



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
LABORATÓRIO DE CATÁLISE BIOMIMÉTICA

**ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO MOLECULAR ENTRE
MONÔMEROS FUNCIONAIS E SUBSTRATOS MODELO
DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE**

**TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO SUBMETIDO À UNIVERSIDADE FEDERAL
DE SANTA CATARINA PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE BACHAREL EM QUÍMICA**

ACADÊMICO: Caio Palla Marques
ORIENTADOR: Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos

Florianópolis, 22 de Junho 2009.

ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO MOLECULAR ENTRE MONÔMEROS FUNCIONAIS E SUBSTRATOS MODELO DA GLUTATIONA S-TRANSFERASE

Trabalho de conclusão de curso de Bacharelado em Química, executado durante o semestre de 2009.1, no Laboratório de Catálise Biomimética da Universidade federal de Santa Catarina – UFSC. Apresentando à disciplina QMC5512 – Estágio II, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Química.

Coordenadora de Estágio: Prof^a. Dra. Inês M. C. Brighente

Orientador do Estágio: Prof. Dr. Josiel Barbosa Domingos

Florianópolis / SC
Semestre 2009.1

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Josiel Barbosa Domingos, por toda dedicação, paciência, conhecimentos transmitidos ao longo desse tempo.

Ao Professor José Carlos Gesser, pelos ensinamentos e apoio ao longo desse trabalho.

Ao Angelo e a Eliane, da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, pelo apoio na operação do RMN.

Aos Professores que contribuíram para a minha formação.

Á minha família, pela confiança e apoio que foram dedicados ao longo de minha vida.

Aos amigos do LACBIO.

Aos amigos e todos que de alguma forma contribuíram para minha formação.

A UFSC, pela infra – estrutura

Ao CNPq e CAPES, pelo apoio financeiro.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Detoxificação de Xenobióticos	13
2.2 Polímeros por Impressão Molecular.....	14
2.3 Associação Molecular.....	16
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Materiais.....	20
4.2 Métodos.....	20
4.2.1 Preparo do composto GSDNB	20
4.2.2 Preparo do composto CBSG	20
4.2.3 Determinação da K_a por Espectrofotometria no UV - Vis	21
4.2.4 Determinação da K_a por RMN ^1H	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1 Estudos de Associação Molecular com o substrato 2,4 - Dinitroclorobenzeno	24
5.2 Estudos de Associação Molecular com o substrato S-(4-carboxibenzil)glutaciona .	28
5.3 Estudos de Associação Molecular com o substrato S-(2,4-dinitrofenil)-glutaciona .	30
6. CONCLUSÃO.....	31
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
8. ANEXOS.....	34
8.1 Anexos I: Plots Benesi Hildebrand para o 2,4 – Dinitroclorobenzeno obtidos por Espectrofotometria no UV - Vis	34
8.2 Anexos II: Plots Benesi Hildebrand para o 2,4 – Dinitroclorobenzeno obtidos por RMN ^1H	35

8.3 Anexos III: Plots Benesi Hildebrand para o S-(4-carboxibenzil)glutathiona obtidos por Espectrofotometria no UV - Vis.....	36
8.4 Anexos IV: Plots Benesi Hildebrand para o S-(4-carboxibenzil)glutathiona obtidos por RMN ¹ H.....	38
8.5 Anexos V: Plots Benesi Hildebrand para o S-(2,4-dinitrofenil)-glutathiona obtidos por Espectrofotometria no UV - Vis.....	39
8.6 Anexos VI: Espectro inicial do substrato CDNB.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas da Glutathione nas formas reduzida e oxidada.....	13
Figura 2. Representação da detoxificação do CDNB na célula.....	14
Figura 3. Etapas na Síntese de um MIP.....	15
Figura 4. Estruturas do CDNB, VZOL e VPY.....	24
Figura 5. Gráfico Benesi – Hildebrand e espectros de UV - Vis obtido pela associação entre CDNB e VZOL 25 °C e usando clorofórmio como solvente.....	25
Figura 6 Gráfico Benesi – Hildebrand e espectros de RMN ¹ H obtido pela associação entre CDNB e VZOL por RMN ¹ H, a 25 °C e usando clorofórmio deuterado como solvente.	25
Figura 7. Estruturas do CDNB e AAC.....	28
Figura 8. Estruturas do CBSG, VPY, VZOL e AAC	29
Figura 9. Estruturas do GSDNB.....	30

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Dados específicos fixados em cada experimento realizado por Espectrofotometria no UV-Vis.....	19
Tabela 2. Dados específicos fixados em cada experimento realizado por RMN ¹ H.....	20
Tabela 3. Valores de K_a para os sistemas CDNB – VZOL e CDNB – VPY usando clorofórmio ou clorofórmio d ³ como solvente, a 25°C.....	21
Tabela 4. Valores de K_a para os sistemas CBSG– VZOL, CBSG – VPY e CBSG – AAC usando DMSO ou DMSO d ⁶ como solvente, a 25°C.....	28
Tabela 5. Valores de K_a para os sistemas GSDNB – VZOL, GSDNB – VPY e GSDNB – AAC usando DMSO como solvente, a 25°C.....	30

ÍNDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Equação química de equilíbrio para formação de um complexo molecular Substrato - Ligante.....	16
Esquema 2. Equações químicas de equilíbrio para formação de complexos moleculares com estequiometrias Substrato – Ligante maiores que 1:1.....	16
Esquema 3. Representações das constantes de equilíbrio para formação de complexos moleculares com diferentes estequiometrias Substrato – Ligante.....	17

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1. Equação de Benesi - Hildebrand para determinação, por espectrofotometria no UV – Vis, da constante de associação de complexos moleculares formados em solução.....17

Equação 2. Equação de Benesi - Hildebrand para determinação, por RMN ¹H, da constante de associação de complexos moleculares formados em solução.....19

SIGLAS E ABREVIATURAS

MIP	Polímero Impressos Molecularmente
GST	Glutathione S-Transferase
GSH	Glutathione
CDNB	2,4 – Dinitroclorobenzeno
CBSG	S-(4-carboxibenzil)glutathione
GSDNB	S-(2,4-dinitrofenil)-glutathione
ET	Estado de Transição
K_a	Constante de Associação
b	Caminho Óptico
$\Delta\epsilon$	Varição no Coeficiente de Extinção Molar
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
ppm	Deslocamento Químico em partes por milhão
S	Substrato
L	Ligante
ET	Estado de Transição
ΔA	Varição de Absorbância
UV – Vis	Ultravioleta - Visível
AAC	Ácido Acrílico
VZOL	1 – Vinilimidazol
VPY	4 – Vinilpiridina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- d^6	Dimetilsulfóxido deuterado
DMF	Dimetilformamida

RESUMO

Impressão molecular é uma técnica direcionada para a síntese de materiais poliméricos com seletividade pré-determinada de substratos; tais materiais têm sido especulados, dentre várias aplicações, como catalisadores de importantes reações de interesse biológico ou industrial.

A idéia central desta técnica é utilização de monômeros funcionais capazes de se coordenar de forma reversível à uma determinada estrutura de um substrato; o complexo resultante é subseqüentemente incorporado numa estrutura polimérica pela copolimerização na presença de excesso de um monômero de ligação cruzada e um solvente inerte. A remoção do substrato deixa sítios com forma e funcionalidade complementares, capazes de recoordenar seletivamente o substrato.

A escolha racional de monômeros funcionais (ligantes) através de estudos pré-polymerização é uma etapa importante na otimização de Polímeros Impressos Molecularmente (MIP's) e pode ser feita determinando-se o valor da constante de associação aparente (K_{ap}) para formação do complexo Substrato - Ligante (S - L).

Nesse trabalho determinou-se, por espectrofotometria no UV – Vis e RMN ^1H , a constante de associação aparente entre substratos capazes de modelar uma reação de interesse bilógico, o 2,4 – Dinitroclorobenzeno, S-(4-carboxibenzil)glutathiona, S-(2,4-dinitrofenil)-glutathiona e os monômeros ácido acrílico, 1 – vinilimidazol e 4 – vinilpiridina.

Os resultados apresentaram coerência entre as duas técnicas utilizadas em tais determinações e revelaram que o solvente deve apresentar efeitos importantes na associação das espécies estudadas.

O S-(2,4-dinitrofenil)-glutathiona foi o sistema que apresentou valores mais altos de K_{ap} com os três monômeros estudados e deve ser, portanto, o substrato mais promissor a ser utilizado na construção de polímeros catalíticos impressos molecularmente.

1. INTRODUÇÃO

Catalisadores desempenham um papel central na indústria e pesquisa química¹. Devido ao alto poder catalítico e especificidade, há séculos a indústria de alimentos, e mais recentemente as indústrias farmacêutica e química, utiliza catalisadores biológicos – enzimas – em seus processos de fabricação. O valor de venda de enzimas para o uso na indústria de alimentos, detergentes, especialidades químicas perfizeram um total de aproximadamente U\$ 700 milhões em 1992, aumentaram para U\$ 2 bilhões em 2004 e o mercado previsto para 2009 é da ordem de \$ 2,4 bilhões².

O uso de enzimas possui limitações, pois essas substâncias são pouco resistentes ao calor, funcionam geralmente em uma estreita faixa variações de pH e não são compatíveis com o uso de solventes orgânicos¹. Sendo assim, há um crescente interesse nas últimas décadas no desenvolvimento de enzimas artificiais³, buscando a mimetização do modo de ação enzimático e seu alto poder catalítico e também a superação das citadas limitações sofridas pelas enzimas.

Na preparação de tais catalisadores artificiais, uma abordagem promissora é o uso de polímeros catalíticos impressos molecularmente (MIP's). Tal técnica tem por objetivo traduzir os princípios da catálise enzimática no desenvolvimento de catalisadores artificiais poliméricos¹.

Por se tratar de materiais poliméricos, tais catalisadores possuem vantagens em relação a algumas limitações de sistemas enzimáticos: resistência ao calor, mudança de pH, mudança de solvente e possibilidade de fabricação em escala industrial. Além disso, tais catalisadores podem ser estudados profundamente através da variação isolada de fatores que afetam seu desempenho, como: temperatura de preparo do polímero, solvente utilizado, quantidade de iniciador da polimerização, natureza química do substrato, monômeros usados na polimerização e quantidade de monômero funcional usado na síntese dos polímeros impressos molecularmente¹.

A escolha racional de monômeros funcionais através de estudos pré-polimerização é uma etapa importante na otimização de Polímeros Impressos Molecularmente (MIP's) e pode ser feita determinando-se o valor da constante de associação aparente (K_{ap}) para formação do complexo Monômero Funcional-Templato (MF-T).

Um sistema de grande interesse para mimetização no desenvolvimento de catalisadores artificiais é a reação de detoxificação de xenobióticos catalisada pela enzima Glutathione S-Transferase (GST), e objeto de estudo deste trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Detoxificação de Xenobióticos

Xenobióticos são compostos estranhos a organismos vivos. Essa classe de compostos inclui drogas, carcinogênicos e compostos que foram introduzidos ao meio ambiente por meios artificiais⁴. Mesmo com uma grande diversidade de estruturas químicas, ligam-se a sítios celulares causando distúrbios generalizados. Estes xenobióticos são eliminados a partir da sua reação com o substrato natural glutatona e catalisada pela enzima Glutathione S-Transferase (GST).

A Glutathione é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não protéico mais importante nos sistemas vivos⁵. Trata-se de um tripeptídeo linear, constituído por três aminoácidos, glicina, ácido glutâmico e cisteína, sendo o grupo tiol deste último o local ativo responsável pelas suas propriedades bioquímicas. Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG, forma dimerizada da GSH), como mostra a figura abaixo.

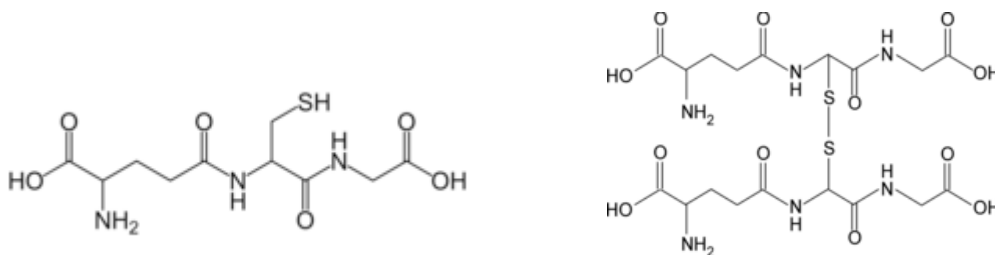


Figura 1 A estrutura a esquerda representa a glutatona na forma reduzida e a estrutura a direita na forma oxidada.

A GST é uma enzima membrânica responsável pela catálise da reação de substituição nucleofílica aromática entre a GSH e xenobióticos, por exemplo, o 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB) (Fig. 2). Esta reação está presente nas células e constitui o principal mecanismo de detoxificação em sistemas biológicos⁵.

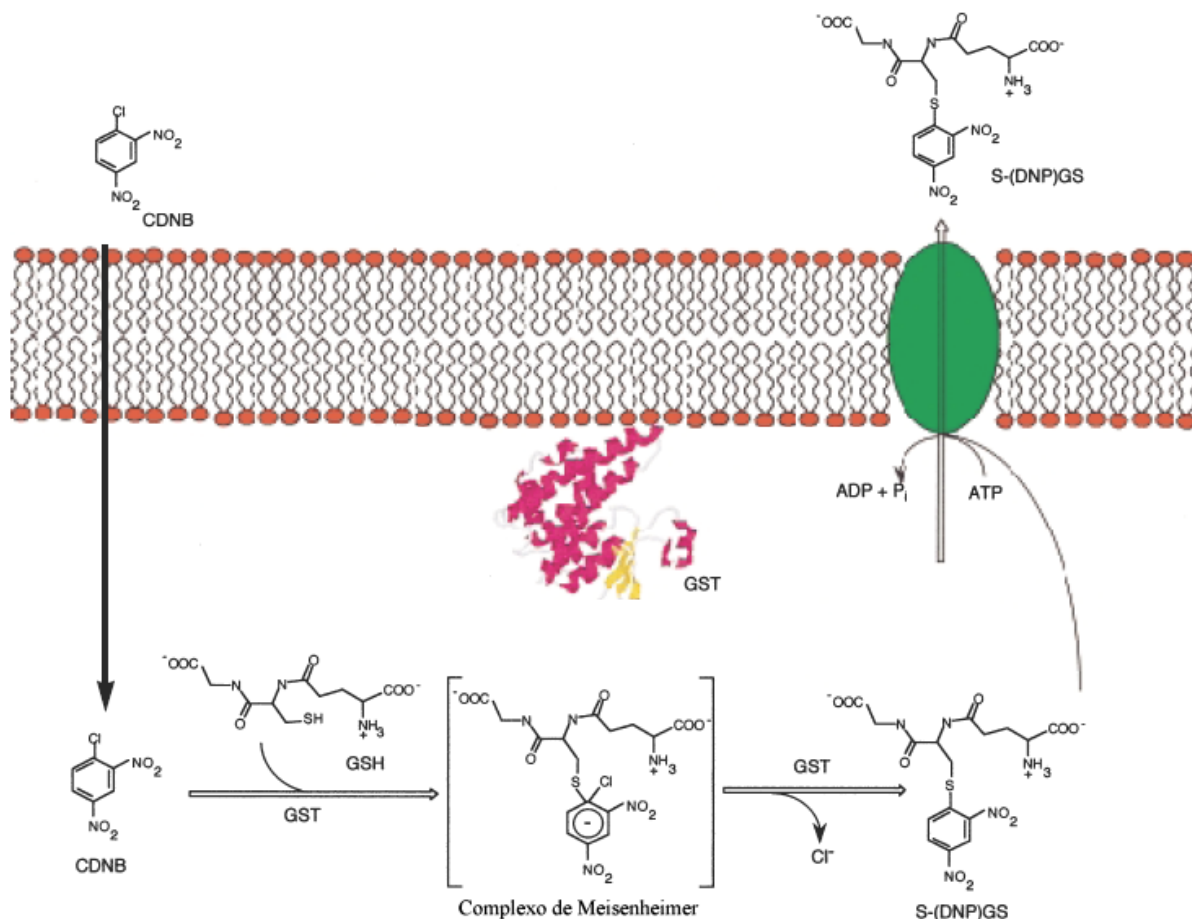


Figura 2 Representação da detoxificação de um xenobiótico (CDNB) na célula.

Com o entendimento do funcionamento e a mimetização desta enzima, sistemas catalíticos artificiais poderiam ser criados para utilização na detoxificação de compostos tóxicos ou em sistemas de liberação controlada de drogas.

Estudos em sistemas artificiais de mimetização do modo de ação da GST já foram reportados. Porém, não há nenhum trabalho descrito na literatura utilizando a técnica de polímeros por impressão molecular.

2.2 Polímeros por Impressão Molecular

Polímeros formados por Impressão Molecular (MIP's) são materiais poliméricos preparados com o objetivo de formar, por toda a rede polimérica, cavidades complementares a uma molécula modelo (substrato). A preparação do polímero impresso molecularmente (MIP) é feita em uma seqüência de passos⁶ (Figura 3).

Primeiro, o substrato se liga a monômeros funcionais (ligantes) em um solvente inerte. Essa ligação pode ser covalente ou não covalente (interações eletrostáticas, forças de *van der waals*, interações π - π *stacking* ou ligações de hidrogênio). Um co-

monômero formador da rede polimérica (Cross-Linker) é adicionado ao meio. Uma substância iniciadora deve ser adicionada para que a polimerização comece. Por ação de calor ou luz ultravioleta a co-polimerização ocorre e o complexo resultante da interação *Substrato - Monômero Funcional (ligante) - (S – L)* é incorporado na rede polimérica. Após a polimerização, o substrato deve ser extraído do polímero, deixando assim cavidades complementares na rede polimérica. A cavidade deve ser então, capaz de reconhecer seletivamente a molécula modelo (substrato)⁶.

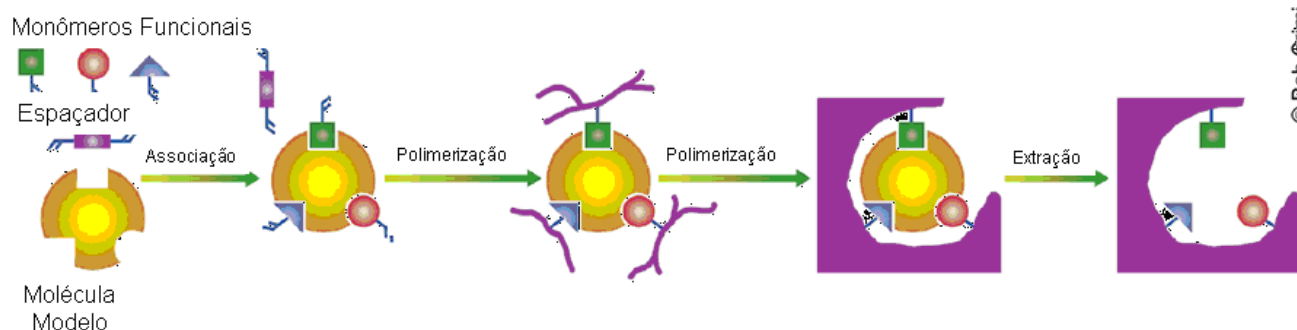


Figura 3. Etapas na síntese de um MIP.

A religação seletiva da molécula modelo pelo MIP pode ser explorada em sensores eletroquímicos⁷, liberação controlada de drogas⁸ e separações analíticas⁹.

A formação de cavidades complementares a um substrato em MIP's possui também uma potencial aplicação em catálise e mimetização de enzimas. Nesse caso, a cavidade do MIP é análoga ao sítio ativo da enzima mimetizada¹⁰. Em aplicações de mimetização da ação enzimática, é desejável que a molécula modelo seja um análogo do estado de transição da reação de interesse, ou seja, o substrato deve possuir a estrutura molecular análoga a estrutura do estado de transição da reação. Assim, a cavidade formada no MIP, após a retirada do substrato, deve possuir grupos funcionais e/ou características conformacionais que potencializem seu reconhecimento, trazendo-os a uma aproximação ideal e também reconhecer e estabilizar o estado de transição da reação¹⁰. Em aplicações de catálise, a molécula modelo usada na construção do MIP também pode ser um substrato da reação, um análogo do ET ou o próprio produto da reação que se deseja catalisar¹⁰.

A escolha racional de monômeros funcionais através de estudos pré-polimerização é uma etapa importante na otimização de MIP's^{11, 12}, pois esses estudos permitem que a interação entre grupos funcionais do substrato e monômeros funcionais (ligantes) seja avaliada através da determinação da constante de formação do complexo molecular

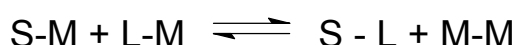
Substrato - Ligante. A constante de associação aparente (K_{ap}) do complexo S - L pode ser determinada com o uso de diferentes técnicas, como RMN - ^1H e espectrofotometria no UV-Vis.. Assim, a escolha de um monômero funcional mais adequado para um determinado substrato na síntese do MIP pode ser feita de maneira racional através da obtenção do valor da K_{ap} do complexo S - L.

2.3 Associação Molecular

Estudos de associação molecular estão inseridos dentro da área de química supramolecular e são importantes no desenvolvimento de MIP's, onde se estuda, através de ensaios pré-polimerização, a associação para formação do complexo molecular S - L.

Complexos moleculares são espécies formadas pela associação não covalente de duas ou mais moléculas. Por convenção, o substrato (S) é a espécie na qual uma propriedade física ou química está sendo medida e o ligante (L) é a espécie cuja concentração é a variável independente¹³.

A associação de complexos moleculares pode ocorrer em diferentes estequiometrias S:L, sendo que as proporções 1:1, 1:2 e 2:1 são reportadas na literatura como sendo mais estáveis e de mais fácil detecção em solução¹³. O equilíbrio de complexação entre as espécies estudadas, no caso especial de uma estequiometria 1:1 S : L , pode ser simplificada representado pelo esquema 1, onde a letra M representa uma molécula do solvente¹³.



Esquema 1. Equação química de equilíbrio para formação de um complexo molecular Substrato - Ligante.

Mas em solução, pode haver a formação concomitante de complexos com estequiometrias S : L maiores que 1 : 1 (esquema 2).



Esquema 2. Equações químicas de equilíbrio para formação de complexos moleculares com estequiometrias Substrato – Ligante maiores que 1:1.

As constantes de equilíbrio para os distintos complexos formados podem ser representadas como no esquema 3.

$$K_{a\ 1:1} = \frac{[S - L]}{[S][L]} \quad K_{a\ 1:2} = \frac{[S - L_2]}{[S - L][L]} \quad K_{a\ 1:n+1} = \frac{[S - L_{n+1}]}{[S - L_n][L]}$$

Esquema 3. Representações das constantes de equilíbrio para formação de complexos moleculares com diferentes estequiometrias Substrato – Ligante.

A detecção separada dos diferentes complexos formados concomitantemente em solução pode não se tornar possível por espectrofotometria no UV – Vis ou por RMN ^1H . Assim, a constante de equilíbrio medida por espectrometria no UV – Vis ou por RMN ^1H deve ser tratada como uma constante de equilíbrio aparente (K_{ap}), resultante da formação dos diferentes complexos detectados pela técnica usada para tal medição.

Quanto mais intensas as interações solvente – substrato ou solvente – ligante, menos intensas devem ser as interações substrato – ligante. Além disso, a magnitude das interações substrato – ligante depende, é claro, da natureza química dessas espécies¹².

A constante de equilíbrio para a formação de complexos em solução pode ser determinada, por espectrofotometria no UV – Visível, segundo a equação de Benesi-Hildebrand¹⁴ (equação 1).

$$\frac{1}{\Delta A} = \frac{1}{b \cdot \Delta \epsilon \cdot [L_0] \cdot [S_0] \cdot K_{ap}} + \frac{1}{b \cdot \Delta \epsilon \cdot [S_0]}$$

Equação 1. Equação de Benesi - Hildebrand para determinação, por espectrofotometria no UV – Vis, da constante de associação de complexos moleculares formados em solução.

Na equação, o termo ΔA é a absorbância medida em cada concentração de L_0 diminuída da absorbância inicial do substrato em um determinado comprimento de onda. Os termos $[S]_0$ e $[L]_0$ são, respectivamente, as concentrações iniciais do substrato e total do monômero funcional (ligante). O gráfico de $1 / \Delta A$ em função de $1 / [L]_0$ fornece, através dos coeficientes linear e angular, a constante de formação K_{ap} do complexo S – L.

A referida constante de associação também pode ser determinada por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)¹⁵. Nesse caso, acompanha-se a variação no deslocamento químico de um hidrogênio do substrato enquanto a concentração do ligante é variada. A concentração do substrato permanece constante ao longo do experimento. A equação 2 é a equação de Benesi – Hildebrand para determinações, por RMN ^1H , da K_{ap} de complexos moleculares em solução.

$$\frac{1}{\Delta\delta} = \frac{1}{\Delta\delta_{\text{tot}} \cdot [L_0] \cdot K_{ap}} + \frac{1}{\Delta\delta_{\text{tot}}}$$

Equação 2. Equação de Benesi - Hildebrand para determinação, por RMN ^1H , da constante de associação de complexos moleculares formados em solução.

Nos experimentos por RMN ^1H , acompanha-se o deslocamento químico de um hidrogênio do substrato, enquanto a concentração do ligante é variada. O valor do deslocamento químico observado é uma média entre o deslocamento químico do substrato e o deslocamento químico do complexo formado. Na equação 2, o termo $\Delta\delta_{\text{tot}}$ é igual a diferença entre o deslocamento químico do complexo e do substrato inicial. O termo L_0 , mais uma vez, refere-se a concentração total do ligante. O termo $\Delta\delta$ refere-se a variação no deslocamento químico de um próton do substrato quando varia-se a concentração do ligante.

A aproximação de que a concentração inicial do ligante é igual a sua concentração no equilíbrio se torna válida desde que, experimentalmente, a concentração do ligante seja pelo menos maior que dez vezes a concentração do substrato. Essa condição deve ser respeitada para que o método Benesi – Hildebrand seja aplicado, tanto por espectrofotometria no UV – Vis como por RMN ^1H ¹⁴. A concentração do substrato deve permanecer durante todo o experimento.

De posse dos valores da constante de formação entre diferentes substratos e monômeros funcionais (ligantes), informações importantes podem ser obtidas acerca de que forças intermoleculares estão presentes nesses sistemas e de qual a magnitude dessas forças. Assim, a construção de polímeros catalíticos molecularmente impressos pode ser feita de maneira racional.

3. OBJETIVOS

1. Sintetizar e caracterizar o S-(2,4-dinitrofenil)-glutaciona (GSDNB) S-(4-carboxibenzil)glutaciona.
2. Sintetizar e caracterizar o S -(4-carboxibenzil)glutaciona (CBSG).
3. Determinar, por espectrometria no UV-Vis e RMN - ^1H , as constantes de associação aparente (K_{ap}) para os complexos moleculares formados entre o substrato CDNB e diferentes monômeros funcionais (ligantes): ácido acrílico (AAC), 4-vinilpiridina (VPY) e 1 – Vinilimidazol (VZOL).
4. Determinar, por espectrometria no UV-Vis e RMN - ^1H , as constantes de associação aparente (K_{ap}) para os complexos moleculares formados entre o substrato CBSG e diferentes monômeros funcionais (ligantes): ácido acrílico (AAC), 4-vinilpiridina (VPY) e 1 – Vinilimidazol (VZOL).
5. Determinar, por espectrometria no UV-Vis, as constantes de associação aparente (K_{ap}) para os complexos moleculares formados entre o substrato GSDNB e diferentes monômeros funcionais (ligantes): ácido acrílico (AAC), 4-vinilpiridina (VPY) e 1 – Vinilimidazol (VZOL).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os reagentes e solventes usados foram: 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB) *Aldrich* 99%, Ácido Acrílico (AAC) *Fluka* 99 %, 4-Vinilpiridina (VPY) *Aldrich* 95%, 1-Vinilimidazol (VZOL) *Aldrich* 99% Clorofórmio P.A *Synth*, Clorofórmio Deuterado *Cambridge Isotope Laboratories*, Dimetilsulfóxido P.A *Nuclear* e Dimetilsulfóxido Deuterado *Cambridge Isotope Laboratories*.

Os aparelhos utilizados foram: Espectrofotômetro Varian 50 Bio e RMN Oxford AS 400.

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo do composto GSDNB

O método de preparo foi adaptado de reações análogas descritas na literatura¹⁶ e estudadas pelo grupo de pesquisa do LACBIO¹⁷. Em um béquer, foi adicionado 0,972 g (3,16 mmol) de GSH, 0,0163 g de TTAP e 15 ml de solução tampão preparada com ácido bórico e ajustada para pH 9,5 com solução de NaOH. Em seguida, adicionou-se lentamente 0,729 g (3,59 mmol) de CDNB ao meio reacional. A reação foi deixada a temperatura ambiente durante ~24 h Após esse tempo, sob banho de gelo, um pó amarelo foi precipitado com a adição de HCl concentrado até pH 3,0. O sólido foi filtrado a vácuo em funil de Buchner, lavado com água destilada e seco em estufa/dessecador. O rendimento obtido na reação foi de 90 % e o Ponto de Fusão foi determinado ser 200 °C (Lit. 200-210 °C).

O pó amarelo foi caracterizado por RMN ¹H (δ, ppm) : 1,90 [H₂N-HC-CH₂-CH₂], 2,32 [H₂C-CH-CO], 2,75 [HC-NH₂] 3,38 [S-CH₂-CH-NH], 3,7[OC-HN-CH-CO], 3,79 [HN-CH-COOH], 4,52 [NH₂-CH-CH₂], 7,95 [C-CH-CH-C-S] 8,45 [HC-CH-C-NO₂], 8,74 [C-NH], 8,88 [C-COOH].

4.2.2 Preparo do composto CBSG

O método de preparo foi adaptado de reações análogas descritas na literatura¹⁸. Em um béquer, foi adicionado 2,5 ml de uma solução NH₄OH 7 % contendo 0,3073 g (1 mmol) de GSH. Após completa solubilização da GSH, foi adicionado uma solução

metanólica contendo 0,2150 g (1 mmol) de ácido α -bromo-p-toluico. Após 1 hora um pó branco foi precipitado, sob banho de gelo, com a adição de HCl concentrado até pH 3,0. O sólido branco foi filtrado e lavado com água e metanol. O rendimento obtido na reação foi de 78 % e o Ponto de Fusão foi determinado ser 198 °C.

O pó branco foi caracterizado por RMN ^1H (δ , ppm) : 1,90 [$\text{H}_2\text{N-CH-CH}_2\text{-CH}_2$], 2,32 [$\text{H}_2\text{C-CH-CO}$], 2,55 [$\text{S-CH}_2\text{-CH}$], 2,75 [HC-NH_2], 3,38 [$\text{S-CH}_2\text{-CH-NH}$], 3,7 [OC-HN-CH-CO], 3,79 [HN-CH-COOH], 4,52 [$\text{NH}_2\text{-CH-CH}_2$], 7,41 [$-\text{CH-CH-CH-CH}_2\text{-S}$], 7,86 [HC-CH-C-COH], 8,41 [C-NH], 8,61 [C-COOH].

4.2.3 Determinação das Constantes de Associação Aparente (K_{ap}) por Espectrofotometria no UV - Vis

As constantes de associação aparente entre os substratos CDNB, CBSG e GSDNB e os monômeros funcionais (ligantes) AAC, VZOL e VPY podem ser determinadas, por espectrofotometria no UV –Vis, como já discutido, por um método bem estabelecido na literatura, o método de Benesi-Hildebrand.

Nesse método, a aquisição espectral de várias soluções é obtida. Em todas as soluções a concentração do substrato é mantida constante, enquanto a concentração do monômero (ligante) é variada. Acompanha-se a variação da absorbância de uma banda do substrato, e um gráfico de Benesi-Hildebrand é feito para determinação da constante de associação, que é obtida a partir dos coeficientes angular e linear da reta. Os experimentos devem ser feitos a temperatura constante, já que os valores de constantes de equilíbrio apresentam dependência com a temperatura.

Em todos os experimentos, duas soluções estoque foram preparadas:

- A) Substrato em concentração conhecida.
- B) Monômero Funcional (ligante) em concentração conhecida + substrato presente na mesma concentração da solução A.

Conforme o caso, os solventes usados foram Dimetilsulfóxido (DMSO) ou Clorofórmio (ver tabela).

Os experimentos foram feitos seguindo o seguinte procedimento: em uma cubeta de quartzo contendo 1,5 ml da solução A realizou-se aquisição espectral de 200 a 700 nm. Foi, então, adicionada uma alíquota da solução B à mesma cubeta onde foi tomada a aquisição espectral da solução A. Após 3 minutos, uma nova aquisição espectral foi feita. Sucessivas alíquotas de solução B foram adicionadas à mesma cubeta, sempre

respeitando o intervalo de 3 minutos entre a adição de cada alíquota de solução B e cada aquisição espectral realizada.

Os valores de absorvância do substrato no comprimento de onda acompanhado foram tomados e plotados em um gráfico de Benesi-Hildebrand.

A K_{ap} pôde então ser obtida através dos valores dos coeficientes angular e linear da reta $1 / \Delta A$ em função de $1 / [L]_0$ (inverso da concentração do ligante) plotada para cada sistema.

A tabela 1 apresenta os parâmetros experimentais referentes a metodologia de cada experimento realizado por espectrofotometria no UV-Vis:

Tabela 1. Parâmetros experimentais fixados em cada experimento realizado por Espectrofotometria no UV-Vis, todos a 25 ° C.

Sistema Estudado	Banda Acompanhada (nm)	Solvente	[Substrato] (mM)
CDNB – VZOL	360	Clorofórmio	5
CDNB – VPY	360	Clorofórmio	5
CDNB – AAC	280	Clorofórmio	0,1
CBSG – VZOL	330	DMSO	105
CBSG – VPY	350	DMSO	135
CBSG – AAC	285	DMSO	0,816
GSDNB – VZOL	340	DMSO	0,08
GSDNB – VPY	342	DMSO	0,08
GSDNB – AAC	285	DMSO	0,074

4.2.4 Determinação das Constantes de Associação Aparente (K_{ap}) por RMN 1H

As constantes de associação aparente dos complexos MF-T estudados também podem ser determinadas por RMN 1H , realizando experimentos análogos aos descritos por UV-Vis, e plotando-se um gráfico de Benesi-Hildebrand, porém acompanhado-se o deslocamento químico (ppm) de picos do substrato.

Em cada experimento, duas soluções estoques foram preparadas:

- A) Substrato em concentração conhecida.
- B) Monômero Funcional em concentração conhecida + substrato presente na mesma concentração da solução A.

Conforme o caso, o solvente usado nas soluções foi clorofórmio deuterado d^3 ou DMSO deuterado d^6 . Os experimentos foram feitos seguindo o seguinte procedimento:

Em um tubo de RMN, foi pipetado 500 μ l da solução A. Um espectro de RMN 1H da solução A foi obtido. Foi, então, adicionada uma alíquota da solução B no mesmo tubo de RMN. Após 3 minutos, foi realizada outra aquisição espectral de RMN 1H . Sucessivas alíquotas da solução B foram adicionadas ao mesmo tubo de RMN e aquisições espectrais foram feitas, sempre respeitando o tempo de 3 minutos entre a adição de cada alíquota e a tomada de cada espectro.

Os valores do deslocamento químico de um próton do substrato, em cada caso, foram acompanhados e plotados em um gráfico de Benesi-Hildebrand.

A K_{ap} pôde então ser obtida através dos valores dos coeficientes angular e linear da reta $1 / \Delta\delta$ em função de $1 / [L]_0$ (inverso da concentração do ligante) plotada para cada sistema.

A tabela 2 apresenta os parâmetros experimentais referentes a metodologia de cada experimento realizado por RMN 1H :

Tabela 2. Parâmetros experimentais fixados em cada experimento realizado por RMN 1H , todos a 25 ° C.

Sistema Estudado	Sinal Observado (ppm)	Solvente	[Substrato] (mM)
CDNB – VZOL	8,76	Clorofórmio d^3	40
CDNB – VPY	8,76	Clorofórmio d^3	100
CBSG – VZOL	7,87	Clorofórmio d^3	60
CBSG – VPY	7,87	DMSO d^6	60
CBSG – AAC	8,61	DMSO d^6	60

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos de Associação Molecular com o substrato 2,4 - Dinitroclorobenzeno

O 2,4 – Dinitroclorobenzeno (CDNB), junto com a glutationa, é um dos reagentes da reação a qual se deseja catalisar usando polímeros molecularmente impressos. O CDNB pode ser, portanto, um substrato no preparo de MIP's que catalisem tal reação. Dessa forma, foram realizados estudos de interação entre o CDNB e os monômeros funcionais (ligantes) VZOL, VPY e AAC. O valor de K_{ap} para tais sistemas foi obtido, quando possível, por espectrofotometria no UV-Vis e RMN ^1H .

Os valores obtidos das K_{ap} para a associação entre CDNB e os monômeros aromáticos VPY e VZOL estão expostos na tabela 3 e foram obtidos a partir dos gráficos de Benesi – Hildebrand como mostrado nas figuras 7 e 8:

Tabela 3. Valores de K_{ap} para os sistemas CDNB – VZOL e CDNB – VPY usando clorofórmio ou clorofórmio d^3 como solvente, a 25°C.

K_{ap} (M^{-1})	CDNB – VZOL	CDNB – 4-VPY
UV-Vis	0,0807	30,40
RMN ^1H	0,01456	0,1561

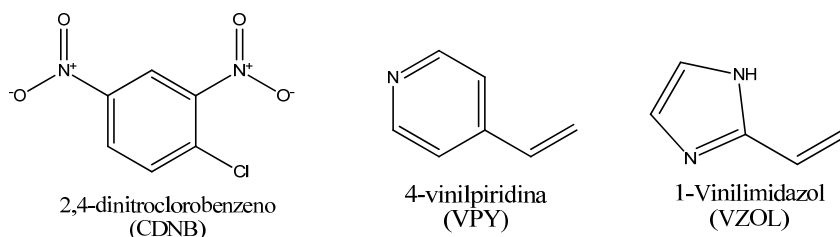


Figura 4. Estruturas do substrato CDNB e os monômeros VPY e VZOL.

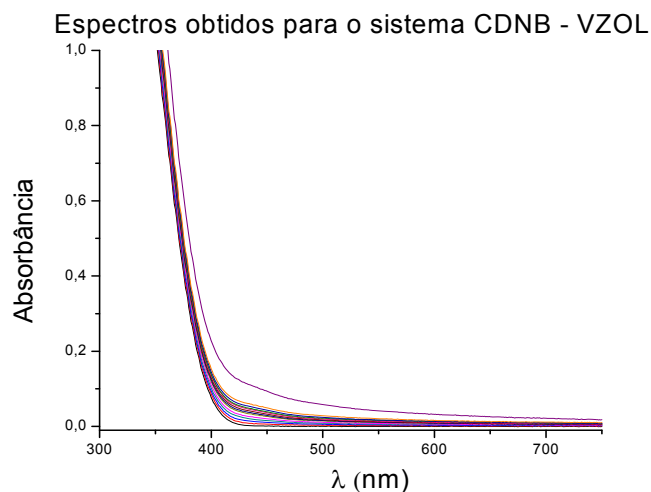
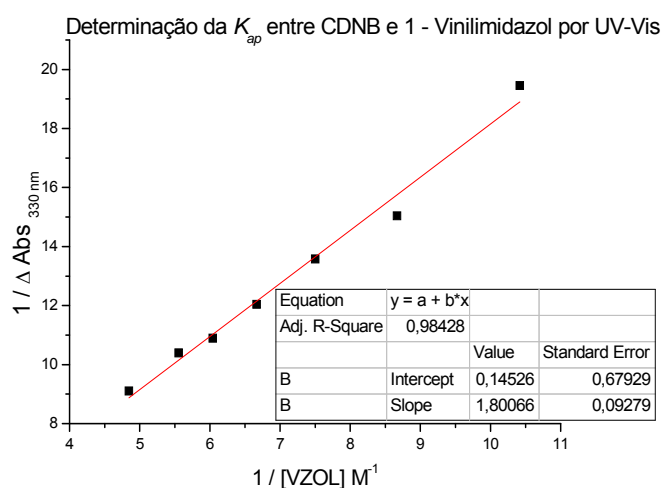


Figura 5. Gráfico Benesi – Hildebrand e espectros de UV-Vis obtido pela associação entre CDNB e VZOL, a 25 °C e usando clorofórmio como solvente.

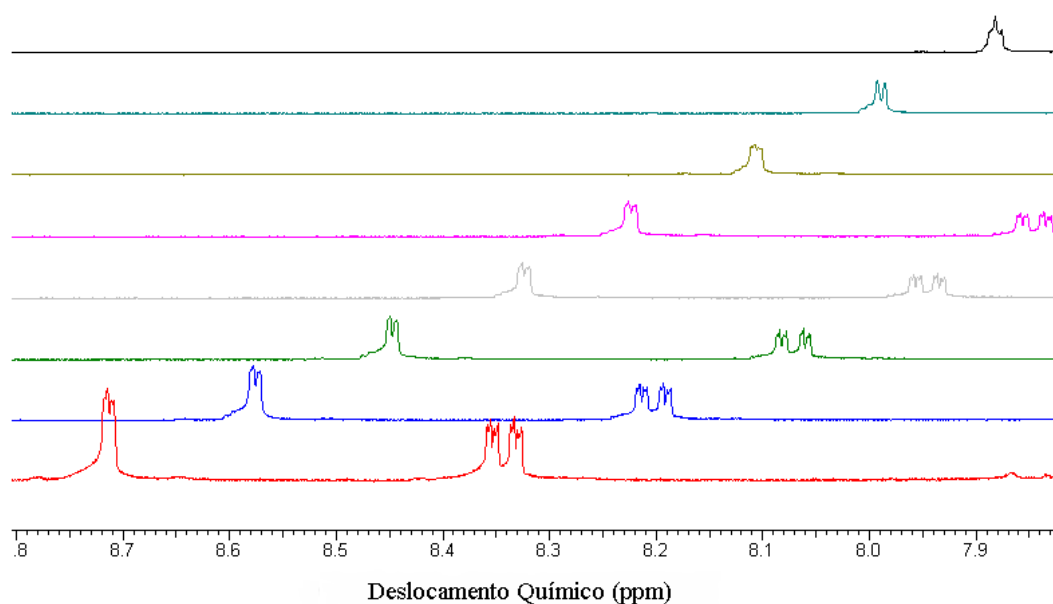
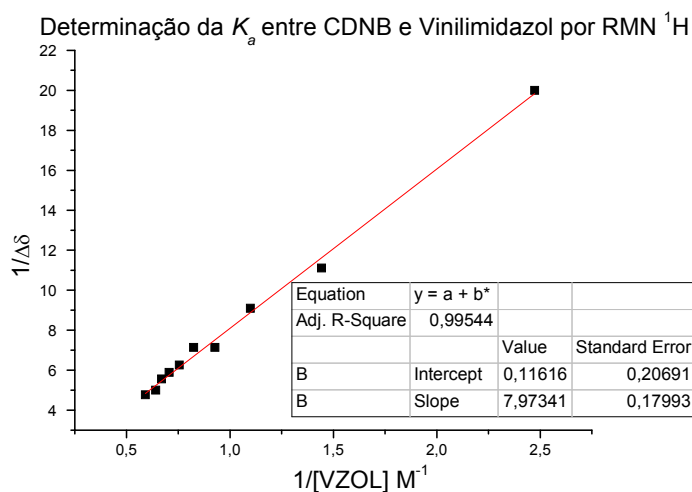


Figura 6. Gráfico Benesi – Hildebrand e espectros de RMN 1H obtidos pela associação entre CDNB e VZOL por RMN 1H , a 25 °C e usando clorofórmio deuterado como solvente.

Na espectrofotometria de UV-Vis, acompanha-se a absorvância do complexo molecular em um determinado comprimento de onda. Essa propriedade é diretamente relacionada com a concentração do complexo através da Lei de Lambert – Beer:

$$Abs_{\text{complexo}} = \varepsilon \cdot [\text{Complexo}] \quad (\text{considerando caminho óptico} = 1 \text{ cm})$$

O ε (coeficiente de absorvidade molar) é uma medida da intensidade com que a absorção ocorre no comprimento de onda estudado. Quanto maior ε , maior a intensidade da absorção. Cada espécie química possui um valor característico de ε , assim, o valor de ε do substrato (CDNB) é diferente do valor do ε de cada complexo formado em solução.

O ε dos referidos complexos é diferente do ε do CDBN devido às interações entre os orbitais do CDBN envolvidos na transição eletrônica em questão com os orbitais do monômero (4-VPY ou VZOL). Essa mudança na diferença de energia entre os orbitais do CDBN envolvidos na transição eletrônica acompanhada é que permite a determinação da K_{ap} do sistema através de espectroscopia no UV-Vis, já que a mudança nos valores de ε de cada complexo formado e de sua concentração na solução é contabilizada nos valores de absorvância no comprimento de onda da transição eletrônica acompanhada, e é proporcional a magnitude das forças de interação envolvidas entre as espécies formadoras de cada complexo formado em solução.

As interações presentes nos complexos CDBN – 4-VPY e CDBN – VZOL devem ser do tipo π - π -stacking, já que as moléculas envolvidas na formação desses complexos são aromáticas. A transição eletrônica prevista para o CDBN em 330 nm deve ser do tipo π - π^* .

O VZOL absorve de maneira pouco intensa em 330 nm, então, em relação a medida de K_{ap} por UV-Vis no sistema CDBN – VZOL deve-se ressaltar ainda que a absorvância medida teve de ser descontada da absorvância desse monômero em 330 nm para que se chegasse ao valor de ΔA usado no gráfico de Benesi-Hildebrand. A absorvância individual do VZOL foi medida em um experimento adicional usando apenas solvente e VZOL nas mesmas concentrações usadas na tabela 2.

Já por RMN ^1H , a natureza da propriedade do sistema acompanhada é diferente da propriedade medida por espectroscopia no UV-Vis. No caso da técnica de RMN ^1H , a propriedade acompanhada é o deslocamento químico dos hidrogênios do substrato durante a formação do complexo molecular.

Quanto maior a desblindagem causada por cada monômero funcional nos hidrogênios aromáticos do CDBN, maior será a variação no deslocamento químico

desses hidrogênios, e, por conseqüência, maior será o valor da K_{ap} medida para um dado sistema CDNB – Monômero funcional.

Pode-se observar que os valores numéricos das K_{ap} diferem de acordo com a técnica utilizada para tal determinação, espectrofotometria no UV-Vis (Fig. 5) ou RMN ^1H (Fig. 6). Isso ocorre devido aos diferentes fenômenos de observação em que se baseiam cada técnica utilizada. Cada técnica, espectrofotometria no UV – Vis ou RMN ^1H , detecta diferentes complexos em diferentes proporções formados em solução, dependendo do comprimento de onda acompanhado, no caso dos experimentos por espectrofotometria no UV – Vis, ou do hidrogênio acompanhado, no caso dos experimentos com RMN ^1H . O fato de cada técnica ser capaz de detectar diferentes complexos, ou uma combinação deles, fica evidenciado não só por cada técnica se valer de diferentes propriedades de observação, desblindagem de hidrogênio ou diferença de energia entre orbitais da transição eletrônica, mas também pelo fato de que o valor numérico da K_{ap} possa variar com o comprimento de onda acompanhado dentro de um mesmo sistema ou também com o hidrogênio acompanhado no caso dos experimentos realizados por RMN ^1H . Mas é importante notar que, apesar do valor numérico da K_{ap} para um mesmo sistema diferir de acordo com a técnica utilizada, há coerência nos valores determinados entre as duas técnicas utilizadas, ou seja, quando comparados os diferentes sistemas CDNB – VZOL e CDNB – VPY, a K_{ap} determinada para os sistemas CDNB – VPY é maior do que a K_{ap} do sistema CDNB – VPY pelas duas técnicas usadas.

Para o sistema CDNB – AAC, Figura 7, a determinação da K_{ap} pôde ser feita apenas por espectroscopia no UV-Vis. O experimento para determinação das constantes de equilíbrio realizado por RMN ^1H , nas mesmas concentrações dos outros sistemas estudados, não apresentou deslocamento significativo de nenhum hidrogênio do CDNB. Isso indica que o ácido acrílico não é capaz de interagir, ou interagir fracamente, com o CDNB de maneira que ocorra uma desblindagem significativa dos hidrogênios aromáticos do CDNB.

Contudo, a K_{ap} para o sistema CDNB – AAC pôde ser determinadas por UV-Vis acompanhando-se a forte variação na absorbância em 280 nm referente a transição $n-\pi^*$ dos grupos nitro presentes no CDNB. Isso pode ser racionalizado se forem consideradas as naturezas do CDNB e AAC. O AAC possui o grupo carboxílico capaz de interagir por ligações de hidrogênio com os grupos nitro do CDNB, mas não com o sistema π como observado com os monômeros VZOL e VPY. Assim, as duas moléculas não devem interagir de maneira significativa através da nuvem eletrônica do anel aromático do CDNB. De fato, não houve variação significativa na absorbância em 330 nm, corresponde

a transição π - π^* da nuvem eletrônica aromática, quando variou-se a [AAC] no sistema CDNB – AAC.

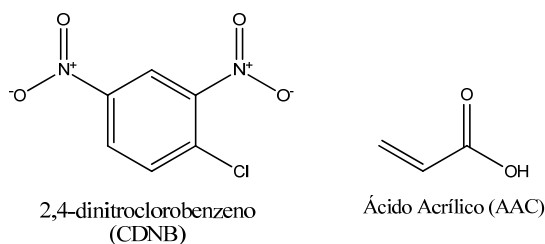


Figura 7. Estruturas do substrato CDNB e monômero AAC.

O valor de K_{ap} determinado por espectrofotometria no UV - Vis para o sistema CDNB – AAC foi de $2,457 \text{ M}^{-1}$, um valor intermediário entre os valores determinados, por espectrofotometria no UV – Vis, para o CDNB e os monômeros aromáticos VZOL e VPY.

5.2 Estudos de Associação Molecular com o substrato S-(4-carboxibenzil)glutaciona

O S-(4-carboxibenzil)glutaciona (CBSG) é um composto que deve ter estrutura análoga ao produto da reação estudada. O CBSG pode ser, portanto, um substrato no preparo de MIP's que catalisem tal reação. Dessa forma, foram realizados estudos de interação entre o CBSG e os monômeros funcionais (ligantes) VZOL, VPY e AAC. O valor de K_{ap} para tais sistemas foi obtido por espectrofotometria no UV-Vis e RMN ^1H .

Os valores obtidos das K_{ap} para a associação entre CBSG e os monômeros VPY, VZOL e AAC estão expostos na tabela 5.

Tabela 4. Valores de K_{ap} para os sistemas CBSG – VZOL, CBSG – VPY e CBSG – AAC usando DMSO ou DMSO d^6 como solvente, a 25°C .

$K_{ap} (\text{M}^{-1})$	CBSG – VZOL	CBSG – 4-VPY	CBSG – AAC
UV-Vis	0,000501	0,0884	1,31
RMN ^1H	0,00373	0,00448	1,96

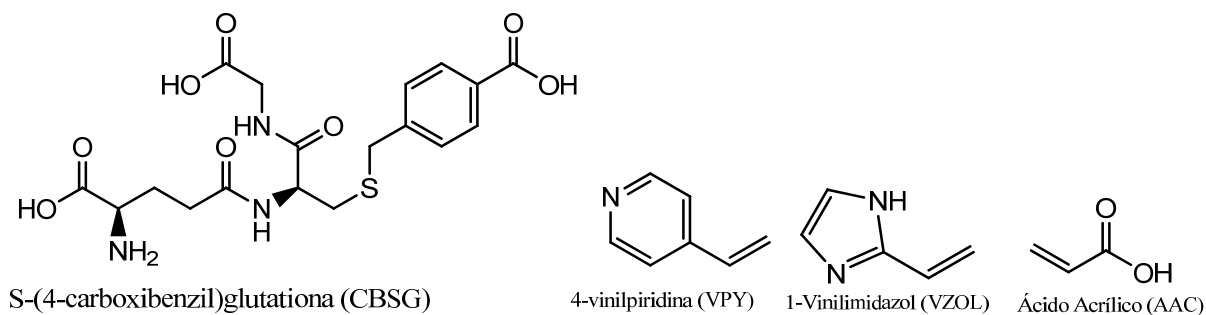


Figura 8. Estruturas do substrato CBSG e monômeros VPY, VZOL e AAC.

Novamente, pode-se observar que os valores numéricos das K_{ap} diferem de acordo com a técnica utilizada para tal determinação – espectrofotometria no UV-Vis ou RMN ^1H . Como já citado, isso ocorre devido aos diferentes fenômenos de observação em que se baseia cada técnica utilizada, levando a observação de diferentes complexos em solução. As constantes de associação para os sistemas CBSG – VZOL e CBSG – 4-VPY apresentaram valores relativamente baixos de K_{ap} , mas deve-se salientar, mais uma vez, que os valores de K_{ap} tanto por UV-Vis quanto por RMN ^1H são coerentes e indicam uma interação entre CBSG e 4-VPY mais intensa em relação a interação entre CBSG e VZOL.

Com o substrato CBSG, diferentemente do que ocorreu com o CDNB, foi possível a determinação da K_{ap} com o AAC também por RMN ^1H , acompanhado o próton ácido do CBSG em 8,61 ppm. Contudo, não houve variação no deslocamento químico dos hidrogênios aromáticos do CBSG, indicando uma interação muito fraca ou nula entre o AAC e os hidrogênios aromáticos do CBSG.

A constante de associação para o sistema CBSG – AAC apresenta um valor maior, tanto por UV-Vis como por RMN ^1H , do que o valor determinado entre os monômeros aromáticos e o mesmo substrato. Isso pode ser racionalizado em termos da natureza da interação presente no sistema CBSG – AAC. Em tal sistema, a força de interação deve ser do tipo ligações de hidrogênio, que devem ser mais intensas do que as interações π - π *stacking* que ocorrem entre o anel aromático presente na molécula do CBSG e cada monômero aromático.

Interações através de ligações de hidrogênio podem favorecer a formação de complexos moleculares com valores altos de K_{ap} . Porém, devem ser também consideradas as interações entre o solvente com o CBSG e o ácido acrílico. O solvente nesse caso, DMSO, é reconhecido como sendo um solvente capaz de interagir fortemente com substâncias próticas e grupos polares. Assim, o DMSO pode interagir fortemente com o CBSG e o AAC, desfavorecendo a formação do complexo CBSG – AAC. O motivo do uso de DMSO em tais estudos é o fato desse solvente ser o único solvente comum de laboratório, junto com o DMF, capaz de solubilizar o substrato CBSG.

Além disso, o DMSO pode ser encontrado mais facilmente que o DMF na sua forma deuterada para estudos com RMN ^1H .

5.3 Estudos de Associação Molecular com o substrato S-(2,4-dinitrofenil)-glutaciona

O S-(2,4-dinitrofenil)-glutaciona (GSDNB) é o produto da reação estudada e um composto que deve ter estrutura análoga ao estado de transição de tal reação. O GSDNB pode ser, portanto, um substrato no preparo de MIP's que catalisem tal reação. Dessa forma, foram realizados estudos de interação entre o GSDNB e os monômeros funcionais (ligantes) VZOL, VPY e AAC. O valor de K_{ap} para tais sistemas foi obtido por espectrofotometria no UV-Vis. Estudos por RMN ^1H com o GSDNB não puderam ser realizados devido a dificuldades em encontrar, experimentalmente, a faixa de concentração em que tais sistemas obedecem às condições de Benesi – Hildebrand e apresentam a linearidade desejada. De qualquer forma, os estudos por UV-Vis apresentaram coerência com os estudos realizados para o CBSG e CDNB, já discutidos, e os resultados obtidos por UV-Vis para o GSDNB foram satisfatórios para obtenção de informações sobre tais sistemas.

Os valores obtidos das K_{ap} para a associação entre GSDNB e os monômeros VPY, VZOL e AAC estão expostos na tabela 6:

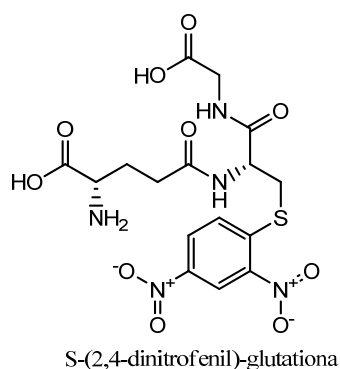


Figura 9. Estrutura do substrato GSDNB.

Tabela 5. Valores de K_{ap} para os sistemas GSDNB – VZOL, GSDNB – VPY e GSDNB – AAC usando DMSO como solvente, a 25°C.

K_{ap} (M^{-1})	GSDNB – VZOL	GSDNB – 4-VPY	GSDNB – AAC
UV-Vis	2,13	93,2	30,73

Pelos valores das K_{ap} entre GSDNB e AAC e entre GSDNB e VPY, pode-se inferir que o GSDNB, dentre os substratos estudados, é o que possui interações mais intensas com todos os monômeros estudados. Assim, tal substrato deve ser o melhor para a síntese de MIP's que atuem na reação que se objetiva catalisar.

6. CONCLUSÃO

Uma etapa importante na construção de polímeros molecularmente impressos (MIP's) envolve os estudos de pré-polimerização, que podem ser feitos através da determinação das constantes de associação (K_{ap}) entre um substrato e diferentes monômeros funcionais (ligantes) através do método de Benesi – Hildebrand.

Neste trabalho, buscou-se a otimização de substratos e monômeros funcionais candidatos ao uso em MIP's para catálise na reação de substituição nucleofílica aromática entre a glutatona, um tripetídeo, e o 2,4 – dinitroclorobenzeno, um xenobiótico.

Os substratos estudados foram o 2,4 dinitroclorobenzeno (CDNB), S-(4-carboxibenzil)glutaciona (CBSG) e S-(2,4-dinitrofenil)-glutaciona, e os monômeros funcionais foram o ácido acrílico (AAC), 4-Vinilpiridina (4-VPY) e 1-Vinilimidazol (VZOL). As K_{ap} puderam ser determinadas por diferentes técnicas, espectroscopia no UV-Vis e RMN ^1H , apresentando valores relativamente pequenos quando comparados a valores de associação molecular de complexos moleculares reportados na literatura. As associações entre GSDNB e os três monômeros estudados mostraram-se as mais favoráveis e tal substrato deve ser o melhor para uso em MIP's.

A análise comparativa entre as duas técnicas usadas – Espectrofotometria no UV – Vis e RMN ^1H revelou coerência entre as medições realizadas nos diversos sistemas e também com os diferentes fenômenos explorados em cada técnica de medição. Esse fato advoga em favor da eficácia do método de Benesi – Hildebrand para estudos de complexos moleculares em solução.

Os experimentos apontaram para um papel importante do solvente no design de MIP's, contruídos a partir de interações não covalentes entre o substrato e o monômero funcional (ligante). Os valores de K_{ap} foram relativamente baixos, porém isso deve ocorrer devido ao uso do solvente DMSO, que deve interagir fortemente com hidrogênios ácidos e grupos polares presentes nos substratos e monômeros. Essa forte interação com o solvente desfavorece a formação do complexo molecular desejado para a construção de MIP's com cavidades efetivas.

A construção de MIP's para catálise na reação desejada deve ser feita, seguindo as conclusões obtidas nesse trabalho, de forma a usar o GSDNB como substrato. Derivatizações em grupos funcionais do GSDNB podem ser feitas para aumentar sua solubilidade em um solvente orgânico menos polar e favorecer então, a formação de complexos moleculares para uso na construção de MIP's.

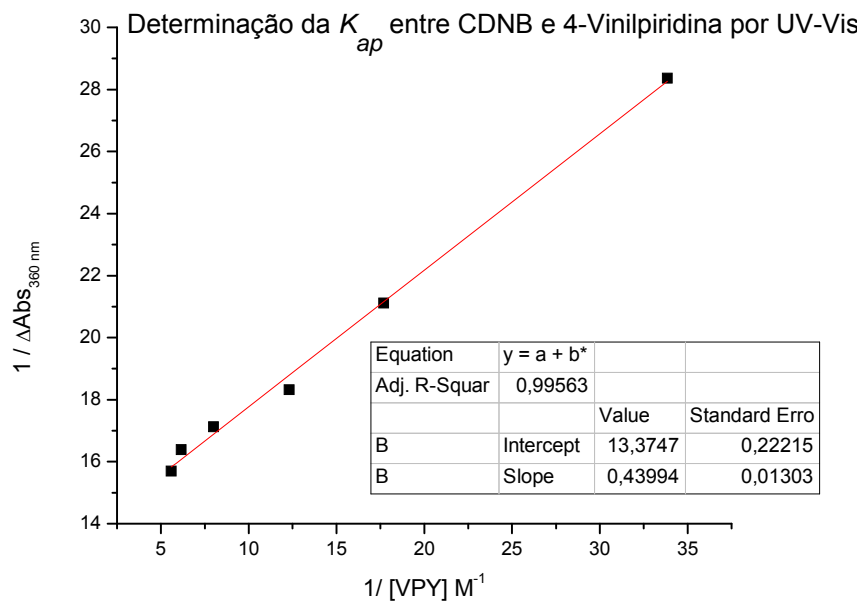
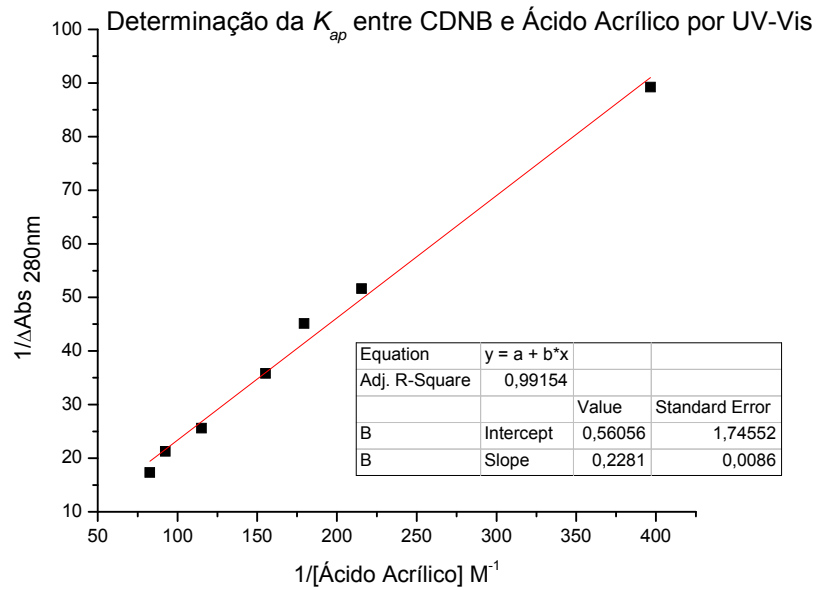
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WULLF, Gunter. Enzyme-like Catalysis by Molecularly Imprinted Polymers. Institute of Organic Chemistry and Macromolecular Chemistry, Heinrich-Heine-University Dusseldorf, Universitätsstr. 1, D-40225 Dusseldorf, Germany, **2002**
2. PAULA, A. V. ; MOREIRA, A. B. R. ; BRAGA, L. P. ; DE CASTRO, H. F. ; BRUNO, L. M. ; Comparação do desempenho da lípase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte híbrido de polissiloxano – polivinilálcool empregando diferentes metodologias . *Química Nova*, 31, 1, **2008**.
3. SOTOMAYOR, M. P. T.; KUBOTA, L. T.; Enzymeless Biosensors: Uma nova area para o desenvolvimento de sensores aperométricos. *Química Nova*, 25, 1, **2002**.
4. IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Electronic version, <http://goldbook.iupac.org/XT06755.html>. Aparecida Bagatin, São Paulo: Pioneira Thomson Learning, **2005**. Acessado em 19/06/2009.
- 5 HUBER, P. C. ; ALMEIDA, W. C. ; DE FATIMA, A. ; Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, 31, 5, **2008**.
6. KARIM, K., BRETON, F., ROUILLON, R., PILETSKA, E. V., GUERREIRO, A., CHIANELLA, I.; PILETSKY, S A. How to find effective functional monomers for effective molecularly imprinted polymers? *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 1795 – 1808, **2005**.
7. FANG, C., YI, C., WANG, Y., CAO, Y., LIU, X. Electrochemical Sensor based on molecular imprinting by photo – sensitive polymers. *School of Chemical and Material Engineering*, 24(10), 3164 -9, **2009**.
8. ALVAREZ LORENZO, C.; CONCEIRO, A.; Molecularly imprinted polymers for drug delivery. *Journal of Chromatography B*, 804, 231 -245, **2004**.
9. FARRINGTON, K.; MAGNER, E.; REGAN, F. Predicting the performance of molecularly imprinted polymers: selective extraction of caffeine by molecularly imprinted solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta* 566, 60 – 68. **2006**.
10. LI, Y., ZHANG, L., CHENG, Z.; Synthesis of an enzyme-like imprinted polymer with the substrate as the template *Chemistry – A European Journal*, 10, 3555– 3561, **2004**.
11. SPIVAK, D. A. Optimization, evaluation, and characterization imprinted polymers. *Advanced Drug Delivery Reviews* 57, 1779– 1794, **2005**.

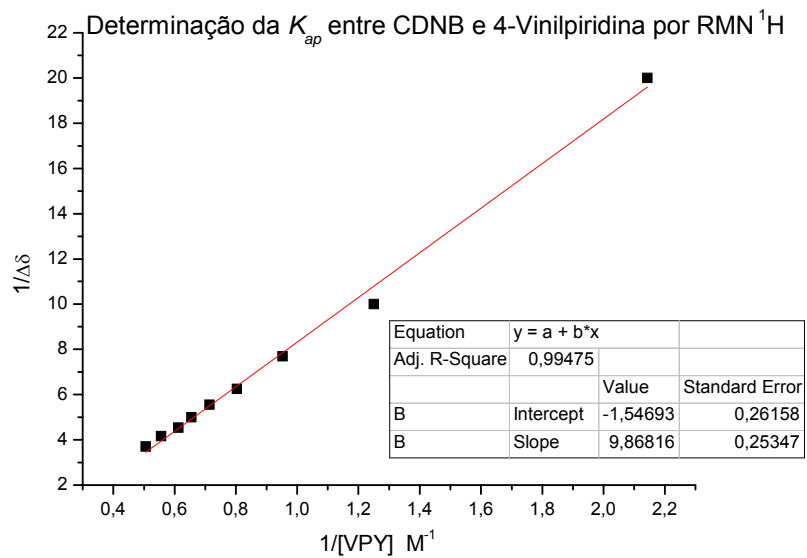
12. DAVIES, M.P., DE BIASI, V., PERRETT, D., Approaches to the rational design of molecularly imprinted polymers, *Anal. Chim. Acta*, 504, 7 – 14, **2004**
13. CONNORS, K. A. Binding constants, John Wiley & Sons, Inc., New York, **1987**.
14. WANG, R., YU, Z. Validity and Reability of Benesi – Hildebrand Method. *Acta Physico – Chimica Sinica*.23(9), 1353 – 1359. **2007**.
15. HIROSE, K. A Practical Guide for the Determination of Binding Constants. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 39, 193–209, **2001**
16. SAUNDERS, B.C. Glutathione. Its reaction with alkali and some N and S derivatives. *Biochem. J.*, 1977–1981, **1934**.
17. LIMA, D. C., Estudos Cinéticos da Reação de S_NAr entre Glutathione e 2,4-Dinitroclorobenzeno em Sistemas Agregados. In: Departamento de Química, *Trabalho de Conclusão de Curso*, UFSC, Florianópolis, **2007**.
18. SU, D., REN, X., YOU, D., LI, D., MU, Y., YAN, G., ZHANG, Y., LUO, Y., XUE, Y., SHEN, J., LIU, Z., LUO., G. Generation of Three Selenium-Containing Catalytic Antibodies with High Catalytic Efficiency Using a Novel Hapten Design Method. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 177–184, **2001**.

8. ANEXOS

8.1 Anexos I: Espectros e Gráficos de Benesi Hildebrand para o 2,4 - Dinitroclorobenzeno obtidos por Espectrofotometria no UV - Vis

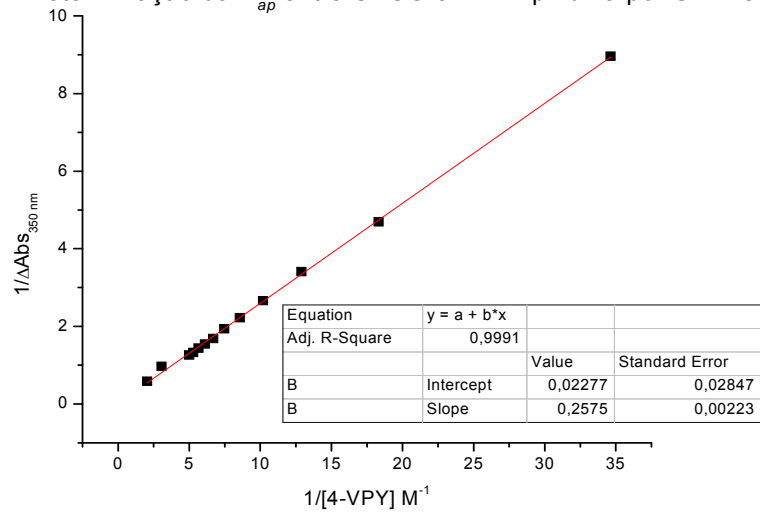


8.2 Anexos II: Espectros e Gráficos de Benesi Hildebrand para o 2,4 - Dinitroclorobenzeno obtidos por RMN ^1H

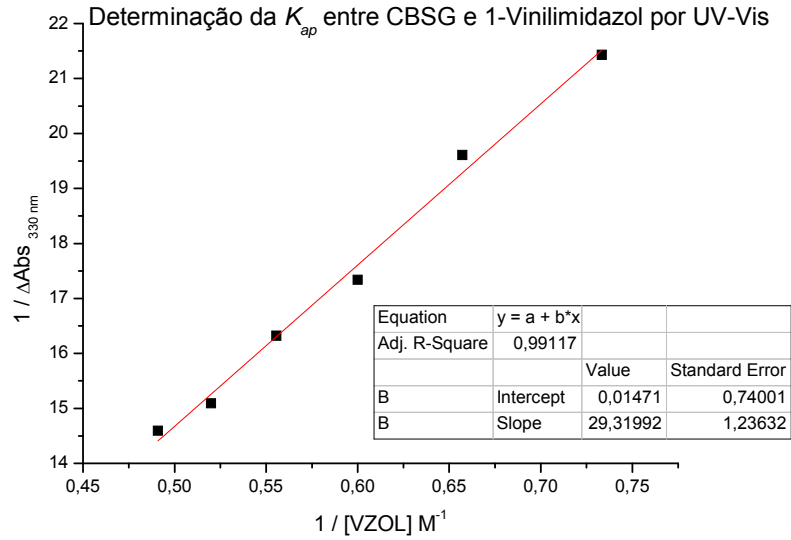


8.3 Anexos III: Espectros e Gráficos de Benesi Hildebrand para o S-(4-carboxibenzil)glutaciona obtidos por Espectrofotometria no UV - Vis

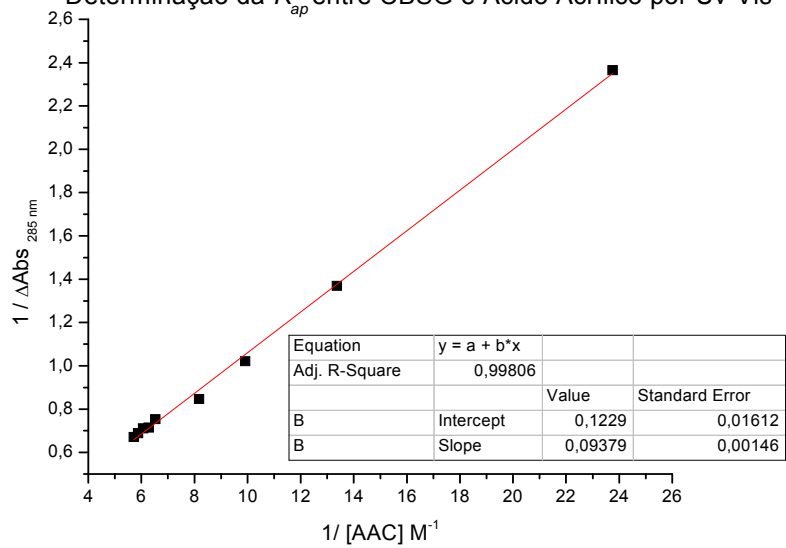
Determinação da K_{ap} entre CBSG e 4-Vinilpiridina por UV-Vis



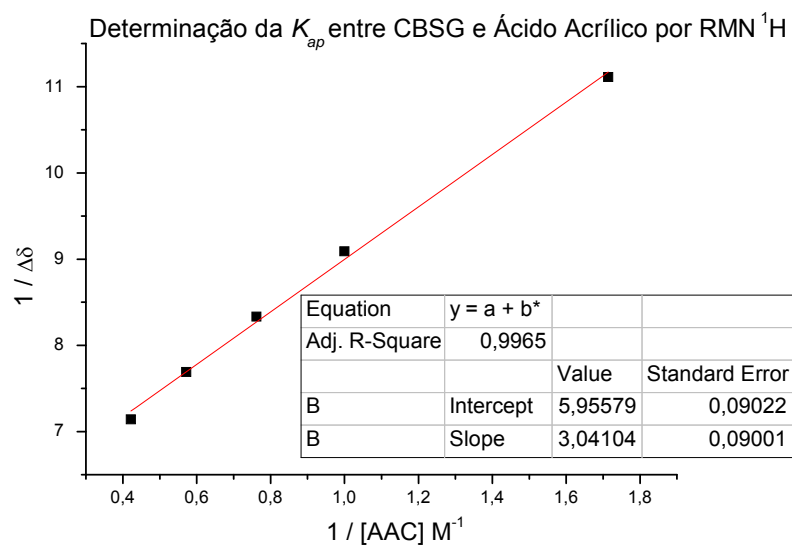
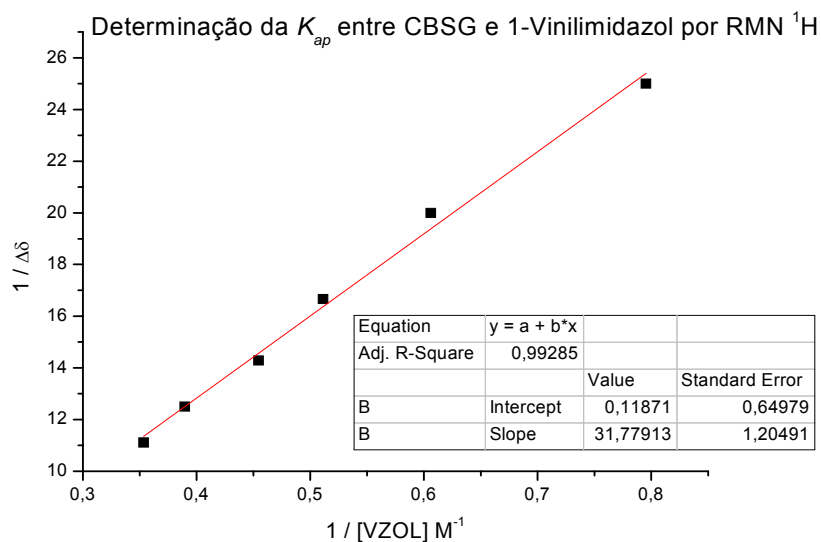
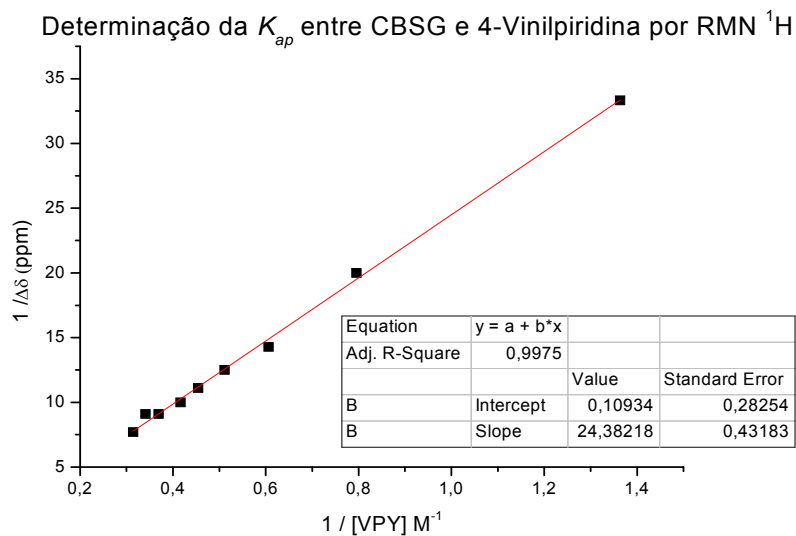
Determinação da K_{ap} entre CBSG e 1-Vinilimidazol por UV-Vis



Determinação da K_{ap} entre CBSG e Ácido Acrílico por Uv-Vis

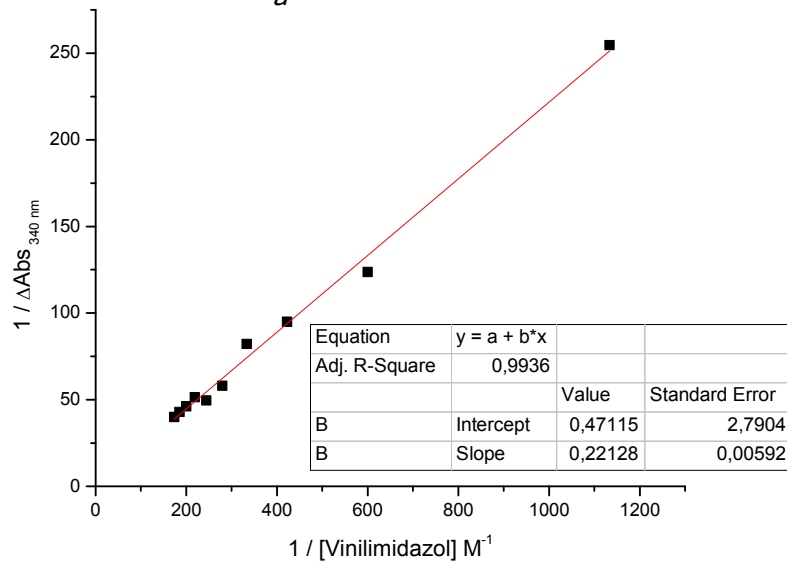


8.4 Anexos IV: Espectros e Gráficos de Benesi Hildebrand para o S-(4-carboxibenzil)glutona obtidos por RMN ¹H

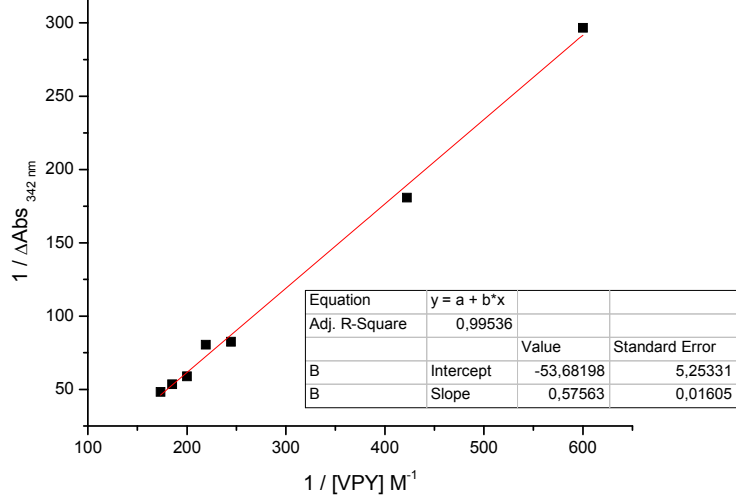


8.5 Anexos V: Espectros e Gráficos de Benesi Hildebrand para o S-(2,4-dinitrofenil)-glutaciona obtidos por Espectrofotometria no UV – Vis

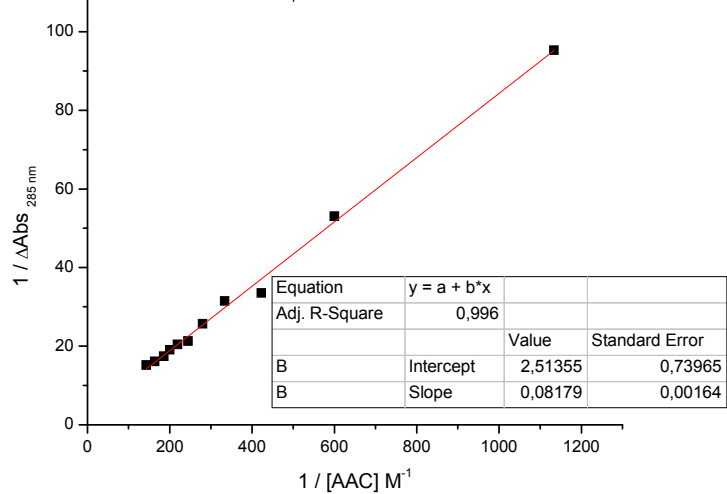
Determinação da K_a entre GSDNB e 1-Vinilimidazol por UV-Vis



Determinação da K_{ap} entre GSDNB e 4-Vinilpiridina por UV-Vis



Determinação da K_{ap} entre GSDNB e ácido Acrílico por UV-Vis



8.6 Anexos VI: Espectro inicial de RMN ^1H do substrato CDNB

