



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102016022788-7 A2

(22) Data do Depósito: 30/09/2016

(43) Data da Publicação: 02/05/2018



\* B R 1 0 2 0 1 6 0 2 2 7 8 8 A

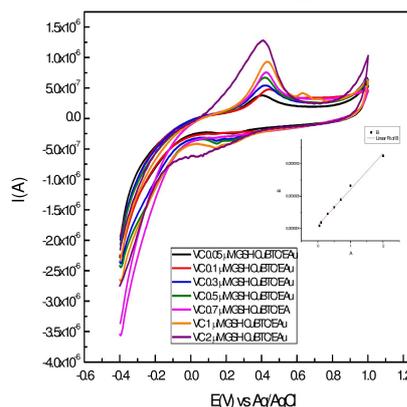
**(54) Título:** DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO NA REDE METAL-ORGÂNICA CU3BTC2 PARA DETECÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

**(51) Int. Cl.:** G01N 27/30; G01N 33/48

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO, UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA, UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

**(72) Inventor(es):** SEVERINO ALVES JUNIOR; NADJA VANESSA DE ALMEIDA FERRAZ; MANOEL ADRIÃO GOMES FILHO; RAILDA SHELSEA TAVEIRA ROCHA DO NASCIMENTO; GIVALDO GENTIL DA SILVA; WELLYTON SILVA VASCONCELOS; ANA PAULA SILVEIRA PAIM; MADALENA CARNEIRO DA CUNHA AREIAS

**(57) Resumo:** DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO NA REDE METAL-ORGÂNICA Cu3BTC2 PARA DETECÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS. A invenção refere-se ao método de preparação de um sensor eletroquímico baseado na rede metal-orgânica cobre (II) ? benzeno - 1, 3, 5 ? tricarboxilato (Cu3BTC2) e a aplicação do mesmo na detecção de glutatona reduzida, utilizando o método voltamétrico. O método de preparação do sensor é caracterizado por compreender os seguintes passos: (A) preparação de resina polimérica de Cu-BTC; (B) Imobilização do filme polimérico de CuBTC na superfície de um eletrodo sólido de ouro, obtendo-se um eletrodo quimicamente modificado denominado CuBTC-EAu. A glutatona é oxidada cataliticamente pelo Sensor CuBTC-EAu em solução tampão fosfato (pH 3.0), apresentando baixo limite de detecção (0.05  $\mu\text{M}$ ) e uma faixa de trabalho linear de 0.05-2 $\mu\text{M}$ , além de boa estabilidade e reprodutibilidade. A aplicabilidade potencial do sensor foi demonstrada pelo seu uso na determinação analítica da concentração de glutatona em amostras biológicas.



## DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO NA REDE METAL-ORGÂNICA $\text{Cu}_3\text{BTC}_2$ PARA DETECÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

01. A presente invenção está inserida no campo da eletroquímica e de sensores para marcadores biológicos. Mais particularmente, esta invenção refere-se ao desenvolvimento de um sensor eletroquímico nano estruturado e seu método de preparação baseado na rede metal-orgânica cobre (II) – benzeno - 1, 3, 5 - tricarboxilato ( $\text{Cu}_3\text{BTC}_2$ ) e a aplicação do mesmo na detecção da glutathiona reduzida em amostras biológicas. A presente invenção aplica-se na área da medicina humana para diagnóstico de várias condições clínicas e avaliação do estresse oxidativo.

02. A glutathiona consiste em um tripeptídeo formado por (1) ácido glutâmico, (2) cisteína e (3) glicina (FIGURA 1), ligados peptidicamente. Trata-se de um composto tiólico, existente no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).

03. As propriedades antioxidantes da glutathiona estão direta ou indiretamente relacionadas a processos biológicos importantes, tais como participação no processo de desintoxicação de xenobióticos, metabolismo de numerosos compostos celulares, síntese de proteínas e DNA, transporte de aminoácidos, atividade enzimática e proteção celular (Pacsial-Ong, E. J. et al. Anal. Chem. 2006, 78, 7577).

04. Tipicamente, a glutathiona pode ser encontrada em fluidos fisiológicos, tais como o plasma e urina, onde os níveis observados estão, normalmente, dentro dos intervalos de 2.0-12 mM (Kleinman, W. A.; Richie, J. P., Jr. Biochem. Pharmacol. 2000, 60, 19-29; Toyooka, T. J. Chromatogr. 2009, 877, 3318-3330).

05. Em particular, problemas na síntese e metabolismo da glutathiona estão associados a vários processos patológicos. De forma que, os níveis deste antioxidante no organismo tem se apresentado cada vez mais importantes nos estudos clínicos. Relatos mostraram que quantidades reduzidas podem ter implicações para doenças como câncer (Di Ílio, C. et al. Cancer Lett. 1995, 91, 19-23; Saydam, N. et al. Cancer Lett. 1997, 119, 13-19; White, P. C. et al. Electroanalysis 2002, 14, 89-98; Harfiel, D. J.

C.; Batchelor-Mcauley, C.; Compton, R. G. *Analyst* 2012, 137, 2285–2296). Além disso, alterações na concentração da glutathiona a nível celular têm sido medidas e associadas a doenças tais como arteriosclerose pré-matura, leucemia, diabetes, Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e doenças de Alzheimer e Parkinson (Seymour, E. H. et al. *Anal. Lett.* 2002, 35, 1387).

06. Neste contexto, o interesse na detecção eficaz e precoce deste biomarcador tem aumentado na última década, onde o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis, baratos e robustos torna-se crucial para o auxílio no diagnóstico e tratamento clínico de várias doenças (Harfield, J. C.; Batchelor-Mcauley, C.; R. G. Compton, R. G. *Analyst* 2012, 137, 2285).

07. Várias técnicas têm sido descritas na literatura para a determinação de GSH. Entre elas podemos encontrar: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectrofluorimetria, espectrofotometria, potenciometria, entre outros. Atualmente, a utilização da CLAE é a mais popular quando comparada com os outros métodos referidos, devido à sua elevada sensibilidade e seletividade (Pastore, A. et al. *Clin. Chim. Acta* 2003, 333, 19). Contudo, a sua utilização em ambientes de cuidados de saúde está limitada, uma vez que se trata de um método que necessita de cuidada preparação de amostras, tempos de análise longos e pessoal especializado para o manuseamento do equipamento. Para este tipo de método, a análise de custo-eficácia fica aquém do desejável, na medida em que as técnicas envolvidas são geralmente caras e complexas tanto em funcionamento como em processamento, pelo que é desejável recorrer a estratégias mais simples e robustas para estudos biológicos e clínicos deste analito (Toyo'oka, T. J. *Chromatogr.* 2009, 877, 3318–3330).

08. De forma particular, as técnicas eletroquímicas apresentam-se apropriadas para determinação de compostos tiólicos, dado a flexibilidade da química redox que caracteriza a maioria dos compostos orgânicos de enxofre. Portanto, o desenvolvimento de medições eletroquímicas diretas, na forma de sensores eletroquímicos, para detecção de glutathiona em amostras não tratadas seriam preferidas devido a sua simplicidade e uso prático em amostras reais (Seymour, E. H.

et al. *Anal. Lett.* 2002, 35, 1387).

09. Os sensores eletroquímicos são conhecidos por serem valiosos na análise de amostras em aplicações biomédicas e ambiental. Nos últimos anos, tornaram-se mais atraentes por causa das vantagens que eles oferecem em tamanho, baixo custo, quantidade de amostra, e requerimento de energia (Wang, *J. Analyst* 2005, 130, 42).

10. Métodos eletroanalíticos para determinação de glutathione baseados na oxidação direta do grupo tiol em eletrodos sólidos como carbono vítreo, grafite pirolítico e ouro, são amplamente explorados. Entretanto, estes eletrodos são geralmente utilizados acoplados a técnicas de separação, devido à falta de seletividade dos mesmos, sendo necessário o uso extensivo de pré-tratamentos das amostras ou adição de reagentes para aumentar a seletividade e/ou evitar a interferência de outros tióis na medição (Moore, R. R.; Banks, C. E.; Compton, R. G. *Analyst*, 2004, 129, 755-758; Toyo'oka, T. *J. Chromatogr.* 2009, 877, 3318-3330; Carvalho, F. D. et al. *Biomed. Chromatogr.* 2005, 8, 134-136; Salehzadeh, H.; Mokhtari, B.; Nematollahi, D. *Electrochim. Acta* 2014, 123, 353-361; Scampicchio, M. et al. *Electroanalysis* 2007, 19, 2437-2443).

11. Além disso, os eletrodos sólidos geralmente apresentam um alto potencial de oxidação para a glutathione, e devido a isto, modificações químicas nas 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 (Marzal, P. C. Desenvolvimento de um eletrodo Amperométrico para a determinação de Glutathione em eritrócitos. Tese de Doutorado. UNICAMP. Campinas – SP. Agosto, 2005).

12. A denominação eletrodo quimicamente modificado (EQM) foi inicialmente utilizada na eletroquímica por Murray e colaboradores, na década de 70, para designar eletrodos com espécies quimicamente ativas convenientemente imobilizadas na superfície desses dispositivos (Moses, P. R.; Wier, P.; Murray, R. W. *Anal. Chem.*, 1975, 47, 1882). O principal objetivo dessa modificação é pré-estabelecer e controlar a

natureza físico-química da interface eletrodo-solução como uma forma de alterar a reatividade e seletividade do sensor base, favorecendo assim, o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações, desde a catálise de reações orgânicas e inorgânicas até a transferência de elétrons em moléculas de interesse (Katz, E. et al. *J. Electroanal. Chem.* 1994, 347, 189.; Person, B. J. *Electroanal. Chem.* 1990, 287, 61).

13. Um EQM consiste de duas partes, isto é, um eletrodo base e uma camada do modificador químico. A forma de preparação é determinada pelas características analíticas desejadas para o sensor, de forma a aperfeiçoar seu desempenho. Em termos analíticos, a modificação do eletrodo deve realizar-se de tal forma que o sensor obtenha sensibilidade, seletividade, estabilidade, reprodutibilidade e aplicabilidade superiores àquelas de um eletrodo base sem prévia modificação, para que seu emprego seja justificado (Li, Y. X.; Lin, X. Q. *Sensor. Actuator.* 2006, 15, 134–139; H.R. ZARE, H. R. et Al. *J. Electroanal. Chem.*, 589 (2006) 60–69).

14. Alguns dos métodos populares de imobilização do material modificador no eletrodo incluem a ligação covalente, adsorção e filmes poliméricos. A modificação dos eletrodos com filmes poliméricos eletroativos é frequentemente preferida sobre os outros métodos por causa das vantagens de fácil aplicação da técnica e controle sobre espessura do filme (Zhu. L. et al. *Biosens. Bioelectron.* 2007, 23, 528).

15. Nos últimos 30 anos, os filmes poliméricos ganharam popularidade por serem estáveis e apresentarem amplificação do sinal, o qual é a característica mais importante em aplicações de sensores analíticos. Além disso, muitos estudos tem focado na incorporação de filmes poliméricos porosos a superfície do eletrodo criando assim um eletrodo de compósito. Essa aplicação tem resultado no aumento do sinal de densidade da corrente, obtendo-se uma maior sensibilidade para a detecção de analitos alvos (Lee, P. T. et al. *Electroanalysis* 2014; Kang, N. K. et al. *Sens. Actuators B, Chem.* 2010, 147, 55).

16. A presente invenção refere-se ao desenvolvimento de um sistema utilizando como alternativa de modificador de eletrodo uma rede metal-orgânica (do inglês Metal Organic Framework – MOF). Redes Metal-Orgânicas consistem em uma nova classe

de materiais porosos cristalinos, introduzidos pela primeira vez por Yaghi e colaboradores. São constituídos por íons metálicos ligados por ligantes orgânicos politópicos que permitem combinar as propriedades de ambos os materiais orgânicos e inorgânicos. Pesquisas envolvendo estes compostos estão expandindo muito rapidamente devido às suas propriedades únicas, tais como microporosidade, área de superfície elevada, adaptabilidade estrutural, flexibilidade e química de caráter sustentável (Yaghi, O.M.; Li, H. *Journal of the American Chemical Society* 1995, 117, 10401; Férey, G. *Chemical Society Reviews* 2008, 37, 191; Farha, O. K.; Hupp, J. T. *Accounts of Chemical Research* 2010, 43, 1166; Phan, A. et al. *Accounts of Chemical Research* 2010, 43,58).

17. Embora os estudos iniciais sobre estes materiais tenham sido impulsionados principalmente para aplicações como materiais para armazenamento de gás ( $\text{CH}_4$ ,  $\text{H}_2$  e  $\text{CO}_2$ ), uma gama de outras aplicações potenciais, também foram propostas e demonstradas, incluindo adsorção seletiva de gás, catálise e liberação controlada de drogas (Li, J. R.; Sculley, J.; Zhou, H. C. *Chem. Rev.* 2012, 112, 869; Ma, L.; Abney, C.; Lin, W. *Chem. Soc. Rev.* 2009, 38, 1248; Horcajada, P. et al. *Chem. Rev.* 2012, 112, 1232; Bétard, A.; Fischer, R. A. *Chem. Rev.* 2012, 112, 1055).

18. Na presente invenção, o complexo de Cobre-benzeno-1,3,5-tricarboxilato (Cu-BTC) foi utilizado como modificador de eletrodo. Também conhecido como MF-199 ou HKUST-1 é uma das redes metal-orgânicas mais estudadas. Trata-se de um sólido microporoso com dois tipos de poros, o qual pode ser sintetizado utilizando uma variedade de métodos, incluindo síntese convencional solvotérmica, assistida por micro-ondas, síntese à temperatura ambiente, síntese por ultrassom, por precipitação, eletroquímica, entres outras (Zhuang et al. *Adv. Func.Mater.* 2011, 21,1442–1447).

19. A capacidade de manipular a superfície do eletrodo tem promovido um avanço tecnológico na área dos eletrodos quimicamente modificados. Isso tem conduzido ao desenvolvimento de processos alternativos de determinação de substratos de interesse clínico, importantes para diagnóstico e análise de condições clínicas, onde sensores com rápida detecção, alta sensibilidade e especificidade são

cada vez mais requeridos.

20. Neste invento foi utilizada a rede metal-orgânica  $\text{Cu}_3\text{BTC}_2$  no desenvolvimento de um sensor para a determinação de GSH. As vantagens de usar essa matriz como alternativa de modificador de eletrodo para utilização em voltametria cíclica está em suas propriedades eletrocatalíticas e na sua grande área superficial, alto volume de poros e alta estabilidade química. Além disso, no organismo, a glutathione se liga naturalmente a íons metálicos endógenos tais como cobre, via reações não enzimáticas. Assim, a rede metal-orgânica escolhida foi à base de cobre, de forma a mimetizar essa afinidade.

21. A presente invenção ainda apresenta a vantagem de ser um método analítico econômico, que conduz a resultados mais rápidos, exatos e reprodutíveis, com manipulações de pequenas quantidades de amostra, que podem ser aplicáveis a medidas "in vitro" e substituir as metodologias tradicionalmente usadas nesta área.

22. Um outro aspecto da invenção refere-se a ser um sensor de fácil construção, que requer procedimentos simples de manuseio, sem necessidade de grandes processos de preparação, cuja análise pode ser realizada até mesmo com equipamentos portáteis.

23. Em um aspecto particular, o sensor desenvolvido mostrou resposta catalítica para a oxidação de GSH em tampão fosfato pH 3,0, com um potencial de oxidação de 0,5V vs. Ag/AgCl, o qual foi menor quando comparado com outros eletrodos metálicos na literatura, onde o potencial de oxidação é geralmente de 1,1 V.

24. Até a presente data, poucos dados estão disponíveis sobre as propriedades eletroquímicas das redes metal-orgânicas, e o estudo de sua aplicação na eletroquímica ainda está engatinhando. Entretanto, combinando suas características de porosidade, alta área superficial, bem como as propriedades eletrocatalíticas dos seus íons metais, um novo método para a modificação da superfície de eletrodos, produzindo EQMs, pode ser promissor no desenvolvimento de novos sensores eletroquímicos e biossensores com propriedades analíticas e eletroquímicas

favoráveis.

25. Para fins analíticos, raros sensores eletroquímicos para glutatona foram desenvolvidos até o momento, e nenhum deles utilizava como material de reconhecimento químico uma rede metal-orgânica catalítica imobilizada sobre um eletrodo base. Este invento é o primeiro a utilizar a rede metal-orgânica  $\text{Cu}_3\text{BTC}_2$  para obtenção de um sensor com propriedades analíticas e eletroquímicas favoráveis, tais como sensibilidade, range analítico, e estabilidade. Estas características devem-se ao elevado número de locais ativos que este tipo de material possui, a forte aderência, bem como outras propriedades complementares.

26. Apenas dois artigos foram encontrados na literatura (Hosseini, H. et al. Biosensors and Bioelectronics 2013, 42, 426-429; Hosseini, H. et al. Electrochimica Acta 2013, 88, 301-309) utilizando a rede metal-orgânica  $\text{Cu}_3\text{BTC}_2$  como modificador de eletrodo. Entretanto, os sensores construídos com este material foram utilizados para detecção de outros analitos alvos, respectivamente, cisteína e a hidrazina. Além disso, os autores não conseguiram uma resposta catalítica ótima que justificasse o uso apenas da rede metal-orgânica como modificador. As características de porosidade e alta área superficial da rede foram combinadas com as propriedades de nanopartículas de ouro para obter a resposta eletrocatalítica desejada, aumentando os custos dos sensores eletroquímicos desenhados, o que, em muitos casos, não seria viável economicamente para análises clínicas rotineiras.

27. Apenas uma patente brasileira foi encontrada na área deste invento. Trata-se de um sensor amperométrico para determinação da atividade da enzima Glutathione Redutase em amostras de hemolisado de hemácias (Carta Patente nº PI 0202893-0, 2015). Neste invento, o sensor desenvolvido teve como objetivo detectar não a presença e/ou quantidade da Glutathione como biomarcador, mas a atividade de uma das enzimas envolvidas no metabolismo desta biomolécula, o que diferencia do invento aqui apresentado.

28. No sistema desenvolvido, as partículas de  $\text{CuBTC}$  (4) foram imobilizadas na superfície de um eletrodo de disco de ouro com diâmetro de 1,7 mm (5), apresentando

contato elétrico de fio de ouro (6) embutido em haste de grafite de 6,50 mm x 750 mm de altura (7) e um anel Viton foi utilizado para fixar o eletrodo no orifício da tampa da célula eletroquímica (8) (FIGURA 2).

29. Uma resina polimérica foi preparada a partir da mistura copolimérica de 2g de acrilamida e acrilato de sódio em 30 mL de solução alcóolica. Em seguida, 100mg de CuBTC em sua forma comercial (Basolite C300) fabricada pela Sigma Aldrich, foi adicionada e sonicada por 2 horas para completa homogeneização da solução, formando a resina polimérica Cu-BTC. Para preparação do eletrodo modificado, uma alíquota (2 $\mu$ L) da resina polimérica foi depositada em um eletrodo de disco de ouro miniaturizado. Após secagem, um filme fino da Rede Metal-Orgânica cobre (II) – benzeno - 1, 3, 5 – tricarboxilato foi formado na superfície do eletrodo de Ouro e identificado pela sigla CuBTC-EAu.

30. Antes de ser utilizado como sensor, as propriedades eletroquímicas do eletrodo quimicamente modificado foram estudadas por voltametria cíclica (VC) numa solução de 0, 1 mol L<sup>-1</sup> de tampão fosfato em pH 3,0, utilizada como eletrólito de suporte.

31. Todas as medidas eletroquímicas foram realizadas em temperatura ambiente, com auxílio de um potenciostato/Galvanostato da Autolab PGSTAT 10, interfaciado a um microcomputador com software NOVA 1.8 para controle do potencial, aquisição e tratamento de dados.

32. O sistema utilizado foi constituído de uma célula eletroquímica de 30 mL de capacidade volumétrica (9), fechada com uma tampa de teflon com três orifícios (10), utilizando-se um eletrodo de referência de prata/cloreto de prata saturado com 3M de cloreto de potássio como eletrólito (Ag/AgCl(KCl<sub>sat</sub>))(11), um eletrodo auxiliar de fio de platina (12) e como eletrodo de trabalho o sensor desenvolvido (13) (FIGURA 3).

33. Após otimização das condições operacionais do sensor - 10mL de Tampão Fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, utilizado como eletrólito de suporte; pH 3.0; potencial aplicado= - 0,4 a 1V; taxa de varredura 50,0 mVs<sup>-1</sup>; tempo de resposta = 15 minutos - os resultados

mostraram que com a adição da glutatona no meio de reação há o aparecimento de um novo pico de oxidação, no potencial de 0.5V, o qual é devido a interação do metal do eletrodo modificado com o grupamento -SH da glutatona, formando um novo complexo (FIGURA 4). Este sinal, portanto, é utilizado para detectar a presença e a quantidade de glutatona em uma amostra, levando em consideração respectivamente o potencial da curva de oxidação e a intensidade da corrente.

34. Nas condições aqui apresentadas, com o aumento da concentração de glutatona na solução há um aumento proporcional do valor de corrente. A glutatona é oxidada cataliticamente pelo CuBTC-EAu gerando um sinal elétrico, e uma equação de regressão linear,  $I_p (\mu A) = 0.5 [GSH] (\mu M) + 0.40$ , foi estabelecida de acordo com a mudança de corrente e a concentração de glutatona na solução, com um coeficiente de correlação ( $r^2$ ) de 0,9965 (FIGURA 5). Onde  $I_p$  é a densidade de corrente de pico anódica em  $\mu A$  e  $[GSH]$  é a concentração da GSH em  $\mu M$ .

35. O sensor desenvolvido apresenta, portanto, uma boa atividade electrocatalítica para a oxidação da glutatona, com baixo limite de detecção ( $0.05 \mu M$ ) e uma faixa linear de resposta de  $0.05-2 \mu M$ , além de boa estabilidade e reprodutibilidade. A aplicabilidade potencial do sensor foi demonstrada pelo seu uso na determinação analítica da concentração de glutatona em amostras biológicas (FIGURA 6).

36. Para os testes em amostras reais, foram coletadas amostras sanguíneas (5 mL) de indivíduos saudáveis, através de punção da veia intermédia do braço, por um profissional qualificado. Tal procedimento teve liberação do comitê de ética em pesquisa sob o número de protocolo 041512/2014.

37. As amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo solução anticoagulante (EDTA- ácido etilenodiamino tetra-acético) e centrifugadas a  $1000 \times g$  por 10 minutos, extraindo-se o sobrenadante. Após centrifugação, estes foram armazenados em tubos criogênicos a  $-80^\circ C$ , devidamente identificados, para posterior análise.

38. Nos estudos voltamétricos, uma alíquota de  $500 \mu L$  foi diluída em  $9,5 mL$  de

solução tampão fosfato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 3,0 (1:20, VV) e submetida a análise por voltametria cíclica (VC) nas mesmas condições anteriormente otimizadas para o sensor desenvolvido.

39. Como pode ser observado na FIGURA 6, a qual mostra o voltamograma de uma amostra de soro, a oxidação ocorre praticamente no mesmo potencial encontrado para as amostras padrão de glutathione, o que demonstra a sensibilidade e efetividade do sensor para a detecção deste analito em amostras complexas, sem que ocorram interferências de outras espécies. Além disso, as medidas em triplicatas demonstram a reprodutibilidade do método, uma vez que a intensidade da corrente ( $I(A)$ ) de eletro-oxidação da glutathione ocorrem em valores muito próximos e dentro da faixa linear de detecção obtida.

40. A concentração de Glutathione nas amostras de soro analisadas pelo método de voltametria cíclica utilizando o Sensor eletroquímico CuBTC-EAu foi de aproximadamente  $1,69 \pm 0,04 \mu\text{M}$ , o que corrobora com os dados da literatura (Frei, B.; Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 1995, 35, 83; Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C.; Free Radical in Biology and Medicine, 3<sup>rd</sup> ed., University Press: Oxford, 2007; Navarro, J et al. Free Radical Biol. Med. 1999, 26, 410-418) quanto aos valores de referência deste antioxidante em sangue humano (TABELA 1).

<b>Tabela 1. Valores de referência para Glutathione em sangue humano</b>	
<b>Antioxidantes</b>	<b>Valores de referência</b>
Glutathione – GSH (Plasma)	1-3 $\mu\text{M}$
Glutathione – GSH (Soro)	1-3 $\mu\text{M}$

Fonte: Adaptada de Frei (1995), Halliwell e Gutteridge (2007) e Navarro (1999).

41. Breve descrição das Figuras. As características e vantagens da presente invenção se tornarão aparentes na descrição detalhada das características e resultados preferidos da invenção, com referência às figuras anexas.

42. Figura 1 - Estrutura Química da Glutathiona.

43. Figura 2 - Eletrodo quimicamente modificado CuBTC-EAu.

44. Figura 3 - Sistema Eletroquímico.

45. Figura 4 - Voltamogramas do CuBTC-EAu em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de Solução Tampão Fosfato pH 3.0 após 15 min. de contato (linha azul) e na presença de  $0,8 \text{ mM}$  de Glutathiona (linha vermelha).

46. Figura 5 - Voltamogramas do CuBTC-EAu em soluções com concentrações progressivas de Glutathiona (GSH) em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de Solução Tampão Fosfato pH 3.0 após 15 min, de contato. Curva de calibração obtida.

47. Figura 6 - Voltamogramas do CuBTC-EAu em soro sanguíneo diluído em  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de Solução Tampão Fosfato pH 3.0 após 15 min, de contato, realizado em triplicata.

48. A invenção é aplicada para determinação de Glutathiona reduzida em matrizes complexas, como é o caso de fluidos biológicos como sangue e urina, com elevada sensibilidade e baixos níveis de interferência, associados com a rapidez que análises rotineiras relacionadas ao diagnóstico clínico exigem.

49. O método desenvolvido pode ter aplicabilidade visando o diagnóstico clínico de vários processos patológicos que estão associados ao estresse oxidativo, como câncer, diabetes, Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) e doenças de Alzheimer e Parkinson. Em especial nos caso de câncer, onde a produção excessiva de radicais livres e espécies reativas de oxigênio está associada à geração de danos como apoptose e mutações.

50. Indivíduos com neoplasia possuem concentrações elevadas de marcadores oxidantes e concentrações reduzidas de substâncias antioxidantes. Além disso, pacientes submetidos ao tratamento por quimioterapia ou radioterapia tem conduzido a uma diminuição da capacidade antioxidante total devida à diminuição significativa dos

níveis de glutathione. Esta capacidade anti-oxidante vem ainda mais afetada com o estadio da doença e consequentemente com a gravidade da mesma, uma vez que os marcadores antioxidantes são encontrados em níveis significativamente mais baixos. Assim a presente invenção aplica-se também ao acompanhamento da resposta terapêutica.

## REIVINDICAÇÕES

1. Sensor eletroquímico baseado na rede metal-orgânica  $\text{Cu}_3\text{BTC}_2$  para detecção da glutathiona reduzida em amostras biológicas, caracterizado por abordar um sistema de três eletrodos, sendo um contra-eletrodo de fio de platina, um eletrodo de referência prata/cloreto de prata ( $\text{Ag}/\text{AgCl}(\text{KCl}_{\text{sat}})$ ) e um eletrodo de trabalho de ouro quimicamente modificado com a estrutura metal-orgânica cobre-benzeno-1,3,5-tricarboxilato ( $\text{CuBTC}$ ), em meio de reação contendo tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 3, para detecção da glutathiona reduzida.
2. Sensor eletroquímico baseado na rede metal-orgânica  $\text{Cu}_3\text{BTC}_2$  para detecção da glutathiona reduzida em amostras biológicas, de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por abordar o método da voltametria cíclica para eletro-oxidação catalítica da glutathiona em baixos potenciais.
3. Método de preparação de eletrodos quimicamente modificados, caracterizado por utilizar como mediador, ou seja, como material de reconhecimento químico, redes metal-orgânicas catalíticas imobilizadas sobre um eletrodo base.
4. Método de preparação do sensor eletroquímico baseado na rede metal-orgânica  $\text{Cu}_3\text{BTC}_2$ , de acordo com a Reivindicação 1, caracterizado por compreender a preparação de uma resina polimérica constituída pelo copolímero acrilamida-acrilato de sódio e a estrutura metal-orgânica  $\text{CuBTC}$ , formando um filme polimérico, o qual é depositado na superfície de um eletrodo de disco de ouro miniaturizado.
5. Método de detecção da glutathiona reduzida em amostras biológicas, caracterizado por usar o sensor eletroquímico descrito na Reivindicação 1, para análise do estresse oxidativo nas áreas de medicina humana ou veterinária.

6. Método de detecção da glutathiona reduzida em amostras biológicas, caracterizado por usar o sensor eletroquímico conforme definido na Reivindicação 1, para determinação e quantificação da glutathiona reduzida em amostras de soro sanguíneo de indivíduos visando o diagnóstico clínico de vários processos patológicos que estão associados ao estresse oxidativo, tais como câncer, arteriosclerose, leucemia, diabetes, AIDS e doenças de Alzheimer e Parkinson.

7. Método de detecção da glutathiona reduzida em amostras biológicas, caracterizado por usar o sensor eletroquímico conforme definido na Reivindicação 1, para determinação e quantificação da glutathiona reduzida em amostras de soro sanguíneo de pacientes com câncer submetidos ao tratamento por quimioterapia ou radioterapia, de forma a acompanhar a resposta terapêutica.

8. Método de detecção da glutathiona reduzida em amostras biológicas, caracterizado por usar o sensor eletroquímico conforme definido na Reivindicação 1, para determinação e quantificação da glutathiona reduzida em amostras de soro sanguíneo de atletas, para avaliação do estresse oxidativo induzido pelo treinamento físico.

**FIGURAS**

FIGURA 1

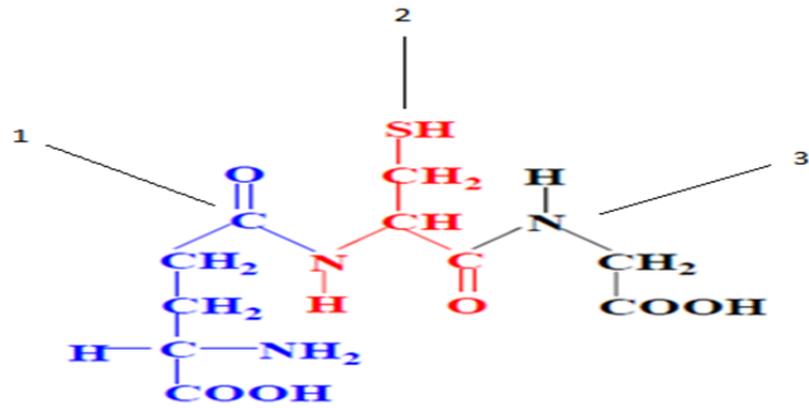


FIGURA 2

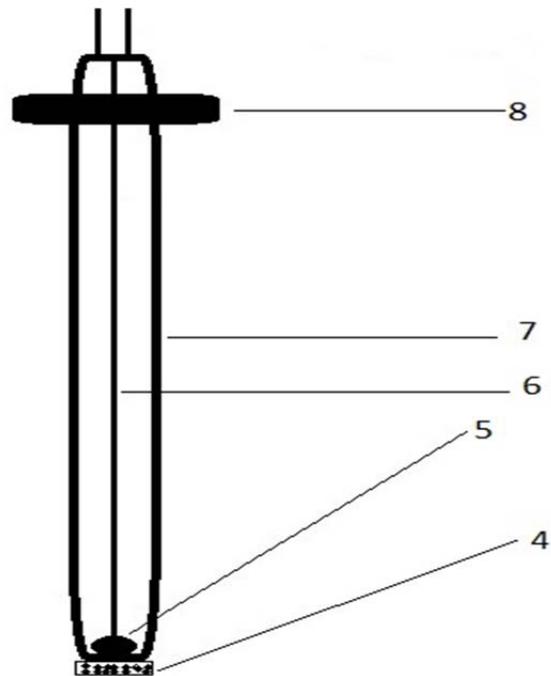


FIGURA 3

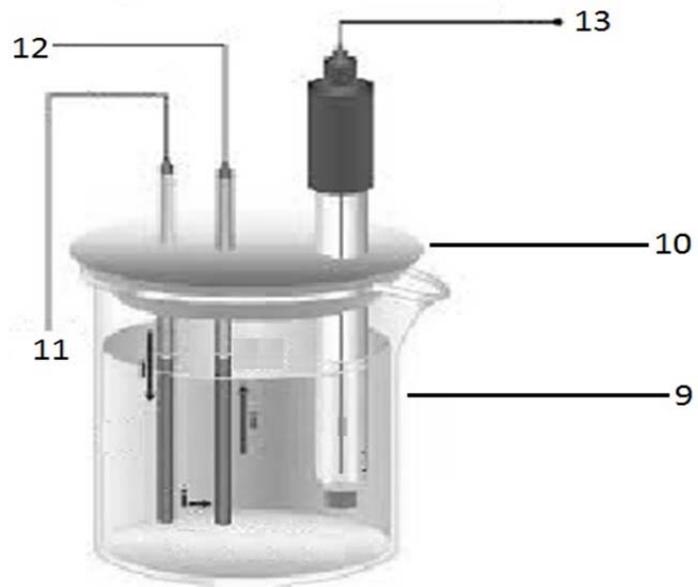


FIGURA 4

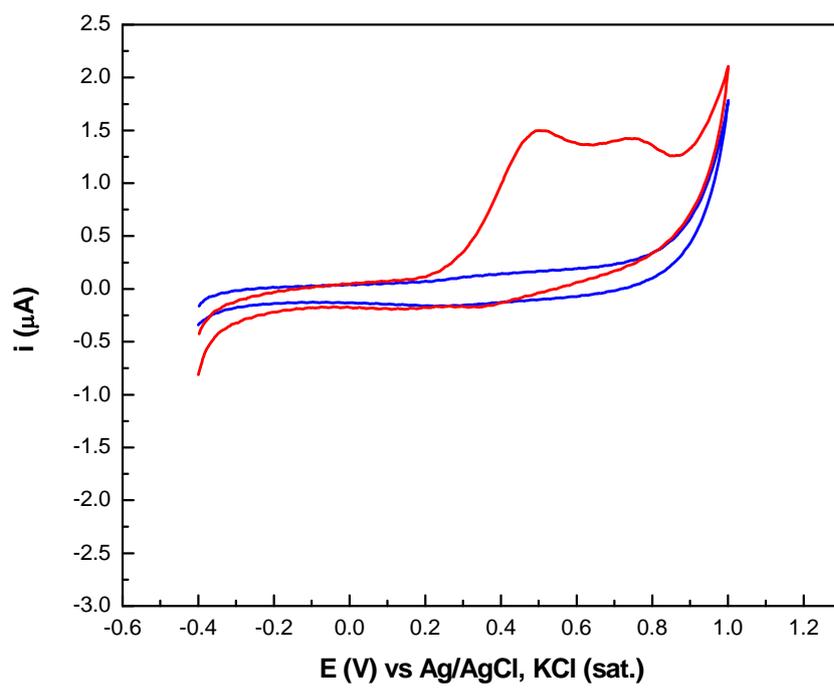


FIGURA 5

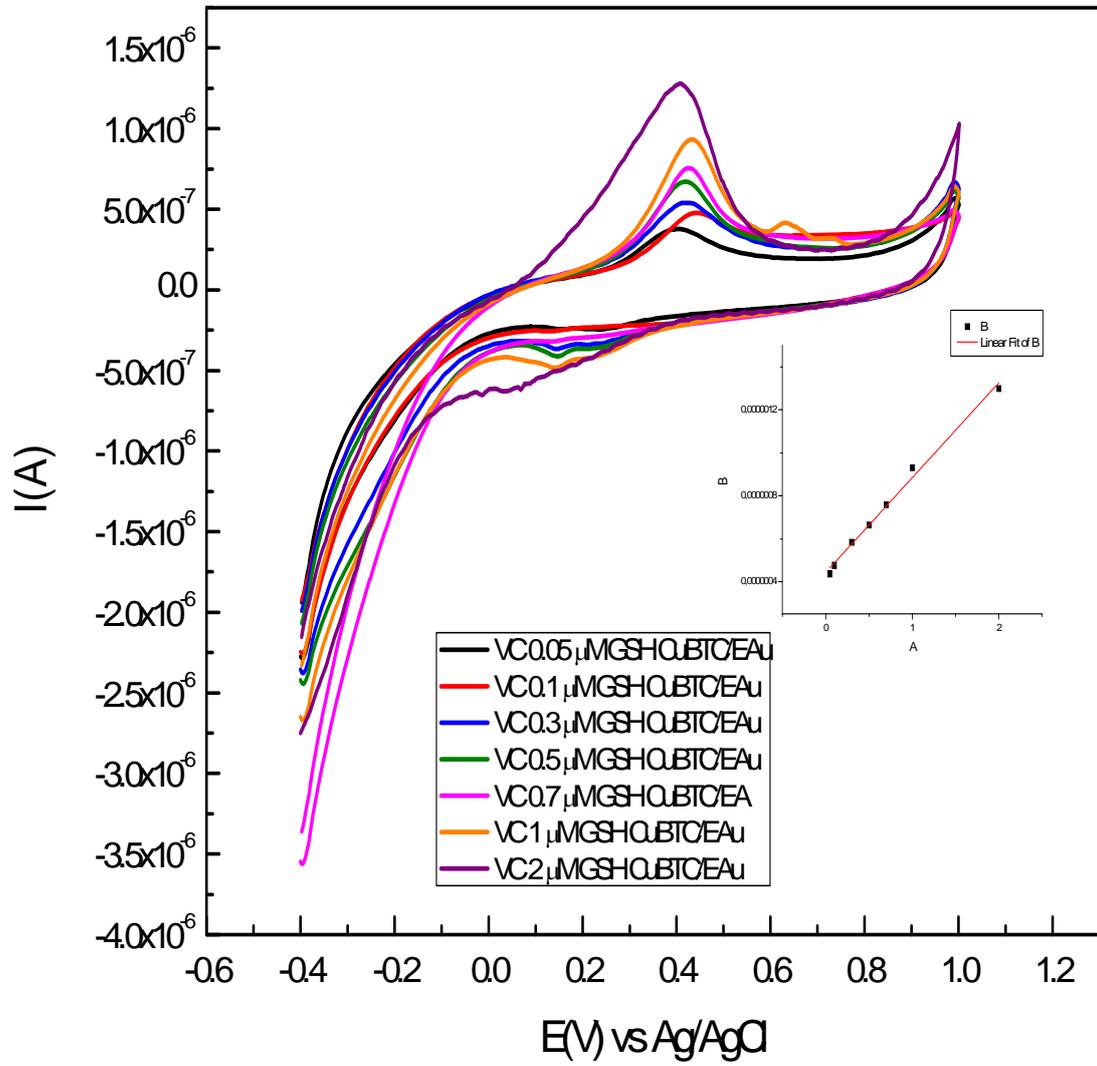
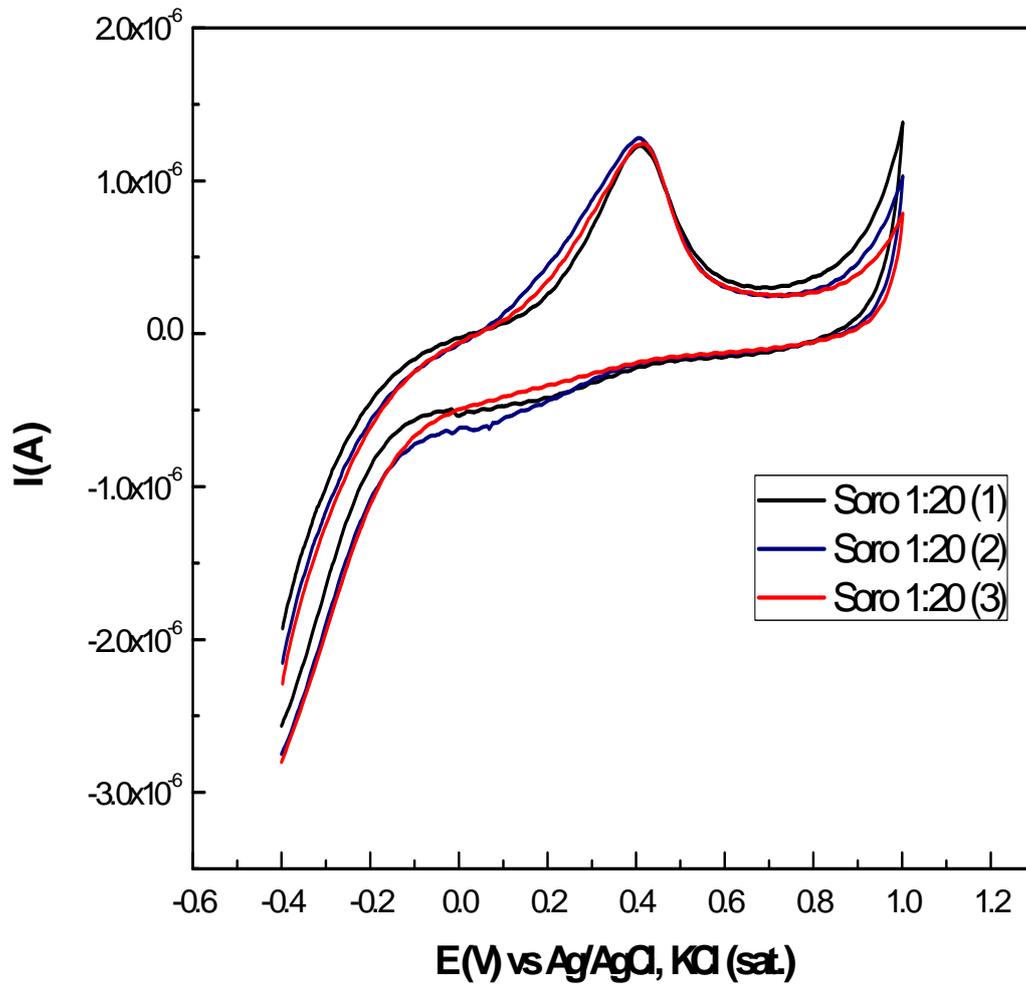


FIGURA 6



## RESUMO

### **DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR ELETROQUÍMICO BASEADO NA REDE METAL-ORGÂNICA $\text{Cu}_3\text{BTC}_2$ PARA DETECÇÃO DA GLUTATIONA REDUZIDA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS**

A invenção refere-se ao método de preparação de um sensor eletroquímico baseado na rede metal-orgânica cobre (II) – benzeno - 1, 3, 5 – tricarboxilato ( $\text{Cu}_3\text{BTC}_2$ ) e a aplicação do mesmo na detecção de glutatona reduzida, utilizando o método voltamétrico. O método de preparação do sensor é caracterizado por compreender os seguintes passos: (A) preparação de resina polimérica de Cu-BTC; (B) Imobilização do filme polimérico de CuBTC na superfície de um eletrodo sólido de ouro, obtendo-se um eletrodo quimicamente modificado denominado CuBTC-EAu. A glutatona é oxidada cataliticamente pelo Sensor CuBTC-EAu em solução tampão fosfato (pH 3.0), apresentando baixo limite de detecção ( $0.05 \mu\text{M}$ ) e uma faixa de trabalho linear de  $0.05\text{-}2\mu\text{M}$ , além de boa estabilidade e reprodutibilidade. A aplicabilidade potencial do sensor foi demonstrada pelo seu uso na determinação analítica da concentração de glutatona em amostras biológicas.