

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS  
CURSO DE QUÍMICA LICENCIATURA

---

**MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO  
DE CISTEÍNA EMPREGANDO UM COMPLEXO DE  
TRANSFERÊNCIA DE CARGA.**

---

**Isabel Lourenço Torres**

Diamantina  
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI  
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS

---

**MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO  
DE CISTEÍNA EMPREGANDO UM COMPLEXO DE  
TRANSFERÊNCIA DE CARGA.**

---

**Isabel Lourenço Torres**

Orientadora: **Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Silva Luz**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Licenciatura em Química, como  
parte dos requisitos exigidos para a conclusão  
do curso.

Diamantina

2011

**MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO  
DE CISTEÍNA EMPREGANDO UM COMPLEXO DE  
TRANSFERÊNCIA DE CARGA**

**Isabel Lourenço Torres**

**Orientadora: Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia Silva Luz**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Curso de Licenciatura em Química, como  
parte dos requisitos exigidos para a conclusão  
do curso.

APROVADO em ..... / ..... / .....

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Flávio Santos Damos – UFVJM

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Débora Villela Franco – UFVJM

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita de Cássia Silva Luz – UFVJM

## **DEDICATÓRIA**

*Dedico este trabalho a Deus por ser minha fortaleza. Aos meus pais, Donizete e Vanilda, aos meus irmãos, Moisés e Marciene, pelo amor, companheirismo, atenção e palavras motivadoras. A todos que acreditaram na realização deste sonho.*

## **AGRADECIMENTOS**

### Agradeço

Em primeiro lugar a Deus por ser o Senhor e Salvador da minha vida. Por agir de forma precisa e permitir que este sonho se concretizasse mesmo diante os obstáculos existentes. Por estar sempre presente nas horas de tristezas e alegrias, pois Ele é o nosso refúgio e fortaleza. Obrigada Senhor!

Aos meus pais, Donizete e Vanilda, pela paciência, atenção, amor, companheirismo e pelas palavras motivadoras que não me deixaram desistir nestes anos de luta. Não há palavras que expressem minha eterna gratidão. Hoje o que sou é fruto dos seus sonhos e esforço. Obrigada por acreditarem em mim e serem exemplos em minha vida.

Aos meus irmãos pela união, alegria, amor e confiança. E que mesmo longe lutaram e venceram comigo cada etapa e obstáculos que tentaram destruir meus sonhos.

A professora Rita e ao professor Luis Antônio por suas orientações, expectativas, confiança, amizade, carinho e exemplo profissional e humano. O conhecimento que adquirir com vocês é para toda uma vida.

A minha tia Nem (in memoriam) que sempre sonhou com a minha formação, pela suas orações e exemplo de vida e a minha avó Maria da Penha por sonhar o meu sonho comigo e ao meu Tio Otaviano pela sua alegria em minhas conquistas. A Toda minha família.

Ao Dilton, Gustavo, Delton, Tatinha e Cátia pela alegria e confiança. A Gizeli, Gabriele, Amanda, Neuma, Lucas e ao PET pelo apoio. A todos pelos momentos inesquecíveis.

Ao Teles e a Maria de Fátima pelo apoio, paciência, atenção e ensinamentos. Por sempre me socorrerem. Sem vocês este trabalho não seria concluído.

Ao Alex, Jhow, Lincoln, Eduardo, Carlos, Emerson, Aline, Claudiney, Claudirene e Edney pelos conselhos e pelas palavras que sempre me fortaleceram. E a Primeira Igreja Batista pelas orações e ensinamentos.

A todos os amigos que fortaleci e conquistei nesta jornada. Pelos momentos de alegria e de falar sério, pela suas existências em minha vida. Adoro muito todos vocês.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta torceram pela minha vitória.

Muito obrigada!

*“Busca o seu próprio desejo aquele que se separa; e insurge-se contra a verdadeira  
sabedoria”.*  
(Provérbios 18: 01)

## RESUMO

**MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE CISTEÍNA EMPREGANDO UM COMPLEXO DE TRANSFERÊNCIA DE CARGA.** A cisteína é um importante aminoácido devido sua alta reatividade em um grande número de materiais biológicos e preparações farmacêuticas. O método espectrofotométrico é baseado no complexo de transferência de carga da reação entre a cisteína, doadora de elétrons e o *p*-cloranil, receptor de elétrons. Este complexo de cor amarela foi confirmado no espectro UV/Visível. Neste sentido, um simples e sensível método para a determinação de cisteína foi descrito. Diferentes variáveis que afetam a reação de complexação de compostos orgânicos foram estudadas e otimizadas, tais como, tempo de reação, temperatura, solvente e a concentração de *p*-cloranil. Após a otimização dos parâmetros experimentais, uma boa relação linear com um coeficiente de correlação de 0,990 foi encontrada entre a absorbância e a concentração na faixa de  $5,00 \times 10^{-6}$  a  $3,75 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ , sensibilidade  $5.898,08 \text{ molL}^{-1}$ , limite de detecção  $1,50 \mu\text{molL}^{-1}$  e limite de quantificação  $5 \mu\text{molL}^{-1}$ . Baseado no método de Job (variação contínua), os resultados indicaram a formação de complexo de transferência de carga 1:1 com a fórmula geral [(cisteína)(*p*-cloranil)].

**Palavras – chave:** *cisteína, complexo de transferência de carga, espectrofotometria.*

## ABSTRACT

**SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF CYSTEINE USING A CHARGE TRANSFER COMPLEX.** Cysteine is an important amino acid due to its high reactivity in a large number of biological materials and pharmaceutical preparations. The spectrophotometric method is based on charge transfer complex between the cysteine reaction, electron donor and *p*-chloranil, electron acceptor. This complex of yellow color was confirmed in the spectrum UV/Visible. In this sense, a simple and sensitive method for determination the cysteine has been described. Different variables affecting the complexation reaction of organic compounds were studied and optimized, such as, time of reaction, temperature, solvent and *p*-chloranil concentration. After the optimization of the experimental parameters, a good linear relation with a coefficient correlation of 0,990 was found between the absorbance and the concentration in the strip of  $5,00 \times 10^{-6}$  to  $3,75 \times 10^{-5}$  mol.L<sup>-1</sup>, sensibility 5.898,08 mol.L<sup>-1</sup>, limit of detection 1,50 μmol.L<sup>-1</sup> and limit of quantification 5 μmol.L<sup>-1</sup>. Based on the method of Job (continuous variation), the results indicate the formation of charge transfer complex 1:1 with the general formula [(cysteine)(*p*-chloranil)].

**Keywords:** *cysteine, charge transfer complex, spectrophotometric.*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 2.1:</b> Forma estrutural da cisteína.....	<b>2</b>
<b>Figura 2.2:</b> Ciclo de remetilação e transsulfuração para a síntese de cisteína – biotransformação de metionina. ....	<b>3</b>
<b>Figura 2.3:</b> Esquema dos componentes principais de um espectrofotômetro .....	<b>8</b>
<b>Figura 2.4:</b> Forma estrutural do <i>p</i> -cloranil .....	<b>10</b>
<b>Figura 4.1:</b> Espectrofotômetro UV/Visível da Varian, modelo Cary 50 Conc (a) e Cubeta de quartzo (b).....	<b>14</b>
<b>Figura 5.1:</b> Espectros na região do visível de soluções de: (a) cisteína, (b) <i>p</i> -cloranil e (c) mistura <i>p</i> -cloranil – cisteína. Concentração do complexo <i>p</i> -cloranil – cisteína= 62,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ preparada numa solução de acetonitrila-água 1:1 .....	<b>18</b>
<b>Figura 5.2:</b> Reação proposta na literatura para a interação entre aminas e <i>p</i> -cloranil: a) reação de substituição; b) reação com formação de um complexo de transferência de carga.....	<b>20</b>
<b>Figura 5.3:</b> Efeito do tempo (minutos) versus absorvância do complexo de transferência de carga entre cisteína e <i>p</i> -cloranil.....	<b>21</b>
<b>Figura 5.4:</b> Efeito da concentração de <i>p</i> -cloranil na absorvância das soluções de <i>p</i> -cloranil – cisteína no comprimento de onda de 333nm. Concentração de cisteína 62,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ....	<b>25</b>
<b>Figura 5.5:</b> Efeito da temperatura no complexo de transferência de carga <i>p</i> -cloranil – cisteína. $\lambda= 333\text{nm}$ . Medidas realizadas após um período de 2 minutos.....	<b>26</b>
<b>Figura 5.6:</b> Aplicação do método de Job para reação entre cisteína e <i>p</i> -cloranil.....	<b>27</b>
<b>Figura 5.7:</b> Possível mecanismo de formação do ânion radicalar derivado do <i>p</i> -cloranil, após reação com o cisteína. ....	<b>28</b>
<b>Figura 5.8:</b> Gráfico da curva analítica para a cisteína em 333 nm. ....	<b>29</b>

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 5.1:</b> Tabela de absorvância dos solventes. Em todos os casos, a concentração de cisteína foi igual a 62,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a concentração de p-cloranil foi igual a 62,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ .....	<b>22</b>
<b>Tabela 5.2:</b> Dados da constate dielétrica ( $\epsilon$ ) e momento de dipolo ( $\mu$ ).....	<b>23</b>
<b>Tabela 5.3:</b> Figuras de mérito para o complexo de TC formado entre a cisteína e o p-cloranil.....	<b>30</b>

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>AD</b>	Doença de Alzheimer
<b>AIDS</b>	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
<b>CG-MS</b>	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
<b>Cis</b>	Cisteína
<b>CTC</b>	Complexo de Transferência de Carga
<b>GSH</b>	Glutadiona Reduzida
<b>Hci</b>	Homocisteína
<b>HPLC</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>MND</b>	Doença Neuromotora
<b>PD</b>	Doença de Parkinson
<b>RF</b>	Radiofrequência
<b>SH</b>	Radical Sulfidrila
<b>TC</b>	Transferência de carga
<b>UV</b>	Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABRIVIATURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>1</b>
2.1 Cisteína .....	1
2.2 Principais métodos utilizados para a determinação da cisteína .....	1
2.2.1 Espectroscopia .....	6
2.3 Complexo de transferência de carga.....	11
<b>3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....</b>	<b>13</b>
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>14</b>
4.1 Reagentes e soluções .....	14
4.2 Instrumentação.....	14
4.3 Estudo do comportamento do <i>p</i> -cloranil e da cisteína.....	15
4.4 Otimização dos parâmetros experimentais .....	15
4.4.1 Estudo do solvente.....	15
4.4.2 Estudo da concentração de <i>p</i> -cloranil e cisteína .....	16
4.4.3 Estudo do tempo .....	16
4.4.4 Estudo da temperatura .....	16
4.5 Estudo da estequiometria da reação.....	17
4.6 Curva analítica para a determinação de cisteína.....	17
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
5.1 Estudo do comportamento espectrofotométrico do <i>p</i> -cloranil na presença e na ausência da cisteína .....	18
5.2 Otimização dos parâmetros experimentais para a determinação da cisteína .....	21
5.2.1 Efeito do tempo de reação do complexo de transferência de carga.....	21
5.2.2 Efeito da natureza do solvente .....	22
5.2.3 Efeito da concentração do agente complexante.....	24
5.2.4 Efeito da temperatura sobre o complexo de transferência de carga .....	25

5.3	Avaliação da estequiometria da reação.....	26
5.4	Construção da curva analítica para a determinação da cisteína.....	28
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>31</b>
	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>32</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>33</b>

## **1. INTRODUÇÃO**

A cisteína (cis) tem um papel importante em vários processos biológico devido sua alta reatividade em um grande número desses materiais e em fármacos. Trabalhos demonstram que a cisteína é importante no desenvolvimento do homem, por pertencer a uma classe de substâncias encontradas no corpo, com a função de desenvolvimento e funcionamento eficaz do metabolismo, sendo muito aplicada na ciência nos tratamentos de doenças, na forma de medicamentos, biomarcadores na evolução de doenças e na química dos alimentos. A sua determinação é de grande importância, com grande interesse em bioquímica, investigação clínica, indústria farmacêutica e pesquisa. Sendo um importante alvo de estudo, e sua avaliação e determinação em matrizes biológicas e preparações farmacêuticas são altamente necessárias.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

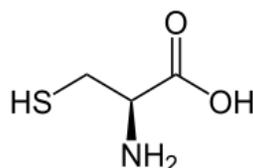
Neste sentido, vários métodos têm sido desenvolvidos para a determinação de cisteína, dentre elas a cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC.

### **2.1 Cisteína**

A cisteína é um aminoácido muito importante codificado pelo código genético e apresenta papel fundamental na manutenção da estrutura terciária de proteínas, sendo, portanto, um dos componentes das proteínas dos seres vivos. Apresenta papel importante em sistemas biológicos e é extensamente usada na medicina e química de alimentos [1]. A cisteína ou derivados de cisteína são extensamente empregados em várias aplicações farmacêuticas, em antibióticos ou suplemento alimentar, assim a sua determinação ou determinações de combinações de cisteína, tais como acetilcisteína, carbocisteína ou cistina são geralmente usadas em investigação clínica, indústria farmacêutica e pesquisa [2-5].

Este aminoácido (cisteína) não só constitui proteínas, mas também apresenta papel importante em vários processos biológicos, tal como redox, transferência de metil, substrato crítico para síntese de proteínas, precursor limitante para GSH, síntese de taurina e reações de fixação de carbono nas quais Acetil-CoA participa [6-9]. O Acetil-CoA é um

componente fundamental no metabolismo dos seres vivos, formado a partir do catabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, sendo constituído de um grupo acetilo, dois carbonos, unidos de maneira covalente e a coenzima A.



**Figura 2.1:** Forma estrutural da cisteína

Além disso, mais pesquisas têm sido focadas na determinação de cisteína, que contém o grupo tiol em sua estrutura, e seus derivados em fármacos, urina, soro e protoplasma, muitos destes tióis são encontrados em combinações relacionadas ao metabolismo de doenças [7-9].

A Cisteína é importante por causa da sua alta reatividade e sua presença em inúmeros materiais biológicos e preparações farmacêuticas. Por ser um aminotiol (aminoácido com grupo tiol) sua principal característica é a presença de um radical sulfidrila (-SH), altamente reativo em sua cadeia lateral [10]. Grupos ativos contendo tiol como a cisteína apresentam papéis importantes como, por exemplo, agente redutor extracelular [6]. Este tiol participa em um grande número de processos bioquímicos que dependem diretamente da reatividade particular do radical sulfidrila (-SH) [10-11].

Outra importante informação da cisteína é que as atividades de algumas enzimas dependem diretamente da reatividade particular de tióis nos resíduos de cisteína. Resíduos de cisteína em proteínas e peptídeos são importantes para estabilizar a conformação direta de moléculas por ligação de dissulfeto no processo de síntese da proteína [12]. Outra função celular é a participação da formação e equilíbrio de intermediários metabólicos importantes, gerando piruvato que pode ser convertido a fosfoenolpiruvato e glicose. A estratégia da formação dos aminoácidos é formar intermediários metabólicos que possam ser convertidos em glicose ou oxidados. Assim o conjunto variado dos vinte aminoácidos é

convertido em outras moléculas, tais como, acetil CoA, acetoacetil CoA ou piruvato [10, 13-14].

Este aminoácido sulfurado (cisteína) é sintetizado a partir da metionina através da via de transsulfuração da homocisteína, que ocorre posteriormente ao ciclo de remetilação da homocisteína (Hci) [15-16]. A homocisteína, formada a partir da metionina hepática, é metabolizada nas vias de desmetilação e de transsulfuração, sendo que seus valores plasmáticos e urinários refletem a síntese celular. A transsulfuração ocorre quando a metionina está presente em excesso ou se a síntese de cisteína é necessária [15-16].

No ciclo da remetilação da homocisteína a metionina sintase catalisa a aquisição de um grupo metila do N<sup>5</sup>-metiltetrahydrofolato (doador de metila) para formar metionina, sendo que a metionina pode ser convertida novamente a homocisteína pela perda do grupamento metila [17]. Todo o processo se encontra na figura 2.2.

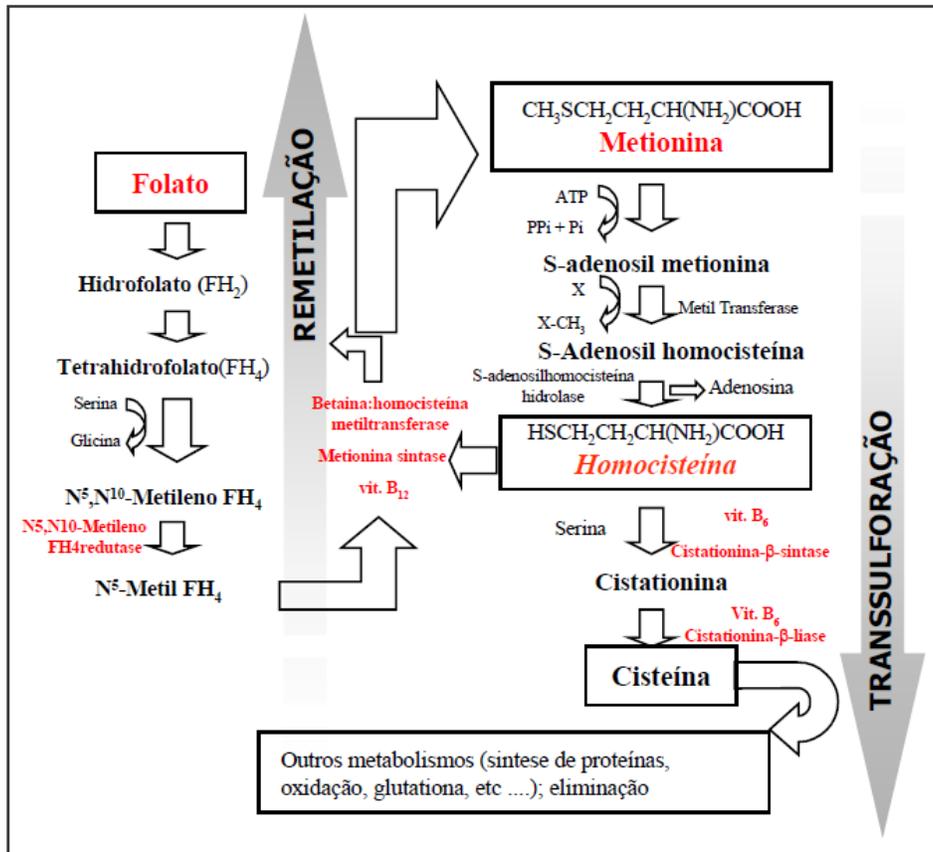


Figura 2.2: Ciclo de remetilação e transsulfuração para a síntese de cisteína – biotransformação de metionina.

Na reação de transsulforação ocorre a oxidação da homocisteína para cisteína. O catabolismo da cadeia carbônica e o átomo de enxofre da metionina/homocisteína ocorrem devido à oxidação ocasionada pela reação de transsulforação. A primeira etapa da transsulforação é a condensação da homocisteína com a serina, através da ação direta da cistationa- $\beta$ -sintase que é dependente da vitamina B<sub>6</sub>, resultando na formação da cistationina. A cistationina é então metabolizada formando a cisteína,  $\alpha$ -cetobutirato e o íon amônio, pela ação direta da cistationa- $\beta$ -liase que é dependente da vitamina B<sub>6</sub>. A cisteína formada contém o grupo SH proveniente do composto metionina/homocisteína e o esqueleto carbônico da serina, podendo ser utilizada para síntese de proteínas, glutatona, ou sofrer reações de catabolização [18]. O esqueleto carbônico da metionina/homocisteína, na forma ácido pirúvico, é oxidado diretamente dentro da mitocôndria formando piruvato desidrogenase ou formando o complexo ácido ceto desidrogenase [19].

Do conjunto básico dos vinte aminoácidos, a leucina e a lisina são puramente cetogênicas. Isoleucina, fenilalanina, triptofano e tirosina são cetogênicos quanto glicogênico. Alguns de seu átomos de carbono se convertem em acetil CoA ou acetoacetil CoA, enquanto outros aparecem como precursores potenciais de glicose. Os outros quatorze aminoácidos, dentre os quais a cisteína, são classificados como puramente glicogênico [20].

As oxidações reversíveis pretendem controlar uma larga gama de atividades e estruturas das proteínas [21]. Os átomos de enxofre da cisteína podem sofrer oxidações múltiplas, e a oxidação reversível de tióis para dissulfetos. Mudanças de oxidação/redução (redox) nos pares tiol/dissulfeto afeta a conformação da proteína, atividades da enzima, atividade do transportador, dos ligantes que ligam a receptores, interações de proteína-proteína, interações de proteína-DNA e a degradação da proteína [21-24]

A cisteína é o único aminoácido que possui o grupo tiol (-SH) [25] e, devido à presença desse grupo, pode sofrer oxidações reversíveis em temperatura ambiente, sob condições fisiológicas [26]. A cisteína é facilmente oxidada para formar um aminoácido dimérico, chamado de cistina, no qual duas moléculas de cisteína estão unidas por uma ligação dissulfeto. Cisteína e cistina são os principais pares tiol/dissulfeto de baixo peso

molecular presente no plasma de mamíferos e tendem a ser estáveis no mesmo [27-28]. No entanto, a oxidação da cisteína não leva apenas a formação de cistina. A oxidação de tióis pode levar a formação de diversos outros produtos, incluindo ácidos sulfênicos, sulfínicos e sulfônicos [29].

Níveis de cisteína estão relacionados a inúmeras condições patológicas. As doenças mais conhecidas são principalmente as neurodegenerativas [13, 30], doença de Alzheimer (AD), Doença de Parkinson (PD) e doença neuromotora (MND), caracterizadas inicialmente pela destruição de áreas específicas do cérebro em níveis elevados [31-32]. Em casos como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) trabalhos demonstram que a cisteína aparece em níveis elevados e pode ser útil como biomarcador na evolução da doença, já pacientes com câncer tem uma quantidade de cisteína diminuída em função dos efeitos tóxico da quimioterapia sobre o organismo [10]. A deficiência de cisteína causa muitas doenças como redução na velocidade do crescimento de crianças, edema, letargia, dano ao fígado e a perda de músculo [05]. Assim, avaliação sensível e seletiva de cisteína em matrizes biológicas e preparações farmacêuticas são altamente necessárias [33].

## **2.2 Principais métodos utilizados para a determinação da cisteína**

Conforme descrito anteriormente a cisteína possui um papel importante em vários processos biológicos, devido sua alta reatividade em um grande número desses materiais e em fármacos. A sua determinação é de grande importância, com grande interesse em bioquímica, investigação clínica, industrial, farmacêutica, nutricional e pesquisa. É muito utilizada em preparações de vitamina, suplementos dietéticos, estimulantes de apetite, complemento para o crescimento e na manutenção de cabelos e unhas.

Diferentes métodos para determinação de cisteína em diversas amostras, tal como formulações farmacêuticas tem sido propostos. Entre os muitos métodos para determinação de cisteína ou combinações de cisteína, os métodos cromatográficos são extensamente usados. Numerosas técnicas como a cromatografia líquida [34], cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC [35-37], eletroforese capilar [38], detecção eletroquímica [39-40],

espectrofotometria, cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas CG-MS [41] e espectroscopia têm sido propostos para a detecção de cisteína.

### 2.2.1 Espectroscopia

As medidas baseadas na luz ou outras formas de radiação eletromagnética são amplamente empregadas em química analítica. As interações da radiação com a matéria são o objeto de estudo da ciência da espectroscopia. Os métodos espectroscópicos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou pelas espécies atômicas de interesse. Podem-se classificar os métodos espectroscópicos de acordo com a região do espectro eletromagnético envolvida na medida. As regiões espectrais que têm sido empregadas incluem os raios  $\gamma$ , os raios X, ultravioleta (UV), visível, infravermelha (IV), microondas e radiofrequência (RF) [42].

Em termos genéricos, pode-se definir espectroscopia como a interação de qualquer tipo de radiação eletromagnética com a matéria. Dessa forma, toda manifestação que nossos olhos percebem, por exemplo, é um tipo de espectroscopia que está acontecendo [43].

Fenômenos espectroscópicos dependem da grandeza da energia da luz, e assim se obtêm informações sobre as transições eletrônicas das substâncias químicas e se observa as cores da natureza que nos cerca. A luz provoca na matéria a chamada transição de estados energéticos. Essas transições podem ser eletrônicas, rotacionais, vibracionais ou ainda translacionais. A luz tem um comportamento duplo: ora apresenta-se como partícula (como se fosse um conjunto de pequeníssimos pontos que chamamos de fótons), ora comporta-se como onda (similar ao efeito que percebemos quando jogamos uma pedra na superfície de um lago de águas calmas) [43].

A tentativa de compreender os efeitos que a radiação eletromagnética exerce sobre a matéria provém de longa data, mas foi com Isaac Newton, proeminente pesquisador inglês, quem iniciou o estudo científico das propriedades da luz. Ele descobriu que a luz branca do sol nada mais era que um somatório de outras luzes, variando do violeta ao vermelho, passando pelo anil, azul, verde, amarelo e laranja [43]. Um espectro de absorção é um gráfico da absorbância *versus* o comprimento de onda [42].

A radiação eletromagnética é uma forma de energia que é transmitida através do espaço a velocidades altas. A radiação eletromagnética pode ser descrita como uma onda com propriedades específicas tais como: frequência, comprimento de onda, velocidade e amplitude. Os tipos de interação mais interessantes em espectroscopia envolvem transições entre diferentes níveis energéticos das espécies químicas [42].

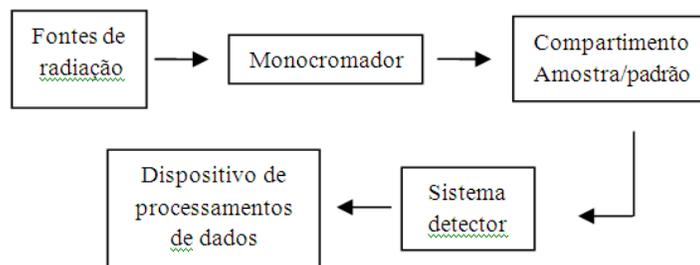
A espectrofotometria ultravioleta e visível (UV/Visível) é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação do princípio ativo de fármacos. A espectrofotometria de absorção molecular é valiosa para a identificação dos grupos funcionais na molécula. Mais importante, entretanto, são as aplicações da espectroscopia de absorção UV/Visível para a determinação quantitativa de compostos contendo grupos absorventes [44-45]. O método espectrofotométrico é baseado em medidas de absorção de radiação eletromagnética [42-45].

A espectroscopia é o termo geral para a ciência que trata da interação da matéria com vários tipos de radiação através da transmissão, absorção ou reflexão da energia radiante incidente em uma amostra. A espectrofotometria se diferencia da espectroscopia por ser um amplo grupo de métodos analíticos que são baseados em espectroscopia molecular e atômica e tratam da medida da intensidade da radiação com um transdutor fotoelétrico.

As análises por espectrofotometria UV/Visível podem ser análise qualitativa e quantitativa. Também é possível detectar contaminações ou processos de decomposição de matérias-primas pela comparação dos espectros de absorção da matéria e do padrão da mesma. A análise quantitativa tem como condição essencial para qualquer determinação por espectrofotometria UV/Visível a observação da lei de Beer [42-45].

A característica mais importante dos equipamentos utilizados para realizar as medidas em espectroscopia é a seleção de radiações monocromáticas, o que possibilita inúmeras determinações quantitativas regidas pela Lei de Beer. Quando a região espectral usada é a UV/Visível, são necessários componentes óticos de quartzo e detectores altamente sensíveis capazes de detectar radiações nessa extensa faixa espectral em que atua o instrumento. Os espectrofotômetros, em geral, contêm cinco componentes principais:

fontes de radiação, monocromador, recipientes para conter as soluções, detectores e indicadores de sinal (Figura 2.3) [42-45].



**Figura 2.3:** Esquema dos componentes principais de um espectrofotômetro

As fontes de radiação mais comuns baseiam-se na incandescência e são muito práticas no infravermelho e no visível. São constituídas por filamentos de materiais que são excitados por descargas elétricas. A fonte de radiação deve gerar radiação contínua e ter intensidade de potência radiante [42-45].

Os monocromadores são dispositivos essenciais dos espectrofotômetros e tem como função a seleção do comprimento de onda que se tem interesse para a análise. É constituído de uma fenda de entrada de um elemento de dispersão de radiação e de uma fenda de saída. O elemento de dispersão pode ser um prisma ou uma rede de difração [42-45].

Os recipientes usados são cubas ou cubetas retangulares de vidro ou quartzo. As cubetas de vidro são usadas quando se trabalha na região do visível. Para a região do ultravioleta, devem-se usar as cubetas de quartzo, que são transparentes à radiação ultravioleta, pois o vidro absorve a mesma. Uma cubeta ou cela ideal deve ser de 1 cm, para simplificar os cálculos da expressão da Lei de Beer [42-45].

O detector é o dispositivo que responde algumas características de um sistema em observação e converte esta resposta em um sinal mensurável. É um elemento sensível na radiação e que pode fornece uma medida da intensidade do sinal analítico [42-45].

A lei de absorção, também conhecida como lei de Beer-Lambert ou somente como lei de Beer, diz quantitativamente como a grandeza da atenuação depende da concentração das moléculas absorventes e da extensão do caminho sobre o qual ocorre a absorção. À

medida que a luz atravessa um meio contendo um analito que absorve, um decréscimo de intensidade ocorre na proporção que o analito é excitado. Para uma solução do analito de determinada concentração, quanto mais longo for o comprimento do caminho do meio através do qual a luz passa (caminho óptico), mais centros absorventes estarão no caminho, e maior será a atenuação. Também, para um dado caminho óptico, quanto maior for a concentração de absorventes, mais forte será a atenuação [42-45].

A transmitância  $T$  da solução é a fração da radiação incidente transmitida pela solução, como mostrado na Equação 1. A transmitância é freqüentemente expressa como uma porcentagem denominada porcentagem de transmitância (Equação 1):

$$T = \frac{P}{P_0} \quad (1)$$

A absorbância  $A$  de uma solução está relacionada com a transmitância de forma logarítmica (Equação 2):

$$A = -\log T = \log \frac{P_0}{P} \quad (2)$$

$A$ = absorbância

$\epsilon$ = absortividade molecular ou coeficiente de extinção

$c$ = concentração do material absorvedor

$l$ = espessura da amostra da amostra através da qual a luz passa.

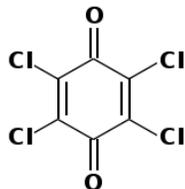
A lei de Beer não se refere a uma concentração qualquer, mas as soluções muito diluídas, como é o caso na espectroscopia UV/Visível. Os desvios são pequenos [42-45]. Estas leis podem ser relacionadas pela fórmula (Equação 3):

$$\epsilon = \frac{A}{cl} \quad (3)$$

onde  $\epsilon$  é o coeficiente de extinção molar,  $c$  é a concentração molar e  $l$  é a espessura, em centímetros. Os resultados experimentais são geralmente fornecidos em termos de extinção molar  $\epsilon$  ou de seu logaritmo,  $\log \epsilon$  [42-45].

Muitos métodos espectrofotométricos com absorção molecular utilizados para análises farmacêuticas são baseados na interação entre um agente complexante e um fármaco, formando complexos de transferência de carga.

O *p*-cloranil, por exemplo, é uma quinona clorada, ou seja, um organoclorado com a fórmula molecular  $C_6Cl_4O_2$  de nome científico 2,3,5,6-tetracloroparabenzoquinona (TCPB).



**Figura 2.4:** Forma estrutural do *p*-cloranil

Dentre alguns exemplos, incluem-se a utilização de quinonas para a determinação de proteínas totais em plasma sanguíneo ou tecidos animais, a determinação simultânea de aminoácidos e proteínas totais e a determinação de cisteína em xampus, pílulas de alimentos, aminoácidos e a misturas de carbocisteínas em produtos farmacêuticos [46-48]. As metodologias analíticas têm buscado como mediadores as moléculas de quinonas, visando transformar o ambiente químico, de um contexto inacessível para os estudos científicos em colaborativos. Na maioria dos métodos são analisados os produtos da reação entre quinonas e a espécie a ser estudada [49].

Reagentes como 2,3-dicloro-5,6-diciano-*p*-benzoquinona (DDQ) e 2,3,5,6-tetracloro-*p*-benzoquinona (*p*-cloranil) são bastante utilizados em síntese orgânica e estes compostos podem ser úteis como moléculas modelo nos estudos de degradação de organoclorados em meio aquoso. A maioria dos métodos de caracterização de diferentes tipos de compostos (fármacos, aminoácidos, proteínas, entre outros) mediados por compostos quinônicos são baseados em estudos como as técnicas espectroscópicas, principalmente a absorção UV-Visível [49].

Muitos compostos em reações de transferência de carga se comportam como bases, ou seja, receptores de elétrons. Dentre os receptores de elétrons comumente utilizados no desenvolvimento de métodos espectrofotométricos baseados na formação destes

complexos, está o *p*-cloranil [50]. Reações de complexo de transferência de carga envolvendo *p*-cloranil ácidos provaram ser versátil em determinação espectrofotométrica para um grande número de fármacos [51-52]

### 2.3 Complexo de transferência de carga

O complexo de transferência de carga (CTC) é um complexo elétron-doador-elétron-receptor caracterizado pela transição eletrônica para um estado no qual exista uma transferência parcial de carga eletrônica do doador para o receptor. Os CTC apresentam cores intensas que absorvem radiação na região visível ou ultravioleta [53-55].

Uma variedade de combinações que formam o complexo de transferência de carga (TC), entre compostos  $\pi$ -receptores com  $\pi$ -doadores são estudados e utilizados para desenvolver simples métodos analíticos como a espectrofotometria.

O complexo molecular formado pelo tipo ácido – base de Lewis de interação entre moléculas orgânicas, ou uma molécula orgânica e uma molécula inorgânica ou átomo, merece atenção considerável com relação aos estudos dos mecanismos de condução eletrônica através de combinações orgânicas. Estes complexos são chamados de complexos de transferência de carga (CTC). Estes dados experimentais contribuem fortemente para o desenvolvimento de um adequado mecanismo de condução eletrônica [56].

Um ligante é um íon ou molécula que pode ter existência independente. Um complexo de transferência de carga é a combinação de um ácido de Lewis com várias bases de Lewis (os ligantes). O átomo da base de Lewis que forma a ligação com o átomo central é chamado de átomo doador, porque ele doa os elétrons usados para formar a ligação. O átomo que é o ácido de Lewis do complexo é o átomo receptor.

Os complexos de transferência de carga são conhecidos por fazer parte de muitas reações químicas como adição, substituição e condensação [57]. Por exemplo, os complexos de transferência de carga de espécies orgânicas são intensamente estudados devido o tipo de interação, que é acompanhada por transferência de elétrons do doador para o receptor [58-59].

Elétrons doadores-receptores de interações de complexo de transferência de carga são importantes no mecanismo de interação da droga (fármaco) como receptor em química de superfície, como também em muitos campos biológicos. Por outro lado, as reações TC de certos  $\pi$ -receptores também são utilizadas em análise farmacêutica [60-62]. Para estas aplicações estudos extensos foram executados em complexos TC de  $\pi$ -receptores.

É importante ressaltar que alguns métodos espectroscópicos são lentos e não suficientemente sensíveis ou seletivos e requer instrumentação complicada, custo analítico relativamente alto e envolve passos demorados antes da análise. Estas dificuldades limitam suas aplicações práticas [63].

Então, o desenvolvimento de novos métodos analíticos que possibilitem o uso mínimo de reagentes e um menor tempo de análise e apresentem custos efetivos é muito importante. A espectrofotometria é bem conhecida e usada para análise rotineira. Então, um seletivo e simples método para a determinação de cisteína a partir da espectrofotometria de absorção molecular foi desenvolvido.

A cisteína foi determinada, no presente trabalho, empregando-se estudos espectrofotométricos baseados na reação de transferência de carga (TC) entre a cisteína, doadora de elétrons, e a espécie receptora de elétrons, o *p*-cloranil. Assim a facilidade de aplicabilidade, sensibilidade, baixo custo e confiança são as vantagens principais deste trabalho.

### **3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS**

O presente trabalho visa o desenvolvimento de um método espectrofotométrico bastante simples para a determinação de cisteína empregando um complexo de transferência de carga formado entre o aminoácido (doador) e o *p*-cloranil (receptor).

Para atender o objetivo geral trabalhou-se com objetivos específicos que se seguem:

- I. Estudar o comportamento do complexo formado entre cisteína e o composto *p*-cloranil para verificar os espectros eletrônicos obtidos com cisteína complexada com *p*-cloranil;
- II. Avaliar o efeito dos seguintes parâmetros para obter máxima absorção: solvente, temperatura e tempo de reação.
- III. Verificar o comportamento da cisteína em diferentes concentrações de *p*-cloranil e sugerir um mecanismo de reação do complexo de transferência de carga e a estequiometria de reação.
- IV. Construção da curva analítica e obter os limites de detecção e quantificação.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes para o desenvolvimento da técnica foram adquiridos com alto grau de pureza (P.A.). A cisteína e o *p*-cloranil foram adquiridos da Sigme- Aldrich. Os reagentes: Clorofórmio, Diclorometano, Acetonitrila e Etanol foram adquiridos da Vetec e água destilada pelo sistema Ultra Purificador da Gehaka.

A solução estoque de cisteína a  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  foi preparada adicionando-se 0,0012 g de cisteína em 10 mL de solvente, acetonitrila e água destilada (destilada pelo sistema Ultra Purificador da Gehaka) na proporção 1:1. A solução estoque de *p*-cloranil  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  foi preparada adicionando-se 0,0025g de *p*-cloranil em 10 mL de acetonitrila e água destilada, também na proporção 1:1.

### 4.2 Instrumentação

Espectrofotômetro UV/Visível da Varian, modelo Cary 50 Conc, cubetas de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e volume total de 4,5 mL. Este espectrofotômetro é conectado ao computador para o controle, aquisição e tratamento de dados. O ultrassom Maxi Clean 1400 para dissolução das amostras, balança analítica Marte modelo AY220 e a estufa Odontobrás.



**Figura 4.1:** Espectrofotômetro UV/Visível da Varian, modelo Cary 50 Conc (a) e Cubeta de quartzo (b)

### 4.3 Estudo do comportamento espectrofotométrico do *p*-cloranil e da cisteína

Para se estudar o comportamento espectrofotométrico tanto da cisteína quanto do *p*-cloranil preparou-se a partir de uma solução estoque de  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de cada substância para se obter uma concentração final de  $62,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  para um volume de 4 mL na cubeta.

As soluções foram preparadas na hora e em seguida as leituras de absorbância foram feitas no espectrofotômetro contra uma solução do branco (apenas os solventes).

### 4.4 Otimização dos parâmetros experimentais

A partir de estudos espectrofotométricos otimizou-se os parâmetros iniciais de estudo tais como, solvente, temperatura e tempo sendo que estes parâmetros influenciam na sensibilidade, estabilidade e respostas do sistema. Posteriormente estudou-se o comportamento espectrofotométrico do complexo de transferência de carga e determinaram-se os picos de absorção máxima dos complexos.

#### 4.4.1 Estudo do solvente

Avaliou-se o efeito do solvente para se obter a resposta máxima de absorção e estabilidade do complexo. Os solventes testados foram acetonitrila, diclorometano, clorofórmio, etanol, água e as misturas na proporção 1:1 entre os reagentes testados e a água.

Preparou-se as soluções estoques de *p*-cloranil  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  e cisteína a  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  nos diferentes solventes puros e em mistura com água, nas diversas proporções para um volume final de 10 mL. Em seguida, fizeram-se as leituras para o branco (solvente), a cisteína na concentração  $62,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , o *p*-cloranil na concentração  $62,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  e as misturas das soluções de *p*-cloranil e cisteína ambos a  $62,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  (complexo TC). Após se verificar o melhor sinal analítico obtido, melhor resultado de absorbância e a formação do complexo TC, este solvente foi utilizado para a análise posterior.

#### 4.4.2 Estudo da concentração de *p*-cloranil e cisteína

No estudo da otimização da concentração de *p*-cloranil e cisteína manteve-se inicialmente a concentração de cisteína constante (em 62,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) e variou-se a concentração do *p*-cloranil ( $5 \times 10^{-6} \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $125 \times 10^{-6} \mu\text{mol L}^{-1}$ ). A concentração de *p*-cloranil que apresentou maior absorvância foi fixada e então variada a concentração da cisteína ( $5 \times 10^{-6} \mu\text{mol L}^{-1}$  a  $125 \times 10^{-6} \mu\text{mol L}^{-1}$ ). Após se obter as melhores concentrações para cada substância, as mesmas foram utilizadas nos estudos subseqüentes.

#### 4.4.3 Estudo do tempo

Analisou-se, em seguida, a influência do tempo de reação para formação do complexo TC em função da absorvância máxima e, conseqüentemente a estabilidade química do complexo TC. As medidas de absorvância em relação ao tempo foram realizadas empregando-se soluções estoques de cisteína e *p*-cloranil de 1  $\text{mmol L}^{-1}$ , preparadas em acetonitrila e a água na proporção 1:1.

As quantidades de cisteína e de *p*-cloranil utilizadas a partir da solução estoque foram de 250  $\mu\text{L}$ . O volume final de solução do complexo TC foi de 4  $\text{mL}$ .

As medidas foram realizadas em diferentes intervalos de tempo entre 0 e 360 minutos. A primeira leitura foi realizada no tempo de 0 segundos, então esta mesma solução foi deixada no espectrofotômetro e as medidas subseqüentes foram feitas nos intervalos de tempo de 10 minutos para as 10 primeiras leituras, depois um intervalo de 30 minutos para as próximas 5 medidas e para as 2 últimas leituras um intervalo entre as medidas de 60 minutos. Com este estudo, foi possível analisar a influência do tempo na estabilidade do sinal analítico e o tempo para que o complexo TC se formasse.

#### 4.4.4 Estudo da temperatura

Estudou-se o efeito da temperatura na formação do complexo TC e a influência da mesma na obtenção da resposta máxima de absorção. As medidas de absorvância em relação à temperatura foram realizadas nas mesmas condições do item anterior. Para cada

medida realizada uma nova mistura (cisteína + *p*-cloranil) na mesma concentração foi feita. As leituras foram feitas num intervalo de 5 a 40 °C, variando-se as temperaturas em 5 °C. Após se obter o maior sinal analítico nas diferentes temperaturas fixou-se a que proporcionou um maior sinal de absorvância para ser utilizada nos estudos anteriores.

#### **4.5 Estudo da estequiometria da reação**

O método da variação contínua, também conhecido como o método de Job estabelece a estequiometria da reação do complexo TC. A estequiometria da reação entre a cisteína e o *p*-cloranil foi determinada com base nos resultados obtidos na variação contínua para a solução 1 mmol L<sup>-1</sup>, cisteína e *p*-cloranil. As soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1 mmolL<sup>-1</sup> tanto da cisteína quanto do *p*-cloranil. O estudo estequiométrico foi realizado variando-se diferentes volumes das espécies estudadas para um total de 4 mL de solução.

#### **4.6 Curva analítica para a determinação de cisteína**

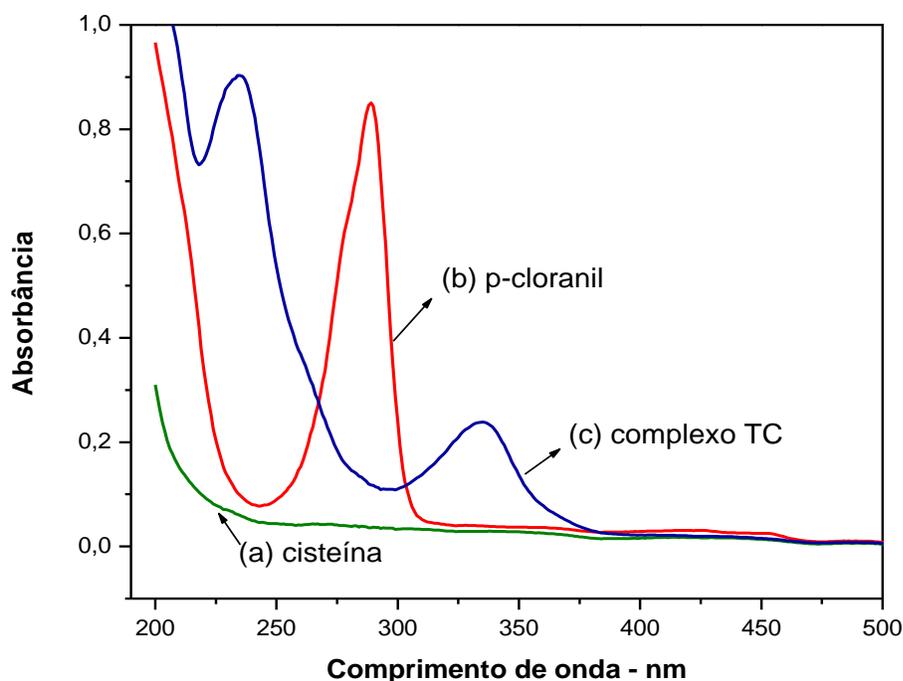
A curva de calibração determina a relação entre a quantidade medida e um valor padrão. Para a construção desta curva primeiro otimizou-se os parâmetros experimentais e, em seguida, construiu-se a curva analítica para a determinação da cisteína, variando-se a sua concentração e mantendo a concentração do agente complexante constante.

As soluções foram preparadas adicionando-se em oito béqueres 250 µL da solução estoque de *p*-cloranil 1 mmol L<sup>-1</sup> e em seguida foram adicionados à cada béquer diferentes alíquotas de cisteína (20, 50, 75, 100; 150; 200; 250; 300; 350; 400 e 450 µL) completando-os até 4 mL com acetonitrila e água na proporção 1:1. Mediu-se a absorvância do branco (solvente), e em seguida foram feitas as leituras das absorvâncias da solução padrão. A curva de calibração foi estabelecida utilizando-se a regressão linear.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Estudo do comportamento espectrofotométrico do *p*-cloranil na presença e ausência de cisteína

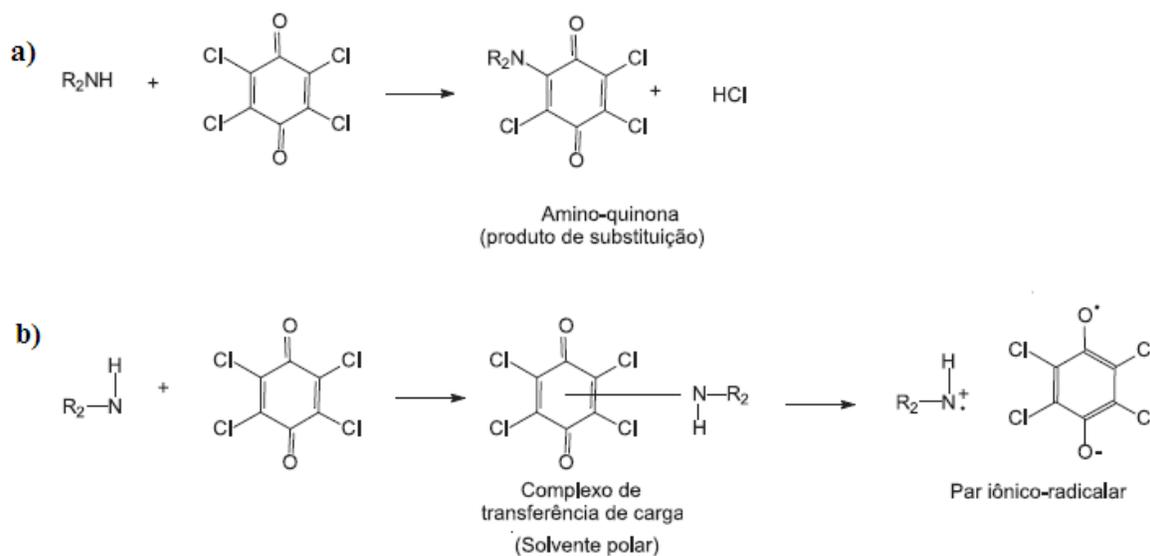
A Figura 5.1 apresenta os espectros: da cisteína (a), apenas do *p*-cloranil (b) e do *p*-cloranil na presença de cisteína (c). De acordo com esses resultados pode-se observar que a cisteína não absorve nenhuma radiação nessa faixa de comprimento de onda (Figura 5.1a). Entretanto, observa-se que o *p*-cloranil apresenta uma banda de absorção em aproximadamente 288 nm (Figura 5.1b). Já quanto se tem a mistura das duas substâncias (Figura 5.1c) observa-se a formação de duas bandas com absorbância máxima nos comprimentos de onda de 234 e 333 nm. Estas novas bandas de absorção indicam a transferência eletrônica entre a cisteína (doador de elétrons) e o *p*-cloranil (receptor de elétrons), ou seja a formação do complexo de transferência de carga.



**Figura 5.1:** Espectros na região do visível de soluções de: (a) cisteína, (b) *p*-cloranil e (c) mistura *p*-cloranil – cisteína. Concentração do complexo =  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  preparada numa solução de acetonitrila-água 1:1.

A interação molecular entre doador-receptor de elétrons está normalmente associada com a formação dos complexos de transferência de carga, intensamente coloridos. O cromógeno predominante do complexo *p*-cloranil – cisteína em acetonitrila e água (1:1) é amarelo, e esta cor é devida ao ânion radicalar, que apresenta absorções máximas em 234 e 333 nm. Esta banda é atribuída à absorção do ânion radical *p*-cloranil  $\bullet^-$  que foi provavelmente formado pela dissociação de um complexo doador-receptor com a cisteína, uma droga de caráter básico, que devido a esta característica, são excelentes doadoras de elétrons que completam a reação de transferência de carga. De acordo com Ayad *et al* [64] em solventes muito polares, como a cisteína, pode ocorrer a dissociação do complexo com a formação de um ânion radicalar (espécie absorvente) como resultado da transferência total da carga do doador para o receptor que seriam, no presente estudo, a cisteína e o *p*-cloranil, respectivamente [65]. Mecanismo similar a este já foi proposto em outros estudos de reações de transferência de carga de compostos doadores com outros reagentes receptores de elétrons tais como o TCNQ e o *p*-CA [66-67] e em outros sistemas envolvendo outros analitos [65].

O *p*-cloranil é comumente utilizado como receptor de elétrons no desenvolvimento de métodos espectrofotométricos baseados na formação destes complexos. A literatura descreve que o *p*-cloranil pode interagir com moléculas contendo centros doadores de elétrons segundo dois tipos de reações, sendo uma delas baseada na formação de uma aminoquinona mono-substituída (Figura 5.2a) e a outra, através da formação de um complexo de transferência de carga com subsequente dissociação do mesmo em solvente polar formando par iônico radicalar (Figura 5.2b) [50].



**Figura 5.2:** Reação proposta na literatura para a interação entre aminas e *p*-cloranil: a) reação de substituição; b) reação com formação de um complexo de transferência de carga [50].

Para comprovar a formação do complexo de transferência de carga entre a cisteína e o *p*-cloranil, a análise dos espectros UV-visível foi fundamental. A formação das novas bandas é devido à perturbação induzida pela coordenação do ligante. As bandas em questão são designadas como uma transição  $\pi \rightarrow \pi^*$  [68] que acontece no ânion radicalar, formado na dissociação do complexo de transferência de carga cisteína – *p*-cloranil, sendo o ânion radicalar estabilizado pela ressonância eletrônica de spin.

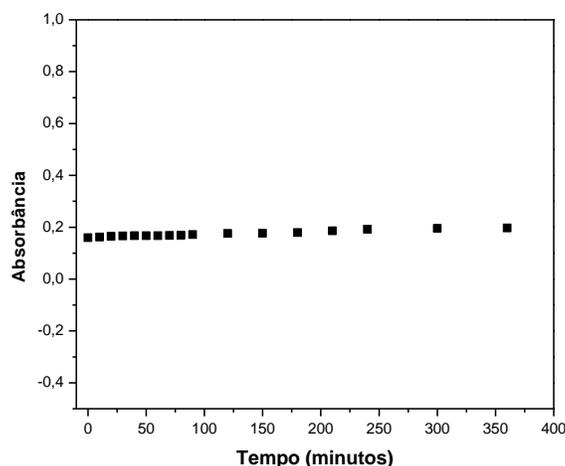
O fenômeno de transferência eletrônica se manifesta nos principais processos responsáveis pela manutenção da vida. A compreensão das interações desse tipo é, portanto, crucial no entendimento de mecanismos de reações fundamentais, o que explica porque esta constitui uma das áreas de pesquisa mais amplas e ativas no âmbito das ciências moleculares modernas. Na natureza, a ocorrência dessas reações está intimamente relacionada aos processos de transferência de energia, a exemplo do que se dá no centro de reação fotossintética, na fosforilação oxidativa, e em muitos outros eventos com múltiplas etapas de transferência de elétrons acopladas, tal como ocorre na cadeia respiratória [69].

## 5.2 Otimização dos parâmetros experimentais para a determinação da cisteína

### 5.2.1 Efeito do tempo de reação do complexo de transferência de carga

A análise do tempo por espectrofotometria permitiu saber a influência do tempo para a formação do complexo de transferência de carga em função da absorbância máxima e da estabilidade química deste complexo em solução no comprimento de onda mais favorável no intervalo de tempo de 0 a 360 minutos.

A mistura *p*-cloranil e cisteína foi preparada à temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C) e em seguida as análises foram realizadas. A resposta mostrou que o desvio padrão relativo entre as medidas realizadas nos tempos acima foi inferior a 1,31%. Assim é comprovado que o complexo de transferência de carga entre *p*-cloranil e cisteína é formado instantaneamente e apresenta uma estabilidade nos sinais de absorbância. Este resultado nos sugere que o complexo formado apresenta absorbância máxima e constante entre 0 a 360 minutos. As medidas das amostras foram realizadas após o seu preparo uma vez que não há diferença significativa entre as absorbâncias na ampla faixa de tempo estudada (Figura 5.3). Este curto tempo de análise é vantajoso em análises quantitativas, pois quanto menor o tempo para realizá-la mais rápida vai ser a análise.



**Figura 5.3:** Efeito do tempo (minutos) versus absorbância do complexo de transferência de carga entre cisteína e *p*-cloranil.

### 5.2.2 Efeito da natureza do solvente

As interações de transferência de carga entre o doador e o receptor de elétrons são geralmente associadas com a formação de complexos de transferência de carga. Nesta reação há formação de radicais e estes precisam ser estabilizados pelos solventes, sendo a escolha do solvente importante para as reações de transferência de carga [70-71]. Neste estudo foram testados os seguintes solventes: etanol, acetonitrila, diclorometano, clorofórmio e a mistura entre acetonitrila e água, na mesma proporção. O solvente possui um papel importante em algumas reações de transferência de carga, pois em uma solução, a espécie absorvente é circundada pelo solvente e este também facilita a transferência de carga entre as espécies. Os valores de absorbância obtidos neste experimento, nos diferentes solventes, são apresentados na Tabela 5.1 e a partir destes selecionou-se o solvente a ser utilizado no desenvolver do trabalho.

**Tabela 5.1:** Tabela de absorbância dos solventes. Em todos os casos, a concentração de cisteína foi igual a  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  e a concentração de *p*-cloranil foi igual a  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Solvente	Absorbância 234nm	Absorbância 333m
Acetonitrila	-	-
Diclorometano	-	-
Clorofórmio	-	-
Etanol	-	0,16065
Água e acetonitrila (1:1)	0,3010	0,16648

As absorbâncias resultantes das misturas correspondem a formação do complexo de transferência de carga e a absorbância apenas do *p*-cloranil, indicando que alguns solventes não são favoráveis para a formação do complexo de transferência de carga entre a cisteína e o *p*-cloranil. A cisteína não absorve no intervalo de comprimento de onda estudado, de 200 a 800nm.

O clorofórmio e o diclorometano apresentaram picos de absorbância para a mistura de cisteína e *p*-cloranil semelhantes aos picos de absorbância do *p*-cloranil próximo a 288nm, não identificando assim a formação do complexo de transferência de carga entre a

cisteína e o *p*-cloranil, limitando seu uso como solvente teste. No solvente água não houve absorbância para nenhuma das espécies. O etanol apresentou um comportamento semelhante à mistura acetonitrila e água, com surgimento de uma banda em 333nm. Porém a mistura, acetonitrila e água na mesma proporção, não absorve próximo ao pico de absorção do *p*-cloranil e apresentou a formação de duas novas bandas com absorvidade abaixo de 1, podendo ser aplicada aos estudos espectrofotométrico por satisfazer a Lei de Beer. A formação do complexo por transferência de carga foi válida pelo desaparecimento da banda do *p*-cloranil e o surgimento de duas novas bandas, com absorção máxima em 234 e 333 nm, sendo assim a mistura de água e acetonitrila o solvente usado para os demais estudos.

Os compostos cisteína e *p*-cloranil dissolvem pouco na água e apresentam boa solubilidade na acetonitrila. A resposta de absorbância da mistura (cisteína e *p*-cloranil) para estes solventes (água ou acetonitrila) não foram satisfatória, não obstante, em solução aquosa a formação do complexo de transferência de carga entre a cisteína e o *p*-cloranil é efetiva. A água e a acetonitrila são polares e entre os solventes testes apresentam maiores constante dielétrica e momento dipolo (tabela 5.2) o que favorece formação do complexo. De acordo com a literatura os solventes polares facilitam a transferência total de carga, fazendo com que o ânion radicalar, formado depois da transferência de carga, seja a espécie cromogênica predominante no meio [70-71]. Satisfazendo o objetivo do trabalho de obter a formação do complexo de transferência de carga e absorbância máxima este solvente foi escolhido.

**Tabela 5.2:** Dados da constante dielétrica ( $\epsilon$ ) e momento de dipolo ( $\mu$ )

Solvente	$\mu$	$\epsilon$
Acetonitrila	3,92	37,5
Água	1,85	78,5
Clorofórmio	1,01	4,82
Diclorometano	1,60	9,08
Etanol	1,69	24,3

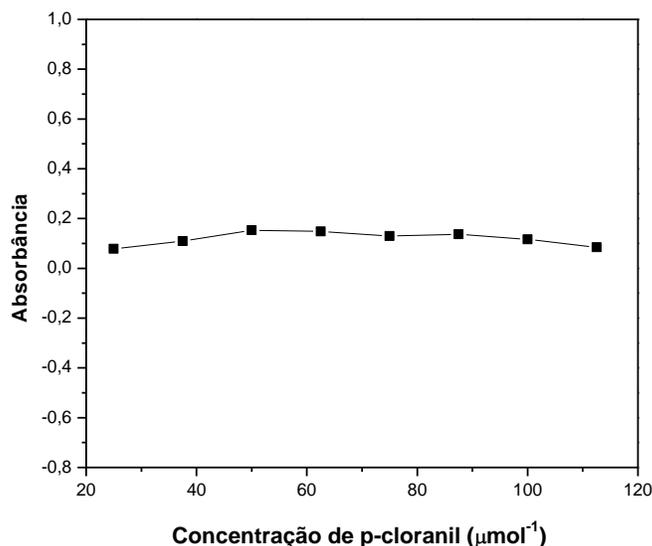
A força de atração entre duas cargas é relacionada de forma inversa a constante dielétrica, assim quanto maior a constante dielétrica menor a força. Então um líquido com alta constante dielétrica, como a acetonitrila e a água, são capazes de solvatar bem os íons mantendo-os dissociados em solução, com ótima estabilização da estrutura carregada (radical-ânion) formada a partir da dissociação do complexo de transferência de carga *p*-cloranil – cisteína. A constante dielétrica do solvente fornece uma medida grosseira da polaridade de um solvente, medindo assim, a habilidade do solvente de reduzir a força do campo elétrico que cerca uma partícula carregada. Esta redução é comparada então à força do campo da partícula carregada.

### 5.2.3 Efeito da concentração do agente complexante

A influência da concentração do agente complexante que forma o CTC é um fator de grande importância, pois no meio reacional a concentração não ideal interfere na sensibilidade analítica e não permite a máxima absorção do CTC na técnica espectrofotométrica.

Neste sentido, a influência das concentrações de *p*-cloranil usadas na preparação da mistura foi estudada e verificou-se que existe a formação do complexo TC para todas as concentrações de *p*-cloranil. No entanto as absorções referentes ao complexo TC acontecem até a concentração de  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ , em que a concentração de cisteína e *p*-cloranil são idênticas. Assim, toda a cisteína presente na mistura foi consumida na reação com o *p*-cloranil formando o complexo TC. A partir desta concentração de *p*-cloranil é possível perceber, pelo espectro, que o pico de absorção no comprimento de onda de aproximadamente 288 nm, relativo ao *p*-cloranil, é formado e a variação na absorbância do complexo é pequena. Então concentração acima  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  interferem na resposta do sinal analítico do complexo formado.

Com o intuito de se obter a melhor resposta, maior sinal analítico e maior sensibilidade analítica, foi escolhida para as análises uma concentração de *p*-cloranil localizada no meio da faixa de concentração estudada ( $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), assim o excesso de reagente e interferência no sinal analítico é evitado.



**Figura 5.4:** Efeito da concentração de *p*-cloranil na absorbância da cisteína no comprimento de onda de 333nm. Concentração de cisteína = 62,5 µmol L<sup>-1</sup>.

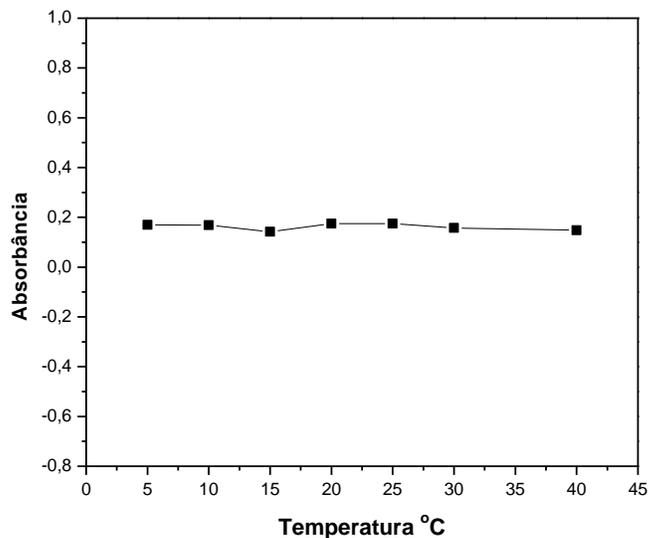
#### 5.2.4 Efeito da temperatura sobre o complexo de transferência de carga

A Figura 5.5 mostra as absorbâncias do CTC obtidas nas temperaturas entre 5 °C a 40 °C, variando-as em 5 °C. As medidas foram realizadas após um período de 2 minutos. Conforme pode ser observado, o complexo apresenta uma grande estabilidade mesmo variando a temperatura, ou seja, o aumento da temperatura não proporciona grandes variações na absorbância do complexo.

O desvio padrão entre as absorbâncias foi inferior a 1,31%, o que indica que a formação do CTC entre a cisteína e o *p*-cloranil acontece em diferentes temperaturas sem variações bruscas na absorbância do complexo, ou seja, o complexo TC é formado em baixas e moderadas temperaturas e na temperatura ambiente.

Dados da literatura revelam que algumas reações de complexo de transferência de carga entre o *p*-cloranil e outras substâncias são normalmente lentas às baixas temperaturas sendo necessário aquecimento a 60–65 °C para que a reação ocorra, porém neste trabalho o resultado obtido sugere que a resposta do CTC é máxima e constante na faixa de

temperatura estudada. Neste sentido, escolheu-se a temperatura ambiente (25° C) para se realizar os demais estudos.

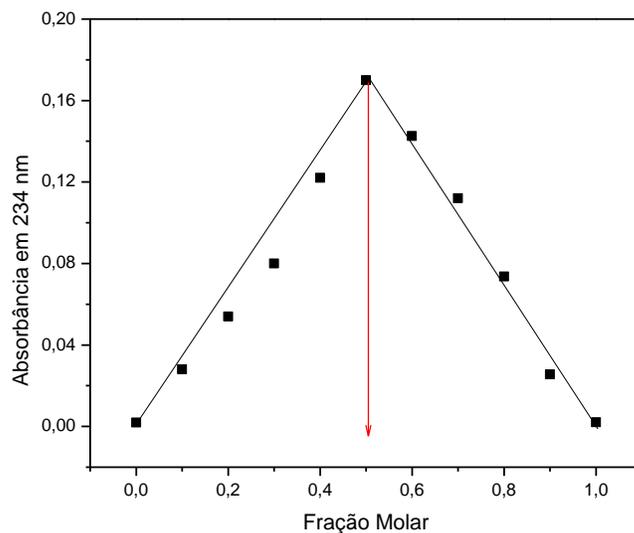


**Figura 5.5:** Efeito da temperatura no complexo *p*-cloranil – cisteína.  $\lambda=333$  nm. Medidas realizadas após um período de 2 minutos.

### 5.3 Avaliação da estequiometria da reação

Para o estudo da variação contínua, também conhecido como o método de Job [72] para o CTC entre doador e receptor, a concentração analítica de ambas foi idêntica e cada mistura foi feita de tal forma que o volume total e o número total de mols de reagentes foram constantes, para que haja uma variação na razão molar dos reagentes. A absorbância de cada solução foi, então, medida em um comprimento de onda adequado, não sendo necessário corrigi-la para cada substância.

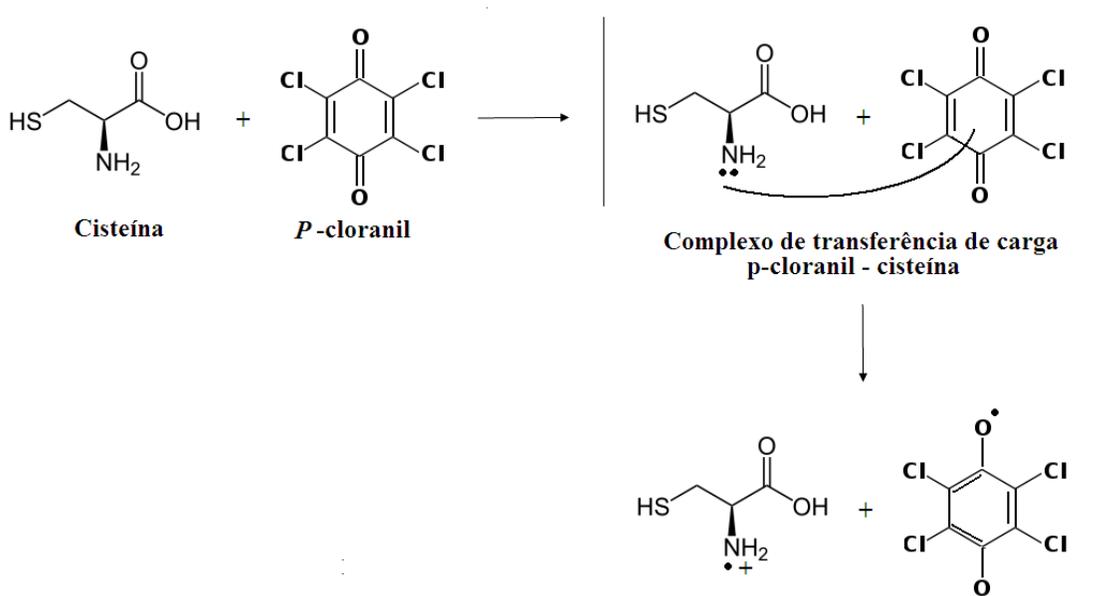
A Figura 5.6 mostra o gráfico da fração molar do ligante versus as absorbâncias, referente ao complexo. De acordo com este gráfico observa-se uma curvatura na região correspondente à fração molar igual a 0,5, indicando a predominância da espécie 1:1 (1 cisteína e 1 *p*-cloranil), com absorbância máxima obtida quando a razão  $[cisteína] / ([p\text{-cloranil}] + [cisteína])$  ou  $[p\text{-cloranil}] / ([p\text{-cloranil}] + [cisteína])$  foi igual a 0,5.



**Figura 5.6:** Aplicação do método de Job para reação entre cisteína e *p*-cloranil.

A Figura 5.7 mostra um possível mecanismo compatível com a estequiometria de 1:1, resultado do teste de Job. A transferência de carga ocorre devido o par de elétrons livre do nitrogênio (da molécula de cisteína), ser mais ácido que o enxofre. Quando um elétron do nitrogênio é transferido para o centro deficiente de carga do *p*-cloranil forma-se o CTC na proporção de uma molécula de cisteína para uma molécula de *p*-cloranil. Sendo a cisteína a doadora de elétron e o *p*-cloranil o receptor de elétrons.

Em solventes polares, como é o caso da acetonitrila e água, pode ocorrer à dissociação do complexo com a formação de um ânion radicalar (espécie absorvente) como resultado da transferência total da carga do doador (cisteína) para o receptor (*p*-cloranil), que, geralmente, é a espécie absorvente nos métodos espectrofotométricos desenvolvidos com base nestas reações.



**Figura 5.7:** Possível mecanismo de formação do ânion radicalar derivado do *p*-cloranil, após reação com o cisteína.

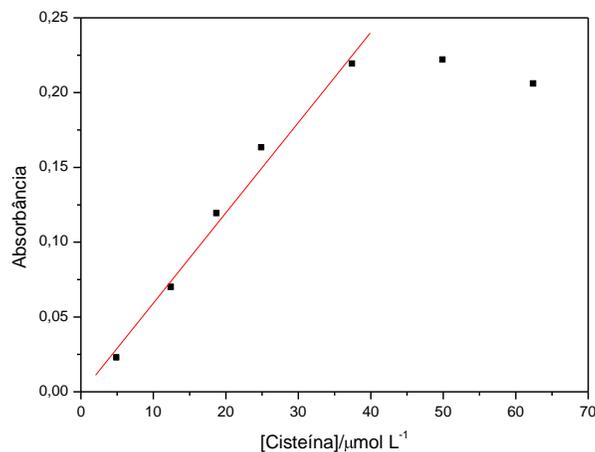
De acordo com os resultados obtidos, é proposto que cada molécula de *p*-cloranil é complexado por uma molécula de cisteína, através da coordenação com o grupo funcional básico (-NH<sub>2</sub>) da molécula de cisteína.

#### 5.4 Construção da curva analítica para a determinação da cisteína

Após a otimização dos parâmetros experimentais construiu-se a curva analítica para a determinação da cisteína, ao variar a sua concentração e manter constante a concentração do *p*-cloranil. Cada sinal analítico da curva foi obtido em triplicata para maior confiabilidade dos resultados.

A curva analítica foi obtida na faixa de concentração de 5,0 a 37,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , com uma equação da reta igual a  $A = 0,004 + 5.898,075[\text{cisteína}/\mu\text{mol L}^{-1}]$  para  $n = 5$  e um coeficiente de correlação linear de 0,990, onde  $A$  representa a absorbância e  $[\text{cisteína}]$  é a concentração de cisteína em  $\text{mol L}^{-1}$ .

É importante ressaltar que o gráfico apresenta-se linear até a concentração 37,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e constante a partir dessa concentração.



**Figura 5.8:** Gráfico da curva analítica para a cisteína em 333 nm.

A Sensibilidade da curva analítica foi de  $5,898,075 \mu\text{mol}^{-1} \text{L}$ . Os limites de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram calculados a partir da curva de calibração obtida experimentalmente a partir das seguintes equações:

$$\text{LOD} = 3 \times (\text{desvio padrão}) / \text{inclinação da reta}$$

$$\text{LOQ} = 10 \times (\text{desvio padrão}) / \text{inclinação da reta}$$

O desvio padrão para as 10 medidas do branco foi de  $2,95 \times 10^{-3}$  no comprimento de onda de 333 nm permitindo assim a obtenção de um LOD de  $1,50 \mu\text{mol L}^{-1}$  e LOQ de  $5,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Neste sentido, verificou-se que o método desenvolvido apresentou uma boa faixa de resposta linear, uma boa sensibilidade e um baixo limite de detecção [73].

A repetibilidade e reprodutibilidade também foram avaliadas. Para os estudos da repetibilidade utilizaram-se dez medidas de absorbância do CTC e obteve-se o desvio

padrão. Para o teste da reprodutividade foram obtidas medidas de absorvância do CTC em quatro dias diferentes, sendo essas leituras feitas em soluções com concentrações de cisteína e *p*-cloranil igual a  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ . O desvio padrão relativo para as respostas de absorvância nos testes de repetibilidade e reprodutibilidade foram inferiores a 2%. Esses resultados indicaram que o complexo de transferência de carga formado entre a cisteína e o *p*-cloranil apresentaram boa repetibilidade e reprodutibilidade.

Os parâmetros analíticos determinados foram então tabelados para melhor visualização, como apresentação resumida das figuras de mérito do método desenvolvido (Tabela 5.2).

**Tabela 5.3:** Figuras de mérito para o complexo de CT formado entre a cisteína e o *p*-cloranil.

Parâmetros	Resultados
Faixa linear	5,00 a 37,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Sensibilidade	5.898,08 $\text{mol}^{-1}\text{L}$
Limite de detecção	1,50 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Limite de quantificação	5 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Reprodutibilidade	2%
Repetibilidade	2%

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados da formação do complexo de transferência de carga, de cor amarela, entre *p*-cloranil (receptor de elétrons) e a cisteína (doadora de elétrons) mostram que o método é estável e sensível o suficiente para detectar quantidades mínimas de  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de cisteína após a otimização dos parâmetros experimentais. Esta determinação pode ser feita em dois comprimentos de onda diferentes (em 234 e 333 nm) na região do UV/Visível, sendo que a cisteína não absorve nesta região e o *p*-cloranil absorve próximo a 288 nm.

As diferentes variáveis que afetam a reação de complexação tais como, tempo de reação, temperatura, solvente e a concentração de *p*-cloranil foram otimizadas e concluiu que a temperatura ambiente ( $25^\circ \text{C}$ ) foi escolhida para realizar as leituras de absorbância do complexo TC, uma vez que este se formou na faixa de  $5$  a  $40^\circ \text{C}$  com desvio padrão inferior a 1,31%. As medidas das amostras foram realizadas após o seu preparo por não apresentar variações significativas da absorbância na ampla faixa de tempo estudada. O curto tempo de análise é vantajoso em análises quantitativas, pois quanto menor o tempo para realizá-la mais rápida vai ser a análise.

Com o intuito de se obter a melhor resposta e maior sensibilidade analítica, foi escolhida para as análises a concentração de  $62,5 \mu\text{mol L}^{-1}$  de *p*-cloranil evitando o excesso de reagente, e o solvente acetonitrila e água na mesma proporção (1:1). Com base no método de Job foi possível determinar a estequiometria da reação e propor um mecanismo para a reação do complexo de transferência de carga. A curvatura na região correspondente à fração molar equivaleu a 0,5 indicando a predominância de 1:1.

Após a otimização dos parâmetros experimentais, uma boa relação linear com um coeficiente de correlação de 0,990 foi encontrada entre a absorbância e a concentração na faixa de  $5,00 \times 10^{-6}$  a  $3,75 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ , sensibilidade  $5.898,08 \text{ mol}^{-1}\text{L}$ , limite de detecção  $1,50 \mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de quantificação  $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ .

O método proposto para a determinação da cisteína mostrou-se simples para aplicações futuras e apresenta baixo custo, baixo tempo de análise e baixo limite de detecção, sendo um método alternativo para detecção espectrofotométrica de cisteína em formulações farmacêuticas.

## **PERSPECTIVAS FUTURAS**

Serão realizados estudos recuperação do analito na amostra e comparados os resultados da pesquisa com diferentes métodos da literatura. Este método espectrofotométrico para a determinação da cisteína empregando a formação de complexo de transferência de carga será aplicado em produtos farmacêuticos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] S. Zhang, W.-L. Sun, W. Zhang, W.-Y. Qi, L.-T. Jin, K. Yamamoto, S. Tao, J. Jin, **Analytica Chimica Acta** 386 (1999) 21–30.
- [2] S. A. Wring, J. P. Hart, B. J. Birch, **Analyst** 114 (1989) 1563–1570.
- [3] D. A. M. Zaia, K. C. L. Ribas, C. T. B. V. Zaia **Talanta** 50 (1999) 1003–1010.
- [4] M. L. Lunara, S. R. D. Phez-Bendito, M. L. Carretob, C. W. McLeodb, **Analytica Chimica Acta** 337 (1997) 341-349
- [5] N. Teshima, T. Nobuta, T. Sakai, **Analytica Chimica Acta** 438 (2001) 21–29.
- [6] A.K. Wayne, P.R. John Jr, **Biochemical Pharmacology** 60 (2000) 19.
- [7] L. Campanella, G. Crescentini, P. Avino, **Journal of Chromatography A** 833 (1999) 137.
- [8] E. Kaniowska, G. Chwatko, R. Glowacki, P. Kubalczyk, E. Bald, **Journal of Chromatography A** 798 (1998) 27.
- [9] D. W. Jacobsen, V.J. Gatautis, R. Green, K. Robinson, S.R. Savon, M. Secic, J. Ji, J.M. Otto, L.M. Taylor, Jr., **Clinical Chemistry** 40 (1994) 873.
- [10] Vellasco, A.P. **Desenvolvimento de nova metodologia para dosagem de cisteína em amostras biológicas através de espectrometria de massas – T&R-MIMS**. 2002. 141 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médica) – Ciências Biomédicas, Faculdade de Ciências Biomédicas da UNICAMP.
- [11] Z. Dursun, I. S. Ahbaz, F.N. Ertas, G. Nisli, J. Turk. **Journal of Chemistry** 27 (2003) 5130–5519.
- [12] S.C. Liang, H. Wang, Z.-M. Zhang, X. Zhang, H.-S. Zhang. **Spectrochimica Acta Part A** 58 (2002) 2605–2611.
- [13] M. Roederer, F. J. T. Staal, P. A. Raju, S. W. Ela, L. A. Herzenber. **Proceedings of the National Academy of Science of the United State of America** 1990, 87, 4884.

- [14] B. Mannervik. *Methods in Enzymology: Glutathione peroxidase*; **Academic Press, New York**, 1985; Vol. 113; p 490.
- [15] R. Hall, R. G. Maila. **Medical Laboratory Hematology, Butterworths**; London, 1986; p 294
- [16] J. M. Burgunder, A. Varriale, B. H. Lauterburg. **European Journal of Pharmacology**. 1989, 36, 127.
- [17] P. Berger, Homocysteine and coronary artery disease, **ACC Educational Highlight**; 13, 1-5, 1998
- [18] Haddad, Renato. **Homocisteína: um novo método de análise utilizando o sistema DIMP/T & R – MIMS**. 2001. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médica). Faculdade de Ciências Médica da UNICAMP.
- [19] R. Paxton, P. W. D. Scislowski, E. J. Davis and R. A. Harris, Role of Branched-Chain 2-oxo Acid Dehydrogenase and Pyruvate Dehydrogenase in 2-oxobutyrate metabolism. **Biochemical Journal** (1986) Mar 1; 234(2): 295-303.
- [20] F. Q. Schafer, G. R. Buettner. Redox Environment of the Cell as Viewed through the Redox State of the Glutathione Disulfide/glutathione Couple. **Free Radical Biology & Medicine** 2001; 30:1191–1212.
- [21] D. Hamdane, L. Kiger, S. Dewilde, B. N. Green, A. Pesce, J. Uzan, T. Burmester, T. Hankeln, M. Bolognesi, L. Moens, M. C. Marden. The Redox State of the Cell Regulates the Ligand Binding Affinity of Human Neuroglobin and Cytoglobin. **The Journal of Biological Chemistry** 2003; 278:51713–51721.
- [23] P. A. Jordan, J. M. Gibbins. Extracellular Disulfide Exchange and the Regulation of Cellular Function. **Antioxidants & Redox Signaling** 2006; 8:312–324.
- [24] I. Kerblat, C. Drouet, S. Chesne, P. N. Marche. Importance of Thioredoxin in the Proteolysis of an Immunoglobulin G as Antigen by Lysosomal Cys-proteases. **Immunology** 1999; 97:62–68.
- [24] J. Yang, H. Chen, I. R. Vlahov, J. X. Cheng, P. S. Low. Evaluation of Disulfide Reduction During Receptormediated Endocytosis by using FRET Imaging. **Proceedings of**

the National Academy of Sciences of the United States of America 2006; 103:13872–13877.

[25] S. I. Rizvi, P. K. Maurya. L-Cysteine Influx in Erythrocytes as a Function of Human Age. **Rejuvenation Research**, v 11, n.3, p.661-665, 2008

[26] R. A. Blanco, T. R. Ziegler, B. A. Carlson, P. Cheng, Y. Park, G. A. Cotsonis, C. J. Accardi, P. D. Jones. Diurnal Variation in Glutathione and Cysteine Redox States in Human Plasma. **American Journal of Clinical Nutrition** v. 86, p.1016–23, 2007.

[27] M. Kemp, Y. Go, D. P. Jones. Nonequilibrium Thermodynamics of Thiol/disulfide Redox Systems: A Perspective on Redox Systems Biology. **Free Radical Biology & Medicine**, v.44, p. 921–937, 2008.

[28] W. A. Kleinman, J. P. Richie. Status of Glutathione and Other Thiols and Disulfides in Human Plasma. **Biochemical pharmacology**, v. 60, p. 19-29, 2000.

[29] L. I. Leichert, U. Jakob. Global Methods to Monitor the Thiol-disulfide State of Proteins in Vivo. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 5 e 6, p. 763-772, 2006.

[30] P. G. Wells, P. M. Kim, R. R. Laposa, C. J. Nicol, T. Parmana, L. M. Winn. **Mutat Res Fund Mol Mech Mutagen** 1997. 396, 65.

[31] W.F. Ganong, **Review of Medical Physiology**, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, 1997.

[32] J. D. Holmes, D.J. Richardson, S. Saed, R. Evans-Gowing, D. A. Russell, J. Sodeau, J. R. **Microbiology**. 143 (1997) 2521.

[33] S. S. M. Hassan, A. F. El-Baz, H. S. M. Abd-Rabboh. **A Analytica Chimica Acta** 602 ( 2007 ) 108–113

[34] M. A. Eid. **Mikrochimica Acta** 129, 91-95 (1998)

[35] V. Ogwo, G. Cohen, **Free Radical Biology and Medicine**. 25 (1998) 362.

[36] G. C. E. Bald, **Talanta**, 2000, 52, 509.

- [37] G. Chwatko, E. Bald, Determination of Cysteine in Human Plasma by High-Performance Liquid Chromatography and Ultraviolet Detection after Pre-column Derivatization with 2-chloro-1-methylpyridinium iodide, **Talanta** 52 (2000) 509–515.
- [38] W. R. Jin, Y. Wang, Determination of Cysteine by Capillary Zone Electrophoresis with End-column Amperometric Detection at a Gold/mercury Amalgam Microelectrode without Deoxygenation. **Journal of Chromatography A** 769 (1997) 307–314.
- [39] C. Zhao, J.C. Zhang, J.F. Song, Determination of L-Cysteine in Amino Acid Mixture and Human Urine by Flow-injection Analysis with a Biamperometric Detector, **Analytical Biochemistry** 297 297 (2001) 170–176.
- [40] J. J. Horn, A. Watson, M. Lewis, T. McCreedy, and J. D. Wadhawan, **Electrochemistry Communications** [41] MeeCord, J. M.; Fridovich, I.; Biol. Chem. 1969, 244, 604.
- [42] HOLLER, F. James, Douglas A. Skoog, Stanley R. Crouch; **Princípios de Análise Instrumental**. Porto Alegre: Bookman, 2009, 380-400.1056p., 28cm. Bibliografia: p. 670-699, ISBN 978-85-7780-460-3.
- [43] L. F. C. de Oliveira. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola** N° 4 – Maio 2001.
- [44] R. M. Silverstein, G. C. Bassler, T. C. Morrill. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos** 5ª ed., LTC.
- [45] M. E. do C. Vinadé, E. R. do C. Vinadé, **Métodos Espectroscópicos de Análise Quantitativa**, editora UFSM.
- [46] Zaia et al., 1992a; Zaia; **Verri Junior; Zaia**, 1999.
- [47] Zaia, et al., 1993; Barreto ; **Aquino; Zaia**, 1990.
- [48] Zaia; Ribas; **Zaia**, 1999.
- [49] I. S. Vieira; F. C. de M. Junior; D. A. M. Zaia; H. de Santana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 167-176, jul./dez. 2008

- [50] P. L. Weinert; L. Pezza; H. R. Pezza. **Química Nova**, Vol. 31, No. 5, 1112-1116, 2008
- [51] E. A. Taha, S. M. Soliman, H. E. L. Abdel & M. M. Azad. **Mikrochimica Acta**, 140 (2002) 175.
- [52] K. Basavaiah, U. Chandrashekar & P. Nagegowda, **Acta Ciencia Indica Chemistry**, 30C (2004) 75.
- [53] G. G. Mohamed, F. Nour El-Dien, N. A. Mohamed, **Spectrochimica Acta A** 68 (5) (2007) 1244.
- [54] Z. Aydogmus, **Spectrochimica Acta A** 70 (1) (2008) 69.
- [55] S. Refat; S. A. El-Korashy; I. M. El-Deen, S.M. El-Sayed. **Journal of Molecular Structure** 980 (2010) 124–136
- [56] A. Ottenberg; C. J. Hoffman; Jeanne Osiecki. **The Journal Of Chemical Physics** Volume 38, Number 8 15 April 1963
- [57] F. P. Fla, J. Palou, R. Valero, C.D. Hall, P. Speers, **Journal of the Chemical Society Perkin Transactions**, 2 (1991) 1925.
- [58] S. K. Das, G. Krishnamoorthy, S.K. Dofra, **Canadian Journal of Chemical**. 78 (2000) 191.
- [59] G. Jones, J.A.C. Jimenez, **Tetrahedron Letters** 40 (1999) 8551.
- [60] A. Korolkovas, **Essentials of Medical Chemistry**, second ed., Wiley, New York,
- [61] A. M. Slifkin, Charge-Transfer Interaction of Biomolecules, **Academic Press**, New York, 1971.
- [62] F. M. Abou Attia, **Farmaco** 55 (2000) 659.
- [63] Y. Wang; J. Wang; F. Yang; X. Yang. **Analytical Sciences** May 2010, Vol. 26
- [64] M. M. Ayad, S. Belal, S. B. El-Adl, A. A. Al-Kheir, **Analyst** **1984**, 109, 1417.

- [65] C. E. R. de Paula, V. G. K. Almeida e R. J. Cassella **Química. Nova**, Vol. 33, No. 4, 914-919, 2010
- [66] Saleh, G. A.; Askal, H. F.; Radwan, M. F.; Omar, M. A.; **Talanta** 2001, 54, 1205.
- [67] Saleh, G. A.; Askal, H. F.; **Analytical Science**. 2003, 19, 281.
- [68] D. W. Randall, S. D. George; P. L. Holland, B. Hedman, K. O Hogson, W. B. Tolman, E. I. J. Solomon. **Journal of the American Chemical Society** 122 (2000) 11636.
- [69] P. F. Barbara, T. J. Meyer, M. A. Ratner. **Journal Of Chemical Physics** 1996, 100, 13148.
- [70] H. P. Trommsdorff, **Journal Of Chemical Physics**. 1972, 56, 5358.
- [71] K. Basavaiah, **II Farmaco** 2004, 59, 315.
- [72] D. C. Harris. **Análise Química Quantitativa**. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001
- [73] Analytical Methods Committee, Recommendations for the definition, estimation and use of the detection limit, **Analyst** 112 (1987) 199.

## **AUTORIZAÇÃO**

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial do presente trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada à fonte.

---

Isabel Lourenço Torres

Isa.quimic@hotmail.com

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

Campus II - Rodovia MGT 367 Km 583, nº 5000

Alto da Jacuba

39100-000 - Diamantina, MG - Brasil

Telefone: (38) 35321222 Fax: (38) 35313283

URL da Home Page: <http://www.ufvjm.edu.br>