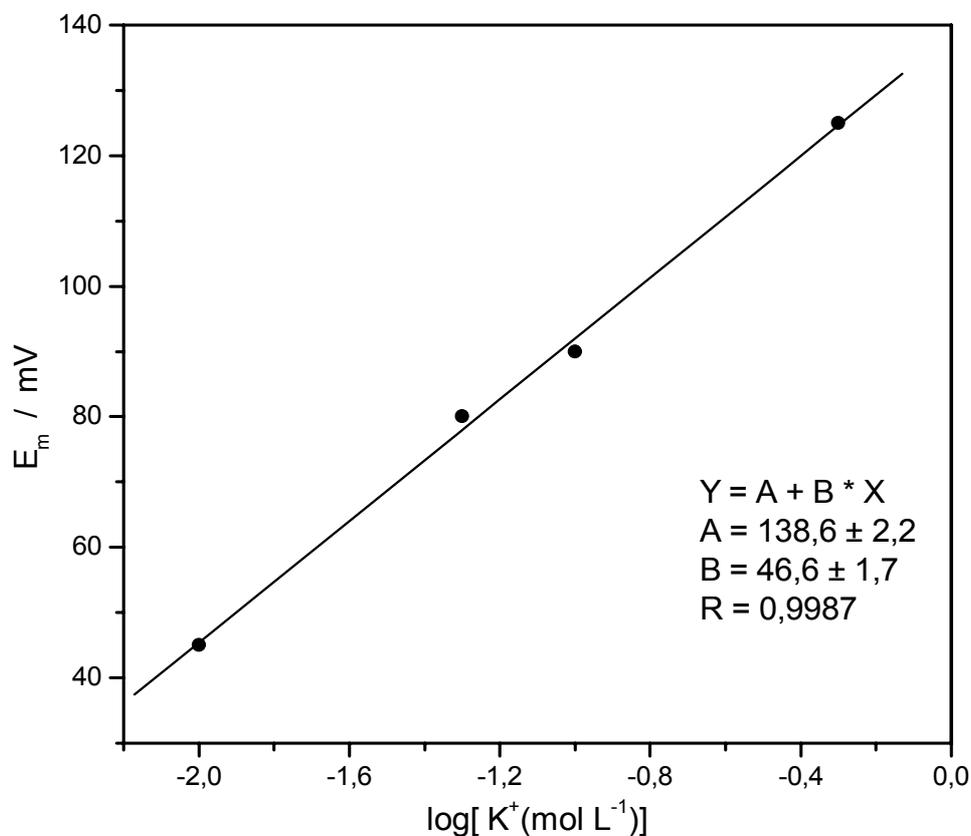


**Figura. IV.7.** Voltamogramas cíclicos do EPC/TTF-TCNQ em diferentes concentrações de KCl. (A) 0,01, (B) 0,05, (C) 0,1 e (D) 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Em pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>.

**Tabela IV.5.** Influência da concentração da solução do eletrólito de suporte no eletrodo. Experimento em solução de KCl, pH 7,0 e velocidade de varredura de 20 mV s<sup>-1</sup>.

[KCl] / mol L <sup>-1</sup>	$\Delta E_p$ / mV	$E_m$ / mV	$I_{pa}$ / $\mu$ A	$I_{pc}$ / $\mu$ A
0,01	230	45	13,0 ± 0,2	13,0 ± 0,3
0,05	220	80	18,1 ± 0,5	16,3 ± 0,4
0,1	220	90	32,2 ± 0,2	31,6 ± 0,2
0,5	210	125	52,3 ± 0,3	47,5 ± 0,8

Esta mudança no potencial médio é linear com o logaritmo da concentração do eletrólito suporte ( $\log[K^+]$ ) como pode ser observado na **Figura IV.8**. A inclinação desta reta é 46,6 mV década<sup>-1</sup> de concentração de K<sup>+</sup>, indicando um processo sub-nernstiano do sistema. Esta dependência do potencial na concentração do eletrólito suporte pode ser devida ao equilíbrio do cátion com a rede cristalina [121], durante o processo redox que envolve inclusão e exclusão deste.

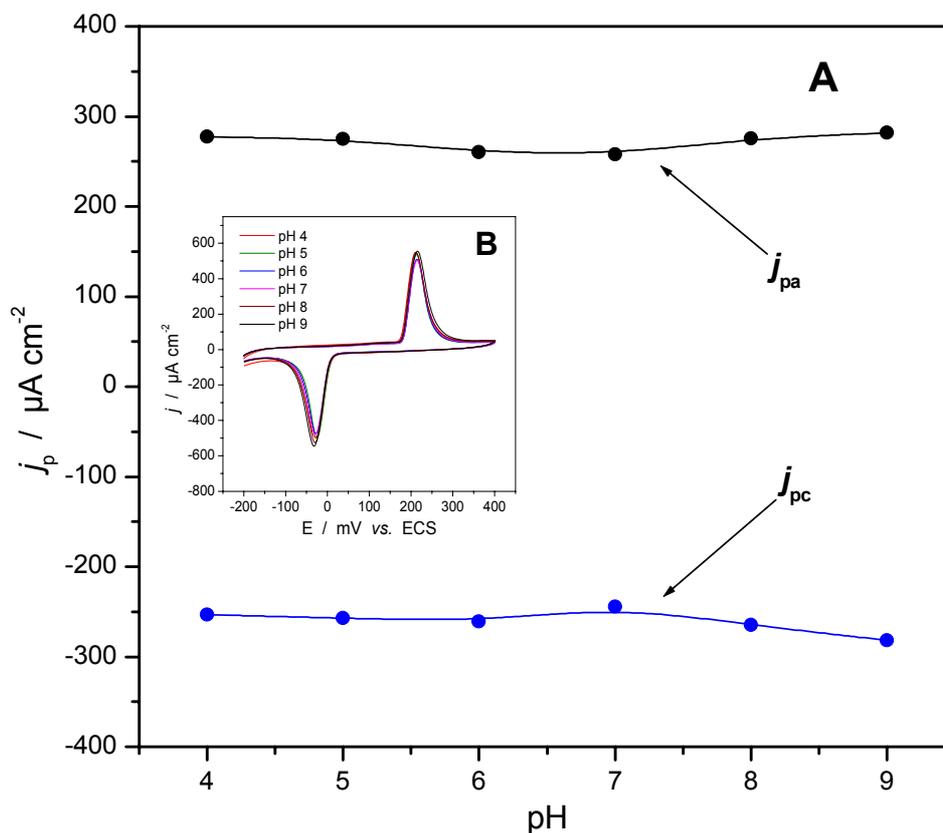


**Figura. IV.8.** Dependência do potencial médio ( $E_m$ ) com o logaritmo da concentração do eletrólito de suporte ( $\log[K^+]$ ).

### IV.3.5. Influência do pH e Natureza do Tampão no Comportamento Eletroquímico do EPC/TTF-TCNQ

A influência do pH na resposta do EPC/TTF-TCNQ também foi verificada na faixa de 4,0 a 9,0. O eletrodo mostrou que o pH do meio não afeta o processo redox do complexo como pode ser observado na **Figura IV.9**, no qual tanto o potencial médio como a separação de pico mantiveram-se constantes. Este comportamento sugere que o próton não

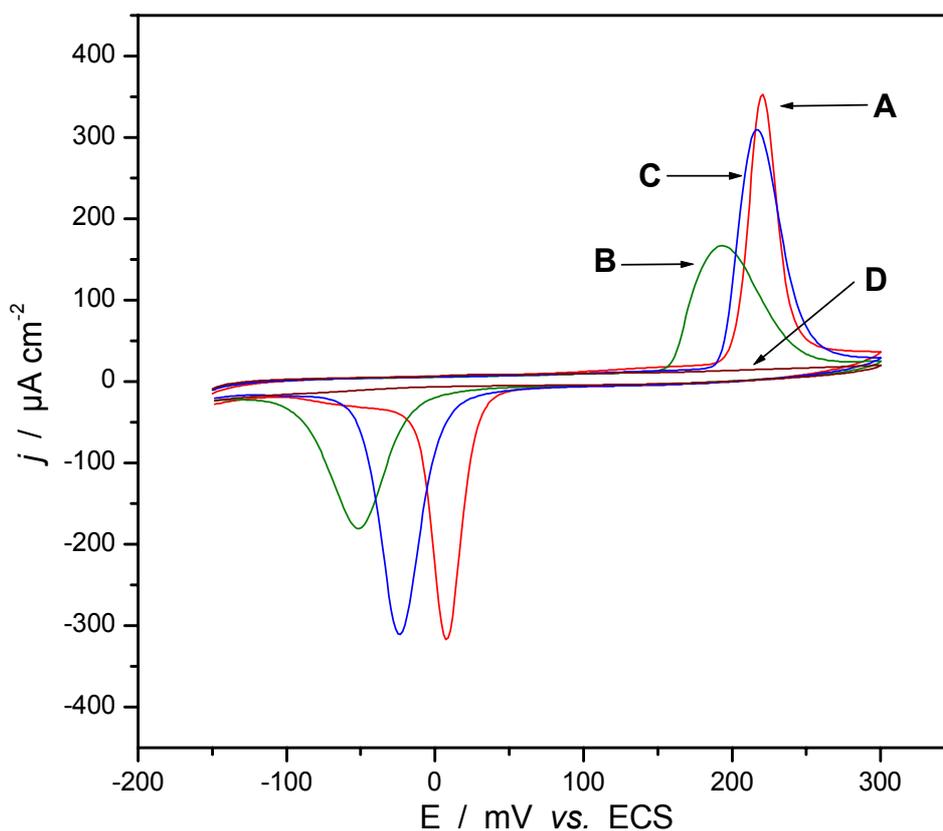
participa no processo redox do complexo, pelo menos dentro da faixa de pH estudado.



**Figura. IV.9.** (A) Efeito do pH da solução (KCl) sobre a resposta do eletrodo EPC/TTF-TCNQ. (B) Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes pH. Velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Seguindo com a otimização do eletrodo desenvolvido, também foram realizados estudos com diferentes tampões, entre eles: Fosfato, HEPES, PIPES e TRIS.

Na **Figura IV.10**, são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos nas diferentes soluções tampão.



**Figura IV.10.** Voltamogramas cíclicos do EPC/TTF-TCNQ obtidos em diferentes soluções tampão: (A)  $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , (B)  $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ HEPES}$ , (C)  $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ PIPES}$ , (D)  $0,1 \text{ mol L}^{-1} \text{ TRIS}$ . Velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Observa-se que a maior resposta em valores de corrente é obtida em tampão fosfato. Isto se deve provavelmente ao íon potássio do fosfato, que tem melhor interação com a rede cristalina do complexo TTF-TCNQ do que

com o íon sódio do PIPES e HEPES, como já foi discutido anteriormente no estudo de diferentes eletrólitos.

Foi calculada também a força iônica de cada tampão utilizado com o intuito de verificar se existia alguma dependência; as forças iônicas calculadas foram: para o tampão Fosfato  $3,5 \cdot 10^{-2}$ , HEPES  $5,6 \cdot 10^{-5}$ , PIPES  $4,7 \cdot 10^{-3}$  e TRIS  $2,8 \cdot 10^{-5}$ , verifica-se que HEPES e TRIS têm a mesma força iônica, no entanto, a resposta obtida para ambos é completamente diferente do que podemos concluir que não existe dependência da resposta do eletrodo com a variação da força iônica, reforçando assim a afirmação que a resposta do eletrodo depende dos íons presentes na solução, como discutido anteriormente.

Já em solução TRIS não se observaram os picos de oxidação e redução do complexo TTF-TCNQ, provavelmente pelo fato do cátion do TRIS não ser capaz de interagir com a rede cristalina do complexo TTF-TCNQ devido ao seu tamanho [85]. Possivelmente o tamanho da cavidade da rede cristalina permite que somente cátions pequenos se difundam através desta mantendo a eletroneutralidade, possibilitando desta forma o aparecimento do processo redox.

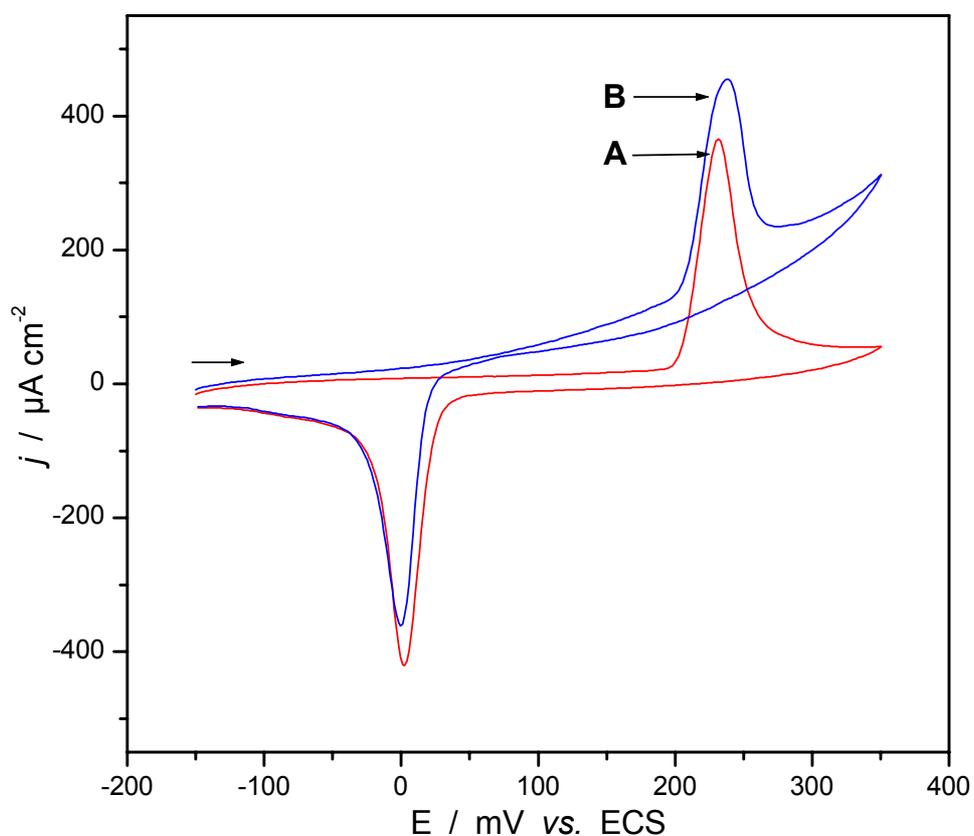
#### **IV.4. Resposta Eletrocatalítica do EPC/TTF-TCNQ para GSH**

Após conhecer o comportamento e as propriedades eletroquímicas do eletrodo de pasta de carbono modificado com o complexo TTF-TCNQ, partiu-se para estudar e otimizar a resposta do eletrodo para a GSH.

Na **Figura IV.11**, é ilustrada a resposta eletrocatalítica para 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de GSH, verificando-se um aumento da corrente anódica em potenciais acima de 0 mV *vs.* ECS. Cabe mencionar que na solução tampão uma concentração de 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de EDTA foi utilizada para evitar a oxidação da GSH pelos íons metálicos que possam estar presentes nas amostras.

É importante mencionar que quando o eletrodo de pasta de carbono sem modificar foi testado para glutathione, nenhuma corrente foi observada na faixa de potencial estudada. Como relatado na literatura [74], a GSH apresenta potenciais de oxidação altos, geralmente acima de 900 mV em eletrodos de grafite.

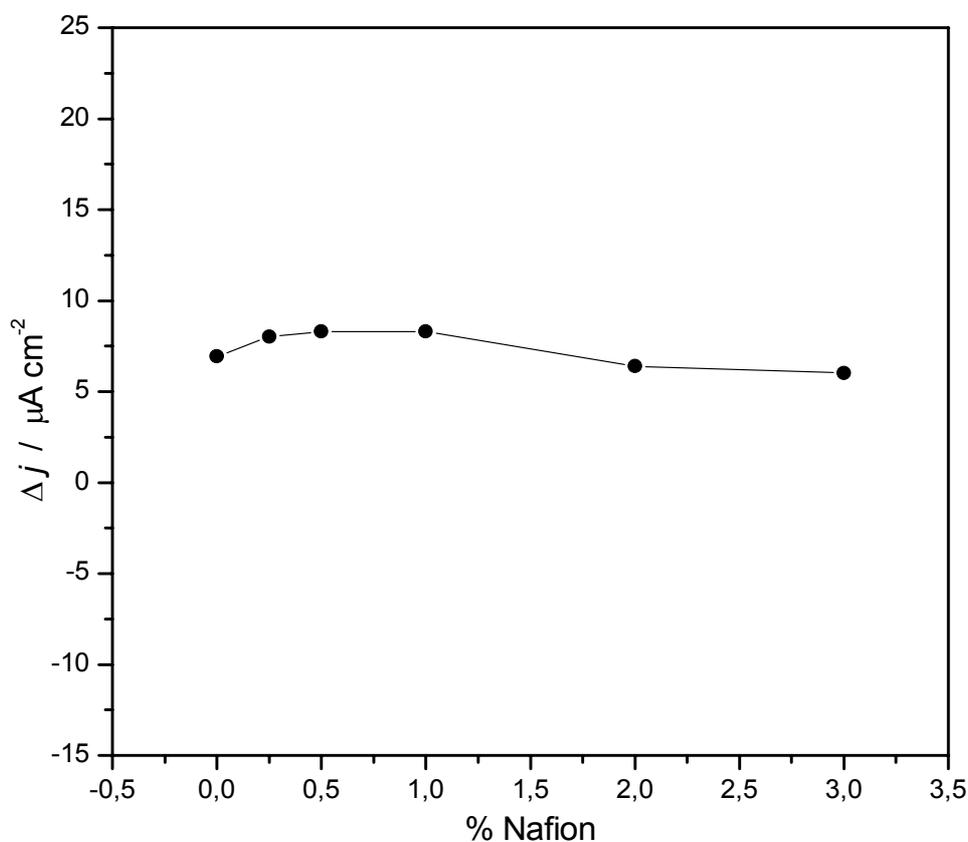
Como observado no voltamograma cíclico da **Figura IV.11**, o eletrodo foi capaz de eletrooxidar a glutathione em baixos potenciais. Isto ocorre provavelmente porque o complexo TTF-TCNQ é capaz de mudar as propriedades eletroquímicas da pasta de grafite, originando um novo material para a construção de eletrodos mais sensíveis, neste caso para GSH o que foi o nosso principal interesse.



**Figura IV.11.** Voltamogramas cíclicos obtidos para EPC/TTF-TCNQ em ausência (A) e presença de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  GSH (B), em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão fosfato contendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  (pH 7,0), com velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

Como Nafion foi utilizado na construção do eletrodo de pasta de grafite modificado com o complexo TTF-TCNQ com objetivo de melhorar a estabilidade do eletrodo, um estudo foi realizado para verificar se a concentração de Nafion no eletrodo afeta a oxidação da GSH. Na **Figura IV.12** pode-se observar que as diferentes concentrações de Nafion na pasta não influenciam a oxidação da GSH. Isto provavelmente se deva ao fato do Nafion encontrar-se dentro da pasta misturada como um aglutinante e não

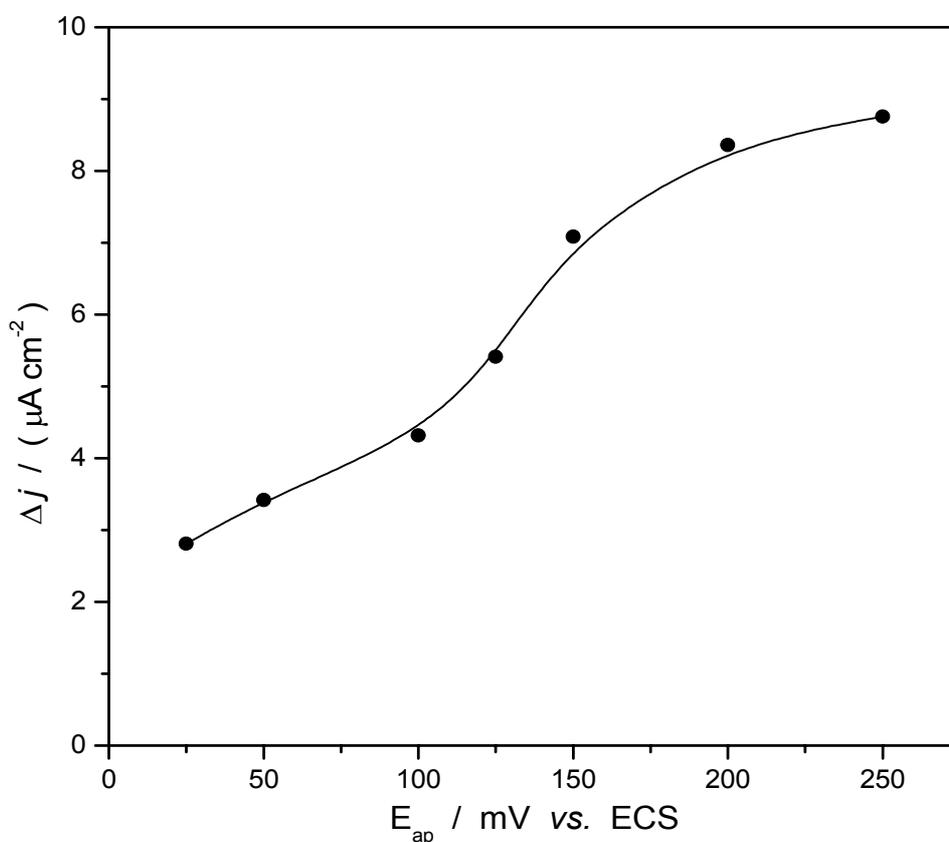
formando um filme. Se o mesmo estivesse como filme este poderia impedir que moléculas grandes e carregadas negativamente se aproximassem à superfície do eletrodo, já que o filme de Nafion apresenta-se carregado negativamente devido aos grupos sulfônicos.



**Figura. IV.12.** Resposta do eletrodo para  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  GSH em diferentes proporções de Nafion (0 a 5% (m/m)) no eletrodo modificado com TTF-TCNQ. Em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão fosfato contendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  (pH 7,0), com velocidade de varredura de  $20 \text{ mV s}^{-1}$ .

### IV.5. Influência do Potencial Aplicado do EPC/TTF-TCNQ na Resposta para GSH

O potencial aplicado tem um grande efeito sobre a resposta do eletrodo para GSH. Na **Figura IV.13** mostra-se a dependência da resposta do eletrodo em diferentes potenciais aplicados.



**Figura IV.13.** Influência do potencial aplicado do EPC/TTF-TCNQ sobre a GSH ( $750 \mu\text{mol L}^{-1}$  GSH) em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão fosfato contendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  (pH 7,0).

Observa-se que a corrente aumenta à medida que se incrementa o potencial, atingindo uma corrente de eletrooxidação máxima para potenciais maiores que 200 mV. Isto sugere que o potencial afeta a sensibilidade do sensor.

Para obter uma boa sensibilidade e minimizar interferências um valor de 200 mV foi escolhido para as medidas amperométricas.

Cabe salientar que o potencial aplicado de 200 mV para a oxidação da GSH com este eletrodo é menor quando comparado com outros eletrodos registrados na literatura [74], os quais geralmente apresentam valores superiores a 900 mV *vs* ECS. Com este baixo potencial, interferentes que apresentam altos potenciais de oxidação podem ser eliminados, os que geralmente são um grande problema na determinação de GSH em amostras biológicas.

#### **IV.6. Efeito da Solução Tampão e pH na Resposta do EPC/TTF-TCNQ**

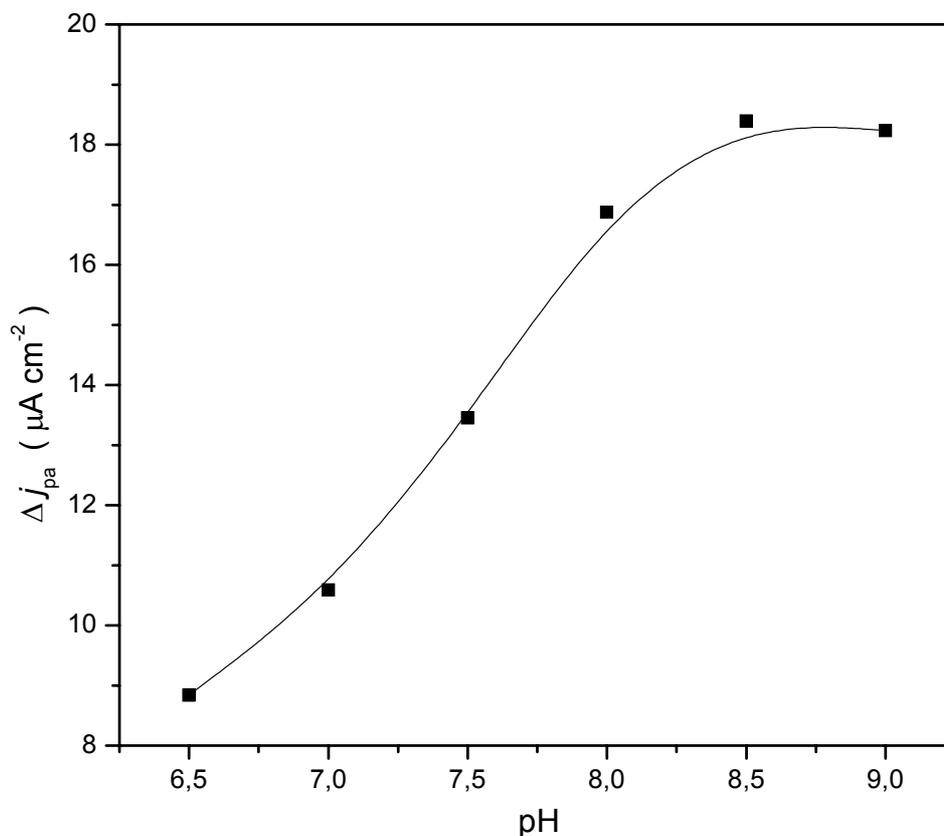
A resposta do eletrodo modificado para GSH em diferentes tampões foi avaliada. Assim, as medidas eletroquímicas foram realizadas em quatro diferentes soluções tampão: Fosfato ( $K_2HPO_4/KH_2PO_4$ ), HEPES, PIPES e TRIS numa concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , todos eles contendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl para ajuste da força iônica, todos em pH 7,0.

A **Tabela IV.6** mostra os valores obtidos para GSH usando os diferentes tampões. Observa-se que a melhor resposta foi obtida com o tampão fosfato. Assim, todos os experimentos posteriores foram realizados neste tampão.

**Tabela IV.6.** Efeito da solução tampão (pH 7,0) contendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl sobre a resposta do sensor obtido num potencial de  $200 \text{ mV vs. ECS}$  e concentração de GSH de  $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ . A concentração da solução tampão foi  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ .

Tampão	$\Delta j (\mu\text{A cm}^{-2})$
Fosfato	$1,47 \pm 0,05$
HEPES	$1,22 \pm 0,04$
PIPES	$1,01 \pm 0,04$
TRIS	$0,79 \pm 0,03$

A **Figura IV.14**, apresenta o efeito de pH sob a resposta do eletrodo, mostrando que a resposta permanece constante entre pH 8,0 - 9,0. Assim, pH 8,0 foi escolhido para estudos posteriores, pois em valores maiores que 8,0 não há uma significativa amplificação no sinal, pelo contrário, a glutathiona reduzida pode ser facilmente oxidada quimicamente a dissulfeto de glutathiona (GSSG). Também foi observado que a repetibilidade das medidas foi prejudicado em altos valores de pH [122].

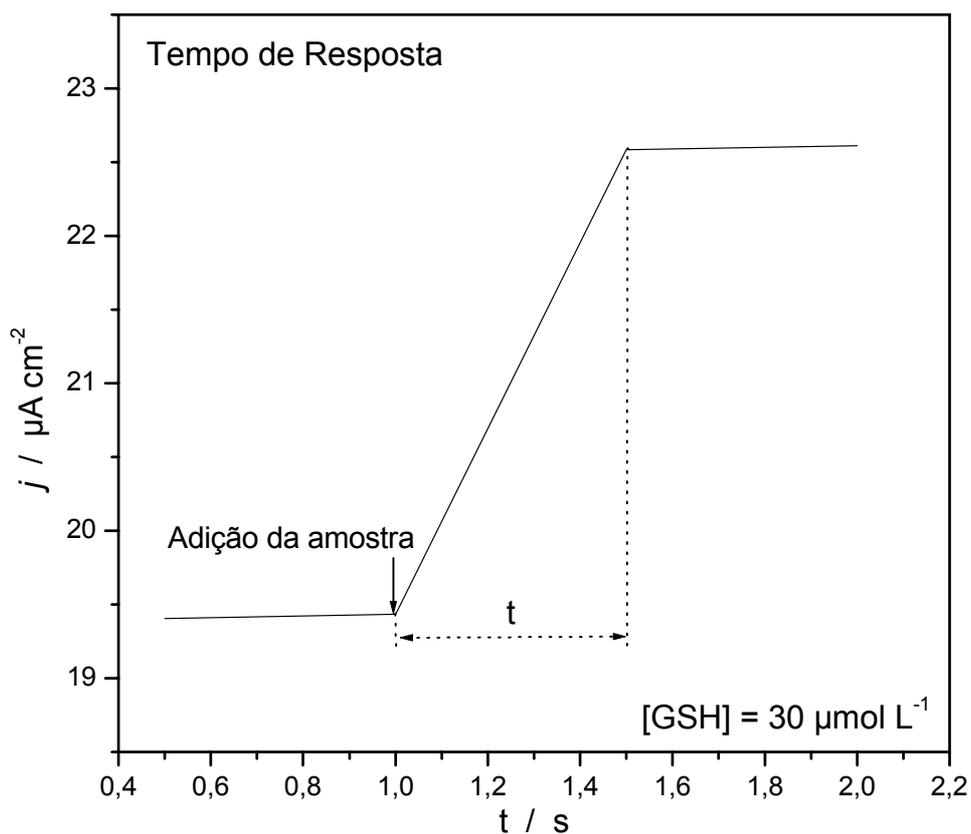


**Figura IV.14.** Dependência da densidade de corrente com o pH da solução para a eletrooxidação da GSH empregando o EPC/TTF-TCNQ em  $750 \mu\text{mol L}^{-1}$  GSH, tampão fosfato contendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ ,  $E_{ap} = 200 \text{ mV vs. ECS}$ .

#### IV.7. Tempo de Resposta do Eletrodo

A resposta do eletrodo modificado com TTF-TCNQ apresentou um tempo de resposta bastante rápido, alcançando uma corrente máxima em cerca de 0,5 s, como observado na **Figura IV.15**. Como é necessário homogeneizar a solução quando o analito é adicionado à cela de medida, um

tempo adicional foi considerado, resultando um tempo total de 10 s. Este tempo de resposta é pequeno considerando que o eletrodo utilizado é feito de pasta de carbono, onde geralmente a difusão das espécies é mais dificultada.



**Figura IV.15.** Dependência do tempo de resposta para a oxidação de  $30 \mu\text{mol L}^{-1}$  GSH aplicando um potencial de 200 mV vs. ECS. Medidas realizadas em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão fosfato contendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$  (pH 8,0).

É conhecido que uma condição para o eletrodo responder é que haja difusão da solução através da pasta, sendo que esta etapa influi no tempo de

resposta [123]. No sistema proposto a difusão é dificultada por tratar-se de um eletrodo compacto, no entanto a resposta é rápida, sugerindo que a superfície do eletrodo se apresenta como uma superfície totalmente ativa, onde ocorre a oxidação da GSH.

#### IV.8. Curva Analítica para GSH

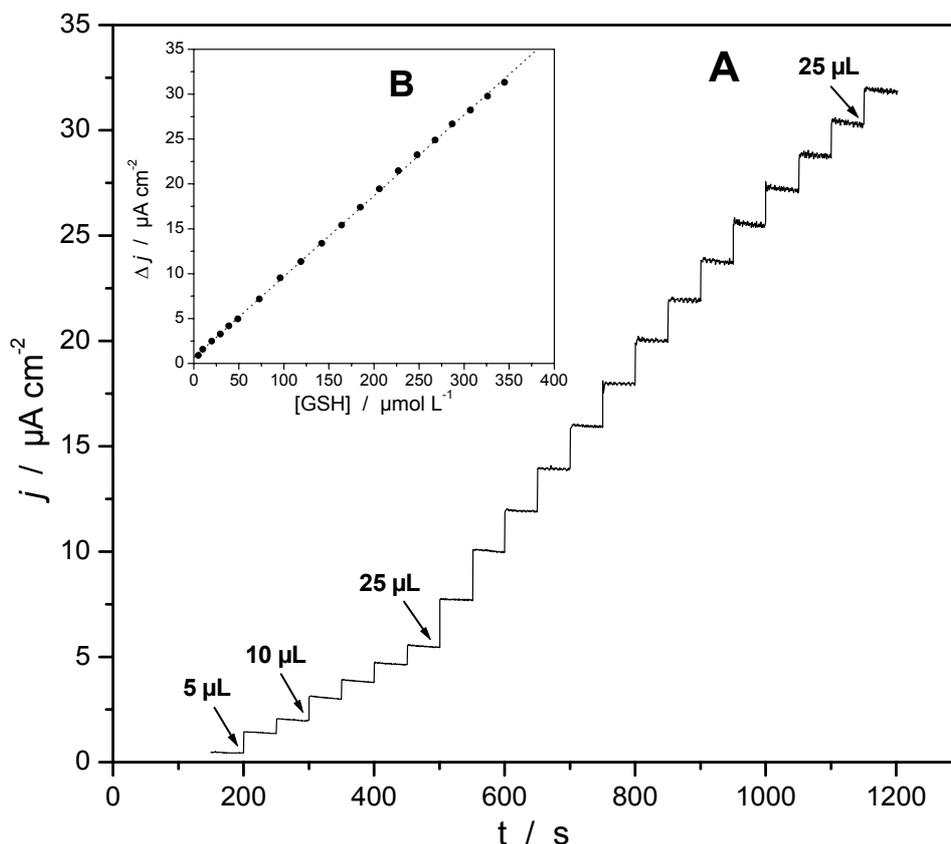
Uma vez otimizado o eletrodo modificado com TTF-TCNQ procedeu-se à utilização deste. Para isto uma curva analítica para GSH (**Figura IV.16**), foi obtida por adições sucessivas de diferentes alíquotas de uma solução 2,5 mmol L<sup>-1</sup> de GSH em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0), contendo 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>EDTA, as medidas amperométricas foram realizadas aplicando-se um potencial de 200 mV *vs.* ECS.

O eletrodo aqui desenvolvido, nas condições otimizadas, mostrou um amplo intervalo de resposta linear entre 5,0 e 340 μmol L<sup>-1</sup> de GSH, com um excelente coeficiente de correlação de 0,9998 para n = 20, ajustado pela equação:

$$\Delta j = 0,7 (\pm 0,1) + 90,1 (\pm 0,4) [\text{GSH}]$$

Onde  $\Delta j$  é a densidade de corrente em μA cm<sup>-2</sup> e [GSH] é a concentração da GSH em mmol L<sup>-1</sup>. O limite de detecção do eletrodo, calculado como três vezes o valor do desvio do branco dividido pela sensibilidade foi de 0,3 μmol L<sup>-1</sup> [124]. A estimativa do desvio padrão

relativo das medidas foi de 2,1% para uma concentração de  $20 \mu\text{mol L}^{-1}$  de GSH ( $n=10$ ).



**Figura IV.16.** (A) Resposta amperométrica do sensor para GSH. (B) Curva analítica obtida para GSH. Aplicando um potencial de 200 mV vs. ECS em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , (pH 8,0) contendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ .

Com objetivo de avaliar as vantagens apresentadas pelo presente eletrodo, este foi comparado com outros eletrodos descritos previamente na literatura, tais como: O eletrodo de grafite pirolítico de plano perpendicular

ao plano basal (GP/PPPB) [74], Biossensor amperométrico a base de glutationa peroxidase (CV/GSH-Px) [122], Eletrodo de pasta de grafite modificado com hexacianoferrato de cobalto (EP/FeCo) [82], Eletrodo de pasta de grafite modificado com ftalocianina de cobalto (EP/Co) [80], e os valores referentes aos parâmetros avaliados são apresentados na **Tabela IV.7**.

**Tabela IV.7.** Parâmetros analíticos de diferentes eletrodos para determinação de GSH e do eletrodo desenvolvido (EPC/TTF-TCNQ).

	GP/PPPB	CV/GSH-Px	EP/FeCo	EP/Co	EPC/TTF-TCNQ
Sensibilidade ( $\mu\text{A cm}^{-2} \text{mmol}^{-1} \text{L}$ )	216	220	248	----	90,1
Faixa Linear ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	10 - 80	20 - 140	5 - 700	2,5 - 62	5 - 340
Limite de Detecção ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	2,7	-----	1,0	0,03	0,3
Potencial Aplicado (mV)	650	650	800	270	200

Observa-se que o eletrodo desenvolvido apresenta faixa linear e limite de detecção semelhante aos eletrodos apresentados, no entanto apresenta uma menor sensibilidade o que não é um parâmetro crítico salientando que este apresenta um menor potencial para oxidação da GSH, seguida só pelo EP/Co.

## IV.9. Estudo de Interferentes para GSH

Sendo que o objetivo do trabalho é utilizar o eletrodo modificado com TTF-TCNQ para a determinação de GSH em amostras de eritrócitos, foi assim verificada a interferência de alguns compostos.

Para isto soluções desses compostos interferentes foram preparadas no dia, nas mesmas condições que para a determinação da GSH (tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0), contendo 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>EDTA). Para as medidas de interferência analítica, o sinal para uma concentração de 50 μmol L<sup>-1</sup> GSH foi registrado, e este sinal foi comparado com o sinal obtido para uma mistura de GSH:interferente de 5:1.

Os valores apresentados na **Tabela IV.8** mostram uma significativa interferência para ácido ascórbico e uma menor interferência para a cisteína, já glicina, ácido glutâmico e glicose não mostraram interferência alguma. A interferência do ácido ascórbico pode ser minimizada pelo uso do ascorbato oxidase [125, 126]. No entanto para o presente caso o ácido ascórbico não é problema na determinação de GSH, pois ele não se encontra presente nos eritrócitos.

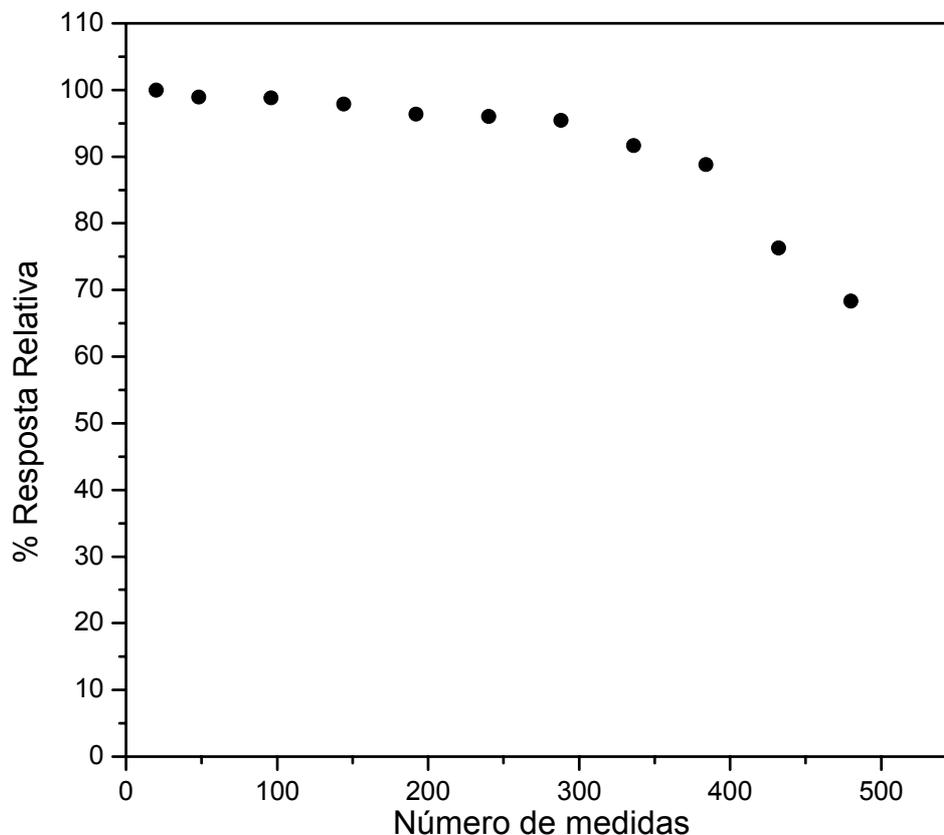
A interferência da cisteína pode ser explicada pelo fato desta apresentar um grupo tiol na sua estrutura. Mas isto não interferiu em nossas medidas de GSH, já que a cisteína não é encontrada em eritrócitos.

**Tabela IV.8.** Valores de recuperação obtidos com o sensor desenvolvido, para soluções de GSH contendo compostos interferentes na concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,0.  $E_{\text{ap}} = 200 \text{ mV vs. ECS}$ .

Composto Interferente	[GSH] adicionado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	[GSH] encontrado ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Recuperação (%)
Ác. ascórbico	50	$54,5 \pm 0,2$	$109 \pm 1$
Cisteína	50	$51,9 \pm 0,3$	$104 \pm 2$
Glicina	50	$49,1 \pm 0,1$	$98 \pm 1$
Ác. glutâmico	50	$50,6 \pm 0,2$	$101 \pm 1$
Glicose	50	$50,5 \pm 0,3$	$101 \pm 1$

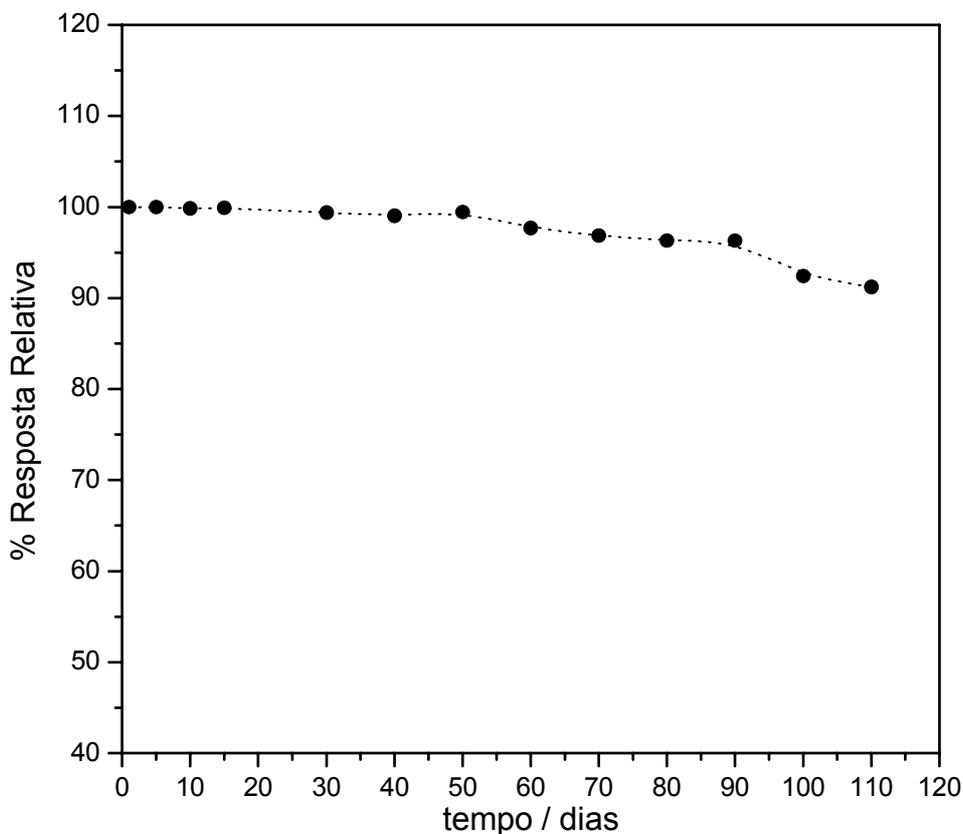
#### IV.10. Estabilidade e Tempo de Vida do EPC/TTF-TCNQ

A estabilidade e o tempo de vida do eletrodo desenvolvido também foram estudados. Para o teste de estabilidade medidas sucessivas com o mesmo eletrodo foram realizadas para uma concentração específica de GSH. Assim, na **Figura IV.17** observa-se que o eletrodo desenvolvido pode ser usado sem perda significativa de sensibilidade até umas 300 determinações. Acima deste número de determinações o eletrodo apresenta uma diminuição na resposta, no entanto não impede a sua utilização.



**Figura IV.17.** Estabilidade operacional do eletrodo modificado com TTF-TCNQ. Concentração de GSH  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 8,0) contendo  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ , com potencial aplicado de  $200 \text{ mV vs. ECS}$ .

Para os testes de tempo de vida do eletrodo, medidas para uma concentração determinada de GSH foram realizadas periodicamente por um tempo prolongado. Como pode ser observado na **Figura IV.18** o eletrodo apresentou um tempo de vida de cerca de 3 meses quando o eletrodo é mantido em temperatura ambiente a seco.



**Fig. IV.18.** Tempo de vida do eletrodo desenvolvido. Concentração de GSH  $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 8,0),  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA}$ , com potencial aplicado de  $200 \text{ mV vs. ECS}$ .

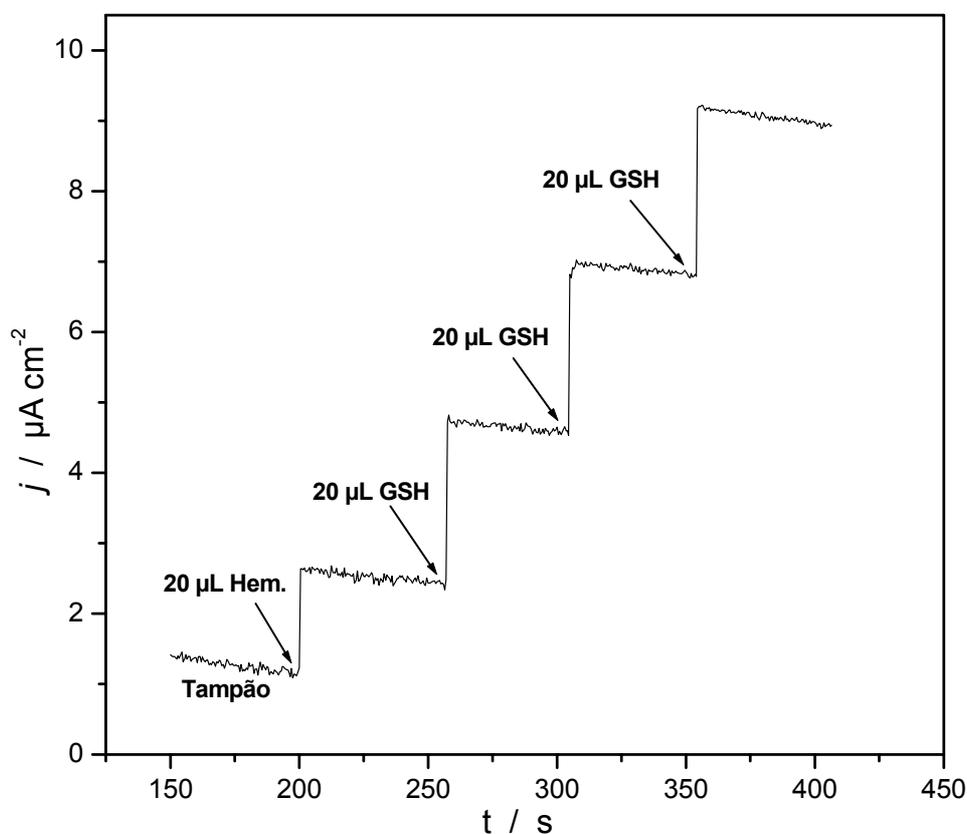
#### **IV.11. Determinação Amperométrica da GSH em Eritrócitos**

Foram analisadas seis diferentes amostras de sangue por triplicata, determinando-se a concentração da GSH com o eletrodo amperométrico desenvolvido e utilizando o método de adição padrão. Os resultados obtidos foram comparados com o método espectrofotométrico.

---

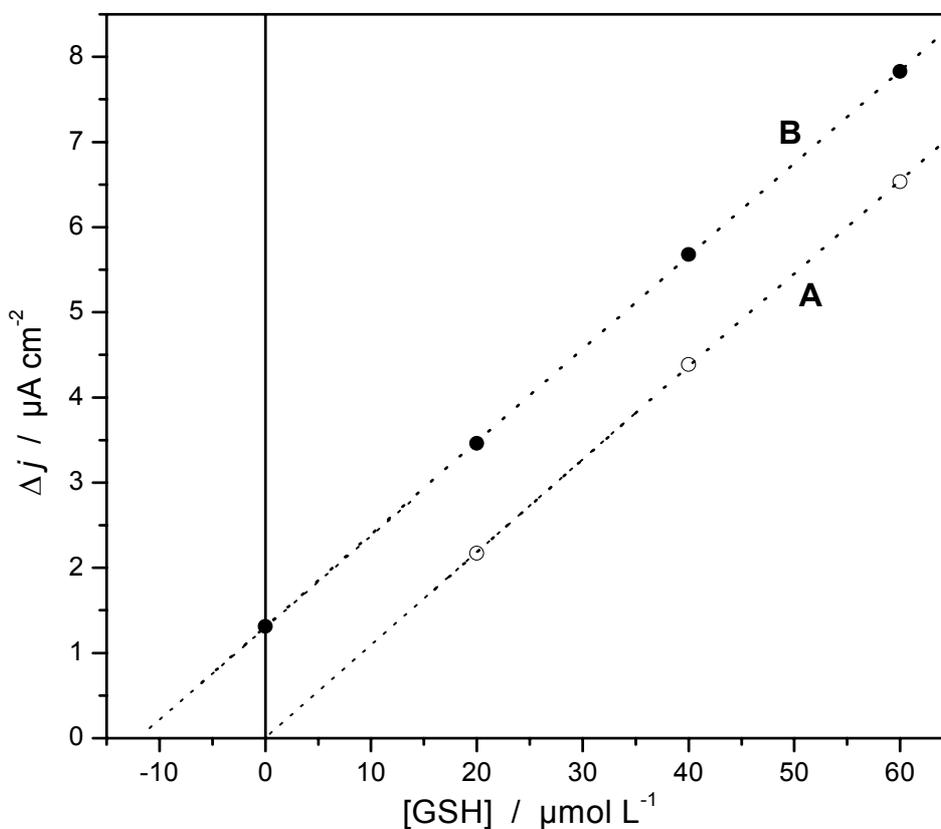
As amostras de sangue foram tratadas previamente como descrito no item **III.5**, onde o ácido sulfosalicílico foi usado para desproteinização. Ácidos tais como perclórico, tricloroacético e metafosfórico foram evitados já que estes ácidos produzem oxidação da GSH, como registrado no estudo realizado por Anderson [111].

Seguidamente as amostras foram colocadas diretamente na célula eletroquímica de medida, utilizando-se 20  $\mu\text{L}$  do lisado de eritrócitos e adições de 20  $\mu\text{L}$  de solução padrão de GSH ( $2,5 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Cabe mencionar que na solução tampão o EDTA foi adicionado com objetivo de inibir a oxidação da GSH por íons metálicos como, por exemplo, o ferro [127]. Na **Figura IV.19** observa-se o amperograma obtido para a determinação da GSH na amostra pelo método de adição padrão, como exemplo.



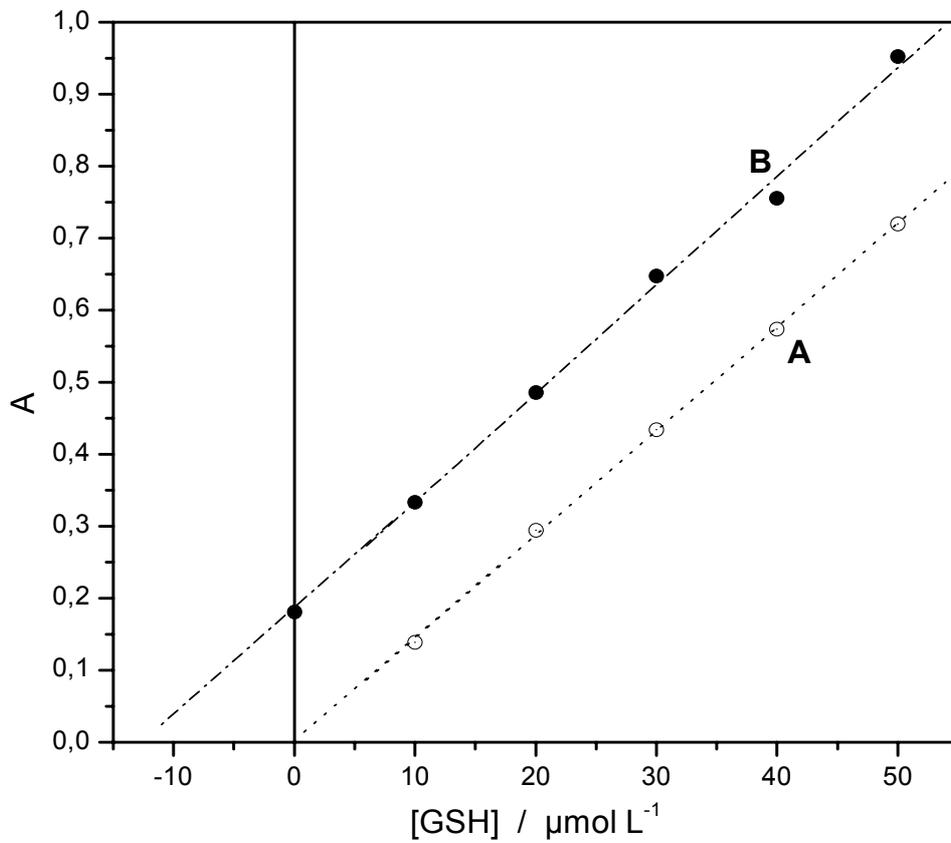
**Figura IV.19.** Cronoamperograma obtido para a determinação da GSH em eritrócitos pelo método de adição padrão. Em tampão fosfato (pH 8,0) 0,1 mol L<sup>-1</sup>, 0,1 mol L<sup>-1</sup> KCl e 0,5 mmol L<sup>-1</sup> EDTA.  $E_{ap} = 200$  mV vs. ECS.

A **Figura IV.20** mostra as curvas de calibração para o padrão (**A**) e a curva de calibração dos padrões contendo a amostra (**B**), para a determinação da GSH. Das curvas observa-se que não há efeito da matriz na resposta do eletrodo.



**Figura IV.20.** Curva de calibração obtida para a determinação da GSH em eritrócitos lisados pelo método de adição padrão. Em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de tampão fosfato (pH 8,0),  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  KCl e  $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$  EDTA.  $E_{\text{ap}} = 200 \text{ mV vs. ECS}$ .

Ao mesmo tempo, as mesmas amostras de sangue foram analisadas pelo método espectrofotométrico. Na **Figura IV.21** observam-se as curvas de calibração obtidas para a determinação de GSH em eritrócitos lisados pelo método de adição padrão.



**Figura IV.21.** Curva de adição padrão para o método espectrofotométrico, para a determinação de GSH em eritrócitos lisados.

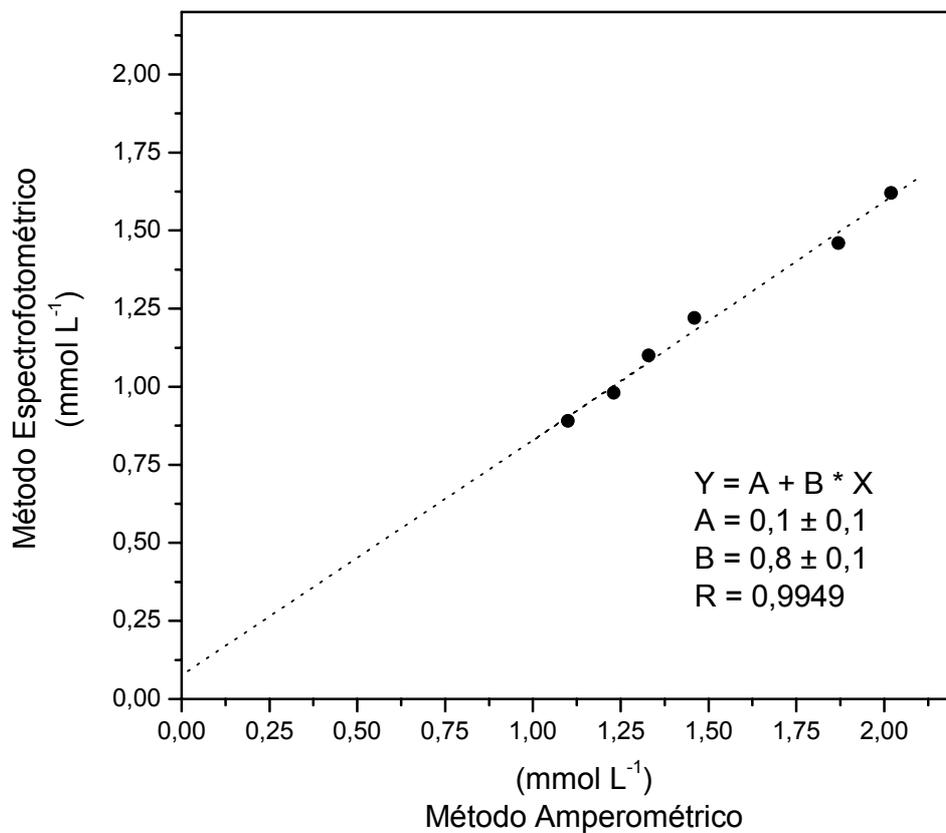
Os valores obtidos para GSH nas amostras analisadas pelo método amperométrico e espectrofotométrico são apresentadas na **Tabela IV.9**.

**Tabela IV.9.** Valores de concentração obtidos pelo método proposto e de referência para análises de GSH em eritrócitos, com os respectivos desvios para 6 amostras.

Amostra	Método Amperométrico* (mmol L <sup>-1</sup> )	Método Espectrofotométrico* (mmol L <sup>-1</sup> )
1	1,23 ± 0,06	0,98 ± 0,09
2	1,46 ± 0,14	1,22 ± 0,07
3	2,02 ± 0,12	1,62 ± 0,06
4	1,1 ± 0,1	0,89 ± 0,06
5	1,33 ± 0,1	1,1 ± 0,09
6	1,87 ± 0,15	1,46 ± 0,11

\* Desvio padrão para três replicatas.

Dos valores apresentados na **Tabela IV.9** observa-se que o método espectrofotométrico apresenta um menor valor para determinação da GSH nas amostras, isto pode ser devido a perda da GSH por oxidação ocasionado pelo prolongado tempo de análise neste método. No entanto uma boa correlação linear entre ambos métodos foi verificada como observado na **Figura IV.22**.



**Figura IV.22.** Correlação entre as medidas obtidas com o método espectrofotométrico e amperométrico.

Adicionalmente foi realizado um teste estatístico “t” pareado, do qual conclui-se que existe uma diferença significativa no nível de confiança de 95% entre os dois métodos. Devido à existência desta diferença, decidiu-se avaliar a exatidão de ambos métodos por teste de recuperação.

## IV.12. Estudos de Recuperação

Estudos de recuperação foram realizados para o método amperométrico e espectrofotométrico, já que os valores de GSH encontrados nos eritrócitos pelo método espectrofotométrico foram menores aos obtidos pelo método amperométrico.

Para os estudos de recuperação o seguinte procedimento foi seguido: dois tubos contendo 2 mL de eritrócitos foram preparados, dos quais o primeiro foi utilizado como controle para determinar a concentração exata da GSH e o segundo utilizado para realizar o teste de recuperação, no qual foi colocado 2 mmol L<sup>-1</sup> de GSH. Seguidamente estes tubos foram tratados como indicados no item III.5 e as determinações foram realizadas em triplicata para cada amostra de hemolisado.

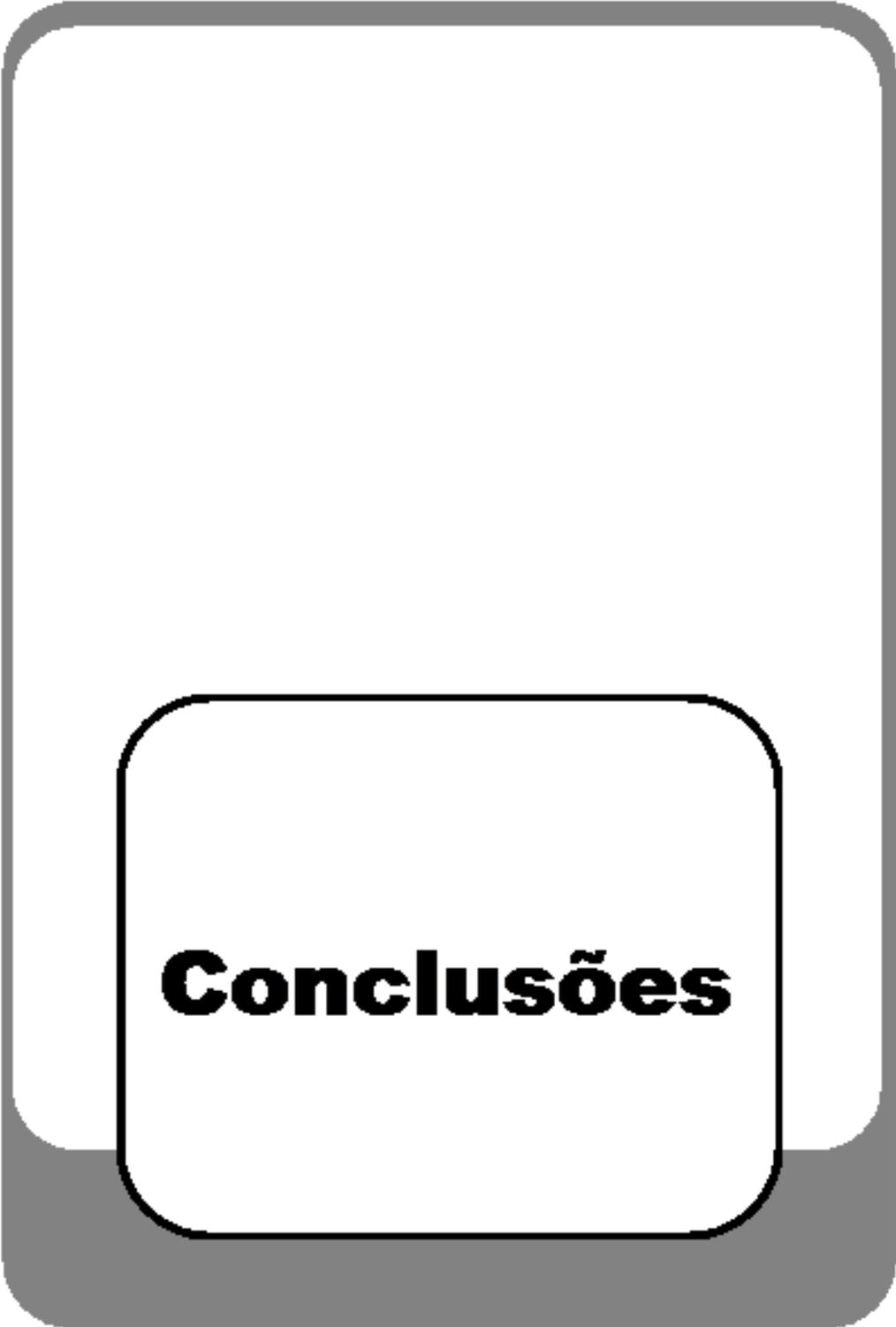
Os resultados obtidos pelo método amperométrico e espectrofotométrico são apresentados nas **Tabelas IV.10 e IV.11**. A recuperação encontrada com o método amperométrico (98-102%) foi melhor quando comparado com o método espectrofotométrico (88-92%). Os resultados obtidos mostram uma melhor exatidão para o método amperométrico que o para o espectrofotométrico sendo que as mesmas amostras foram utilizadas para ambos métodos. Estes baixos valores de recuperação para o método espectrofotométrico podem ser devido a problemas de oxidação química da GSH durante a etapa de análise, já que neste método os tempos de análise são mais demorados que no método amperométrico.

**Tabela IV.10.** Valores de recuperação em porcentagem para três amostras diferentes obtidas pelo método amperométrico.

Amostra	[GSH] Adicionado (mmol L <sup>-1</sup> )	[GSH] Medido (mmol L <sup>-1</sup> )	% Recuperação
4	---	1,1 ± 0,09	99,5
	2,00	3,09 ± 0,20	
5	---	1,33 ± 0,10	98,0
	2,00	3,29 ± 0,23	
6	---	1,87 ± 0,15	102,5
	2,00	3,92 ± 0,28	

**Tabela IV.11.** Valores de recuperação em porcentagem para três amostras diferentes obtidas pelo método espectrofotométrico.

Amostra	[GSH] Adicionado (mmol L <sup>-1</sup> )	[GSH] Medido (mmol L <sup>-1</sup> )	% Recuperação
4	---	0,89 ± 0,06	92,5
	2,00	2,74 ± 0,14	
5	---	1,1 ± 0,09	91,0
	2,00	2,92 ± 0,16	
6	---	1,46 ± 0,11	90,5
	2,00	3,26 ± 0,21	



**Conclusões**

## V. CONCLUSÕES

Este trabalho mostra que o composto TTF-TCNQ foi capaz de mediar a transferência de elétrons entre o eletrodo e a GSH, permitindo a oxidação da GSH num potencial aplicado de 200 mV *vs.* ECS. Este potencial foi muito menor quando comparado com outros eletrodos modificados descritos na literatura, onde potenciais maiores que 700 mV foram empregados.

O eletrodo desenvolvido apresentou uma ampla faixa de resposta linear de 5 a 340  $\mu\text{mol L}^{-1}$  com limite de detecção de 0,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e uma excelente estabilidade, o qual pode ser deixado a temperatura ambiente a seco sem nenhum problema de perda de resposta, diferente de outros eletrodos que precisam de cuidados especiais.

A repetibilidade do eletrodo, para uma concentração de 20  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de GSH, foi de 2,1% em uma série de 10 medidas sucessivas, apresentando um tempo de resposta total de 10 s. Além disso, o eletrodo mostrou um longo tempo de vida de aproximadamente três meses.

Embora o eletrodo desenvolvido apresente faixa linear e limite de detecção similares, e menor sensibilidade, quando comparado com outros eletrodos existentes na literatura para a determinação de GSH, a maior vantagem deste eletrodo é a possibilidade de determinar GSH em um potencial bastante baixo, de forma simples, rápida.

O método proposto permitiu a determinação direta da concentração de GSH em lisados de eritrócitos sem o uso de reagentes adicionais, mostrando-se superior a outros métodos como o espectrofotométrico, por exemplo, onde são utilizados vários reagentes e longos tempo de análise são requeridos.



# **Referências**

## VI. REFERÊNCIAS

1. Dolphin, D.; Poulson, R.; Avramovic, O. Glutathione: Chemical, Biochemical, and Medical Aspects. Vol. III. Part A. Ed. Willey Interscience, New York. 1989, p. ix.
2. Meister, A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.*, 263 (1988) 17205-17208.
3. Meister, A.; Anderson, M. E. Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.* 52 (1984) 711-760.
4. Meister, A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science*, 220 (1983) 472-477.
5. Cooper, A. J. L., Kristal, B. S. Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* 378 (1997) 793-802.
6. Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Clarke, N. D., Biochemistry 5<sup>th</sup> Edition, W. H. Freeman and Company, New York. 2002, p. 686.
7. Meister, A.; Larsson, A. Glutathione synthetase deficiency and other disorders of the  $\gamma$ -glutamyl cycle. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, editors. The metabolic basis of inherited disease. 6<sup>th</sup> Edition, New York, McGraw-Hill; 1989. p 855-868.
8. Chai, Y. C.; Ashraf, S.S.; Rokutan, K.; Johnston, Jr. R. B.; Thomas, J. A. S-thiolation of individual human neutrophil proteins including actin by stimulation of the respiratory burst: evidence against a role for glutathione disulfide. *Arch. Biochem. Biophys.* 310 (1994) 273-281.
9. Knapen, M. F. C. M., Zusterzeel, P. L. M., Peters, W. H. M., Steegers, E. A. P., "Glutathione and glutathione-related enzymes in reproduction" *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 82 (1999) 171-184.
10. Mills, B. J., Lang, C. A. Differential Distribution of Free and Bound Glutathione and Cyst(e)ine in Human Blood. *Biochem. Pharmacol.* 52 (1996) 401-406.
11. Reed, D. J.; Fariss, M. W. Glutathione depletion and susceptibility. *Pharmacol. Rev.* 36 (1994) 235-335.
12. Ishikawa, T., Sies, H., "Glutathione as an antioxidant toxicological aspects". In: D. Dolphin O. Avramović, R. Poulsen (Ed) Glutathione, chemical biological and medical aspects, Part B, Vol. 263, New York, Wiley, 1988, p. 613-644.
13. Shan, X. Q., Aw, T. Y. Jones, D. P., Glutathione dependent protection against oxidative injury. *Pharmacol. Ther.* 47 (1990) 61-71.

14. Gandy, J.; Primiano, T.; Novak, R. F.; Kelce, W. R.; York, J. L. Differential expression of glutathione S-transferase isoforms in compartments of the testis and segments of the epididymis of the rat. *Drug Metab. Dispos.* 24 (1996) 725-733.
15. Haliwell, B., Gutteridge, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 186 (1990) 1-85.
16. Haliwell, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* 59 (1992) 609-623.
17. Ferreira, A. L. A., Matsubara, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev. Ass. Med. Brasil*, 43 (1997) 61-68.
18. Galleano, M. Puntarulo, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. *Biochim. Biophys. Acta*, 1271 (1995) 321-326.
19. Deneke, S. M., Fanburg, B. L. Regulation of cellular glutathione. *Am. J. Physiol.* 257 (1989) L163-L173.
20. Mladenov, M. Redox kinetic measurements of glutathione at the mercury electrode by square-wave voltammetry. The role of copper, cadmium and zinc ions. *Bioelectrochemistry*, 65 (2004) 69-76.
21. Di Ílio, C., Sacchetta, P., Angelucci, S., Zezza, A., Tenaglia, R., Aceto, A. Glutathione peroxidase and glutathione reductase activities in cancerous and non-cancerous human kidney tissues, *Cancer Lett.* 91 (1995) 19-23.
22. Saydam, N., Kirb, A., Demir, O., Hazan, E., Oto, O., Saydam, O., Guner, G. Determination of glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase levels in human lung cancer tissues. *Cancer Lett.* 119 (1997) 13-19.
23. Van Asbeck, B. S. Hoidal, J. Vercellotti, G. M. Protection against lethal hyperoxia by tracheal insufflation of erythrocytes: role of red cell glutathione. *Science*, 277 (1985) 756-759.
24. Hall, R., Malia, R. G. *Medical Laboratory Hematology*, Butterworths, London, (1986) 294.
25. Burgunder, J. M., Varriale, A., Lauterburg, B. H. Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 36 (1989) 127-131.
26. Curello, S., Ceconi, C., Cargnoni, A., Cornacchiari, A., Ferrari, R., Albertini, A. Improved procedure for determining glutathione in

- plasma as na index of myocardial oxidative stress. *Clin. Chem.* 33 (1987) 1448-1149.
27. Roederer, M., Staal, F. J. T., Raju, P. A., Ela, S. W., Herzenberg, L. A. Cytokine-stimulated human-immunodeficiency-virus replication is inhibited by N-acetyl-L-cysteine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87 (1990) 4884-4888.
  28. Gambhir, J. K., Lali, P., Jain, A. K. Correlation between blood antioxidants levels and lipid peroxidation in rheumatoid arthritis. *Clin. Biochem.* 30 (1997) 351-352.
  29. Pirmohamed, M., Williams, D., Tingle, M. D. Intracellular glutathione in the peripheral blood cells of HIV-infected patients: Failure to show a deficiency. *AIDS* 10 (1996) 501-507.
  30. Samiec, P. S., Drews-Botsch, C., Flagg, E. W., Glutathione in human plasma: decline in association with ageing, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radical Biol. Med.* 24 (1998) 699-704.
  31. Del'Innocenti, D., Rosati, F., Iantomasi, T., GSH system in relation to redox state in dystrophic skin fibroblasts. *Biochimie* 81 (1999) 1025-1029.
  32. Bonnenfont-Rousselot, D., Lacomblez, L., Jaudon, M. Blood oxidative stress in amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 178 (2000) 57-62.
  33. Cecchi, C., Latorraca, S., Sorbi, S. Glutathione level is altered in lymphoblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 275 (1999) 152-154.
  34. Yasa, M. Y., Kacmaz, M., Ozturk, H. S., Durak, I. Antioxidant status of erythrocytes from patients with cirrhosis. *Hepato-Gastroenterol.* 46 (1999) 2460-2463.
  35. Lou, M. F., Dickerson, J. E. Protein-thiol mixed disulfides in human lens. *Exp. Eye Res.* 55 (1992) 889-896.
  36. Rahman, I., MacNee, W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation. *Eur. Respir. J.* 16 (2000) 534-554.
  37. Hayes, J. D., McLellan, L. I., Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defense against oxidative stress. *Free Radical Res.* 31 (1999) 273-300.
  38. Rossi, R.; Milzani, A.; Dalle-Donne, I. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin. Chem.* 48 (2002) 742-753.
  39. Delmas-Beauvieux, M. C., Peuchant, E., Couchoron, A. The enzymatic antioxidant system in blood and glutathione status in human immunodeficiency virus (HIV)-infect patients: effects of

- supplementation with selenium or  $\beta$ -caroteno. *Am. J. Clin. Nutr.* 64 (1996) 101-107.
40. Herzenberg, L. A., De Rosa, S. C., Dubs, J. G. Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 1967-1972.
  41. Samiec, P. S., Drews-Botsch, C., Flagg, E. W. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radical Biol. Med.* 24 (1998) 699-704.
  42. Baron, V., Muriel, P., Role of glutathione, lipid peroxidation and antioxidants on acute bile-duct obstruction in the rat. *Biochim. Biophys. Acta*, 1472 (1999) 173-180.
  43. Jahoor, F., Jackson, A., Gazzard, B. Erythrocyte glutathione deficiency in symptom-free HIV infection is associated with decreased synthesis rate. *Am. J. Physiol.* 276 (1999) E205-E211.
  44. Navarro, J., Obrador, E., Carretero, J. Changes in glutathione status and antioxidant system in blood and in cancer cells associate with tumor growth in vivo. *Free Radical Biol. Med.* 26 (1999) 410-418.
  45. Papp, A., Nemeth, I., Karg, E., Papp, E. Glutathione status in retinopathy of prematurity. *Free Radical Biol. Med.* 27 (1999) 738-743.
  46. Mansoor, M. A. Svardal, A. M. Ueland, P. M. Determination of the in vivo redox status of cysteine, cysteinylglycine, homocysteine, and glutathione in human plasma. *Anal. Biochem.* 200 (1992) 218-229.
  47. Mansoor M. A.; Svardal A. M.; Scheneede, J.; Ueland P. M. Dynamic relation between reduced, oxidized, and protein-bound homocysteine and other thiol components in plasma during methionine loading in healthy men. *Clin. Chem.* 38 (1992) 1316-1321.
  48. Buchberger, W., Winsauer, K. Determination of glutathione in biological material by high performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Anal. Chim. Acta*, 196 (1987) 251-254.
  49. Fukunaga, K., Nakazono, N., Yoshida, M. Determination of reduced-form glutathione and total glutathione in blood and plasma by high performance liquid chromatography with on-column fluorescence derivatization. *Chromatographia*, 48 (1998) 690-694.
  50. Parmentier, C., Leroy, P., Wellman, M., Nicolas, A. Determination of cellular thiols and glutathione-related enzyme activities: versatility of high-performance liquid chromatography-spectrofluorimetric detection. *J. Chromatogr. B*, 719 (1998) 37-46.

51. Chen, X. P., Cross, R. F., Clark, A. G., Baker, W. L. Analysis of reduced glutathione using a reaction with 2,4-dichloro-1-(naphthyl-4-ethoxy)-s-triazine (EDTN). *Mikrochim. Acta*, 130 (1999) 225-231.
52. Besada, A., Tadros, N. B., Gawargious, Y. A. Copper(II)-neocuproine as color reagent for some biologically-active thiols spectrophotometric determination of cysteine, penicillamine, glutathione and 6-mercaptopurine. *Mikrochim. Acta*, 3 (1989) 143-146.
53. Raggi, M. A., Nobile, L., Giovannini, A. G. Spectrophotometric determination of glutathione and of its oxidation product in pharmaceutical dosage forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (1991) 1037-1040.
54. Compagnone, D., Massoud, R., Di Ilio, C., Federici, G. Potentiometric determination of glutathione and glutathione transferase activity. *Anal. Lett.* 24 (1991) 993-1004.
55. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* 82 (1959) 70-77.
56. Owes, C. W. I.; Belcher, R. V. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. *Biochem. J.* 94 (1965) 705-711.
57. Tietze, F. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: application to mammalian blood and others tissues. *Anal. Biochem.* 27 (1969) 502-522.
58. Cohn, V. H.; Lyle, J. A fluorometric assay for glutathione. *Anal. Biochem.* 14 (1966) 434-440.
59. Hissin, P. J.; Hilf, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal. Biochem.* 74 (1976) 214-226.
60. Ivanov, A. R.; Nazimov, I. V.; Baratova, L.; Lobazov, A. P.; Popovich, G. B. Determination of biologically active low-molecular-mass thiols in human blood. III. Highly sensitive narrow-bore isocratic reversed-phase highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, 913 (2001), 315-318.
61. Romero F. J.; Mueller-Klieser, W. Semiquantitative bioluminescent assay of glutathione. *J. Biolumin. Chemilumin.* 13 (1998) 263-266.
62. Piccoli, G.; Fiorani, M.; Biagiarelli, E. Simultaneous high-performance capillary electrophoretic determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells in the femtomole range. *J. Chromatogr. A*, 676 (1994) 239-246.

63. Jin, W.; Li, W.; Xu, Q.; Quantitative determination of glutathione in single human erythrocytes by capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis*, 21 (2000) 774-779.
64. Carru, C.; Zinellu, A.; Mario Pes G. Ultrarapid capillary electrophoresis method for the determination of reduced and oxidized glutathione in red blood cells. *Electrophoresis*, 23 (2002) 1716-1721.
65. Rabenstein, D. L.; Saetre, R. Mercury-based electrochemical detector of liquid chromatography for the detection of glutathione and other sulfur-containing compounds. *Anal. Chem.* 49 (1977) 1036-1039.
66. Allison, L. A.; Mayer, G. S.; Shoup, R. E. o-Phthalaldehyde derivatives of amines for high-speed liquid chromatography/electrochemistry. *Anal. Chem.* 56 (1984) 1089-1096.
67. Richie, Jr. J. P.; Lang, C. A. The determination of glutathione, cyst(e)ine and other thiols and disulfides in biological samples using high-performance liquid chromatography with dual electrochemical detection. *Anal. Biochem.* 163 (1987) 9-15.
68. Hiraku, Y.; Murata, M.; Kawanishi, S. Determination of intracellular glutathione and thiols by high performance liquid chromatography with a gold electrode at the femtomole level: comparison with a spectroscopic assay. *Biochim. Biophys Acta*, 1570 (2002) 47-52.
69. Harvey, P. R.; Ilson, R. G.; Strasberg, S. M. The simultaneous determination of oxidized and reduced glutathione in liver tissue by ion pairing reverse phase high performance liquid chromatography with a coulometric electrochemical detector. *Clin. Chim. Acta*, 180 (1989) 203-212.
70. Rose, R. C.; Bode, A. M.; Analysis of water-soluble antioxidants by high-pressure liquid chromatography. *Biochem. J.* 306 (1995) 101-105.
71. Capitan, P.; Malmezat, T.; Breuillè, D.; Obled, C. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of stable isotopes of cysteine and glutathione in biological samples. *J. Chromatogr. B*, 732 (1999) 127-135.
72. Compagnone, D., Federici, G., Scarciglia, L., Palleschi, G., "Flow-through analysis of glutathione in human erythrocytes with an amperometric biosensor", *Anal. Lett.* 27 (1994) 15-27.
73. Manna, L., Valvo, L., Betto, P. Determination of oxidized and reduced glutathione in pharmaceuticals by reversed-phase high-performance liquid chromatography with dual electrochemical detection. *J. Chromatogr. A*, 846 (1999) 59-64.

74. Moore, R. R., Banks, C. E., Compton, R. G. Electrocatalytic detection of thiols using an edge plane pyrolytic graphite electrode. *Analyst*, 129 (2004) 755-758.
75. Lacourse, W. R., Owens, G. S. Pulsed electrochemical detection of thiocompounds following microchromatographic separations. *Anal. Chim. Acta*, 307 (1995) 301-319.
76. Allison, L. A. Shoup, R. E. Dual Electrode Liquid Chromatography Detector for Thiols and Dissulfide. *Anal. Chem.* 55 (1983) 8-12.
77. Zhang, S., Huang, F., Zhao, J., Wen, L., Zhou, F., Yang, P. Determination of thiols in urinary sample by capillary-column liquid chromatography with amperometric detection at a carbon electrode. *Talanta*, 58 (2002) 451-458.
78. Durst, R. A. Bäumer, A. J., Murray, R. W., Buck, R. P., Andrieux. C. P. Chemically Modified Electrodes: Recommended Terminology and Definitions. *Pure Appl. Chem.* 69 (1997) 1317-1323.
79. Halbert, M. K., Baldwin, R. P. Electrocatalytic and Analytical Response of Cobalt Phthalocyanine containing Carbon Paste Electrodes toward Sulfhydryl Compounds. *Anal. Chem.* 57 (1985) 591-595.
80. Wring, S. A., Hart, J. P., Birch, B. J. Development of an Improved Carbon Electrode Chemically Modified with Cobalt Phthalocyanine as a Re-usable Sensor for Glutathione. *Analyst*, 114 (1989) 1563-1570.
81. Griveau, S. Gulppi, M., Pavez, J., Zagal, J. H., Bedioui, F. Cobalt Phthalocyanine-Based Molecular Materials for the Electrocatalysis and Electroanalysis of 2-Mercaptoethanol, 2-Mercaptoethanesulfonic Acid, Reduced Glutathione and L-Cysteine. *Electroanalysis*, 15 (2003) 779-785.
82. Shankaran, D. R., Narayanan, S. S. Amperometric Sensor for Glutathione Based on a Mechanically Immobilized Cobalt Hexacyanoferrate Modified Electrode. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 75 (2002) 501-505.
83. Cox, J. A. Gray, T. J. Flow-injection amperometry of cysteine and glutathione at an electrode modified with a ruthenium-containing inorganic film. *Electroanalysis*, 2 (1990) 107-111.
84. Nalini, B., Narayanan, S. S. Electrocatalytic Oxidation of Sulfhydryl Compounds at Ruthenium (III) Diphenyldithiocarbamate Modified Carbon Paste Electrode. *Electroanalysis*, 10 (1998) 779-783.

85. Jaeger, C. D; Bard, A. J. Electrochemical Behavior of Tetrathiafulvalene-tetracyanoquinodimethane Electrodes in Aqueous Media, *J. Am. Chem. Soc.* *101* (1979), 1690-1699.
86. Cass, A. E. G. Biosensors a Practical Approach. Oxford University Press, (1990) p. 14, 63.
87. Albery, W.J., Bartlett, P. N., Bycroft, M., Craston, D. H., Driscoll, B. J. Amperometric Enzyme Electrodes: Part III. A conducting salt electrode for the oxidation of four different flavoenzymes.. *J. Electroanal. Chem.* *218* (1987) 119-126.
88. McKenna, K., Boyette, S. E., Brajter-Toth, A. Electrochemical Behaviour of Small Biological Molecules at Organic Donor-Acceptor Electrodes in Aqueous Media. *Anal. Chim. Acta*, *206* (1988) 75-84.
89. Zhao, S., Korell, U., Cuccia, L., Lennox B. Electrochemistry of organic conducting salt electrodes – a unified mechanistic description. *J. Phys. Chem.* *96* (1992) 5641-5652.
90. Zhao, S.L., Lennox, R. B. Bioelectrocatalysis at organic conducting salt electrodes. Use of hexamethylenetetrafulvalene tetracyanoquinodimethane (HMTTeF-TCNQ) as a versatile electrode material. *J. Electroanal. Chem.* *346* (1993) 161-173.
91. Hill, B. S., Scolari, C. A., Wilson, G. S., Enzyme electrocatalysis at organic salt electrodes. *J. Electroanal. Chem.* *252* (1988) 125-138.
92. Jaeger, C. D; Bard, A. J. Electrochemical Behavior of Donor-tetracyanoquinodimethane Electrodes in Aqueous Media, *J. Am. Chem. Soc.* *102* (1980) 5435-5442.
93. Bond, A. M., Fletcher, S., Symons, P. G. The relationship between the electrochemistry and the crystallography of microcrystals. The case of TCNQ (7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane) *Analyst*, *123* (1998) 1891-1904.
94. Wooster, T. J., Bond, A. M. Ion selectivity obtained under voltammetric conditions when a TCNQ chemically modified electrode is presented with aqueous solutions containing tetraalkylammonium cations. *Analyst*, *128* (2003) 1386-1390.
95. Scaboo, K. M., Chambers, J. Q. Role of Nucleation in the redox reactions of TTF-TCNQ single crystal electrodes in contact with aqueous KBr solutions. *Electrochim. Acta*, *43* (1998) 3257-3267.
96. Suarez, M. F.; Bond, A. M.; Compton, R. G. Significance of redistribution reactions detected by in situ atomic force microscopy during early stages of fast scan rate redox cycling experiments at a solid 7,7,7,8-tetracyanoquinodimethane-glassy carbon electrode-

- aqueous (electrolyte) interface. *J. Solid State Electrochem.* 4 (1999) 24-33.
97. Shaw, S. J. Marken, F.; Bond, A. M. Detection of new features associated with the oxidation of microcrystalline tetrathiafulvalene attached to gold electrodes by the simultaneous application of electrochemical and quartz crystal microbalance techniques. *Electroanalysis*, 8 (1996) 732-741.
98. Kathirgamanathan, P., Mazid, M. A., Rosseinsky, D. R. The highly conductive non-stoichiometric tetrathiafulvalene nitrate composition, conductivity and structure. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* (1982) 593-596.
99. Ferraris, J.; Cowan, D. O.; Walatka, V.; Perlstein, Jr. J. H. Electron Transfer in a New Highly Conducting Donor-Acceptor Complex, *J. Chem. Am. Soc.* 95 (1973), 948-949.
100. Korell, U.; Lennox, R. B. Determination of ascorbic acid using an organic conducting salt electrode. *Anal. Chim.* 64 (1992) 147-151.
101. Pandey, P. C., Pandey, V., Mehta, S. An amperometric sensor for L-ascorbic acid based on graphite paste electrode. *Indian J. Chem. Sect. A*, 32 (1993) 701-703.
102. Kulys, J., D'Costa, E. J. Printed electrochemical sensor for ascorbic acid determination. *Anal. Chim. Acta*, 243 (1991) 173-178.
103. Cenas, N., Rozgaite, J., Pocius, A., Kulys, J. Electrocatalytic oxidation of NADH and ascorbic acid on electrochemically pretreated glassy carbon electrodes. *J. Electroanal. Chem.* 154 (1983) 121-128.
104. Dong, S. J., Wang, Y. D. The application of chemical modified electrodes in analytical chemistry. *Electroanalysis*, 1 (1989) 99-106.
105. Peterson, M. Electrocatalytic oxidation of ascorbic acid and voltammetric determination with a ferrocene modified platinum electrode. *Anal. Chim. Acta*, 187 (1986) 333-338.
106. Murthy, A. S. N., Gupta, A. R. L. Tetracyanoquinodimethane (TCNQ) modified electrode for NADH oxidation. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 33 (1994) 71-73.
107. Ohsaka, T., Tanaka, K., Tokuda, K. Electrocatalysis of poly(thionine) modified electrodes for oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 3 (1993) 222-224.
108. Perrin, D. D., Armarego, W. L. F. "Purification of Laboratory Chemicals". Third Edition 1988. Pergamon Press.
109. Habif, S., Mutaf, I., Turgan, N., Onur, E., Duman, C., Ozmen, D., Bayindir, O., Age and gender dependent alterations in the activities of

- glutathione related enzymes in healthy subjects. *Clin. Biochem.* 34 (2001) 667-671.
110. Alves, A. A., Pereira da Silva, L., Macedo, D. V., Kubota, L. T. Amperometric sensor for glutathione reductase activity determination in erythrocyte hemolysate. *Anal. Biochem.* 323 (2003) 33-38.
111. Anderson, M. Determination of Glutathione and Glutathione Disulfide in Biological Samples. *Methods Enzymol.* 113 (1985) 548-555.
112. Kuo-Chuan, H., Jung-Yu, L. NO<sub>2</sub> gas sensing based on vacuum-deposited TTF-TCNQ thin films. *Sens. Actuators, B* 93 (2003) 370-378.
113. Wheland, R. C., Gillson, J. L. Synthesis of Electrically Conductive Organic Solids. *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 3916-3925.
114. Silverstein, R. M., Webster, F. X. Identificação Espectrofotométrica de Compostos Orgânicos. 6<sup>a</sup> Edição. Livros Técnicos e Científicos Editora S. A. p. 67-135.
115. Vidal, J. C., Méndez, S., Castillo, J. R. Electropolymerization of pyrrole and phenylenediamine over a organic conducting salt based amperometric sensor of increased selectivity for glucose determination. *Anal. Chim. Acta*, 385 (1999) 203-211.
116. Wooster, T. J., Bond, A. M., Honeychurch, M. J. An Analogy of an Ion-Selective Electrodes Sensor Based on the Voltammetry of Microcrystals of Tetracyanoquinodimethane or Tetrathiafulvalene Adhered to an Electrode Surface. *Anal. Chem.* 75 (2003) 586-592.
117. Martorell, D. Céspedes, F., Martínez-Fàbregas, E., Alegret, S. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using biosensor based on a polishable, 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane modified, graphite-epoxy biocomposite. *Anal. Chim. Acta*, 337 (1997) 305-313.
118. Gunasingham, H., Tan, C. H., Carbon Paste-Tetrathiafulvalene Amperometric Enzyme Electrode for the Determination of Glucose in Flowing Systems. *Analyst*, 115 (1990) 35-39.
119. Boyd, R. H., Phillips, W. D. Solution dimerization of tetracyanoquinodimethane ion radical. *J. Chem. Phys.* 43 (1965) 2927-2929.
120. Bartlett, P. N., Tong, X. Q. Dissolution Processes at TTF-TCNQ Single-Crystal Electrodes: A Dynamic *in Situ* Electrochemical Scanning Tunneling Microscopy Study. *J. Phys. Chem. B*, 101 (1997) 8540-8549.

- 
121. Kubota, L. T., Gushikem, Y., Cyclic voltammetry studies of copper and nickel hexacyanoferrate immobilized on a silica gel surface coated with titanium (IV) oxide. *J. Electroanal. Chem.* 362 (1993) 219-225.
  122. Rover, L., Kubota, L. T., Höehr, N. F., Development of an amperometric biosensor based on glutathione peroxidase immobilized in a carbodiimide matrix for the analysis of reduced glutathione from serum. *Clin. Chim. Acta*, 308 (2001) 55-67.
  123. Rosatto, S. S., Kubota, L. T., Oliveira-Neto, G. Biosensor for phenol based on the direct electron transfer blocking of peroxidase immobilising on silica-titanium. *Anal. Chim. Acta*, 390 (1999) 65-72.
  124. Recommendations for the Definition, Estimation and Use of the Detection Limit. *Analyst*, 112 (1987) 199-204.
  125. Saari, N. B., Fujita, S., Miyazoe, R., Okugawa, M. Distribution of ascorbato oxidase activities in the fruits of family cucurbitaceae and some of their properties. *J. Food Biochem.* 19 (1996) 321-327.
  126. Fernandes, J. C. B., Kubota, L. T. Neto, G. O. Potentiometric biosensor for L-ascorbic acid based on ascorbato oxidase of natural source immobilized on ethylene vinylacetate membrane. *Anal. Chim. Acta*, 385 (1999) 3-12.
  127. Munday, R. Toxicity of thiols and disulfides: involvement of free-radical species. *Free Radical Biol. Med.* 7 (1989) 659-673.



**Propostas  
para  
Trabalhos  
Futuros**

## VII. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Como propostas para trabalhos futuros sugere-se:

- O desenvolvimento de eletrodos descartáveis utilizando o complexo TTF-TCNQ para determinação de glutathiona em análises clínicas, a fim de evitar contaminação em análises entre pacientes.
- O desenvolvimento de eletrodos para determinação de glutathiona oxidada (GSSG), a fim de encontrar a relação GSH/GSSG o qual poderia dar uma informação mais clara do estado de estresse oxidativo do paciente.
- Desenvolver eletrodos com complexos de TTF-TCNQ modificados que podem melhorar ainda mais a transferência de elétrons entre a glutathiona e o eletrodo.