

**Desenvolvimento de métodos expeditos para quantificação
de cisteína/cistina**

Carla Sofia Andrade Peixoto

Dissertação apresentada à
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança
para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

Este trabalho foi efetuado sob orientação de:

Doutora Carla Silva
Doutora Joana Amaral
Doutor António Ribeiro

Novembro 2013

**Desenvolvimento de métodos expeditos para quantificação
de cisteína/cistina**

Carla Sofia Andrade Peixoto

Dissertação apresentada à
Escola Superior de Tecnologia e Gestão
Instituto Politécnico de Bragança
para obtenção do grau de Mestre em
Tecnologia Biomédica

O trabalho experimental desenvolvido no âmbito desta dissertação foi integralmente realizado no Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos Funcionais e Inteligentes (CENTI)



Agradecimentos

O espaço limitado desta secção de agradecimentos, seguramente, não me permite agradecer, como devia, a todas as pessoas que, ao longo do meu Mestrado em Tecnologia Biomédica - Biomecânica e Reabilitação me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. Desta forma, deixo em poucas palavras, os meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que me ajudaram neste processo contínuo de aprendizagem e crescimento.

Em primeiro lugar quero agradecer ao CeNTI (Centro de Nanotecnologia e Materiais Técnicos, Funcionais e Inteligentes) pela oportunidade de ter efetuado um estágio num ambiente empresarial e, por me ter disponibilizado todo o material necessário para o desenvolvimento do trabalho.

Á minha orientadora na empresa, a Doutora Carla Joana Silva pela disponibilidade, apoio, empenho, sugestões e críticas ao trabalho que, muito elevaram os meus conhecimentos científicos e, sem dúvida estimularam o meu desejo de querer, sempre, saber mais e a vontade permanente de querer fazer melhor.

Aos Professores Joana Amaral e António Ribeiro, os meus sinceros e honestos agradecimentos, pela coorientação neste trabalho. Muito obrigada pela total disponibilidade e apoio que sempre revelaram para comigo.

A todos os meus colegas do CeNTI, em especial à Anabela, Ana Sofia e Tânia pela amizade e companheirismo.

A todos os meus Amigos pelo apoio, pelo carinho e pelos bons momentos que passamos juntos.

Á minha família, sobretudo aos Meus Pais e á Minha Irmã, um enorme obrigado por todo o apoio, compreensão e incentivo que demonstraram, não só na elaboração desta dissertação, mas também por acreditarem sempre em mim ao longo de toda a minha vida, naquilo que faço.

Ao Paulo pela força, pelo companheirismo, pelo carinho e por tudo o resto que só nós sabemos.

Um agradecimento muito especial ao meu Avô Carlos, que partiu recentemente, e na qual sei que teria o maior orgulho em mim. Obrigado por todos os ensinamentos de vida.

A todos eles, dedico este trabalho, pois sem eles não seria possível.

Resumo

No presente trabalho pretendeu-se estudar a aplicação das técnicas de espectrofotometria UV-Vis e da cromatografia líquida em fase reversa acoplado ao detetor de UV para detecção e quantificação de cisteína em amostras de cabelo, cedidas pelo CeNTI, e sujeitas previamente a um processo de hidrólise ácida. Neste trabalho, ambos os métodos desenvolvidos foram validados procedendo ao estudo de parâmetros como a gama de linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

No método da espectrofotometria UV-Vis as amostras foram analisadas recorrendo a um espectrofotómetro da PerkinElmer, Lambda 35 de duplo feixe. A resposta foi calculada pela relação entre as absorvâncias dos vários padrões de cisteína e a concentração dos mesmos. Efetuando a análise do coeficiente de correlação para a cisteína foi possível verificar que a correlação entre as absorvâncias e a concentração dos padrões foi linear, verificando-se um $R^2=0.9995$. O limite de detecção e quantificação para a cisteína foi de 0,002 mM e 0,005 mM, respetivamente.

No método de HPLC todos os padrões (cisteína e cistina) e amostras de cabelo foram analisadas utilizando uma coluna C_{18} , 5 μ m, (15 cm e diâmetro de 4,6 mm), e uma fase móvel composta por ácido tricloroacético (TCA) 0,01M e pH=2,2 com acetonitrilo na proporção de 9,6:0,4. A resposta foi calculada pela relação entre área dos picos de cisteína e cistina vs concentração de cisteína e cistina. Pela análise dos coeficientes de correlação quadrática da curva de calibração para os padrões de cisteína e cistina constatou-se que existe uma boa correlação entre a área e a concentração dos padrões, tendo-se verificado um $R^2=0.9981$ para a cisteína e $R^2=0.9978$ para a cistina. O limite de detecção registado para a cisteína apresentou o valor de 0,040mM, enquanto para a cistina o valor foi de 0,021 mM. O limite de quantificação verificado par a cisteína foi de 0,120 mM e para a cistina foi de 0,064 mM.

Os resultados de validação aplicados para a linearidade, limites de detecção e quantificação e exatidão das amostras analisadas demonstraram a aplicabilidade de ambos os

métodos na detecção e quantificação de cisteína e cistina nas amostras de cabelo. No entanto efetuando a comparação dos dois métodos, verifica-se que o método da espectrofotometria foi aquele que permitiu detetar um maior número de resíduos de cisteína presente nas amostras de cabelo.

Palavras-chave: cisteína; cistina; cabelo; espectrofotometria; HPLC e validação.

Abstract

In the present work we intended to study the application of UV-Vis spectrophotometry and liquid chromatography coupled to an UV detector for detection and quantification of cysteine in several hair samples, provided by CeNTI, and previously subject to the process of acid hydrolysis. In this work, both the developed methods were validated by the study of parameters such as the range of linearity, limits of detection and quantification, precision and accuracy.

In the UV-Vis spectrophotometry method the samples were analyzed using a spectrophotometer PerkinElmer Lambda 35 with double beam. The response was calculated as the ratio between the absorbances of various patterns and cysteine concentrations. Performing the analysis of the correlation coefficient for cysteine it was also observed that the correlation between the absorbance and the concentration of the standards was linear, providing a correlation coefficient of $R^2 = 0.9995$. The limit of detection and quantification of cysteine was 0.002 mM and 0.005 mM, respectively.

The HPLC method analyzed all standards (cysteine and cystine) and hair samples by using a C18 column, with 5 microns (diameter 15 cm, 4.6 mm) and a mobile phase consisting of trichloroacetic acid (TCA) 0,01M and pH = 2.2 with acetonitrile in the ratio of 9,6:0,4. The response was calculated as the ratio of the peak area versus cysteine and cystine concentration of cysteine and cystine. For the analysis of correlation coefficients of quadratic calibration curve for patterns of cysteine and cystine was found that there is a good correlation between the area and the concentration of the standards, having been an $R^2 = 0.9981$ for cysteine and $R^2 = 0.9978$ to cystine. The detection limit for registered cysteine showed the value of 0.040 mM, while for cystine value was 0.021 mM. The limit of quantification was verified pair cysteine and 0.120 mM cystine was 0.064 mM.

The results of validation applied to the linearity, limits of detection and quantification and accuracy of the samples demonstrated the applicability of both methods in the detection and quantification of cysteine and cystine in hair samples. However making the comparison of the two methods, the results presented by the spectrophotometry method allowed to detect a larger number of residues present in hair samples cysteine.

Keywords: cysteine, cystine, hair, spectrophotometry, HPLC and validation.

Conteúdo

Agradecimentos	iv
Resumo	vii
Abstract	x
Lista de tabelas	xvi
Lista de figuras	xvii
Capítulo 1	1
Introdução	1
1.1. Importância, motivação e objetivos.....	1
1.2. Organização da Tese.....	2
Capítulo 2	4
Revisão Bibliográfica	4
2.1. Aminoácidos.....	4
2.2. Cisteína	5
2.3. Importância da cisteína e outros derivados nos sistemas biológicos.....	7
2.4. Mecanismo de formação de ligações dissulfureto (-S-S-)	10
2.5. Metodologias de detecção e quantificação de cisteína.....	12
2.5.1. Detecção de cisteína/cistina por métodos espectrofotométricos	14
2.5.1.1. Espectrofotometria de UV-Vis.....	14
2.5.1.2. Espectrofotômetro	14
2.5.1.3. Detecção de cisteína/cistina por técnicas espectrofotométricas	15
2.5.2. Detecção de cisteína/cistina por métodos cromatográficos.....	16
2.5.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC).....	16

2.5.2.2. Breve descrição de um sistema de cromatografia líquida (HPLC)	18
2.5.2.3. Detecção de cisteína e cistina por HPLC.....	20
<i>Redução das ligações dissulfureto (-S-S- a -SH)</i>	20
<i>Reagentes de Derivatização ultravioleta para tióis</i>	21
<i>Trabalhos descritos na literatura</i>	22
2.6. Validação do método analítico	23
2.6.1 Especificidade/Seletividade.....	23
2.6.2 Gama de linearidade.....	24
2.6.3 Limite de Detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)	24
2.6.4 Precisão.....	25
2.6.5 Exatidão	26
Capítulo 3	27
Materiais e Métodos	27
3.1. Reagentes e soluções	27
3.2. Material e equipamento de espectrofotometria e cromatografia.....	29
3.3. Metodologia experimental	31
3.3.1. Análises realizadas por espectrofotometria.....	31
3.3.1.1. Parâmetros de validação do método	31
3.3.2.2. Análise de amostras de cabelo.....	33
3.3.2. Análises realizadas por cromatografia líquida.....	34
3.3.2.1. Parâmetros de validação do método	34
3.2.1.2. Análise de amostras de cabelo.....	36
Capítulo 4	38
Resultados e Discussão	38
4.1. Análise de cistina e cisteína por espectrofotometria	39
4.1.1. Parâmetros de validação do método.....	39

4.1.2. Estudo do efeito da variação da concentração de NaOH na recuperação	44
4.1.3. Análise de cisteína nas amostras de cabelo	46
4.1.3.1. Determinação do efeito de matriz nas análises por espectrofotometria ...	46
4.1.3.2. Estabilidade do método para detecção de cisteína nas amostras de cabelo	48
4.2. Análise de cistina e cisteína por HPLC	52
4.2.1. Parâmetros de validação do método.....	52
4.3. Comparação dos métodos da espectrofotometria UV-Vis e HPLC na detecção de cisteína no cabelo	58
Capítulo 5	62
Conclusões e Propostas futuras	62
Referências bibliográficas	64
Anexos	73
Anexo A.....	73
Anexo B	76

Lista de tabelas

Tabela 1. Métodos atuais para determinação de cisteína e seus derivados [26].....	13
Tabela 2. Lista de características de todos os reagentes utilizados na preparação de soluções e padrões	28
Tabela 3. Dados obtidos para a absorvância a um comprimento de onda fixo de 412 nm, para o método de detecção da cisteína por espectrofotometria UV-Vis	40
Tabela 4. Valores registados para as absorvâncias a duas temperaturas (20°C e 37°C) dos padrões a um comprimento de onda fixo de 412 nm.....	42
Tabela 5. Resultados experimentais obtidos no estudo da influência da concentração de NaOH no rendimento da reação	45
Tabela 6. Valores dos parâmetros da carta de controlo através da Abs a 412 nm para o cabelo do padrão de controlo.....	50
Tabela 7. Dados experimentais obtidos para a determinação da curva de calibração da cisteína.....	53
Tabela 8. Dados experimentais obtidos para a determinação da curva de calibração da cistina	54
Tabela 9. Resultados experimentais obtidos dos ensaios de recuperação de cistina a cisteína em água.....	56
Tabela 10. Valores referentes à concentração de cisteína nas 26 amostras de cabelo....	59
Tabela 11. Tabela referente às constantes calculadas pelo método dos mínimos quadrados.....	76
Tabela 12. Valores registados da cisteína a uma temperatura de 20°C para um intervalo de confiança de 95 % no UV-Vis.	77
Tabela 13. Valores do LOD registados da cisteína a uma temperatura de 20°C para um intervalo de confiança de 95 % no UV-Vis.....	77
Tabela 14. Valores do LOQ registados da cisteína a uma temperatura de 20°C para um intervalo de confiança de 95 % no UV-Vis.....	77

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura geral de um aminoácido.	4
Figura 2. Estrutura química da L-cisteína.	5
Figura 3. Formação reversível de uma ligação dissulfureto pela oxidação de duas moléculas de cisteína [20].	6
Figura 4. Componentes básicos de um sistema de cromatografia líquida (HPLC).	19
Figura 5. Reação de derivatização da cisteína com o CMPI [67].	21
Figura 6. Sistema de espectrofotometria UV-Vis (PerkinElmer) utilizado.	30
Figura 7. Sistema de cromatografia líquida (Waters) utilizado.	31
Figura 8. Curva de calibração da L-cisteína a 20 °C e os respetivos desvios padrão em cada ponto (vermelho) pelo método da espectrofotometria.	41
Figura 9. Gráfico referente ao efeito da variação de temperatura por espectrofotometria.	43
Figura 10. Curva de calibração obtida pelo método de adição de padrão por espectrofotometria.	47
Figura 11. Carta de controlo para o cabelo padrão de controlo pelo método espectrofotométrico.	51
Figura 12. Curva de calibração obtida para a análise de cisteína por HPLC.	53
Figura 13. Gráfico de calibração obtido para a cistina pelo método do HPLC.	54
Figura 14. Curva de calibração obtida pelo método de adição de padrão por HPLC.	57

Capítulo 1

Introdução

1.1. Importância, motivação e objetivos

Os aminoácidos possuem um papel decisivo nas mais diversas funções biológicas que ocorrem no corpo humano. De entre os diversos aminoácidos que existem no nosso organismo, a cisteína tem um papel importante na síntese de proteínas. A cisteína caracteriza-se por possuir na sua cadeia lateral um grupo tiol bastante reativo, podendo este reagir com determinados compostos, como é o caso das espécies reativas de oxigénio (ROS). O grupo tiol permite também que duas cisteínas possam formar uma ligação covalente originando um resíduo de cistina. A cisteína desempenha um papel fundamental na fisiologia humana, no entanto, níveis anormais deste aminoácido no ser humano poderão ser um indicador de diversas patologias, como são os casos de crescimento lento, despigmentação do cabelo, edema, letargia, danos hepáticos, perda de massa muscular e gordura, doenças da pele, fraqueza, diabetes, cistinúria, doenças degenerativas, cancro entre outras. Consequentemente, torna-se necessário proceder à separação e determinação de aminoácidos em vários fluídos e/ou tecidos biológicos por forma a identificar e quantificar este aminoácido em particular. Surge assim a necessidade de desenvolver técnicas que permitam alcançar o objetivo referido, as quais encontram muitas das suas aplicações em áreas como a bioquímica clínica e a indústria farmacêutica.

Como referido, a cisteína pode funcionar como um importante biomarcador para um determinado número de patologias que lhe estão associadas. Dada a semelhança estrutural dos aminoácidos, a maioria dos métodos relatados na literatura para a determinação

de cisteína em amostras biológicas, envolve a utilização de métodos cromatográficos, por forma a proceder à separação dos diferentes aminoácidos. Contudo, devido à presença do seu grupo tiol característico, a espectrofotometria é também um método amplamente utilizado como método de quantificação de cisteína, contudo este método em particular, requer a adição de um reagente que promova o desenvolvimento de cor.

O objetivo do presente trabalho prende-se em estabelecer um método que visa a determinação e quantificação dos aminoácidos cisteína/cistina por meio de técnicas espectrofotométricas. Pretende-se sobretudo utilizar reagentes com cromóforos capazes de interagir especificamente com os resíduos de cisteína/cistina e verificar a sua adequabilidade para quantificar o teor destes compostos, por comparação com outras técnicas, como a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) com deteção UV. Finalmente pretende-se calibrar o método e testar em amostras reais como o cabelo, com o intuito de verificar qual a influência da matriz de análise na determinação destes aminoácidos.

1.2. Organização da Tese

A dissertação apresentada consta de 5 capítulos: Introdução, Revisão Bibliográfica, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões e Perspetivas Futuras.

No Capítulo 1 é feita uma breve introdução, apresentando-se de forma sucinta a estrutura e objetivos da dissertação, bem como o enquadramento e a motivação do trabalho.

No Capítulo 2 são apresentados alguns conceitos teóricos relacionados diretamente com o trabalho, e cujo conhecimento é indispensável à compreensão do mesmo. Um conceito transversal a todo o trabalho realizado é o conceito de aminoácido, e mais especificamente do aminoácido cisteína, bem como da importância biológica deste aminoácido e seus derivados. De seguida procede-se à descrição do mecanismo de formação de ligações dissulfureto, resultante da oxidação do grupo tiol na cadeia lateral dos aminoácidos.

Posteriormente são detalhadas algumas metodologias descritas na literatura para a determinação de resíduos de cisteína e, por último, é feita uma abordagem relativa aos métodos utilizados atualmente para a deteção e quantificação de cisteína/cistina em

várias amostras biológicas. Dentro destes, destaca-se a espectrofotometria (UV-Vis) como método rápido, simples e eficaz na determinação dos aminoácidos cisteína e a cromatografia líquida de fase reversa (HPLC-RP) como técnica bastante poderosa e utilizada na separação de amostras heterogéneas.

No Capítulo 3 apresentam-se os reagentes e as soluções, o material e o equipamento de espectrofotometria e de cromatografia líquida e finalmente toda a metodologia utilizada ao longo do trabalho experimental.

No Capítulo 4 apresentam-se os resultados experimentais obtidos na determinação de alguns parâmetros de validação dos métodos analíticos de espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis) e de cromatografia líquida (HPLC). São igualmente apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos na análise de cistina e cisteína em amostras de cabelo utilizando os dois métodos atrás referidos.

Por último, no Capítulo 5 apresentam-se as conclusões do trabalho e sugere-se propostas para trabalhos futuros.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1. Aminoácidos

Os α -aminoácidos, unidades estruturais base das proteínas, são definidos como sendo substâncias biologicamente ativas que podem ser encontrados em células vivas, mas também em fluídos corporais de animais, em quantidades variáveis de acordo com o tecido em particular. Os α -aminoácidos caracterizam-se por apresentarem uma estrutura geral comum (Figura 1), nomeadamente um carbono central (quiral, exceto no caso da glicina) ao qual se ligam dois grupos funcionais, um grupo carboxilo e um grupo amina, um átomo de hidrogénio e uma cadeia lateral (R), sendo que esta última influencia de forma determinante as características de cada aminoácido [1–3].

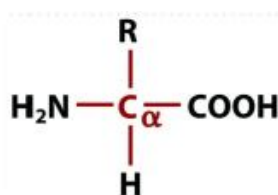


Figura 1. Estrutura geral de um aminoácido.

Para além da sua função primária como constituintes das proteínas, os aminoácidos desempenham um importante papel em vários sistemas biológicos, sendo utilizados como substratos intermediários metabólicos e como mensageiros fisiológicos, contribuindo a nível físico-químico para a manutenção do pH, dos potenciais elétricos, dos

potenciais redox dos sistemas biológicos, da osmose, bem como da manutenção da força iônica [1, 2, 4, 5].

Dada a sua importância biológica, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de encontrar uma correlação entre níveis alterados de alguns aminoácidos, no sangue e noutros fluidos ou tecidos, e o desenvolvimento de patologias tais como a diabetes, cancro e doenças degenerativas como Alzheimer e Parkinson [6]. Por este motivo, do ponto de vista da bioquímica e química clínica, é de extrema importância o desenvolvimento de metodologias que permitam a separação e determinação de aminoácidos em amostras biológicas [7]. De igual forma, nos últimos anos tem sido dada uma relevância crescente ao estudo da estrutura e composição de proteínas, com particular ênfase na determinação da sequência de aminoácidos [2].

Adicionalmente, nas últimas décadas, tem-se assistido a um número crescente de trabalhos com particular importância no setor da indústria alimentar, que visam a determinação da composição de aminoácidos livres/totais em alimentos, com a finalidade de determinar a sua composição química e nutricional [3–5, 7–10].

2.2. Cisteína

De entre os aminoácidos codificados, a cisteína é considerada como sendo muito específica e única por conter um grupo tiol (-SH) muito reativo na sua cadeia lateral, que lhe confere uma baixa polaridade [11, 12]. A estrutura química da cisteína pode ser visualizada na Figura 2.

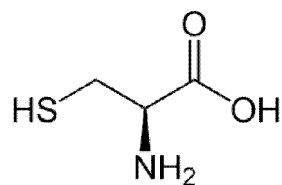


Figura 2. Estrutura química da L-cisteína.

A cisteína está envolvida em múltiplas funções biológicas [13] desempenhando um importante papel a nível dos processos biológicos e metabólicos que ocorrem nos orga-

nismos vivos, sendo por exemplo muito importante na manutenção da homeostasia celular [11, 14]. Este aminoácido assume ainda um papel crucial na estrutura de muitas proteínas, dada a sua capacidade para formar ligações dissulfureto (-S-S-) com outros resíduos de cisteína [15, 16] que existam na mesma cadeia polipeptídica ou em cadeias diferentes. Desta forma, duas moléculas de cisteína podem facilmente ser oxidadas para formar um aminoácido dimérico unido covalentemente por uma ligação dissulfureto, designado por cistina [17–19], e cuja formação se encontra representada na Figura 3.

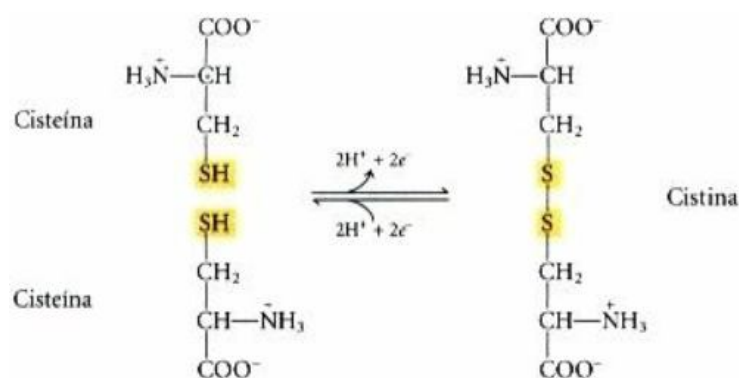


Figura 3. Formação reversível de uma ligação dissulfureto pela oxidação de duas moléculas de cisteína [20].

Segundo Petersen e colaboradores [21], o papel da cisteína numa estrutura proteica é muito dependente da localização celular da proteína em que está inserida. De facto, atualmente sabe-se que as proteínas citosólicas contêm um número relativamente baixo de ligações dissulfureto, uma vez que existem sistemas enzimáticos envolvidos na manutenção dos grupos -SH na sua forma reduzida [11]. Já as proteínas destinadas à membrana citoplasmática e à via de excreção apresentam frequentemente pontes de enxofre (ligações do tipo -S-S-) na sua estrutura [13]. Nestes casos, como referido anteriormente, os grupos -SH podem sofrer um determinado número de reações de oxidação reversíveis, promovendo a sua conversão a -S-S- formando assim ligações dissulfureto. Este tipo de ligação, sendo do tipo covalente e permitindo a interação entre regiões que podem estar relativamente afastadas entre si na sequência polipeptídica, confere grande estabilidade conformacional, causando igualmente um incremento na rigidez estrutural. Desta forma, estas ligações desempenham um papel de extrema

importância na estabilização da estrutura tridimensional de um grande número de proteínas, influenciando de forma particular as suas características estruturais [22].

2.3. Importância da cisteína e outros derivados nos sistemas biológicos

A cisteína é conhecida como sendo um dos aminoácidos mais importantes nos sistemas biológicos e metabólicos, funcionando como um componente estrutural e funcional muito importante para a estabilização de muitas proteínas extracelulares [23–27]. Ela apresenta múltiplas funções devido às propriedades químicas e únicas do grupo tiol (–SH) presente na sua constituição [28, 29]. A elevada nucleofilicidade, atividade redox e propriedade de ligações a metais, fazem da cisteína um elemento essencial de muitas proteínas e um componente chave em muitas funções catalíticas [29, 30].

Um dos aspetos em que moléculas como a cisteína contendo grupos tiol desempenham um papel de extrema importância, prende-se com a eventual presença de radicais livres nas células. Em particular, os organismos aeróbios estão sujeitos a um conjunto de espécies reativas de oxigénio (ROS) que podem danificar, de forma direta ou indireta, todas as macromoléculas como proteínas, lípidos, hidratos de carbono e até mesmo o ADN, através de processos de oxidação e redução [31]. A formação destes radicais livres não é um processo programado para muitos organismos, contudo a sua formação é essencial dada a dependência destes para muitos processos oxidativos que ocorrem no seu interior [32, 33]. A maioria dos grupos –SH estão prontos para reagirem com as ROS, cujo objetivo passa por neutralizá-las a produtos consecutivamente menos tóxicos, promovendo a formação de ligações dissulfureto, por oxidação de moléculas de cisteína [29, 30].

Para além do importante papel atrás mencionado, a cisteína desempenha outras funções nos sistemas biológicos, como por exemplo, a nível do metabolismo celular. A cisteína está frequentemente associada a um metabolismo correto de um determinado número de compostos bioquímicos essenciais, tais como a coenzima-A, heparina, bioti-

na e ácido lipóico, estando por isso associada a lesões cutâneas, edemas, lesões no fígado, letargia, perda de massa muscular e de gordura e à despigmentação do cabelo.

Um dos aspetos em que moléculas como a cisteína desempenham um papel muito importante, prende-se com a sua presença no cabelo humano. Dependendo do seu teor de humidade, o cabelo é constituído essencialmente à base de proteínas (65% a 95%) [34, 35], mais especificamente por queratina (cerca de 80%) [36, 37]. As queratinas são estruturas fibrilares formadas por cadeias polipeptídicas, sendo as ligações dissulfureto (-S-S-) as principais ligações cruzadas presentes. A elevada presença do aminoácido cistina ($\approx 750 \mu\text{mol}/\text{grama}$ de cabelo) [34, 35] permite a formação de uma rede tridimensional estrutural, a qual confere propriedades mecânicas e térmicas adequadas. Esta estrutura complexa organiza-se formando verdadeiras fibras que, ao aderirem umas às outras conferem uma elevada textura e flexibilidade ao cabelo contra ataques químicos.

O cabelo humano é formado por três estruturas muito importantes; a cutícula, o córtex e a medula. A cutícula surge como sendo o componente mais importante do cabelo humano, uma vez que pode ser mais ou menos afetado pela utilização de produtos de cosméticos, da mesma forma que é responsável pelas propriedades visuais e táteis do cabelo, tendo ainda potencial para auxiliar no diagnóstico de patologias [35]. A cutícula é formada por camadas muito importantes (a camada A, a exocutícula e a endocutícula) ricas em cisteína e cistina. A camada “A” é uma estrutura muito resistente, a qual apresenta cerca de 30% de conteúdo de cistina. As ligações cruzadas presentes nesta camada, não só fornecem uma elevada resistência física, mas também as torna relativamente resistentes contra ataques químicos. A exocutícula, conhecida também pela camada “B”, corresponde a 55% da área total da cutícula e é rica em cisteína ($\approx 15\%$). A endocutícula, por sua vez apresenta um baixo grau de cistina, apenas cerca de 3%. O córtex ocupa a maior parte da área do cabelo (cerca de 75% a 80%) e da mesma forma que a cutícula encontra-se preenchida por ligações cruzadas de cistina, também no córtex encontra-se um elevado teor de cistina [35, 37]. Por último, a medula surge como uma camada cilíndrica, fina no centro do cabelo apresentando um elevado teor de lípidos e um baixo teor de cistina [35].

As permanentes e as colorações têm sido amplamente utilizadas na atualidade como processos populares de manutenção e obtenção de um cabelo bonito [37]. Estes tipos de tratamentos compartilham processos químicos idênticos envolvendo sobretudo etapas

oxidativas da cisteína que poderão originar, por ventura, danos no cabelo [35]. A conversão do aminoácido cisteína para ácido cisteico tem sido relatada na literatura como um importante indicador de danos no cabelo, quando sujeitos a esse tipo de tratamentos [37].

Apesar do significado biológico da cisteína e seus derivados encontrarem-se bem definidos, só recentemente é que a análise dos seus níveis em fluidos fisiológicos, tais como plasma e urina, têm sido reconhecidos na literatura, como um indicador importante para o diagnóstico e tratamento de uma série de patologias clínicas associadas [14, 38]. Exemplos disso são a cistinose e a cistinúria. A cistinose caracteriza-se por ser uma doença autossômica recessiva, na qual o paciente apresenta um déficit de transporte de cistina nos lisossomas [25, 39]. A cistina armazenada é fracamente solúvel em água e, por este motivo cristaliza no interior dos lisossomas dos diversos tipos de células, levando a lesões generalizadas nos tecidos e nos órgãos. A cistinúria, por sua vez, é uma doença caracterizada por um aumento da excreção urinária de cistina, e de outros aminoácidos básicos, tais como a arginina, ornitina e lisina, nos túbulos renais e trato gastrointestinal, conduzindo a uma maior concentração de cistina na urina [39, 40]. Assim, a elevada concentração de cistina na urina é responsável pela formação de cálculos renais.

Adicionalmente, na literatura encontram-se relatos de patologias associadas a níveis anormais de aminoácidos contendo enxofre no cabelo humano [41–43]. Exemplo disso é a tricotiodistrofia (TTD). O termo tricotiodistrofia engloba um conjunto de doenças genéticas autossômicas recessivas raras, sendo caracterizadas, principalmente por um déficit de cisteína e cistina no cabelo [42, 43]. Os indivíduos que padecem desta patologia geralmente apresentam ainda baixa estatura, atraso grave de desenvolvimento mental, infertilidade, má dentição, ictiose e distrofia ungueal [41].

Para além da cisteína, existem outras moléculas biológicas que incluem grupos tiol na sua composição e que desempenham funções essenciais na fisiologia humana, tais como a glutatona (GSH) e a homocisteína (Hcy). A GSH consiste numa molécula que integra três aminoácidos na sua composição, nomeadamente ácido glutâmico, cisteína e glicina, e que desempenha uma função muito importante nas células, contribuindo para a manutenção da homeostasia celular. A redução dos níveis de GSH pode estar relacio-

nado com o envelhecimento precoce e na patogênese de muitas doenças, como são os casos da Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), da doença de Alzheimer, doença hepática e doença pulmonar obstrutiva crônica.

A Hcy é um aminoácido homólogo da cisteína diferindo na sua cadeia lateral, uma vez que apresenta um grupo adicional, o grupo metileno, imediatamente antes do grupo tiol. A Hcy é um aminoácido que se encontra naturalmente presente no sangue, mas que em níveis elevados na circulação pode causar alterações a nível dos vasos sanguíneos. Níveis elevados de homocisteína no plasma, por exemplo podem funcionar como um indicador de um determinado número de condições patológicas, como são os casos das doenças degenerativas, mais precisamente, Alzheimer e Parkinson, de doenças cardiovasculares como são os casos da aterosclerose e hipertensão e da SIDA. Por conseguinte, níveis elevados de cisteinilglicina, no plasma ou na urina, são documentados em pacientes que apresentem artrite reumatoide, podendo estar associada com a extensão do processo inflamatório [16, 28, 44].

Pela relevância deste aminoácido e, dada a importância da concentração de cisteína e seus derivados em amostras biológicas como é o caso do plasma, urina e cabelo, e a possível associação entre patologias e níveis alterados de cisteína, a sua análise e quantificação parece assumir um papel de importância crescente [45]. Atualmente existe uma extensa variedade de métodos descritos na literatura cujo desenvolvimento teve por objetivo a determinação dos níveis de cisteína em fluidos fisiológicos, sendo ainda escassos os trabalhos desenvolvidos relativos à matriz cabelo humano.

2.4. Mecanismo de formação de ligações dissulfureto (-S-S-)

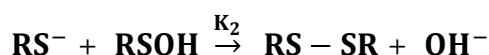
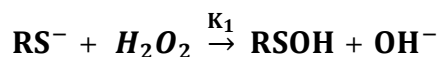
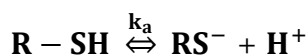
Os aminoácidos cisteína e cistina afetam positivamente os processos melanogénéticos, contribuindo para a manutenção da pigmentação do cabelo. O desejo de obtenção de um cabelo saudável e bonito levou a que uma enorme indústria desenvolvesse produtos, com vista à obtenção de um cabelo com melhor qualidade. Contudo, os métodos químicos comumente usados para clarear o cabelo podem alterar as suas propriedades, conduzindo a danos da fibra capilar, por isso é necessário a inclusão de produtos capazes de combater esses problemas. Desta forma, ao longo dos anos, vários têm sido os

estudos que relatam um déficit de cisteína e cistina no cabelo contribuindo para o processo que é a despigmentação do cabelo.

Na literatura, o mecanismo de formação de pontes dissulfureto por intermédio das ROS, mais concretamente por intermédio do peróxido de hidrogénio (H_2O_2), assume-se como o processo mais comum para a oxidação de cisteína nas proteínas, uma vez que o H_2O_2 é um oxidante que tem a capacidade de induzir com maior facilidade a oxidação dos resíduos de cisteína, a um pH altamente alcalino. Nos processos de coloração e permanente do cabelo é utilizado frequentemente o H_2O_2 . Este tipo de tratamentos pode tornar o cabelo mais poroso e com menos brilho, sendo também verificadas alterações na hidrofiliabilidade da superfície, constantes de difusão, capacidade de absorção e grau de adesão das fibras.

Na generalidade, quando o grupo $-SH$ reage com um peróxido, um ácido sulfénico ($-RSOH$) é formado. No entanto, como este ácido geralmente é instável, ele poderá evoluir para estados de oxidação superiores para formar um ácido sulfínico ($-SO_2H$) e ainda eventualmente para ácido sulfónico ($-SO_3H$) [33].

Os autores Ashby et al. [46] consideram a oxidação dos resíduos de cisteína a cistina como um processo reversível sob o ponto de vista enzimático, no entanto eles referem a oxidação cisteína para formar um ácido sulfénico, como sendo uma modificação potencialmente problemática. Assim sendo, a análise dos dados cinéticos para a oxidação da cisteína, por intermédio do H_2O_2 , pode ser evidenciada através das seguintes equações [47];



O mecanismo proposto por Luo et al. [47] relata uma compreensão completa do mecanismo de reação entre os grupos tióis e o H_2O_2 em solução aquosa. Segundo os

autores, este mecanismo deverá ser útil para racionalizar o destino a ser dado a determinadas proteínas quando submetidas ao tratamento com H_2O_2 [33]. A prova de que a ligação dissulfureto não é o único produto de reação, sob determinadas condições, levou a uma maior exploração de fatores passíveis de influenciarem o destino a ser dado ao intermediário RSOH e aos produtos de reação formados no final, quando o RSOH reage com H_2O_2 ou então com outra molécula de RSOH [47].

De acordo com os autores Rhee et al. [48] o H_2O_2 em si funciona como um agente oxidante suave e relativamente inerte à maioria das biomoléculas. Uma vez que o pKa do grupo tiol do resíduo de cisteína é aproximadamente 8,5 e sendo este mais difícil de oxidar na presença de H_2O_2 comparativamente com o anião tiolato (RS^-) de cisteína, é espantável que poucas sejam as proteínas onde se possa esperar que possuam um resíduo de cisteína, a qual é vulnerável à oxidação por parte do H_2O_2 nas células. Na verdade, determinados resíduos de cisteína apresentam valores de pKa relativamente baixos, como foi referido anteriormente, podendo existir sob a forma de anião tiolato (RS^-), a pH neutro, devido às cargas positivas nas proximidades dos resíduos de aminoácidos que estão disponíveis para a interação com o RS^- . Assim sendo, proteínas contendo resíduos de cisteína e que apresentem pKa relativamente baixos, podem ser alvos de processos de oxidação por ação de H_2O_2 [48–50].

2.5. Metodologias de deteção e quantificação de cisteína

A análise de aminoácidos presentes em amostras biológicas é muito importante em áreas como a investigação clínica, a indústria farmacêutica e a bioquímica. Atualmente encontram-se descritas na literatura várias metodologias aplicadas à quantificação de resíduos de cisteína e cistina em diferentes fluidos biológicos, sendo frequente a utilização de cromatografia líquida de alta performance (HPLC) acoplada a diversos detetores (tais como UV-Vis, fluorescência ou eletroquímico), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, bem como a utilização da espectrofotometria. Enquanto esta última é muito utilizada em análises de rotina, dada a sua rapidez e simplicidade de execução, já as técnicas cromatográficas requerem instrumentação específica e por vezes

complexa, com custos relativamente elevados, limitando por isso o âmbito das suas aplicações práticas.

A Tabela 1 apresenta, de uma forma geral, diferentes métodos utilizados com vista à determinação quantitativa de cisteína, bem como as vantagens e desvantagens que lhes estão associadas [26].

Tabela 1. Métodos atuais para determinação de cisteína e seus derivados [26]

Método Analítico	Vantagens	Limitações
HPLC com deteção fluorescente	Barato e elevada sensibilidade	Amostras derivatizadas podem revelar-se instáveis e sensíveis à luz
HPLC com deteção eletroquímica	Não requer derivatização e determinação simultânea de tióis oxidados e reduzidos	Dificuldade em estabilizar o detetor
HPLC com deteção UV	Facilmente acessível, elevada reprodutibilidade e derivatização simples	Embora não muito seletivo, boas separações têm sido conseguidas recentemente
GC ou HPLC com deteção de espectrometria de massa	Seletivo e sensível	Dificuldade em quantificar todos os tióis num único cromatograma
Eletroforese Capilar	Rápido e sensível	Outros picos a partir de reagente fluorescente

Métodos recentes como a cromatografia líquida de alta performance acoplada ao detetor de UV (HPLC-UV) e a espectrofotometria UV-Vis parecem oferecer bons resultados relativamente à determinação do aminoácido cisteína/cistina nos vários fluidos biológicos, sendo estes os métodos utilizados no atual trabalho.

Considerando que neste trabalho se pretende implementar metodologias com base na utilização da espectrofotometria e da cromatografia líquida de alta performance, de seguida, descrevem-se alguns dos principais conceitos no que respeita a utilização destas técnicas na análise de resíduos de cisteína e cistina, bem como trabalhos desenvolvidos por alguns autores.

2.5.1. Detecção de cisteína/cistina por métodos espectrofotométricos

2.5.1.1. Espectrofotometria de UV-Vis

A espectrofotometria UV-Vis assenta o seu princípio de funcionamento em transições eletrónicas que ocorrem devido à absorção da radiação pelas ligações ou por grupos funcionais específicos presentes nas moléculas. Na espectrofotometria UV-Vis, a absorção de luz ocorre na região do ultravioleta (comprimento de onda compreendido entre 200 e 400 nm) e na região do visível (comprimento de onda compreendido entre 400 e 800 nm). Este tipo de radiação eletromagnética possui energia suficiente para que os fótons interajam com os eletrões da amostra, promovendo a excitação dos eletrões ligantes ou não ligantes para estados de energias consecutivamente superiores.

A espectrofotometria UV-Vis caracteriza-se essencialmente por ser uma técnica quantitativa, dado que a radiação que é absorvida por uma dada espécie depende diretamente da sua concentração na amostra. Quando os valores das absorvâncias estão compreendidos entre 0 e 1, existe uma relação linear entre a intensidade de absorvância e a quantidade de cromóforos absorventes, a um comprimento de onda fixo. Esta relação pode ser descrita através da equação seguinte, designada pela lei de *Beer-Lambert* [51–53]:

$$Abs = \log \frac{I_0}{I} = \epsilon l C$$

onde *Abs* representa a absorvância (adimensional); I_0 a intensidade da luz incidente, I intensidade da luz transmitida, ϵ a absortividade molar da espécie ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l o percurso ótico (cm) e C a concentração da solução analisada (mol L^{-1}).

A lei de Lambert-Beer assume que a luz incidente é um feixe paralelo e monocromático, e que as moléculas do solvente e do soluto estão orientadas inteiramente ao acaso.

2.5.1.2. Espectrofotómetro

Um espectrofotómetro UV-Vis é constituído por 4 elementos principais, entre eles destacam-se a fonte de luz, o monocromador, o porta-amostra e o detetor. A fonte de luz

emite um feixe de radiação em direção ao monocromador que tem por objetivo polarizar a radiação. Um sistema de espelhos permite dividir a radiação incidente em dois feixes iguais, sendo um dos feixes direcionado para a referência e outro para a amostra. Ambos os feixes são enviados posteriormente para o detetor, o qual irá medir, para cada comprimento de onda, a diferença de intensidade dos feixes. Finalmente, os resultados são enviados para um computador, que fará a respectiva aquisição do espectro.

A fonte de radiação UV-Vis mais comum resulta da combinação de lâmpadas de tungstênio e deutério, que emitem na zona do visível e na zona do UV, respetivamente. O espectrofotómetro pode operar com um feixe único ou duplo, sendo este último utilizado na maior parte dos casos, com o objetivo de eliminar facilmente todas as interferências da célula de amostra. De entre as principais vantagens da utilização de um sistema UV-Vis é de salientar a grande variedade do tipo de amostras que podem ser analisadas.

2.5.1.3. Detecção de cisteína/cistina por técnicas espectrofotométricas

Atualmente existem diferentes métodos descritos para deteção de cisteína por meio de técnicas espectrofotométricas. O método de Ellman's é atualmente o método mais usado para a análise dos grupos –SH e –S-S- em várias amostras biológicas, no qual o 5,5-ditio-2-nitrobenzoato (DTNB) é utilizado para reagir com os grupos –SH, produzindo uma substância de cor amarela, a uma absorvância máxima de 412 nm. Este método é característico por ser simples, rápido, direto para a determinação do teor de –SH em várias soluções de proteínas que apresentem um baixa turbidez. No entanto, se for utilizado diretamente para determinar o teor de grupos –SH em soluções turvas, os resultados que irão ser obtidos, poderão não ser fidedignos. Este é um problema comum a todos os métodos espectrofotométricos, incluindo a espectrometria ultravioleta.

Dos vários trabalhos na literatura que referem a utilização do método de Ellman's para deteção de cisteína e cistina em várias amostras, destaca-se o trabalho desenvolvido pelos autores Cavaco e colaboradores [36] que teve por objetivo o desenvolvimento de um método para a quantificação dos grupos –SH e –S-S- em amostras de cabelo. Para isso utilizaram o reagente de Ellman's, após uma redução completa das ligações

dissulfureto com o agente redutor Borohidreto de sódio (NaBH_4). Os autores como Ou et al. [19] desenvolveram um método que permitiu quantificar os teores de $-\text{SH}$ e $-\text{S}-\text{S}-$ em proteínas através de técnicas espectrofotométricas, utilizando o reagente de Ellman's. Nesta experiência foi usada a acetona para destruir o sistema de emulsão por precipitação das proteínas. As proteínas, por conseguinte foram dissolvidas em tampão Tris-glicina com ureia, permitindo desta forma determinar o teor de grupos $-\text{SH}$ livres.

2.5.2. Detecção de cisteína/cistina por métodos cromatográficos

A Cromatografia é um método instrumental bastante utilizado na análise qualitativa e quantitativa de aminoácidos presentes em amostras biológicas.

O termo **cromatografia** significa “**escrita da cor**” tendo origem na combinação das palavras gregas “*chroma*” e “*graphein*”. A cromatografia pode ser definida como um processo de separação dos vários componentes presentes numa mistura. A separação é conseguida através da distribuição dos componentes em duas fases distintas (uma móvel e outra estacionária) que se encontram em contacto mútuo. A amostra é transportada pela fase móvel e interage com a fase estacionária. A separação é conseguida devido ao tipo e intensidade das interações que os diferentes componentes apresentam com a fase estacionária [54, 55].

A cromatografia surge em 1903 com os estudos pioneiros do botânico **Mikhail S. Tswett**, realizados com o objetivo de separar os diferentes compostos presentes em extratos de plantas. Desde então, têm-se verificado grandes avanços, quer ao nível da instrumentação/eletrónica e informática do sistema cromatográfico, quer das fases estacionárias utilizadas que permitiram o desenvolvimento e aperfeiçoamento desta técnica de separação. De igual forma, assistiu-se a uma evolução dos sistemas de deteção utilizados.

2.5.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC)

A Cromatografia líquida de alta performance (ou “de alta resolução”) (HPLC) surgiu no início na década de 60 sendo atualmente utilizada para a análise de diversos tipos de

compostos como sejam os produtos farmacêuticos, biomoléculas, polímeros e muitos outros compostos orgânicos e iónicos [56–59].

A técnica de HPLC pode ser subclassificada em cromatografia líquida em fase reversa (HPLC-RP); cromatografia líquida em fase normal (HPLC-NP); cromatografia de troca iónica (HPLC-IEC) e cromatografia de exclusão de tamanho (HPLC-SEC) [60].

A cromatografia líquida de fase reversa (HPLC-RP) constitui uma ferramenta muito poderosa para a separação de amostras heterogéneas e assenta o seu princípio de funcionamento com base nas diferenças hidrofóbicas registadas entre a fase móvel e a fase estacionária. Este modo de cromatografia utiliza uma fase móvel polar e uma fase estacionária apolar, sendo este modo utilizado em cerca de 70% a 80% dos procedimentos cromatográficos existentes.

As moléculas com elevado grau de hidrofília, como é o caso dos aminoácidos (cisteína/cistina) e outros peptídeos podem ser separados de acordo com esta técnica, permitindo obter um elevado poder de resolução. O mecanismo de separação cromatográfica depende essencialmente da interação hidrofóbica existente entre a ligação do soluto na fase móvel com a fase estacionária. De uma forma geral, pode dizer-se que na cromatografia líquida de fase reversa, os compostos apolares ou fracamente polares são mais fortemente retidos na fase estacionária, do que na fase móvel, fazendo com que a retenção de um composto na fase estacionária seja tanto maior, quanto menor for a sua solubilidade na fase móvel [60–62].

Neste modo de cromatografia, o tempo de retenção para moléculas apolares é significativamente superior, enquanto as moléculas de carácter polar eluem de forma mais rápida. Este fato encontra-se também relacionado com o tamanho das próprias moléculas, uma vez que o tempo de retenção aumenta de acordo com a área da superfície hidrofóbica, que é inversamente proporcional ao tamanho do composto. Assim sendo, as moléculas demasiado grandes vêm reduzidas a interação entre a superfície do composto, com a fase estacionária. Por outro lado, os compostos ramificados eluem de forma mais célebre que os seus isómeros lineares, dado que a sua superfície total é mais reduzida [61, 62].

A maioria das fases estacionárias utilizadas são as de enchimento, quer de partículas sólidas ou de partículas revestidas com filme de líquido (designadas por “colunas de

fase ligada”). Em cromatografia líquida de fase reversa, as colunas mais utilizadas são as colunas C₁₈ (colunas de enchimento constituídas por partículas de sílica ligadas a um filme de líquido constituído por um *n*-alcano com 18 átomos de carbono). No entanto, existem também as colunas C₈ (*n*-alcano com 8 átomos de carbono), que são igualmente bastante utilizadas [61, 62].

A maioria das fases móveis utilizadas em HPLC de fase reversa consiste em misturas de acetonitrilo-água, mas também misturas de acetonitrilo-ácido acético, acetonitrilo-tampão acetato de amónio, e ainda misturas ternárias. Neste tipo de procedimento, o acetonitrilo é utilizado com maior frequência como fase móvel, pois diminui a retenção da maioria das moléculas hidrofóbicas, aumentando dessa forma a eficiência da separação.

2.5.2.2. Breve descrição de um sistema de cromatografia líquida (HPLC)

Um sistema de HPLC é formado essencialmente por uma bomba que tem como função forçar a fase móvel a passar pelo sistema até ao detetor. Geralmente a pressão é elevada devido à passagem do líquido através da coluna cromatográfica que contém um enchimento caracterizado por um diâmetro de partícula bastante reduzido (normalmente de 3 ou 5 µm) [60]. A amostra é introduzida no topo da coluna, e o eluato poderá ser continuamente observado através de um detetor, podendo, em seguida, passar a um coletor de frações. A Figura 4 representa de uma forma esquemática os componentes básicos de um sistema de cromatografia líquida.

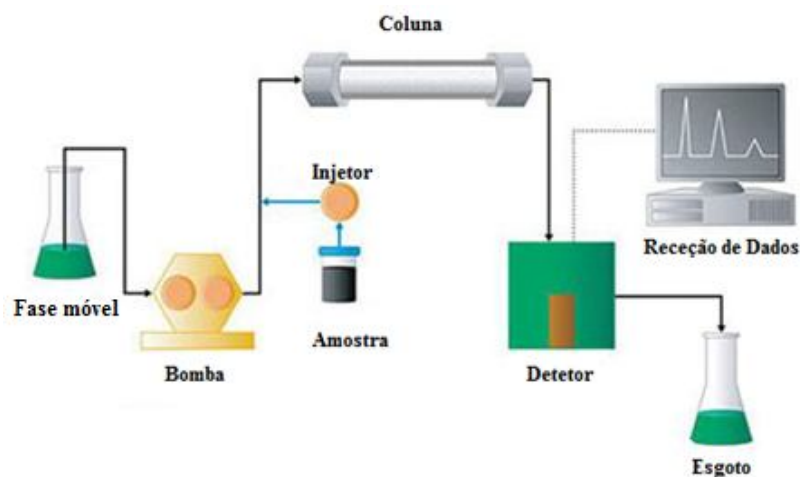


Figura 4. Componentes básicos de um sistema de cromatografia líquida (HPLC).

A bomba de HPLC deve proporcionar ao sistema um caudal constante, sem pulsos e com elevada reprodutibilidade. As colunas de cromatografia líquida são geralmente de aço-inoxidável, com diâmetro interior de cerca de 2 - 4 mm, sendo empacotadas com um enchimento apropriado para a separação pretendida. Pode ainda ser utilizada uma pré-coluna, que contém um enchimento com a mesma fase estacionária que a coluna analítica, funcionando como um saturador do eluente nesta fase, contribuindo ainda para preservar a coluna analítica de certos componentes indesejáveis da amostra (tais como espécies fortemente retidas pela estacionária) [63].

Os detetores podem ser agrupados em dois grupos: os gerais ou universais, cuja resposta é idêntica para compostos que apresentam o mesmo grupo funcional, e os seletivos ou específicos em que a sua resposta difere de acordo com a estrutura molecular dos componentes.

O detetor de UV, mais especificamente constitui o detetor mais utilizado em HPLC. Ele apresenta, em geral, uma elevada sensibilidade relativamente a solutos absorventes de radiação UV, sendo fracamente sensíveis a variações de fluxo e temperatura. Exigem, porém, obviamente, que os solutos em estudos absorvam radiação e que o eluente não seja absorvente desta.

2.5.2.3. Detecção de cisteína e cistina por HPLC

Atualmente podem ser encontrados na literatura diferentes métodos desenvolvidos com vista à deteção e quantificação de cisteína e cistina em várias amostras biológicas, por meio de técnicas cromatográficas.

Segundo os autores Bald et al. [64] as técnicas de separação em fase líquida, mais concretamente HPLC-UV, surge como uma das técnicas mais utilizadas na atualidade para a determinação de substâncias orgânicas em diversas matrizes. Contudo, muitas substâncias de real interesse, incluindo tióis não podem ser detetadas, uma vez que não dispõem de propriedades estruturais necessárias para a produção de sinais compatíveis com o detetor de UV. Assim, os procedimentos descritos na literatura requerem, por norma, a redução de ligações dissulfureto, bem como a derivatização dos grupos tióis instáveis, com um agente de derivatização compatível com o agente redutor.

Redução das ligações dissulfureto (-S-S- a -SH)

De acordo com Bald e seus colaboradores [65] a elevada sensibilidade à oxidação por parte do grupo -SH da cisteína em várias matrizes, faz com que esta ocorra muitas vezes sob a forma de dissulfuretos (-S-S-), tornando-a inacessível a agentes de derivatização. As amostras devem, por isso, ser tratadas com um agente redutor, tanto para a redução das ligações dissulfureto como para a manutenção dos grupos -SH na sua forma reduzida, até à derivatização. A escolha de um agente redutor adequado é muito importante, pois este deverá ser compatível com o agente de derivatização, para o grupo tiol. Contudo, caso os agentes redutores tais como o 2-mercaptoetanol, ditioneitol, ditioeritritol, o borohidreto de sódio/potássio e ainda as fosfinas; TNBP (tributilfosfina) e TCEP (tris (2-carboxietil) fosfina cloridrato) não forem compatíveis com o reagente de derivatização, poderão conduzir à formação de derivados, interferindo dessa forma com os resultados verificados nos cromatogramas. Assim sendo e, de acordo com estes mesmos autores, os agentes redutores 2-mercaptoetanol e o ditioneitol são adequados para o procedimento experimental desenvolvido ao longo deste trabalho, uma vez que não consomem o CMPI (iodeto de 2-cloro-1-metilpiridina) utilizado no atual procedi-

mento cromatográfico como reagente de derivatização, evitando a produção de derivados adicionais. Contudo estes dois agentes redutores não são adequados quando se pretende introduzir no processo, o CMQT (2-cloro-1-metilquinolínio tetrafluoroborato) como reagente de derivatização, pois pode conduzir à formação de derivados passíveis de interferirem com os cromatogramas [66].

Introduzido em 1997, o TCEP pode ser usado para a determinação de grupos de tióis no plasma e urina, surgindo como um agente redutor não volátil, solúvel e estável em soluções de água, ligeiramente ácida ou alcalina, e inodoro. Em geral, o TCEP é o preferido para as análises, dada a sua facilidade de uso e repetibilidade. Por outro lado, outros estudos comprovam que o uso de borohidreto de sódio ou de potássio não deverão ser uma escolha preferencial, dadas as dificuldades de controlo do pH e da formação significativa de espuma por parte da amostra [66].

Reagentes de Derivatização ultravioleta para tióis

Como a cisteína é impossível de ser detetada e quantificada por espectrofotometria na ausência de cromóforos, este problema poderá ser solucionado com o uso de um reagente de derivatização. Os reagentes de derivatização, como são os casos dos mais vulgarmente conhecidos e utilizados: CMPI, CMQT e BCPB (4-bis (4-carboxilato-1-piridínio) butano), têm como objetivo reagir com o grupo funcional de cisteína, produzindo um objeto de análise. O CMPI, especificamente, reage com a cisteína em solução aquosa, ligeiramente alcalina, para assim conduzir à formação do derivado S-piridínio, um tioéter estável (Figura 5) o qual possui um elevado coeficiente de absorvidade molar, a um comprimento de onda de 312 nm.

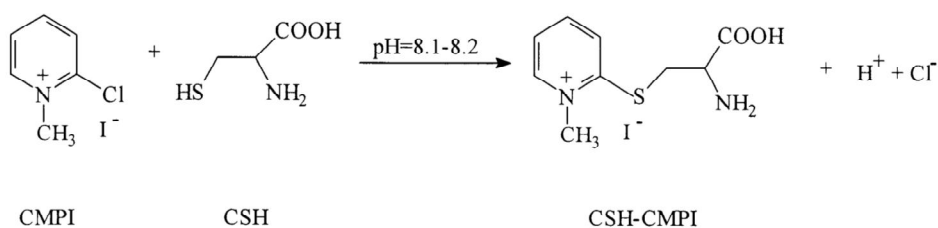


Figura 5. Reação de derivatização da cisteína com o CMPI [67].

Segundo os mesmos autores, praticamente todos os métodos cromatográficos existentes para a determinação de tióis dependem essencialmente deste procedimento de derivatização, antes ou após a separação. O método da pré-coluna parece ser aquele mais recomendado, para a análise de tióis, uma vez que existem grupos que podem ser decompostos na coluna analítica durante a separação.

Trabalhos descritos na literatura

Na literatura estão documentados alguns trabalhos que relatam o desenvolvimento e validação de métodos cromatográficos, mais precisamente HPLC com detecção UV, em várias matrizes biológicas como o plasma e a urina, para detecção de cisteína.

Bald e colaboradores [67] descrevem um método para determinação de cisteína no plasma, através de HPLC-UV, sob condições isocráticas. Os passos essenciais deste trabalho incluem a derivatização da cisteína, através da reação do grupo tiol com o CMPI, para formar o derivado cisteína S-piridínio estável, com absorção UV a um comprimento de onda de 312 nm. A análise do plasma incluiu 3 etapas fundamentais; a redução das ligações dissulfureto com 2-mercaptoetanol, seguido de derivatização com o CMPI, formando o derivado cisteína S-piridínio que é posteriormente separado e quantificado por RP-HPLC com detecção UV, sendo este um método reproduzível e sensível.

Relativamente à matriz urina, também na literatura encontram-se documentados diferentes trabalhos desenvolvidos com base em HPLC-UV, com o objetivo de determinar e quantificar cisteína e outros grupos de tióis. Prova disso é o trabalho apresentado por Amarnath et al. [26] onde relatam um método específico HPLC-UV para determinação de cisteína e outros tióis na urina. O passo chave na análise é o tratamento com TCDI (1,1-tiocarbonildiimidazol) que reage rápida e quantitativamente com os grupos amino e tiol para formar ditiocarbamatos cíclicos estáveis com absorção UV a um comprimento de onda de 250-300 nm. A análise da urina inclui 4 etapas fundamentais que incluem: redução das ligações dissulfureto com TCEP, ciclização com TCDI, purificação total, separação e quantificação por cromatografia líquida com detecção UV. O método mostrou-se reproduzível e sensível. Bald e seus colaboradores [68] também apresentam o

desenvolvimento e validação de um método para determinação de cisteína e homocisteína na urina. O trabalho realizado requer 3 etapas, todas elas igualmente importantes que incluem, a redução das ligações dissulfureto com o agente redutor TNBP, a conjugação dos tióis com o reagente de derivatização CMPI, formando o derivado S-piridínio de cisteína e de homocisteína, sendo posteriormente separados e quantificados por cromatografia líquida de fase reversa com detecção UV.

2.6. Validação do método analítico

A validação é necessária para qualquer método analítico, de forma a ser possível obter resultados fiáveis e reprodutíveis por operadores diferentes desde que estes utilizem o mesmo tipo de procedimento/equipamento em qualquer laboratório. A validação de um método analítico é feita através da realização de diversos testes e da determinação de diferentes parâmetros, nomeadamente: a especificidade/seletividade, a gama de linearidade/curva de calibração, os limites de detecção e de quantificação, a precisão, a exatidão/recuperação, a robustez e a estabilidade. Neste trabalho apenas se estudam os parâmetros gama de linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

2.6.1 Especificidade/Seletividade

A especificidade é definida como a capacidade que o método possui de identificar a presença de um determinado soluto em presença de outros compostos que estão presentes na amostra (impurezas, agentes de degradação, a matriz, etc.). A seletividade é um parâmetro que mede a capacidade que o método possui de distinguir a resposta de um analito da resposta de outros compostos interferentes presentes na amostra.

2.6.2 Gama de linearidade

A escolha de um modelo de calibração adequado é fundamental para a obtenção de resultados quantitativos fiáveis. É então necessário investigar a relação entre a concentração de analito na amostra e a correspondente resposta do detetor.

Para determinar a linearidade do método são preparadas diferentes soluções de concentrações conhecidas da substância que se pretende pesquisar. De seguida, procede-se à análise de cada uma destas soluções de acordo com um procedimento analítico bem definido. Para cada solução, o detetor irá fornecer um sinal proporcional à concentração da substância de interesse. A curva de calibração é obtida representando, para todas as soluções, o sinal do detetor no eixo do y e a correspondente concentração no eixo do x.

A gama de linearidade deve ser determinada recorrendo a um número suficiente de padrões, normalmente entre 5 a 8, devendo abranger toda gama de concentrações estudadas. Desta forma, a gama de linearidade é determinada através da determinação estatística de uma regressão linear:

$$Y = bX + a$$

Onde b representa o declive da reta e a a ordenada na origem. Deve-se igualmente indicar o coeficiente de correlação quadrático (r^2) entre as variáveis Y e X . Idealmente, o valor do declive deverá ter um valor diferente de zero, a ordenada na origem não deverá ser estatisticamente diferente de zero, e o coeficiente de correlação para a reta de calibração, deverá ter um valor próximo da unidade.

2.6.3 Limite de Detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de deteção e o limite de quantificação podem ser determinados realizando uma avaliação visual, utilizando razão sinal-ruído na linha de base (normalmente 3:1 ou 2:1 para o LOD e 10:1 para o LOQ) ou utilizando o desvio padrão e o declive da resposta do detetor (gama de linearidade). Para o atual trabalho, estes parâmetros foram determinados através dos parâmetros da gama de linearidade (curvas de calibração da

cisteína e da cistina). Dado que o limite de detecção é dependente da relação sinal-ruído existente, este pode ser melhorado através do aumento do sinal cromatográfico, reduzindo conseqüentemente o ruído do detetor. O sinal correspondente à altura do pico pode ser aumentado através da seleção do comprimento de onda mais apropriado, do volume de injeção assim como da seleção da fase móvel. O ruído, por sua vez, pode ser reduzido com recurso à utilização de detetores com elevada sensibilidade, os quais apresentam baixo ruído, com um tempo de resposta por parte do detetor mais lento, bombas com baixa pulsação e fases móveis com uma baixa absorvância.

O limite de detecção de um método corresponde à concentração mínima da substância que é possível detetar, ou seja, refere-se ao teor mínimo a partir do qual é possível detetar a presença do analito numa amostra. Este parâmetro é definido calculando a concentração que o modelo linear estima para o valor de sinal igual à soma do valor da ordenada na origem com 3 vezes o valor do parâmetro estatístico auxiliar da regressão ($\text{sinal} = a + 3S_{y/x}$). O limite de quantificação de um método corresponde à concentração mínima analito que é possível quantificar. O valor do limite de quantificação é obtido de considerando a soma do valor da ordenada na origem com 10 vezes o valor do parâmetro estatístico auxiliar da regressão ($\text{sinal} = a + 10S_{y/x}$).

Dado que o limite de detecção e quantificação dependem de vários fatores que variam no tempo, nomeadamente contaminações de amostras, equipamento, operador, entre outros, eles deverão ser sempre reavaliados sempre que ocorra uma variação de equipamento, pessoal e critérios.

2.6.4 Precisão

A precisão pode ser avaliada através da realização de ensaios de repetibilidade, de precisão intermédia ou de reprodutibilidade. A repetibilidade expressa a precisão sob as mesmas condições operatórias num intervalo de tempo curto, sendo por vezes designada de “precisão intra-análise”. A precisão intermédia expressa as variações de resultados dentro do mesmo laboratório, em dias diferentes, operadores diferentes, equipamento diferente, etc. A reprodutibilidade expressa a precisão de resultados entre laboratórios

distintos. Neste trabalho a precisão foi determinada através de ensaios de repetibilidade utilizando as análises dos padrões de cisteína e de cistina. Expressa-se a repetibilidade com o desvio padrão e o coeficiente de variação dos resultados experimentais obtidos.

2.6.5 Exatidão

A exatidão de um método analítico traduz a proximidade do valor obtido em relação ao valor esperado, estipulado ou verdadeiro. A metodologia normalmente utilizada para avaliar a exatidão de um método pode envolver:

- (i) A comparação dos resultados obtidos com os resultados obtidos com um método de referência validado (neste caso a exatidão do método de referência deve ser conhecida);
- (ii) A utilização de uma amostra de referência cuja concentração é conhecida;
- (iii) A utilização do método da adição de padrão, na qual se realizam de ensaios de recuperação.

A exatidão dos métodos instrumentais utilizados neste trabalho (HPLC e UV-Vis) foi determinada através do método da adição de padrão a amostras de cabelo. Devido à elevada complexidade da amostra de cabelo, as interações do composto a analisar com a matriz podem ser significativas e diminuir a exatidão do método. O método de adição de padrão é uma técnica normalmente utilizada nestes casos e naqueles em que existe dificuldade em encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância em estudo. Alíquotas de soluções padrão a diferentes níveis de concentração são adicionadas à amostra, permitindo que qualquer interferente presente na amostra afete de forma similar o padrão. Este método é um procedimento indireto para a determinação da concentração.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

Neste capítulo apresentam-se os reagentes e as soluções, o material e o equipamento de espectrofotometria e de cromatografia líquida e finalmente toda a metodologia utilizada ao longo do trabalho experimental.

3.1. Reagentes e soluções

Na tabela seguinte apresentam-se todos os reagentes utilizados na preparação das soluções e padrões necessários para as análises de espectrometria ultravioleta-visível e cromatografia líquida.

Tabela 2. Lista de características de todos os reagentes utilizados na preparação de soluções e padrões

Reagente	CAS	Fórmula química	Pureza	Marca
2-Mercaptoetanol (<i>2-MTE</i>)	60-24-2	C ₂ H ₆ OS	>99,0%	Aldrich
5,5'-Ditiobis-(ácido 2-nitrobenzóico) (<i>DTNB</i>)	69-78-3	C ₁₄ H ₈ N ₂ O ₈ S ₂	> 98%	Sigma
Acetonitrilo	75-05-8	C ₂ H ₃ N	99,8%	VWR
Ácido clorídrico	7647-01-0	HCl	37%	Riedel
Ácido etilenodiaminotetracético (<i>EDTA</i>)	6381-92-6	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ .2H ₂ O	p.a.	Merck
Ácido perclórico (<i>PCA</i>)	7601-90-3	HClO ₄	69,0- 72,0%	Aldrich
Ácido tricloroacético (<i>TCA</i>)	76-03-9	C ₂ HCl ₃ O ₂	99,0%	Sigma
Borohidreto de sódio (<i>NaBH₄</i>)	16940-66-2	NaBH ₄	96%	Aldrich
Dihidrogenofosfato de sódio monohidratado	10049-21-5	NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	98%	Panreac
Hidrogenofosfato de sódio	7558-79-4	Na ₂ HPO ₄	99%	Sigma
Hidróxido de sódio	1310-73-2	NaOH	> 98,5%	Sigma
Iodeto de 2-cloro-1-metilpiridina (<i>CMPI</i>)	14338-32-0	C ₆ H ₇ ClIN	97%	Aldrich
L-cisteína	52-90-4	C ₃ H ₇ NO ₂ S	97%	Aldrich
L-cistina	56-89-3	C ₆ H ₁₂ N ₂ O ₄ S ₂	≥ 99,5%	Sigma
Tris	77-86-1	C ₄ H ₁₁ NO ₃	> 99,9%	Sigma

Estes reagentes foram utilizados na preparação de quatro tipos distintos de soluções: (i) soluções de padrões (de cistina e de cisteína); (ii) soluções utilizadas na preparação das amostras de cabelo: soluções tampão (Tris e fosfato), EDTA e PCA; (iii) soluções de agentes redutores (NaBH₄ e 2-MTE) e (iv) soluções de agentes de derivatização

(CMPI e DTNB). A descrição detalhada da preparação de cada uma destas soluções encontra-se apresentada no anexo A.

3.2. Material e equipamento de espectrofotometria e cromatografia

Todas as soluções e padrões foram preparados utilizando uma balança analítica Mettler-Toledo, modelo XS205 Dual range, com uma precisão de ± 0.01 mg. Para a preparação de tampões de valor de pH determinado utilizou-se um sistema potenciométrico da Thermo Scientific, modelo Orión 3 Star. O eletrodo de vidro para medição de pH foi calibrado a cada 2 semanas com os respectivos padrões de pH fornecidos pelo fabricante.

Sistema de espectrofotometria de ultravioleta-visível (UV-Vis)

As determinações espectrofotométricas UV-Vis foram realizadas utilizando um espectrofotômetro da marca Perkin Elmer Lambda 35 de feixe duplo. Utilizaram-se cuvetes de quartzo, da marca Hellma com um percurso ótico de 1 cm. As leituras de absorvância foram realizadas a um comprimento de onda de 412 nm. Na Figura seguinte, apresenta-se o sistema de espectrofotometria UV-Vis que foi utilizado neste trabalho.



Figura 6. Sistema de espectrofotometria UV-Vis (PerkinElmer) utilizado.

Sistema de cromatografia líquida (HPLC)

Utilizou-se um sistema de cromatografia líquida da marca Waters equipado com uma bomba da Waters 510, um detetor UV Waters 486 e um amostrador automático Waters 717 Plus. A aquisição de dados foi realizada através de um computador com o *software* Millennium R32 para tratamento de dados experimentais.

As análises foram efetuadas utilizando uma coluna cromatográfica LiChrospher RP-18, da marca Supelco, com o comprimento de 15 cm e diâmetro de 4,6 mm. Esta coluna possui um enchimento com partículas de 5 μm de diâmetro e poros de 100 Å. Para proteção da coluna, utilizou-se um filtro pré-coluna com um enchimento com diâmetro de partícula de 2 μm .

Todas as análises foram realizadas à temperatura ambiente e com recurso a um amostrador automático. O volume do *loop* de injeção foi de 20 μL e o comprimento de onda utilizado foi de 312 nm.

A fase móvel foi preparada utilizando uma mistura de solução de ácido tricloroacético (TCA) 0,01M e pH=2,2 com acetonitrilo na proporção de 9,6:0,4. O caudal foi mantido a um valor constante de 0,5 mL/min.

Na Figura seguinte, apresenta-se o sistema de cromatografia líquida que foi utilizado neste trabalho.



Figura 7. Sistema de cromatografia líquida (Waters) utilizado.

3.3. Metodologia experimental

3.3.1. Análises realizadas por espectrofotometria

3.3.1.1. Parâmetros de validação do método

O primeiro estudo experimental realizado consistiu na determinação de alguns parâmetros de validação do método espectrofotométrico: a gama de linearidade, os limites de detecção e de quantificação, a precisão e a exatidão.

Gama de linearidade

A gama de linearidade do método espectrofotométrico foi determinada a duas temperaturas diferentes (20°C e 37°C) de forma a avaliar a eventual existência de diferenças significativas nos parâmetros estatísticos da gama de linearidade devida a variações da

temperatura. A metodologia apresentada de seguida foi utilizada na determinação às duas temperaturas. Para se avaliar da existência de diferenças significativas (a 95% de confiança) entre as gamas de linearidade obtidas às duas temperaturas utilizou-se a metodologia proposta por Miller & Miller [69] e que se encontra detalhada no anexo B.

A partir da solução de stock preparou-se uma solução diluída de cisteína (0,4:10). Como a solução inicial de cisteína foi preparada em HCl 1M, preparou-se de seguida uma solução de HCl 0,04M para completar as soluções dos vários padrões de modo a eliminar interferências de pH, ao adicionar volumes crescentes da solução de trabalho nos diferentes padrões.

As soluções padrão de cisteína foram preparadas a 9 níveis diferentes de concentração (entre 0,007mM a 0,064mM). A cada uma destas soluções padrão adicionou-se 100 μ L de reagente de Ellman's (DTNB) com uma concentração de 4 mg/mL e uma solução de tampão fosfato 0,1M com EDTA 1mM (pH=8.0) até perfazer o volume final total de 5mL. A medição da absorvância das soluções padrão foi realizada a 412nm, após um período de incubação de 15 minutos.

Prepararam-se 5 réplicas de cada padrão para cada nível de concentração e as análises correspondentes foram realizadas em cinco dias consecutivos. As gamas de linearidade foram obtidas utilizando a média dos valores experimentais obtidos para os cinco dias.

Limites de deteção (LOD) e de quantificação (LOQ)

O limite de deteção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados utilizando o desvio padrão e o declive da resposta do detetor (curvas de calibração de cisteína). Assim, o limite de deteção foi definido calculando a concentração que o modelo linear estima para o valor de sinal igual à soma do valor da ordenada na origem com 3 vezes o valor do parâmetro estatístico auxiliar da regressão ($\text{sinal} = a + 3S_{y/x}$). O valor do limite de quantificação é obtido de forma semelhante, mas considerando a soma do valor da ordenada na origem com 10 vezes o valor do parâmetro estatístico auxiliar da regressão ($\text{sinal} = a + 10S_{y/x}$). A metodologia detalhada destas determinações encontra-se apresentada no anexo B.

Precisão

A avaliação da precisão do método espectrofotométrico foi realizada determinando a repetibilidade utilizando as soluções de padrão de cisteína. As soluções padrão de cisteína foram analisadas em cinco dias consecutivos. Os valores encontrados para o desvio padrão na determinação da linearidade do método são utilizados para estudar a repetibilidade.

Exatidão

Para a preparação das amostras a serem avaliadas pelo método de adição de padrão foi utilizado o cabelo como matriz de referência.

Para isso, foi preparada uma amostra medindo uma massa rigorosa de cabelo a qual foi submetida a hidrólise ácida. Desta solução retiraram-se alíquotas de 0,400 mL às quais foram adicionados níveis diferentes de solução padrão de cisteína (0,000mM, 0,010mM, 0,020mM, 0,031mM, 0,041mM e 0,051mM). Seguidamente procedeu-se à adição de 100 μ L de DTNB (4mg/mL) e tampão fosfato (0,1M com EDTA 1mM a pH=8.0) até perfazer o volume total de 5mL em cada uma das soluções.

3.3.1.2. Análise de amostras de cabelo

Influência da concentração de NaOH na reação de redução

De modo a determinar a influência do pH da solução do agente redutor (NaBH_4) foi calculado o rendimento da reação de redução de cistina a cisteína. Foram então preparados padrões com concentrações conhecidas de cisteína (0,028mM, 0,042mM e 0,056mM), cistina (0,029mM, 0,044mM e 0,058mM) e mistura de ambas (cisteína + cistina) de concentrações (0,029mM, 0,043mM e 0,057mM), os quais foram submetidos

a reação de redução tendo-se utilizado soluções de NaBH_4 preparadas com diferentes concentrações de NaOH . Estas soluções foram posteriormente derivatizadas e analisadas por espectrofotometria UV-Vis.

Os valores de rendimento da reação de redução ($\eta\%$), foram calculados dividindo o valor da concentração obtido (através da curva de calibração da cisteína) pelo valor da concentração teórica (de cisteína, cistina e mistura de ambas).

Análise de amostras de cabelo

A redução de cistina a cisteína foi efetuada utilizando a metodologia proposta por Cavaco et al. [38]. Deste modo, a 350 μL de amostra foram adicionados 150 μL de solução Tris (50mM, $\text{pH}=6.8$) e 1 mL de NaBH_4 a 4% em solução de NaOH 0,05 M (preparado no momento). As amostras (incluindo o branco) foram sujeitas a um período de incubação de uma hora, num banho de água a uma temperatura de $37^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$ e sob agitação constante.

Após este período de incubação, o NaBH_4 residual foi inativado pela adição de 200 μL de HCl 5M, sob agitação durante 10 minutos. De seguida, o pH da mistura foi ajustado a 8,0 por adição de 2 mL de tampão fosfato (0,1 M com EDTA 1 mM a $\text{pH}=8,0$). Após esta adição, retirou-se uma alíquota de 1 mL de cada uma das amostras para reação com DTNB (100 μL) em tampão fosfato (3,9 mL) perfazendo um volume total de 5 mL. A absorvância foi medida a 412 nm após 15 minutos de incubação. Os resultados experimentais obtidos foram normalizados para concentração de cisteína por massa de cabelo.

3.3.2. Análises realizadas por cromatografia líquida

3.3.2.1. Parâmetros de validação do método

No método cromatográfico foram estudados os mesmos parâmetros de validação referidos para o método espectrofotométrico, exceto a precisão: a gama de linearidade, os

limites de detecção e de quantificação e a exatidão. A metodologia utilizada em cromatografia foi semelhante à metodologia utilizada em espectrofotometria.

Gama de linearidade

O estudo da gama de linearidade foi efetuado quer para a análise de cistina quer para a análise de cisteína. Preparou-se uma solução stock de cisteína e outra de cistina. Os padrões foram obtidos realizando uma diluição da solução stock para uma concentração intermédia (diluição 1:5) e de seguida preparando 7 níveis distintos de concentração. Para os padrões de cisteína foram utilizadas soluções de concentração entre 0,110 mM e 0,827 mM e para os padrões de cistina foram utilizadas soluções de concentração entre 0,055 mM e 0,416 mM. A preparação dos padrões foi realizada com o auxílio de micropipetas sendo utilizada água desionizada para completar um volume final de 750 µL.

Os padrões de cisteína e de cistina foram submetidos a um processo de redução e derivatização de acordo com o seguinte procedimento: Adicionou-se 750 µL de padrão a 750 µL de tampão Tris 1M (pH 8.2). De seguida, adicionou-se 375 µL de solução de EDTA 0,1M e 75 µL de uma solução 2-mercaptoetanol 0,1M. Após um período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 150 µL de solução aquosa de CMPI 0,1M. A solução obtida foi agitada em vórtex e mantida à temperatura ambiente durante cerca 30 minutos. De seguida, realizou-se a adição de 900 µL de uma solução de ácido perclórico 3M. Após homogeneização foi retirada uma alíquota da solução e colocada num vial para a análise cromatográfica.

A curva de calibração para a cisteína e para a cistina foi determinada representando em ordenadas os valores das áreas cromatográficas obtidas com os padrões e em abcissas os valores de concentração desses mesmos padrões.

Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ)

Estes parâmetros de validação do método cromatográfico foram determinados utilizando uma metodologia semelhante à utilizada no método espectrofotométrico. Ou seja, foram determinados através da curva de calibração da cisteína e cistina.

Exatidão

Com vista à determinação experimental da exatidão do método cromatográfico foi calculada a percentagem de recuperação de cisteína adicionada a amostras de água. Para isso foram preparados 7 padrões de cistina em água com concentrações entre 0,055 mM e 0,417 mM.

Paralelamente foram também preparadas amostras de cabelo adicionadas de cistina. Estas amostras foram preparadas medindo uma massa rigorosa de cabelo, sendo de seguida submetidas a hidrólise ácida. Desta solução retirou-se um volume de 250 µL ao qual se adicionou a cistina de forma a obterem-se soluções com concentrações compreendidas entre 0,073 mM e 0,364 mM.

A exatidão do método, expressa pela recuperação obtida em percentagem, foi calculada através da relação do valor experimental (calculado para cada amostra) e do valor teórico da concentração de cisteína.

3.3.2.2. Análise de amostras de cabelo

Estas análises foram realizadas utilizando a mesma metodologia apresentada para a análise dos padrões de cistina e cisteína, com a inclusão de uma etapa adicional de hidrólise ácida, prévia à etapa de redução.

Seguindo o procedimento recomendado pelos autores Pohn et al. [70], as amostras de cabelo utilizadas foram sujeitas a um tratamento de hidrólise ácida com 5 mL de uma solução de HCl 5M. A hidrólise foi realizada a uma temperatura de 110°C e durante um

período de tempo de 24 horas. Após este tempo, a solução foi arrefecida e de seguida neutralizada para um valor de $\text{pH}=7$ utilizando uma solução de NaOH 4M. Após este procedimento, as amostras de cabelo sofreram o mesmo procedimento de redução e derivatização a que as soluções padrão foram sujeitas, descrito previamente. De seguida, procedeu-se à sua análise por cromatografia líquida e determinou-se a concentração de cisteína.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

Neste capítulo apresentam-se os resultados experimentais obtidos na determinação de alguns parâmetros de validação dos métodos analíticos de espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis) e de cromatografia líquida (HPLC). São igualmente apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos na análise de cistina e cisteína em amostras de cabelo utilizando os dois métodos atrás referidos.

Devido à elevada sensibilidade à oxidação por parte do grupo $-SH$ de cisteína presente em várias matrizes, como é o caso do cabelo, este aminoácido encontra-se muitas vezes sob a forma de dissulfuretos, tornando-o inacessível a reagentes com cromóforos capazes de interagir especificamente com os resíduos de cisteína. Assim, para medir o conteúdo total de cisteína é necessário clivar as pontes dissulfureto, a fim de se obter o grupo $-SH$ livre.

O primeiro método apresentado visa a determinação e quantificação de resíduos cisteína em várias amostras de cabelo, através da espectrofotometria ultravioleta-visível. O procedimento encontra-se dividido em duas partes fundamentais; a primeira referente à determinação do conteúdo total de cisteína livre, através de uma reação com o reagente de Ellman's, determinando-se a gama de linearidade com os padrões de cisteína. Na segunda parte determina-se a quantidade total de cisteína, numa reação semelhante com o reagente de Ellman's, após redução completa das ligações dissulfureto nas amostras de cabelo, utilizando como agente redutor, o $NaBH_4$.

O segundo método, o método da cromatografia líquida em fase reversa compreende três etapas fundamentais; a medição do conteúdo total de cisteína livre, sendo necessá-

rio clivar as pontes dissulfureto existentes através do agente redutor, 2-mercaptoetanol; a derivatização dos grupos tióis instáveis, com um agente de derivatização compatível com o agente redutor, como é o caso do CMPI e, por último, a detecção e quantificação de cisteína por HPLC com detecção UV, sob condições isocráticas.

4.1. Análise de cistina e cisteína por espectrofotometria

4.1.1. Parâmetros de validação do método

Gama de linearidade

Para a validação deste método foram realizadas cinco repetições, em dias diferentes, do método de obtenção da curva de calibração para a cisteína, sendo apresentados os resultados para a ordenada na origem, o declive da reta e o coeficiente de correlação quadrático. Os padrões de cisteína foram preparados por dissolução de um volume apropriado da solução stock em água, seguindo o protocolo descrito na secção de material e métodos (ponto 3.3.1.1.).

A curva de calibração (relação entre a absorvância do analito vs concentração do analito) foi estabelecida no intervalo de concentrações entre 0,007 mM e 0,064 mM para a cisteína. Foram preparados 9 padrões distribuídos entre este intervalo, sendo que as concentrações de cisteína estudadas foram de 0,007, 0,014, 0,021, 0,028, 0,035, 0,043, 0,050, 0,057 e 0,064 mM.

A curva de calibração foi obtida por recurso à regressão linear (Figuras 8), estando os resultados relativos à cisteína sumariados nas Tabela 3, respetivamente.

Tabela 3. Dados obtidos para a absorvância a um comprimento de onda fixo de 412 nm, para o método de detecção da cisteína por espectrofotometria UV-Vis

Concentração (mM)	Absorvância (412 nm)						
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Média	σ
0,007	0,096	0,095	0,089	0,093	0,094	0,093	$\pm 0,002$
0,014	0,209	0,209	0,196	0,208	0,199	0,204	$\pm 0,006$
0,021	0,312	0,304	0,296	0,307	0,294	0,303	$\pm 0,007$
0,028	0,409	0,408	0,391	0,413	0,389	0,402	$\pm 0,010$
0,035	0,510	0,518	0,488	0,514	0,483	0,503	$\pm 0,014$
0,043	0,613	0,616	0,588	0,616	0,580	0,603	$\pm 0,015$
0,050	0,714	0,702	0,684	0,720	0,676	0,699	$\pm 0,017$
0,057	0,811	0,802	0,780	0,821	0,771	0,797	$\pm 0,019$
0,064	0,914	0,916	0,877	0,921	0,860	0,898	$\pm 0,024$

Na Figura 8 apresenta-se a curva de calibração obtida da relação linear entre as absorvâncias da cisteína e as respectivas concentrações usadas nas soluções padrão, assim como o valor do coeficiente de correlação, declive da reta, ordenada na origem e os desvios-padrão em cada ponto (representados a vermelho).

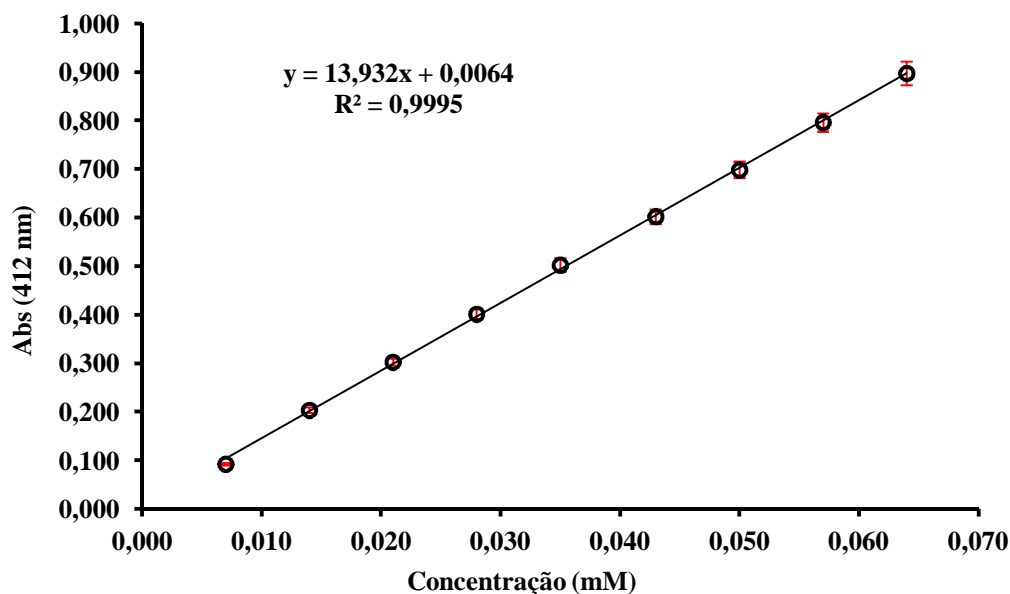


Figura 8. Curva de calibração da L-cisteína a 20 °C e os respectivos desvios padrão em cada ponto (vermelho) pelo método da espectrofotometria.

Pela análise do coeficiente de correlação quadrático da curva de calibração verifica-se que existe uma boa correlação entre a absorvância e a concentração de cisteína dos padrões ($R^2=0.9995$). Utilizando a metodologia proposta por Miller et al. [69] determinaram-se os parâmetros estatísticos de ordenada na origem e declive assim como o respectivo intervalo de confiança a 95%. A equação que define a curva de calibração é $y = 13,932x + 0,0064$. Os cálculos necessários para a determinação do intervalo de confiança para a curva de calibração encontram-se apresentados no anexo B.

Limites de deteção e quantificação

Como já referido, teoricamente, o Limite de Deteção (LOD) e o Limite de Quantificação (LOQ) podem ser calculados de maneiras distintas, sendo uma delas baseada na utilização dos parâmetros da curva de calibração. Para o atual trabalho, as determinações do LOD e LOQ foram efetuadas através do estudo da curva de calibração, obtida para a cisteína, e representada respetivamente na Figuras 8. Utilizando a metodologia proposta por Miller et al. [69] determinou-se os valores do LOD e LOQ, de acordo com

o anexo B. Os valores obtidos experimentalmente para o limite de detecção e limite de quantificação são de 0,002mM e 0,005mM, respetivamente.

Efeito da variação da Temperatura

Para gerar resultados confiáveis e reprodutíveis, as amostras, os padrões e reagentes utilizados deverão ser estáveis por um período razoável de tempo. A estabilidade das amostras e dos padrões é muito importante em termos de tempo e de temperatura. A estabilidade de dias ou meses é o mais desejável, no entanto, em alguns casos, as soluções precisam de ser preparadas cada vez que se procede a uma análise. No que diz respeito à temperatura, se uma solução não for estável a T ambiente, o aumento da temperatura poderá conduzir a uma diminuição da estabilidade das amostras e dos padrões.

Com o objetivo de verificar a influência da temperatura de incubação na medição da absorvância nos padrões, foram efetuados dois ensaios, um mantendo os padrões 15 min à T ambiente (T=20°C) e medindo depois a sua absorvância a 412 nm, e outro colocando os padrões num banho de água a T=37 °C, sem agitação durante 15 minutos, e medindo a sua absorvância a 412 nm. Os resultados estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Valores registados para as absorvâncias a duas temperaturas (20°C e 37°C) dos padrões a um comprimento de onda fixo de 412 nm

Padrão	Concentração cisteína (mM)	Abs 20°C	Abs 37 °C	ΔAbs (Abs (20°C) - Abs (37 °C))
1	0,007	0,095	0,086	0,009
2	0,014	0,209	0,191	0,018
3	0,021	0,304	0,288	0,016
4	0,028	0,408	0,386	0,022
5	0,035	0,518	0,487	0,031
6	0,043	0,616	0,582	0,034
7	0,050	0,702	0,693	0,009
8	0,057	0,802	0,779	0,023
9	0,064	0,916	0,868	0,048

Para poder comparar se existem diferenças significativas entre as duas temperaturas (20°C e 37°C) apresenta-se na Figura 9 as duas curvas de calibração obtidas da relação entre as absorvâncias da cisteína e as respectivas concentrações usadas nas soluções padrão à temperatura de 20°C e de 37°C, assim como os valores do coeficiente de correlação, declive da reta e ordenada na origem, respetivamente.

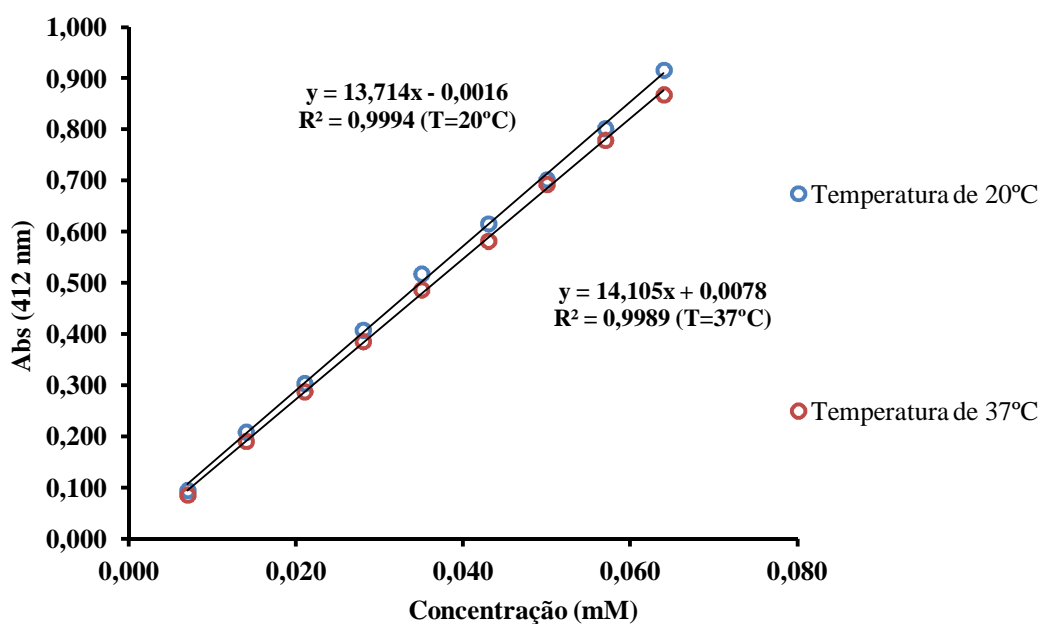


Figura 9. Gráfico referente ao efeito da variação de temperatura por espectrofotometria.

Pela análise dos coeficientes de correlação quadrático das duas retas de calibração, à temperatura de 20°C e 37°C verifica-se que existe uma boa relação entre as absorvâncias e as concentrações de cisteína dos padrões ($R^2 = 0.9994$ e $R^2 = 0.9989$).

Por outro lado, de acordo com as duas retas apresentadas anteriormente na Figura 9 é possível verificar que existe uma ligeira variação dos valores das absorvâncias (Δ Abs) à temperatura de 20°C e à temperatura de 37°C, para a mesma faixa de concentração de cisteína analisada. Os valores das absorvâncias à temperatura de 37°C são inferiores comparativamente com os valores à temperatura de 20°C, contudo, a variação registada

não é muito significativa, pelo que por razões de simplicidade e poupança de recursos, optou-se por efetuar as restantes análises à temperatura de 20°C.

4.1.2. Estudo do efeito da variação da concentração de NaOH na recuperação

Tendo em conta o estudo apresentado pelos autores Bald e seus colaboradores [65] foi possível verificar que o agente redutor NaBH_4 apresentava dificuldades de controlo de pH na preparação das amostras. Para além disso, a reação de decomposição do NaBH_4 durante a preparação das amostras de cabelo foi concomitante com a produção de espuma, podendo dessa forma interferir com os resultados obtidos e originar conseqüentes variações dos mesmos.

Dado que o pH a que é feita a redução com NaBH_4 é considerado um fator importante, testou-se a preparação do NaBH_4 em diferentes concentrações de NaOH: 0,2M, 0,1M, 0,05M e 0,04M. Os rendimentos obtidos constam na Tabela 5 que se segue.

Tabela 5. Resultados experimentais obtidos no estudo da influência da concentração de NaOH no rendimento da reação

Padrões	0,2 M de NaOH			0,1 M de NaOH			0,05 M de NaOH			0,04 M de NaOH		
	Conc. teórica	Conc. exp (mM)	η (%)	Conc. teórica	Conc. exp (mM)	η (%)	Conc. teórica	Conc. exp. (mM)	η (%)	Conc. teórica	Conc. exp (mM)	η (%)
Cisteína	0,028	0,020	71	0,028	0,020	71	0,028	0,020	71	0,028	0,019	68
Cisteína	0,042	0,031	74	0,042	0,031	74	0,042	0,032	76	0,042	0,032	76
Cisteína	0,056	0,042	75	0,056	0,042	75	0,056	0,043	77	0,056	0,046	82
Cistina	0,029	0,020	69	0,029	0,021	72	0,029	0,023	79	0,029	0,021	72
Cistina	0,044	0,032	73	0,044	0,034	78	0,044	0,034	77	0,044	0,034	77
Cistina	0,058	0,040	69	0,058	0,047	81	0,058	0,049	84	0,058	0,048	83
Mistura	0,029	0,020	69	0,029	0,021	72	0,029	0,021	72	0,029	0,019	66
Mistura	0,043	0,029	67	0,043	0,033	77	0,043	0,034	79	0,043	0,031	72
Mistura	0,057	0,039	68	0,057	0,044	77	0,057	0,046	81	0,057	0,041	72

Analisando a Tabela 5 apresentada anteriormente, e partindo do princípio que todo o conteúdo de cistina é reduzido a cisteína, ou seja, que a taxa de redução é de 100%, verifica-se que, de uma maneira geral, após uma diminuição da concentração de NaOH na qual o NaBH₄ é preparado, o rendimento da reação aumentou de forma muito ligeira. Inicialmente, para uma concentração de NaOH mais elevada, nomeadamente 0.2M, o rendimento da reação (η) registou o valor médio de 70% ± 2 , enquanto que para uma concentração de NaOH de 0.1M, o rendimento médio situou-se nos 75%. ± 3 Com o objetivo de verificar se o rendimento da reação poderia aumentar com a redução da concentração de NaOH, voltou-se a preparar uma nova solução de NaOH, de concentração 0.05M, e o valor do rendimento aumentou ligeiramente para o valor médio de 77% ± 4 . No entanto, voltando a reduzir a concentração da solução de NaOH para 0.04 M, verificou-se que o valor médio do rendimento desceu ligeiramente para o valor de 74% ± 5 , tendo aumentado os desvios nos valores obtidos para o rendimento.

Apesar de os valores da concentração de NaOH na qual o NaBH₄ é preparado apresentarem variações pouco significativas, todos os procedimentos efetuados posteriormente foram realizados a uma concentração de NaOH de 0,05M, permitindo assim um menor consumo do reagente NaOH sem comprometer a qualidade dos resultados, havendo por isso uma maior poupança de recursos, o que só por si já é positivo.

4.1.3. Análise de cisteína nas amostras de cabelo

4.1.3.1. Determinação do efeito de matriz nas análises por espectrofotometria

Tendo em conta que o cabelo é uma matriz complexa constituído essencialmente à base de queratina, uma proteína que apresenta na sua constituição inúmeros grupos funcionais, foi efetuado o estudo do método de adição padrão à matriz de cabelo, de acordo com o protocolo experimental descrito no ponto 3.3.1.2., apresentado na secção de materiais e métodos do capítulo 3, com o intuito de verificar qual a possível interferência desta matriz na determinação dos resíduos de cisteína.

O método de adição padrão é uma forma importante de superar o efeito da matriz. É normalmente utilizado para determinar a concentração de um analito, que se encontra presente numa matriz complexa. Alíquotas de padrão a níveis de concentrações diferentes foram adicionadas a porções da amostra, permitindo que qualquer interferente presente na amostra afete de forma similar o padrão. A ideia é sobretudo adicionar padrão à matriz e monitorizar a alteração de resposta do instrumento.

Na Figura 10 está representado o método de adição de padrão de cisteína a uma amostra de cabelo.

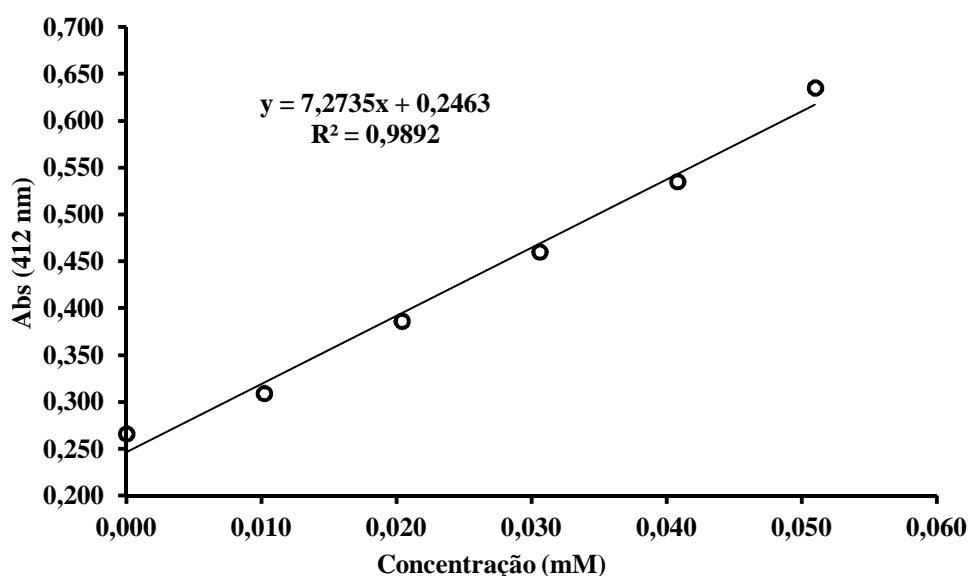


Figura 10. Curva de calibração obtida pelo método de adição de padrão por espectrofotometria.

O método de adição padrão é um procedimento indireto de determinação da concentração do analito, que nunca será tão exato e preciso quanto uma determinação direta da concentração, a partir de uma curva de calibração. É sempre preferível eliminar as interferências através da escolha de condições analíticas apropriadas ou, se possível, através do tratamento químico da amostra em vez de usar o método adição padrão. Este método deve ser sempre encarado como último recurso em vez de um método de eleição.

Analisando o gráfico apresentado anteriormente verifica-se que existe uma boa correlação entre as absorvâncias e a concentração de cisteína na matriz de cabelo

($R^2=0.9892$). A equação que define o gráfico é $y = 7,2735x + 0,2463$, concluindo que o cabelo como matriz de referência não interfere na detecção de cisteína.

4.1.3.2. Estabilidade do método para detecção de cisteína nas amostras de cabelo

Para se poder obter resultados confiáveis e reprodutíveis, os métodos desenvolvidos para detecção dos resíduos de cisteína deverão ser estáveis e encontrar-se sob controlo estatístico. Um dos meios utilizados em laboratório para o Controlo da Qualidade Interno é a utilização de Cartas de Controlo (CC). O principal objetivo do emprego deste tipo de ferramenta estatística é o de visualizar a evolução e controlar continuamente os resultados obtidos nos métodos que são praticados e desenvolvidos. Contudo estes documentos devem ser considerados como uma orientação e não como um guia a seguir, estando a sua elaboração estritamente dependente das necessidades inerentes de cada laboratório.

As Cartas de Controlo permitem, sobretudo detetar possíveis situações anormais/erros que possam ocorrer durante a execução dos métodos de ensaio. Deste modo, quando um método de análise se encontra sobre controlo estatístico, é possível afirmar que as fontes de variação do método se devem apenas a fatores aleatórios. No entanto, pode acontecer que o método esteja a ser afetado por erros sistemáticos, cuja avaliação é feita através de estudos pontuais de exatidão do método, após estabilização/controlo estatístico do mesmo.

As Cartas de Controlo são de extrema utilidade se forem elaboradas com um objetivo concreto. Como objetivos é de citar, entre outros, os seguintes:

- Controlo de Equipamentos automáticos;
- Validação de Calibrações;
- Controlo da Precisão e Exatidão da técnica;
- Controlo das Operações inerentes à realização do método de ensaio.

As Cartas de Controlo são constituídas, essencialmente por um conjunto de linhas que irão permitir ao operador saber se tem ou não o processo sob controlo. Dessa forma, nestas cartas constam;

- **Linha Central:** é uma linha que poderá corresponder à média das leituras efetuadas ou à média dos desvios verificados.
- **Limite Superior de Controle (LSC):** é uma linha que poderá corresponder ao valor da linha central acrescida de 3σ , onde σ representa o desvio padrão da grandeza a ser controlada. Este acréscimo depende fundamentalmente do rigor com que se pretende trabalhar.
- **Limite Inferior de Controle (LIC):** é uma linha que poderá corresponder ao valor da linha central subtraída de uma grandeza definida por 3σ . O valor desta grandeza depende fundamentalmente do rigor com que se pretende trabalhar.
- **Limite Superior de Alerta (LSA):** muitas vezes é necessário definir uma linha que alerte o operador que poderá estar a entrar numa zona de perigo. É usual definir esta linha a partir da linha central acrescida de 2σ se o limite superior de controlo tiver sido definido por 3σ (situação mais comum).
- **Limite Inferior de Alerta (LIA):** É usual também definir esta linha a partir da linha central subtraída de 2σ se o limite inferior de controlo tiver sido definido por 3σ (situação mais comum), onde σ representa o desvio padrão das leituras.

Com o objetivo de verificar se o método desenvolvido por espectrofotometria (UV-Vis) é estável para a determinação e quantificação dos resíduos de cisteína, foi realizada uma carta de controlo com 15 padrões do cabelo controlo. A Tabela 6, que se segue representa os cálculos efetuados para os valores do LSC, LIC, LSA e LIA através dos valores das absorvâncias a um comprimento de onda fixo de 412 nm, registados para as várias amostras dos padrões do cabelo controlo.

Tabela 6. Valores dos parâmetros da carta de controlo através da Abs a 412 nm para o cabelo do padrão de controlo

Nº de determinações	Abs (412 nm)	Media	σ	LSC	LIC	LSA	LIA
1	0,514						
2	0,569						
3	0,529						
4	0,420						
5	0,483						
6	0,553						
7	0,594						
8	0,610	0,585	0,092	0,860	0,310	0,768	0,402
9	0,567						
10	0,690						
11	0,708						
12	0,492						
13	0,617						
14	0,690						
15	0,735						

Na Figura 11 está representada a carta de controlo para o cabelo controlo tendo em conta os resultados apresentados na Tabela 6 referente ao método espectrofotómetro desenvolvido, com vista ao controlo contínuo dos resultados obtidos.

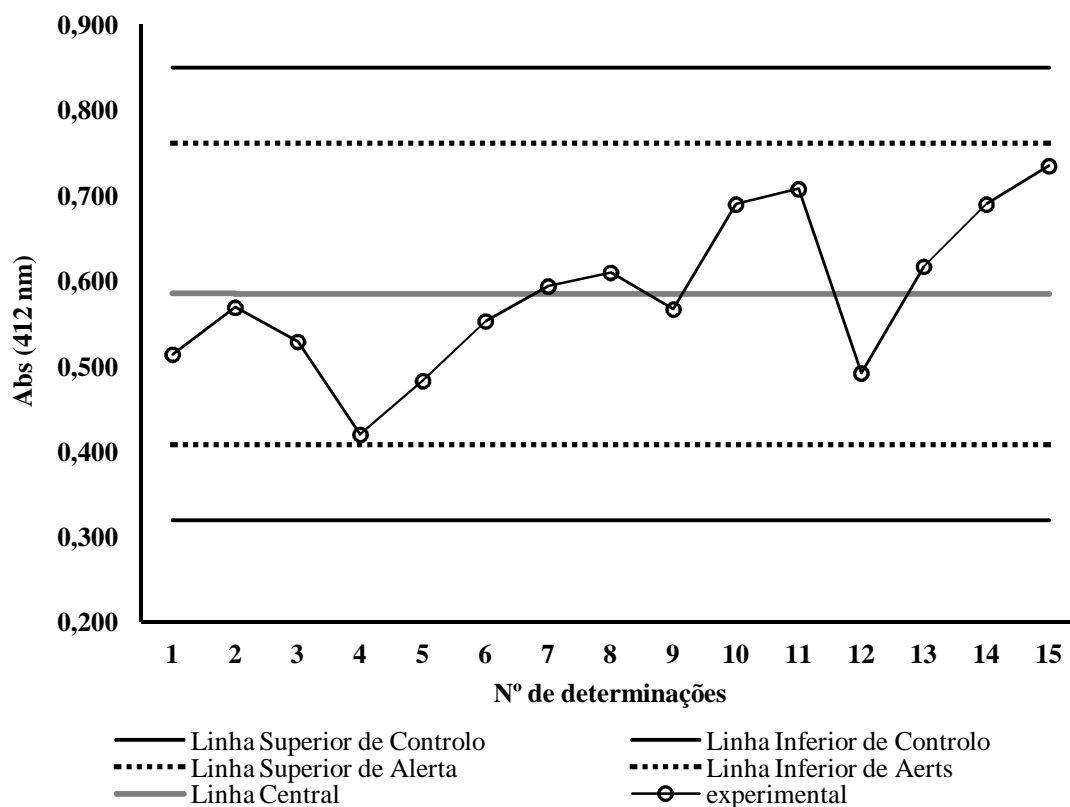


Figura 11. Carta de controle para o cabelo padrão de controle pelo método espectrofotométrico.

Analisando a Carta de Controle realizada para o método espectrofotométrico e apresentada anteriormente pela Figura 11, é possível constatar que para as 15 amostras de cabelo de controle analisadas, verifica-se que o processo encontra-se sob controle estatístico. Todas amostras de cabelo analisadas foram aceites por este método, uma vez que todos os valores apresentados para cada uma das amostras estão dentro dos limites superiores (LSC) e inferiores de controlo (LIC) definidos previamente, levando a concluir que o método desenvolvido é estável para a deteção de cisteína nas amostras de cabelo do padrão de controlo. Para além disso, não se verificam quaisquer tipos de valores para além das linhas superiores e inferiores de alerta. Salienta-se no entanto que as cartas de controlo apenas devem ser colocadas em rotina após aquisição de pelo menos 25 pontos experimentais, pelo que esta carta deverá ser considerada somente como indicativa.

4.2. Análise de cistina e cisteína por HPLC

4.2.1. Parâmetros de validação do método

Gama de linearidade

À semelhança do que foi realizado pelo método da espectrofotometria, também para o método da cromatografia líquida se procedeu à validação do método. Foram realizadas duas curvas de calibração, uma para a cisteína e outra para a cistina, apresentando-se os resultados para a ordenada na origem, declive da reta e coeficiente de correlação quadrático. Os padrões de cisteína e cistina foram preparados por dissolução de um volume apropriado da solução stock em água, seguindo o protocolo descrito na secção de material e métodos do capítulo 3 apresentado ponto 3.3.2.1.

As curvas de calibração (relação entre as áreas do analito vs concentração do analito) foram estabelecidas no intervalo de concentrações entre 0,110mM e 0,827mM para a cisteína e entre 0,055 e 0,416mM para a cistina. Foram então preparados 7 padrões, tanto para a cisteína como para a cistina distribuídos entre estes intervalos, sendo que as concentrações de cisteína estudadas foram de 0,110, 0,221, 0,331, 0,441, 0,552, 0,662 e 0,827 mM e para a cistina foram 0,055, 0,111, 0,166, 0,222, 0,277, 0,333 e 0,416 mM.

As curvas de calibração foram obtidas por recurso à regressão linear (Figuras 12 e 13), estando os resultados relativos à cisteína e cistina sumariados nas Tabelas 7 e 8, respetivamente.

Tabela 7. Dados experimentais obtidos para a determinação da curva de calibração da cisteína

Concentração (mM)	Áreas
0,110	2026603
0,221	3230793
0,331	4777252
0,441	6399708
0,552	8199386
0,662	9643877
0,827	12200417

Na Figura 12 apresenta-se a curva de calibração obtida da relação linear entre as áreas dos picos da cisteína e as respectivas concentrações usadas nas soluções padrão, assim como o valor do coeficiente de correlação, declive da reta e ordenada na origem.

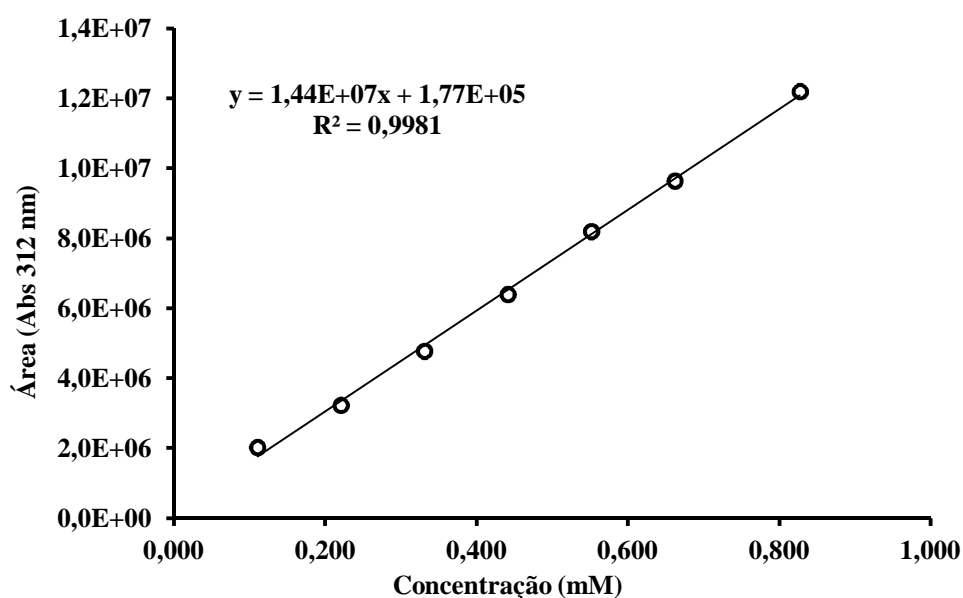


Figura 12. Curva de calibração obtida para a análise de cisteína por HPLC.

Pela análise do coeficiente de correlação quadrático da curva de calibração verifica-se que existe uma boa correlação entre as áreas dos picos e a concentração de cisteína dos padrões ($R^2=0.9981$). A equação que define a curva de calibração é $y = 14388888x + 176664$.

Tabela 8. Dados experimentais obtidos para a determinação da curva de calibração da cistina

Concentração (mM)	Áreas
0,055	1632734
0,111	3158349
0,166	4651039
0,222	6126348
0,277	7488699
0,333	8791269
0,416	10604239

Na Figura 13 apresenta-se a curva de calibração obtida da relação linear entre as áreas dos picos obtidos para o caso da utilização de padrões de cistina e as respectivas concentrações, assim como o valor do coeficiente de correlação, declive da reta e ordenada na origem.

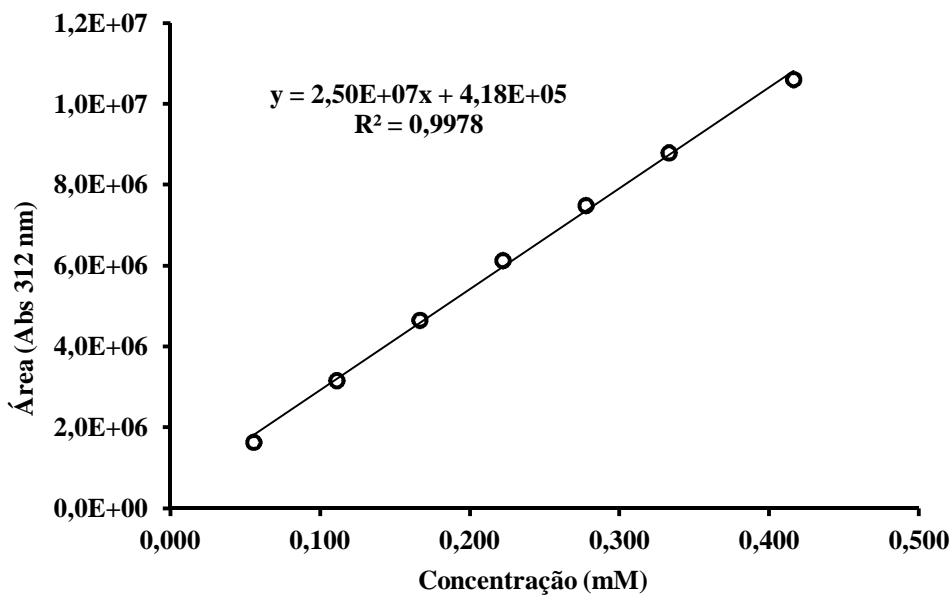


Figura 13. Gráfico de calibração obtido para a cistina pelo método do HPLC.

À semelhança do que se verificou com a cisteína, também a correlação apresentada entre a concentração de cistina e a resposta do detetor foi elevada, obtendo-se um coeficiente de correlação quadrático de ($R^2=0.9978$). A equação que traduz a curva de calibração é $y = 24993504x + 418433$.

Limites de deteção e quantificação

À semelhança do que foi realizado pelo método da espectrofotometria UV-Vis, os Limites de Deteção (LOD) e os Limites de Quantificação (LOQ) da cisteína e da cistina pelo método de cromatografia líquida foram calculados com base nos parâmetros das curvas de calibração apresentadas nas Figura 12 e 13. Os valores obtidos experimentalmente para os limites de deteção e limites de quantificação da cisteína e cistina são de 0,040mM e 0,120mM para a cisteína e de 0,021mM e 0,064mM para a cistina, respetivamente.

Exatidão

A exatidão deste método (HPLC) foi avaliada através da determinação da percentagem de recuperação de cistina adicionada a cisteína em água.

Os padrões foram preparados de acordo com a metodologia apresentada no ponto 3.3.2.1. Os resultados experimentais obtidos para a recuperação ($\eta\%$) apresentam-se na Tabela 9 (recuperações em água) e através do método de adição de padrão para o cabelo, Figura 14.

Tabela 9. Resultados experimentais obtidos dos ensaios de recuperação de cistina a cisteína em água

Concentração Cisteína teórica (mM)	Concentração Cisteína Experimental (mM)	η (%)
0,110	0,101	92
0,221	0,207	94
0,331	0,311	94
0,441	0,413	94
0,552	0,508	92
0,662	0,599	90
0,827	0,725	88

Os resultados experimentais obtidos para a recuperação da cisteína em água e apresentados na Tabela 9 permitem-nos verificar que se consegue obter uma conversão (redução) completa de cistina a cisteína, uma vez que se obtêm valores experimentais de recuperação compreendidos entre 88 e 94% (valor médio de 92%). Pode-se verificar que aumentando o valor de concentração de cistina o valor das recuperações obtidas (eficiência de redução) diminui. Apesar destes valores irem diminuindo ligeiramente podemos referir que para o caso da água, a exatidão do método pode ser considerada elevada dentro dos intervalos de concentração estudados.

À semelhança do que foi realizado no método espectrofotométrico, também no método da cromatografia líquida em fase reversa foi efetuado o estudo do método de adição de padrão de cistina a uma amostra de cabelo, com o intuito de verificar qual a possível interferência desta matriz na determinação dos resíduos de cisteína.

Na Figura 14 está representado o método de adição de padrão de cistina a uma amostra de cabelo.

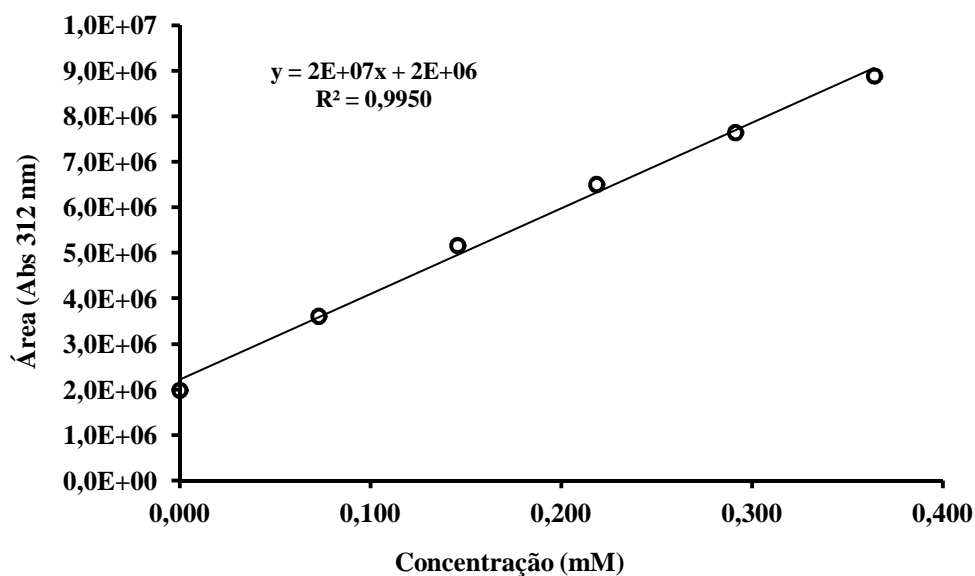


Figura 14. Curva de calibração obtida pelo método de adição de padrão por HPLC.

Analisando o gráfico apresentado anteriormente verifica-se que existe uma boa correlação entre as áreas dos picos e a concentração de cisteína na matriz ($r^2=0.9950$). A equação que define o gráfico é $y = 18812920x + 2214303$, levando a concluir que o cabelo como matriz de referência não interfere na detecção de cisteína.

4.3. Comparação dos métodos da espectrofotometria UV-Vis e HPLC na deteção de cisteína no cabelo

Após a determinação dos principais parâmetros de validação dos métodos de espectrofotometria (UV-Vis) e cromatografia líquida (HPLC), procedeu-se à análise dos conteúdos de cisteína para as 26 amostras de cabelo, cedidas previamente pelo CeNTI e, sujeitas ao tratamento de hidrólise ácida, como foi descrito no ponto 3.2.1.2 da secção materiais e métodos do capítulo 3.

As concentrações de cisteína obtidas experimentalmente por espectrofotometria (UV-Vis) e cromatografia líquida utilizando as curvas de calibração apresentadas na secção anterior foram normalizadas para massa de cisteína (mg) por massa de cabelo (mg de cabelo).

Na Tabela 10 apresentam-se os valores obtidos para a concentração de cisteína nas 26 amostras de cabelo pelo método espectrofotométrico (UV-Vis) e pelo método da cromatografia líquida (HPLC).

Tabela 10. Valores referentes à concentração de cisteína nas 26 amostras de cabelo

Amostras de cabelo	Massa de cabelo (mg)	Concentração cisteína por UV-Vis ($\mu\text{mol/mg}$)	Concentração cisteína por HPLC ($\mu\text{mol/mg}$)
Controlo	77,5	797	111
1	81,3	912	108
2	82,4	610	76
3	74,3	724	85
4	75,3	564	80
5	78,0	679	95
6	78,8	539	72
7	79,3	668	92
8	80,4	769	107
9	76,9	735	83
10	75,1	548	81
11	82,1	696	89
12	77,5	688	82
13	75,2	463	99
14	81,0	492	64
15	76,0	558	71
16	76,6	543	71
17	78,7	642	76
18	78,8	386	51
19	79,4	510	67
20	76,1	580	75
21	78,3	539	69
22	80,8	670	76
23	76,7	804	69
24	79,3	676	77
25	82,9	666	78

Todas as 26 amostras de cabelo analisadas anteriormente foram sujeitas ao tratamento de hidrólise ácida, para ser possível determinar o teor em cisteína das mesmas. Adicionalmente, as amostras de cabelo, exceto as amostras de cabelo do padrão de controlo, tinham sido sujeitas previamente a diversos tratamentos oxidativos, que não fazem parte do âmbito deste estudo.

Analisando a Tabela 10 apresentada anteriormente verifica-se que ambos os métodos, a espectrofotometria (UV-Vis) e a cromatografia líquida em fase reversa com deteção UV conseguiram detetar os vários resíduos de cisteína nas diferentes amostras de cabelo analisadas, a comprimentos de onda fixo de 412 nm e 312 nm, respetivamente. As amostras de cabelo controlo foram aquelas que apresentaram um conteúdo superior de cisteína em ambos os métodos, comparativamente com as restantes amostras, uma vez que este tipo de cabelo não sofreu qualquer tipo de tratamento oxidativo prévio.

Efetuando a comparação dos dois métodos relativos ao conteúdo de cisteína apresentado para cada amostra, foi possível verificar que o método da espectrofotometria UV-Vis foi aquele que permitiu detetar para todas as amostras de cabelo, um maior número de resíduos de cisteína, face ao método da cromatografia líquida com deteção UV, uma vez que o método por HPLC não se encontra totalmente desenvolvido.

Desta forma, podemos afirmar que o método da espectrofotometria desenvolvido é o mais adequado quando se pretende analisar conteúdos de cisteína em amostras complexas, como é o caso do cabelo, dada a elevada presença de grupos funcionais, mas também, por este ter revelado ser um método expedito, simples, rápido e eficaz na determinação dos teores de cisteína. Apesar do método da cromatografia líquida em fase reversa ter também detetado resíduos de cisteína, e ter-se revelado num método acessível e de derivatização simples, o fato de ele não ser muito seletivo, embora já se consigam boas separações atualmente, não foi o suficiente para detetar um maior número de resíduos de cisteína, face ao método da espectrofotometria.

A espectrofotometria (UV-Vis) vê muitas das suas aplicações, sobretudo em análises de rotina, dada a sua elevada rapidez e simplicidade de execução, já as técnicas cromatográficas como a cromatografia líquida em fase reversa com deteção UV requerem sobretudo uma instrumentação específica e por vezes complexa, com custos relativamente elevados, limitando por isso o âmbito das suas aplicações práticas.

A redução das ligações dissulfureto (-S-S- a -SH) com um agente redutor apropriado constituiu também o passo essencial para a medição do conteúdo total de tióis, uma vez que a maior parte dos aminoácidos que contêm o grupo tiol na sua constituição encontram-se ligados covalentemente a proteínas, e a outros aminoácidos existentes no cabelo, por intermédio de ligações dissulfureto. Embora o NaBH_4 apresentasse dificuldades iniciais de controlo de pH, isso não foi suficiente para que se registasse variações significativas nos resultados obtidos. À semelhança do que se verificou para o NaBH_4 , a utilização do 2-mercaptoetanol também revelou ser uma escolha muito importante, pois este mostrou ser compatível com o reagente de derivatização, o CMPI, impedindo a formação de subprodutos passíveis de interferir com os resultados obtidos.

Assim sendo, e tendo em conta os parâmetros analisados verifica-se que o método da espectrofotometria UV-Vis foi aquele que apresentou melhores resultados comparativamente com o método da cromatografia líquida com deteção UV, para a deteção e quantificação do aminoácido cisteína nas 26 amostras de cabelo.

Capítulo 5

Conclusões e Propostas futuras

O desejo de obtenção de um cabelo bonito e saudável conduziu à criação de uma grande indústria para o desenvolvimento de produtos de cabelo, com vista ao melhoramento da sua aparência [36]. Os tratamentos químicos convencionais apresentam efeitos prejudiciais sobre as propriedades mecânicas e térmicas do cabelo, requerendo o uso de formulações de tratamento, com vista à recuperação dessas propriedades perdidas.

O objetivo do presente trabalho teve por base o desenvolvimento de um método que permitisse a deteção e a quantificação dos aminoácidos cisteína e cistina por meio de técnicas espectrofotométricas. Foram então utilizados reagentes com cromóforos, como o DTNB, que interagiram com os resíduos de cisteína e cistina, em específico, permitindo desta forma verificar a sua adequabilidade para quantificar o teor destes compostos em 26 amostras de cabelo cedidas previamente pelo CeNTI e que foram previamente sujeitas a tratamentos oxidativos, através da comparação com outras técnicas desenvolvidas, como foi o caso da cromatografia líquida em fase reversa com deteção UV.

Através dos resultados apresentados no capítulo anterior para o método da espectrofotometria, após a sua validação, foi possível verificar que este método, face ao método da cromatografia líquida em fase reversa, detetou um maior número de resíduos de cisteína em todas as amostras de cabelo sujeitas a análise. A redução das ligações dissulfureto (-S-S- a -SH) com um agente redutor apropriado constituiu o passo essencial para a medição do conteúdo total de tióis, uma vez que a maior parte destes aminoácidos que contêm o grupo tiol na sua constituição encontram-se ligados covalentemente a proteínas, e a outros aminoácidos existentes no cabelo, por intermédio de ligações dissulfureto. Apesar do NaBH_4 ter apresentado dificuldades iniciais no controlo de pH, este inconve-

niente não foi suficiente para provocar variações significativas nos resultados obtidos. A utilização do 2-mercaptoetanol nos procedimentos cromatográficos também revelou ser uma escolha correta, pois este mostrou ser compatível com o reagente de derivatização, o CMPI, impedindo dessa forma que ocorresse a formação de subprodutos passíveis de influenciar de forma significativa os resultados experimentais obtidos.

Em suma, após a avaliação dos parâmetros analisados para os dois métodos desenvolvidos ao longo do presente trabalho, aquele que melhor se adequa à detecção de cisteína em amostras complexas, como é o caso do cabelo devido à elevada presença de grupos funcionais, é o método da espectrofotometria (UV-Vis), também por ser um método rápido, simples, eficaz e de fácil execução, ao passo que o método da cromatografia líquida, embora este seja um método acessível e de derivatização simples, requer uma instrumentação específica e por vezes complexa, com custos relativamente elevados, limitando por isso o âmbito das suas aplicações práticas.

Por último, como trabalhos futuros, sugere-se o desenvolvimento e a validação de métodos que visam a determinação e a quantificação de cisteína, cistina e outros grupos de tióis em amostras como o plasma e a urina, uma vez que na literatura são reportados vários trabalhos de interesse referentes à utilização de matrizes complexas como são os casos das matrizes referidas.

Referências bibliográficas

- [1] A. Lopes, “Estudo das bases moleculares da cistinúria na População Portuguesa” , Universidade de Aveiro , 2009.
- [2] A. Khan , F. Faiz, “Amino acid analysis using ion exchange resins” , *Journal of Natural Sciences and Mathematics* , vol. 48, no. 1 , 2008 , pp. 1–17.
- [3] S. Hou , H. He , W. Zhang , H. Xie , X. Zhang, “Determination of soil amino acids by high performance liquid chromatography-electro spray ionization-mass spectrometry derivatized with 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate.” , *Talanta* , vol. 80, no. 2 , 2009 , pp. 440–7.
- [4] S. P. Bathena , J. Huang , A. A. Epstein , M. D. B. Howard E. Gendelman , Y. Alnouti, “Rapid and reliable quantitation of amino acids and myo-inositol in mouse brain by high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry” , *Journal of chromatography B* , vol. 893–894 , 2012 , pp. 15–20.
- [5] M. Silva, “Glicopéptidos fluorescentes: síntese e caracterização” , Universidade do Minho , 2009.
- [6] L. Campanella , G. Crescentini , P. Avino, “Simultaneous determination of cysteine, cystine and 18 other amino acids in various matrices by high-performance liquid chromatography.” , *Journal of chromatography. A* , vol. 833, no. 2 , 1999 , pp. 137–45.
- [7] M. P. Frank , R. W. Powers, “Simple and rapid quantitative high-performance liquid chromatographic analysis of plasma amino acids.” , *Journal of chromatography B* , vol. 852, no. 1–2 , 2007 , pp. 646–9.

- [8] P. Figueiredo, “Proteínas” , em *Introdução à química alimentar*, 2009 , pp. 26–40.
- [9] D. Fekkes, “State-of-the-art of high-performance liquid chromatographic analysis of amino acids in physiological samples.” , *Journal of chromatography. B, Biomedical applications* , vol. 682, no. 1 , 1996 , pp. 3–22.
- [10] G. Alcantara, “Desenvolvimento e validação de metodologias para análise simultânea de aminoácidos como possíveis marcadores neurobiológicos da esquizofrenia utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção” , Universidade de São Paulo , 2012.
- [11] E. Bald , G. Chwatko , R. Głowacki , K. Kuśmierk, “Analysis of plasma thiols by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection” , *Journal of Chromatography A* , vol. 1032, no. 1–2 , 2004 , pp. 109–115.
- [12] J. T. Brosnan , M. E. Brosnan, “The sulfur-containing amino acids: an overview” , *The Journal of nutrition* , 2006 , pp. 1636–1640.
- [13] S. Bakirdere , E. Bramanti , A. D’ulivo , O. Y. Ataman , Z. Mester, “Speciation and determination of thiols in biological samples using high performance liquid chromatography – inductively coupled plasma-mass spectrometry and high performance liquid chromatography – Orbitrap MS” , *Analytica chimica acta* , vol. 680, no. 1–2 , 2010 , pp. 41–7.
- [14] E. Bald , R. Glowacki , J. Drzewoski, “Determination by liquid chromatography of free and total cysteine in human urine in the form of its S-quinolinium derivative.” , *Journal of chromatography. A* , vol. 913, no. 1–2 , 2001 , pp. 319–29.
- [15] R. Hell , M. Wirtz, “Molecular Biology, Biochemistry and Cellular Physiology of Cysteine Metabolism in *Arabidopsis thaliana*.” , *American Society of Plant Biologists* , vol. 9, no. 9 , 2011 , pp. 1–19.

- [16] Y. Wang , J. Wang , F. Yang , X. Yang, “Spectrophotometric determination of cysteine with gold nanoparticles stabilized with single-stranded oligonucleotides” , *Analytical Sciences* , vol. 26, no. May , 2010 , pp. 545–549.
- [17] A. Waseem , M. Yaqoob , A. Nabil, “Flow-injection Determination of Cysteine, N-Acetyl Cysteine and Glutathione in Pharmaceuticals via Potassium Ferricyanide-Fe (III) Spectrophotometric System” , *Chemical Research in Chinese Universities* , vol. 26, no. 6 , 2010 , pp. 893–898.
- [18] M. Brigham , W. Stein , S. Moore, “The concentrations of cysteine and cystine in human blood plasma” , *Journal of Clinical Investigation* , 1960 , pp. 1633–1638.
- [19] S. Ou , K. C. Kwok , Y. Wang , H. Bao, “An improved method to determine SH and –S–S– group content in soymilk protein” , *Food Chemistry* , vol. 88, no. 2 , 2004 , pp. 317–320.
- [20] W. Dröge, “Oxidative stress and ageing: is ageing a cysteine deficiency syndrome” , *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* , vol. 360, no. 1464 , 2005 , pp. 2355–72.
- [21] M. T. Petersen , P. H. Jonson , S. B. Petersen, “Amino acid neighbours and detailed conformational analysis of cysteines in proteins.” , *Protein engineering* , vol. 12, no. 7 , 1999 , pp. 535–48.
- [22] D. L. Nelson , M. M. Cox, “Aminoácidos, Peptídeos e Proteínas” , em *Lehninger - Princípios de Bioquímica*, pp. 89–122.
- [23] I. Ohtsu , N. Wiriyathanawudhiwong , S. Morigasaki , T. Nakatani , H. Kadokura , H. Takagi, “The L-cysteine/L-cystine shuttle system provides reducing equivalents to the periplasm in Escherichia coli.” , *The Journal of biological chemistry* , vol. 285, no. 23 , 2010 , pp. 17479–87.

- [24] R. Hell , M. Wirtz, “Molecular biology, biochemistry and cellular physiology of cysteine metabolism in *Arabidopsis thaliana*” , *American Society of Plant ...* , 2011 , pp. 1–19.
- [25] P. Ševčíková , Z. Glatz, “Specific determination of cysteine in human urine by capillary micellar electrokinetic chromatography” , *Journal of Separation Science* , vol. 26, no. 8 , 2003 , pp. 734–738.
- [26] K. Amarnath , V. Amarnath , K. Amarnath , H. L. Valentine , W. M. Valentine, “A specific HPLC-UV method for the determination of cysteine and related aminothiols in biological samples.” , *Talanta* , vol. 60, no. 6 , 2003 , pp. 1229–38.
- [27] P. Piste, “Cysteine – master antioxidant” , *International journal of pharmaceutical, chemical and biological sciences* , vol. 3, no. 1 , 2013 , pp. 143–149.
- [28] L.-P. Liu , Z.-J. Yin , Z.-S. Yang, “A L-cysteine sensor based on Pt nanoparticles/poly(o-aminophenol) film on glassy carbon electrode.” , *Bioelectrochemistry (Amsterdam, Netherlands)* , vol. 79, no. 1 , 2010 , pp. 84–9.
- [29] N. Giles , A. Watts , G. Giles , F. Fry, “Metal and redox modulation of cysteine protein function” , *Chemistry & biology* , vol. 10 , 2003 , pp. 677–693.
- [30] J. M. Held , B. W. Gibson, “Regulatory control or oxidative damage? Proteomic approaches to interrogate the role of cysteine oxidation status in biological processes.” , *Molecular & cellular proteomics: MCP* , vol. 11, no. 4 , 2012 , p. R111.013037.
- [31] E. Shacter, “Quantification and significance of protein oxidation in biological samples.” , *Drug metabolism reviews* , vol. 32, no. 3–4 , 2000 , pp. 307–26.

- [32] G. Manda , M. T. Nechifor , T.-M. Neagu, “Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies” , *Current Chemical Biology* , vol. 3, no. 1 , 2009 , pp. 342–366.
- [33] C. M. Cremers , U. Jakob, “Oxidant Sensing by Reversible Disulfide Bond Formation.” , *The Journal of biological chemistry* , 2013 , pp. 1–12.
- [34] C. R. Robbins, “Chemical and Physical Behavior of Human Hair” , em *Chemical and Physical Behavior of Human Hair* , 5th ed., Berlin, Heidelberg Springer Berlin Heidelberg , 2012.
- [35] M. V. R. Velasco , T. C. de S. Dias , A. Z. de Freitas , N. D. V. Júnior , C. A. S. de O. Pinto , T. M. Kaneko , A. R. Baby, “Hair fiber characteristics and methods to evaluate hair physical and mechanical properties” , *Brazilian Journal of pharmaceutical sciences* , vol. 45 , 2009.
- [36] M. Fernandes , A. Cavaco-Paulo, “Protein disulphide isomerase-mediated grafting of cysteine-containing peptides onto over-bleached hair” , *Biocatalysis and Biotransformation* , vol. 30, no. 1 , 2012 , pp. 10–19.
- [37] T. Inoue , K. Takehara , N. Shimizu , Y. Kitajima , K. Shinohara , A. Ito, “Application of XANES profiles to X-ray spectromicroscopy for biomedical specimens: part II. Mapping oxidation state of cysteine in human hair.” , *Journal of X-ray science and technology* , vol. 19, no. 3 , 2011 , pp. 313–20.
- [38] I.-K. Tan , B. Gajra, “Plasma and urine amino acid profiles in a healthy adult population of Singapore.” , *Annals of the Academy of Medicine, Singapore* , vol. 35, no. 7 , 2006 , pp. 468–75.
- [39] A. Pastore , R. Massoud , C. Motti, “Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, cysteamine, and 2-mercaptopropionylglycine in plasma and urine” , *Automation and Analytical Techniques* , vol. 832 , 1998 , pp. 825–832.

- [40] I. Fermo , C. Arcelloni , R. Paroni, “High-performance liquid chromatographic method to quantify total cysteine excretion in urine.” , *Analytical biochemistry* , vol. 307, no. 1 , 2002 , pp. 181–3.
- [41] S. Cheng , J. Stone , D. de Berker, “Trichothiodystrophy and fragile hair: the distinction between diagnostic signs and diagnostic labels in childhood hair disease.” , *The British journal of dermatology* , vol. 161, no. 6 , 2009 , pp. 1379–83.
- [42] S. Faghri , D. Tamura , K. H. Kraemer , J. J. Digiovanna, “Trichothiodystrophy: a systematic review of 112 published cases characterises a wide spectrum of clinical manifestations.” , *Journal of medical genetics* , vol. 45, no. 10 , 2008 , pp. 609–21.
- [43] J. Sass , D. Skladal , B. Zelger, “Trichothiodystrophy: quantification of cysteine in human hair and nails by application of sodium azide-dependent oxidation to cysteic acid” , *Arch Dermatol Res* , no. June , 2004 , pp. 1–8.
- [44] G.-L. Wang , Y.-M. Dong , H.-X. Yang , Z.-J. Li, “Ultrasensitive cysteine sensing using citrate-capped CdS quantum dots.” , *Talanta* , vol. 83, no. 3 , 2011 , pp. 943–7.
- [45] J. F. Salazar , H. Schorr , W. Herrmann , B. Herbeth , G. Siest , P. Leroy, “Measurement of thiols in human plasma using liquid chromatography with precolumn derivatization and fluorescence detection.” , *Journal of chromatographic science* , vol. 37, no. 12 , 1999 , pp. 469–76.
- [46] M. Ashby , P. Nagy, “Revisiting a proposed kinetic model for the reaction of cysteine and hydrogen peroxide via cysteine sulfenic acid” , *International Journal of Chemical Kinetics* , 2006 , pp. 32–38.
- [47] D. Luo , S. W. Smith , B. D. Anderson, “Kinetics and mechanism of the reaction of cysteine and hydrogen peroxide in aqueous solution.” , *Journal of pharmaceutical sciences* , vol. 94, no. 2 , 2005 , pp. 304–16.

- [48] S. G. Rhee, “Cellular Regulation by Hydrogen Peroxide” , *Journal of the American Society of Nephrology* , vol. 14, no. 90003 , 2003 , p. 211S–215.
- [49] J. R. Kim , H. W. Yoon , K. S. Kwon , S. R. Lee , S. G. Rhee, “Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH.” , *Analytical biochemistry* , vol. 283, no. 2 , 2000 , pp. 214–21.
- [50] H. J. Forman , M. Maiorino , F. Ursini, “Signaling functions of reactive oxygen species.” , *Biochemistry* , vol. 49, no. 5 , 2010 , pp. 835–42.
- [51] D. A. Skoog , D. M. . West , F. J. Holler, *Fundamentals of Analytical Chemistry* , 7th ed. Saunders College Publishing , 1996.
- [52] T. Owen, “Principles and applications of UV-visible spectroscopy” , em *Fundamentals of UV-visible spectroscopy*, Agilent Technologies , 2000 , pp. 2–28.
- [53] F. Schmid, “Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry” , *Encyclopedia of life sciences* , 2001 , pp. 1–4.
- [54] J. Nogueira, “Mikhail S. Tswett: Um legado para a cromatografia moderna” , *spq.pt* , 1903 , pp. 51–56.
- [55] C. Eith; , M. Kolb; , A. Seubert; , K. H. Viehweger, “Theory of chromatography” , em *Practical Ion Chromatography*, Switzerland Metrohm Lt., K. H. Viehweger , 2002.
- [56] R. Minocha , S. Long, “Simultaneous separation and quantitation of amino acids and polyamines of forest tree tissues and cell cultures within a single high-performance liquid chromatography run using dansyl derivatization.” , *Journal of chromatography. A* , vol. 1035, no. 1 , 2004 , pp. 63–73.
- [57] A. Karlström , S. Hober, “Chromatographic methods for protein purification” , 2006 , pp. 5–8.

- [58] K. Petritis , C. Elfakir , M. Dreux, “HPLC-CLND for the analysis of underivatized amino acids” , *Lc gc europe* , no. July , 2001 , pp. 389–395.
- [59] A. Ammar, “Analysis of Drug Substances by Using New Concepts of HPLC and Development of Some HPTLC Methods” , Universidade de Berlim , 2009 , pp. 1–21.
- [60] U. Huber , R. E. Majors, “Introduction into preparative HPLC” , em *Principles in preparative HPLC*, A. T. Inc, Ed. 2007 , pp. 2–10.
- [61] M. C. García, “The effect of the mobile phase additives on sensitivity in the analysis of peptides and proteins by high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry.” , *Journal of chromatography. B* , vol. 825, no. 2 , 2005 , pp. 111–23.
- [62] Michael W. Dong, *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Hoboken, New Jersey A JOHN WILEY & SONS, INC , 2006.
- [63] A. Pombeiro, “Técnicas cromatográficas e electroforéticas” , em *Técnicas e operações unitárias em química laboratorial* , 4^a ed., F. Gulbenkian, Ed. Lisboa , 2003 , pp. 433–599.
- [64] K. Kuśmierk , G. Chwatko , R. Głowacki , P. Kubalczyk , E. Bald, “Ultraviolet derivatization of low-molecular-mass thiols for high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis analysis.” , *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* , vol. 879, no. 17–18 , 2011 , pp. 1290–307.
- [65] R. Głowacki , E. Bald, “Fully automated method for simultaneous determination of total cysteine, cysteinylglycine, glutathione and homocysteine in plasma by HPLC with UV absorbance detection.” , *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* , vol. 877, no. 28 , 2009 , pp. 3400–4.

- [66] K. Kuśmierek , G. Chwatko , R. Głowacki , E. Bald, “Determination of endogenous thiols and thiol drugs in urine by HPLC with ultraviolet detection.” , *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* , vol. 877, no. 28 , 2009 , pp. 3300–8.
- [67] 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* , vol. 52, no. 3 , 2000 , pp. 509–15.
- [68] E. Kaniowska , G. Chwatko , R. Głowacki , P. Kubalczyk , E. Bald, “Urinary excretion measurement of cysteine and homocysteine in the form of their S-pyridinium derivatives by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection.” , *Journal of chromatography. A* , vol. 798, no. 1–2 , 1998 , pp. 27–35.
- [69] J. Miller , J. Miller, “Errors in instrumental analysis, regression and correlation” , em *Statistics for analytical chemistry* , 3 rd editi., E. Horwood, Ed. 1988 , pp. 101–141.
- [70] G. Pohn , J. Csapó , É. Varga-Visi, “Enantiomers of methionine and cyst (e) in the form of methionine-sulphon and cysteic acid after performic acid oxidation by reversed phase high performance” , *Agriculturae Conspectus Scientificus* , vol. 68, no. 4 , 2003 , pp. 269–273.

Anexos

Anexo A

Solução tampão de TCA

A solução de TCA 0,01M, pH 2.2, foi preparada dissolvendo 1,6339 g de TCA em água desionizada e ajustando o pH com uma solução de NaOH completando o volume a 1000 mL.

Solução tampão de Tris pH 8.2

A solução tampão de Tris pH 8.2 foi preparada dissolvendo em água desionizada 3,029 g de Tris e adicionando 0,938 mL de HCl, perfazendo um volume de 25 mL.

Solução de 2-mercaptoetanol (2-MTE)

A solução de 2-mercaptoetanol 0,1M foi preparada dissolvendo 0,070 mL de 2-mercaptoetanol em água desionizada, perfazendo um volume de 10 mL.

Solução de CMPI

A solução de CMPI 0,1 M foi preparada dissolvendo em água desionizada 0,6387 g de CMPI, perfazendo o volume a 25 mL.

Solução de EDTA

A solução de EDTA 0,1 M foi preparada dissolvendo em água desionizada 1,8612g de EDTA, perfazendo o volume a 50 mL.

Solução de PCA

A solução de PCA 3M foi preparada dissolvendo 5,17 mL de PCA 70% em água desionizada, perfazendo o volume a 20 mL.

Solução de tampão de fosfato

A solução tampão de fosfato 0,1M, pH 8,0, foi preparada dissolvendo em água desionizada 0,47g de Na_2HPO_4 , 6,6 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ e 0,19g de EDTA e completando o volume a 500mL.

Solução tampão de Tris pH 6.8

A solução tampão de Tris 50 mM, pH 6,8, foi preparada dissolvendo em água desionizada 1,535g de base Tris, adicionando 1mL de HCl concentrado e perfazendo o volume a 250mL.

Solução de DTNB

A solução de reagente de DTNB foi preparada dissolvendo 4mg de reagente por mL de solução tampão de fosfato (0,1M e 1mM de EDTA a pH 8,0).

Solução stock de cisteína

A cisteína foi dissolvida em HCl 1M. A concentração da solução ‘mãe’ de cisteína era cerca de 18 mM (21,5 mg em 10 mL).

Solução stock de cistina

A cistina foi preparada em HCl 1M. A concentração da solução “mãe” de cistina era cerca de 8,2 mM (20 mg em 10 mL).

Anexo B

Curva de Calibração para o método cromatográfico: Método dos Mínimos Quadrados

$$y = a + b \cdot x$$

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x}$$

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \sum_i (y_i - \bar{y})^2}}$$

xi = Concentrações

yi = Sinal

Tabela 11. Tabela referente às constantes calculadas pelo método dos mínimos quadrados.

\bar{x}_{med}	Média de x
\bar{y}_{med}	Média de y
n	Nº pontos
b	Declive
a	Ordenada na origem
R²	Coefficiente de correlação quadrático

Cálculo dos erros das constantes a e b

$$s_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2}$$

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\left\{ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right\}^{1/2}}$$

$$s_a = s_{y/x} \left\{ \frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2}$$

Curva de Calibração para o método da Espectrofotometria: Método dos Mínimos Quadrados

Tabela 12. Valores registados da cisteína a uma temperatura de 20°C para um intervalo de confiança de 95 % no UV-Vis.

t_{95 (n-2)}	2,365	t de Student para 95% e n-2 graus de liberdade
S_{y/x}	0,006	Estatística auxiliar
S_b	0,112	Desvio padrão de b
S_{b/b}	0,804	Desvio padrão relativo de b (em %)
Amplitude IC(b)	0,265	Intervalo de confiança de b (=t*S _b)
S_a	0,004	Desvio padrão de a
S_{a/a}	68,023	Desvio padrão relativo de a (em %)
Amplitude IC(a)	0,011	Intervalo de confiança de a (t*S _a)

Tabela 13. Valores do LOD registados da cisteína a uma temperatura de 20°C para um intervalo de confiança de 95 % no UV-Vis.

Cálculo do Limite de Detecção		
Sinal (a+3S _{yx})	0,025	
Concentração (mM)	0,002	(sinal-a) /b

Tabela 14. Valores do LOQ registados da cisteína a uma temperatura de 20°C para um intervalo de confiança de 95 % no UV-Vis.

Cálculo do Limite de Quantificação		
Sinal (a+10S _{yx})	0,069	
Concentração (mM)	0,005	(sinal-a)/b

