



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

HELLEN CRISTINA MORAES DOS SANTOS

**USO DE CDOTS COMO MATRIZ IONIZANTE NA IDENTIFICAÇÃO DO CORTISOL POR
MALDI-TOF MS**

BRASÍLIA, 2023

HELLEN CRISTINA MORAES DOS SANTOS

**USO DE CDOTS COMO MATRIZ IONIZANTE NA IDENTIFICAÇÃO DO CORTISOL
POR MALDI-TOF MS**

Monografia de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Farmacêutico, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Prof(a). Juliano Alexandre Chaker

BRASÍLIA, 2023

HELLEN CRISTINA MORAES DOS SANTOS

**USO DE CDOTS COMO MATRIZ IONIZANTE NA IDENTIFICAÇÃO DO CORTISOL
POR MALDI-TOF MS**

BANCA EXAMINADORA

Orientador(a): Prof. Dr. Juliano Alexandre Chaker
Universidade de Brasília
Faculdade de Ceilândia

Profª Drª. Hellen Kempfer Philippsen
Universidade Federal Rural da Amazônia, campus Belém.
Intituto Socioambiental e dos Recursos Hídricos (ISARH)

Profº Drº. Osmino Rodrigues Pires Junior
IB - Intituto de Ciências Biológicas
Departamento de Ciências Fisiológicas

BRASÍLIA, 2023

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, pois sempre acreditaram em mim e me apoiaram em todas as minhas escolhas.

Principalmente a minha mãe Silvânia Ramos, que não mediu esforços para que eu pudesse chegar até aqui, abdicou de desejos e sonhos para manter meus estudos e lutou dia após dia para que eu concluísse a minha graduação.

Ao meu padrasto Ronny José Gomes por ter me proporcionado tudo que estava ao seu alcance para que eu pudesse chegar até aqui, e ao meu tio Sidinei, que não está mais entre nós, sempre me incentivou e acreditou que eu poderia ir além e realizar todos os meus sonhos.

Ao meu pai Robson Moraes e minha madrasta Valdeniza dos Santos por todo incentivo e constância nos meus estudos e por toda dedicação.

Ao meu amor, Rafael Melo, por toda ajuda, compreensão, companheirismo, paciência, conselhos, enxugadas de lágrimas, por não me deixar desistir, por me proporcionar muitos momentos de alegria no meio do caos, por ser meu porto seguro, sem você eu não conseguiria chegar até aqui.

As minhas amigas Letícia Chies, Amanda Pereira, Ester Moraes, Raquel Andrade, Milena Silva, que me acompanham a bastante tempo, vocês fazem parte dessa formação por compartilharem momentos de alegrias, tristeza, puxões de orelhas, e obrigada por todos os conselhos e por estares comigo até hoje.

A todos que de alguma forma contribuíram e participaram dessa linda caminhada, obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, e a Nossa Senhora, donos de toda a ciência, disposição, sabedoria, poder, por ter me dado força para enfrentar meus medos e angústias durante essa jornada e por ter me capacitado para chegar até aqui.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Juliano Alexandre Chaker, que aceitou me orientar na realização deste projeto, por todo conhecimento passado, pela vivência e trabalhos executados em laboratório, sempre me instruindo e estando sempre disponível para tirar minhas dúvidas.

A banca de avaliadores composta pela Hellen Kempfer e Osmino Rodrigues, que prontamente aceitaram o convite de avaliar esse trabalho.

Ao laboratório de Nanotecnologia da Faculdade de Ceilândia e sua equipe, por ter aberto as suas portas e sua estrutura, para que tivesse essa oportunidade de conhecimento e realização deste trabalho.

Por fim, agradeço ao curso de Farmácia da Universidade de Brasília, principalmente a Faculdade de Ceilândia e a todos os docentes que compartilharam seu conhecimento e experiência, formando a profissional que me torno hoje.

RESUMO

Introdução: O Maldi-tof (espectrometria de massa de tempo de voo de desorção por ionização a laser assistida por matriz) vêm sendo usado como um potencial substituto para as análises utilizadas na rotina laboratorial, mas há grandes esforços para substituir suas matrizes tradicionais por nanopartículas. Os pontos de carbonos Cdots são utilizados como matriz para compostos de baixa massa molecular de íons positivos, mas principalmente de íons negativos, pois há excelentes propriedade físico-químicas, condutividade eletrônica, boa solubilidade entre outros. O cortisol tem diversas funções, mas é denominado principalmente o hormônio do estresse, e com isso a amostra capilar vem sendo utilizada como dosímetro biológico pois tem a capacidade de identificação sistêmica do hormônio a grandes períodos. **Objetivos:** O objetivo da pesquisa é o desenvolvimento de metodologia de identificação de cortisol a partir de amostras capilares obtidas de formas não invasivas, utilizando Cdots como matriz ionizante, juntamente com a espectrometria de massas MALDI-TOF/MS, auxiliando na qualificação e monitoração de doenças relacionadas a este hormônio. **Materiais e métodos:** As amostras capilares utilizadas no estudo foram adquiridas de forma não invasiva e as mesmas passaram por um processo de lavagem, corte e extração com metanol e acetona e secagem. Foram suspensas com matriz ionizante de carbono dots e analisados. **Resultados e discussões:** O processo de análise foi de espectros com massa carga (m/z) de 150 a 600. As amostras foram comparadas com padrão de cortisol e com matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmico. As amostras com Cdots detectaram o cortisol em sua amostra pura, quanto com o padrão e detectou o cortisol metabolizado em 378 m/z na amostra capilar, mostrando sinais limpos, sem interferências, se mostrando de fácil leitura e facilidade de detecção. **Conclusão:** Conclui-se que os Cdots são a grande aposta como nova matriz de análise de MALDI-TOF de pequenas moléculas, pois além de sua ampla aplicabilidade, há um grande favorecimento de análise, alta estabilidade e baixa interferência de sinais. Este método pode ser aplicado em análises de várias moléculas pequenas e auxiliar na pesquisa de análise de varios compostos biológicos.

Palavras chaves: Cortisol, MALDI, capilar, matrizes ionizantes, Cdots , baixa massa molecular;

ABSTRACT

Introduction: MALDI-TOF (matrix-assisted laser ionization desorption time-of-flight mass spectrometry) has been used as a potential substitute for routine laboratory analyses, but there are great efforts to replace their traditional matrices with nanoparticles. Carbon dots are used as a matrix for low molecular mass compounds of positive ions, but mainly negative ions, as they have excellent physicochemical properties, electronic conductivity, good solubility, among others. Cortisol has several functions, but it is mainly called the stress hormone, and with that the capillary sample has been used as a biological dosimeter because it has the ability to systematically identify the hormone for long periods. **Objectives:** The objective of the research is the development of methodology for the identification of cortisol from capillary samples obtained in non-invasive ways, using Carbon dots as an ionizing matrix, together with mass spectrometry MALDI-TOF/MS, helping in the qualification and monitoring of diseases related to this hormone. **Materials and methods:** The capillary samples used in the study were acquired non-invasively and they underwent a process of washing, cutting and extraction with methanol and acetone and drying. They were suspended with carbon dots ionizing matrix and analyzed. **Results and discussions:** The analysis process was of charge mass spectra (m/z) from 150 to 600. The samples were compared with cortisol standard and with α -cyano-4-hydroxycinnamic matrix. Samples with Carbon dots detected cortisol in their pure sample, as well as with the standard and detected metabolized cortisol at 378 m/z in the capillary sample, showing clean signals, without interference, proving to be easy to read and easy to detect. **Conclusion:** It is concluded that the Carbon dots are the big bet as a new matrix for the analysis of MALDI-TOF of small molecules, because in addition to its wide applicability, there is a great favoring of analysis, high stability and low interference of signals. This method can be applied in the analysis of various small molecules and aid in the research analysis of various biological compounds.

Keywords: Cortisol, MALDI, capillary, ionizing matrices, Carbon dots, low molecular mass;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema gráfico da síntese e liberação do cortisol.....	2
Figura 2. Esquema gráfico do funcionamento de um equipamento de MALDI-TOF.....	4
Figura 3. Nanopartículas de Carbono Cdots - CdotR e CdotB dopados com Nitrogênio.....	8
Figura 4. : Espectograma de matriz de Cdots B, Cdot R e α -ciano-4-hidroxicinâmico(HCCA).....	12
Figura 5. Espectograma em faixa de laser 358 nm a 372 nm em modo reflector positivo em matriz de Cdot B adicionada amostra de cortisol padrão (cortisol deuterado D4) e amostra capilar.....	13
Figura 6. Espectograma em faixa de laser 105 nm a 740 nm em modo reflector positivo em matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmico(HCCA) adicionada amostra capilar.....	14
Figura 7. Espectograma em faixa de laser 100 nm a 746 nm em modo reflector positivo em matriz de Cdot B adicionada amostra capilar.....	14
Figura 8. Espectograma em faixa de laser 359 nm a 366 nm em modo reflector positivo em matriz de Cdot B adicionada amostra capilar.....	15

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Matrizes mais utilizadas no MALDI-TOF.....	6
---	---

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight

HPA - Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal

GC – Glicocorticoide

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

CRH – Corticotropina

HHA - Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

CHCA - Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

HCCA - Ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico

AS – Ácido sinapínico

DHB – Ácido gentísico

CDOTS - Carbon Dots

6 β -OHF - 6 β -hidroxicortisol

CYP3A4 - Citocromo p450

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	2
2.1 CORTISOL.....	2
2.2 MALDI-TOF	4
2.3 MATRIZES IONIZANTES.....	5
2.4 C-DOTS	7
3. JUSTIFICATIVA	9
4. OBJETIVOS	10
4.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	10
5. METODOLOGIA.....	11
5.1 CONSIDERAÇÕES ETICAS.....	11
5.2 COLETA E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS.....	11
5.3 EXTRAÇÃO DO CORTISOL.....	11
5.4 PREPARO DA PLACA DO MALDI-TOF.....	12
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
7. CONCLUSÃO	16
8. REFERÊNCIAS	17

1. Introdução

O cortisol é um hormônio que está diretamente ligado a diversas atividades regulatórias de sistemas importantes do corpo ⁽¹⁾, é produzido nas Glândulas Suprarrenais (especificamente na zona fasciculada e zona reticular), e é o principal glicocorticoide (GC) endógeno humano secretado em resposta ao hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) ⁽²⁾, liberado pelo eixo hipotalâmico pituitária-adrenal (HPA) em caso de estresse ⁽³⁾.

Em condições de estresse, o organismo começa a agir fisiologicamente, secretando uma grande quantidade de cortisol ⁽⁴⁾, considerado um dos seus principais hormônios ⁽⁵⁾. Sendo assim gerando uma resposta muito complexa do organismo, envolvendo reações físicas, psicológicas, mentais e hormonais às adversidades ⁽⁶⁾.

As concentrações de cortisol são mensuradas utilizando amostras de plasma, saliva, urina e, o suor, mas apesar de serem métodos bem estabelecidos na comunidade acadêmica, é importante salientar que essas medidas refletem apenas níveis agudos do hormônio, contemplando períodos de no máximo 24 horas.

A partir disso, a utilização do cortisol capilar mostra-se com grande potencial para suprir esses espaços metodológicos ⁽⁴⁸⁾, pela sua grande capacidade de retenção e devido a isso há o armazenamento por um período de tempo relativamente longo de várias substâncias ⁽⁷⁾. Devido a esta característica, autores denominam o cabelo como “dosímetro biológico” ⁽⁸⁾; Uma vantagem do uso de cabelo é fato de que é uma matriz muito estável, de transporte, armazenamento, de coleta fácil e não invasiva, podendo ainda apresentar concentração dos compostos de 50 a 100 vezes superior a outros tipos de matrizes ^(9,10).

Dentre os métodos utilizados para a qualificação de cortisol em matrizes biológicas destacam-se técnicas de imunoensaios, e coleta de sangue o que muitas vezes levam a erros de dosagem dado os ciclos circadianos e flutuações de metabolismo. Com isso essa pesquisa tem como proposta o desenvolvimento de metodologias de identificação de cortisol capilar, fazendo o uso da

espectrometria de massas MALDI-TOF (do inglês, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight), usando nanopartículas de carbono Cdots como matriz ionizante para suprir esses desafios metodológicos acerca de medidas de cortisol no sangue.

2. Fundamentação teórica

2.1. Cortisol

O Cortisol é um glicocorticóide liberado através da estimulação do eixo hipotalâmico- pituitária-adrenal (HPA). Com diversas funções em respostas imunes e inflamatórias, é considerado o hormônio do estresse, por ser liberado em grande quantidade sob condições estressantes ⁽⁴¹⁾

A secreção do cortisol depende da estimulação de uma cascata de reações, que pode ser ativada por diferentes motivos, sejam eles fisiológicos ou ambientais. O hormônio liberador da corticotropina (CRH), produzido no hipotálamo é o primeiro elemento dessa cascata. O CRH é liberado na eminência média do hipotálamo e age na hipófise anterior produzindo e estimulando a secreção da corticotropina (ACTH) ⁽⁴²⁾.

A ACTH, também denominada adrenocorticotrófico é o principal responsável pela liberação do cortisol, pois age diretamente no córtex na glândula suprarrenal, fazendo assim sua síntese e liberação do cortisol e seus precursores ⁽⁴³⁾. Esse conjunto de estruturas envolvidas na secreção do cortisol recebe o nome de eixo hipotálamohipófise-adrenal (HHA, ou eixo hipotálamo pituitária-adrenal - HPA) ⁽⁴²⁾, como poder ser observado na figura 1 (FIGURA 1)

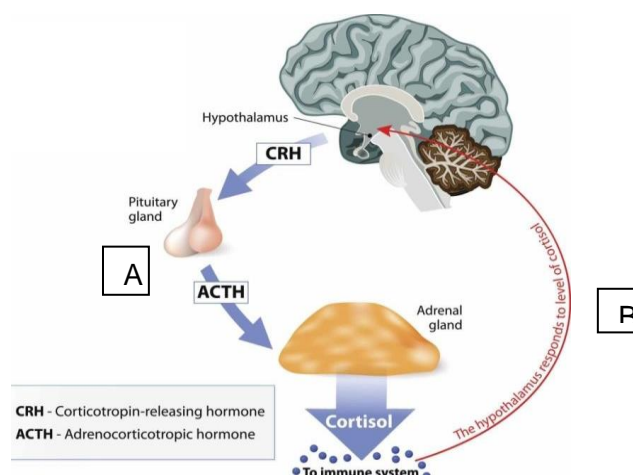


Figura 1 - Esquema gráfico da síntese e liberação do cortisol. (A) Cascata de secreção do cortisol. (B) Sistema de retroalimentação do cortisol. **Fonte:** Verywell health, 2021.

O controle da secreção do CRH é feito a partir de um sistema de retroalimentação (FIGURA 1), ou seja, altas concentrações de cortisol na circulação inibem a liberação do CRH e ACTH, que por fim inibirão o próprio cortisol⁽⁴²⁾.

Alterações nas concentrações de cortisol podem desencadear uma série de doenças e complicações na saúde de diferentes indivíduos. A secreção diminuída do hormônio possui relação com diferentes quadros depressivos. Por outro lado, a exposição prolongada a elevados níveis do glicocorticóide pode modificar a pressão sanguínea e as concentrações de insulina, aumentando o risco de desenvolvimento de diabetes, hipertensão arterial e doenças ateroscleróticas⁽⁴³⁾. Sua secreção aumentada também pode ser vista em doenças agudas como infarto do miocárdio e infecções⁽⁴⁴⁾, além de ser altamente relacionada com os sintomas da Doença de Alzheimer e Síndrome de Cushing.

As concentrações de cortisol são mensuradas utilizando amostras de plasma, saliva, urina e, mais recentemente, o suor. Apesar de serem métodos bem estabelecidos na comunidade acadêmica, é importante salientar que essas medidas refletem apenas níveis agudos do hormônio, contemplando períodos de no máximo 24 horas⁽⁵⁰⁾.

A medição do cortisol no cabelo é um método recentemente desenvolvido para medir os níveis do GC em longo prazo⁽⁴⁵⁾, pois a análise do cortisol capilar apresenta um meio complementar de monitorar o estresse, identificando a exposição sistêmica a esse GC, por períodos mais longos⁽⁴⁶⁾.

Apesar de se tratar de um método relativamente novo, o cortisol capilar apresenta importantes vantagens⁽⁴⁷⁾, tal como facilidade na coleta de forma não invasiva, estabilidade, facilidade de transporte^(9,10), armazenamento em temperatura ambiente, não dependência da aderência da amostra para realização do estudo⁽⁴⁸⁾ e podendo ainda apresentar concentração dos compostos de 50 a 100 vezes superior a outros tipos de matrizes^(9,10). No entanto, ainda existem importantes lacunas acerca dos protocolos para coleta, extração e avaliação do cortisol a partir do cabelo, assim como de um valor padrão estimado para a concentração deste hormônio em indivíduos saudáveis.

2.2.MALDI-TOF

O MALDI- TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight) ⁽¹¹⁾ trata-se de um espectrômetro de massas sequencial, com fonte de ionização do tipo MALDI (ionização a laser assistida por matriz) com dois analisadores de massa do tipo TOF (tempo de voo).

Consiste num sistema no qual a amostra é colocada em uma placa em que contém a matriz, e um feixe de laser é irradiado sobre a mistura amostra/matriz, a energia é absorvida pela matriz, onde há uma transferência de prótons da matriz para a amostra ionizando as moléculas e ao mesmo tempo desencadeando o processo de dessorção, possibilitando a passagem da amostra para o estado gasoso ⁽¹²⁾ . Os íons formados são acelerados por meio de um campo elétrico dentro de um tubo de vácuo e individualmente analisados, por um analisador do tipo TOF (tempo-de-voo), e posteriormente, detectados pelo detector (FIGURA 2)⁽¹³⁾. Desse modo, os analitos, separados por TOF formam espectros de massa de acordo com sua razão m/z (massa/carga) e com picos que indicam quantidades variáveis de cada substância analisada ⁽¹²⁾. Uma base de dados computadorizada interpreta e fornece o resultado e obtém-se um gráfico específico⁽¹⁴⁾

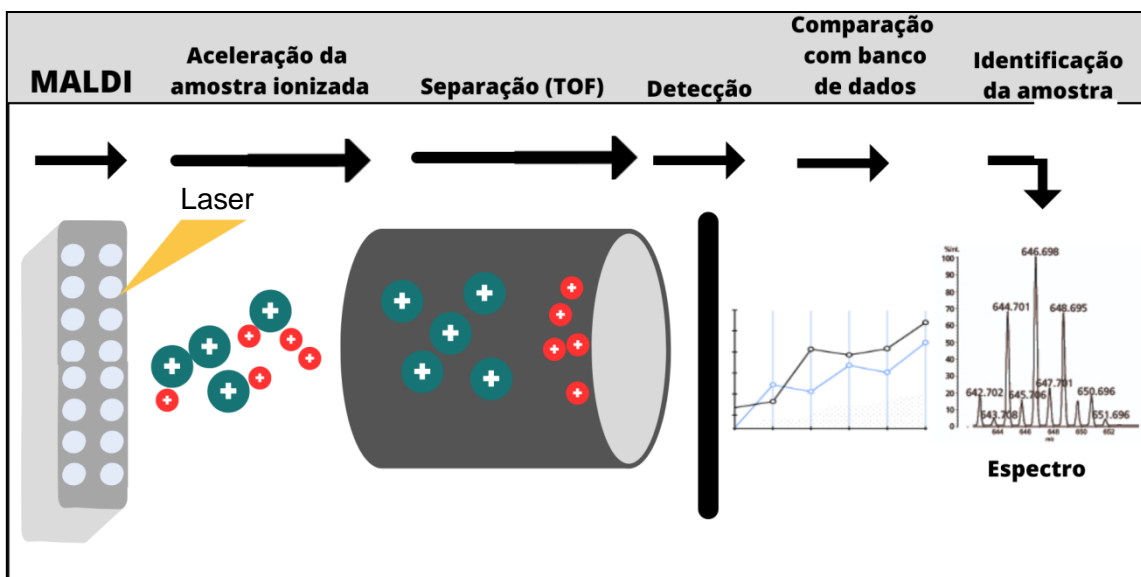


Figura 2 - Esquema gráfico do funcionamento de um equipamento de MALDI-TOF durante a identificação de uma amostra.

Fonte: Autoria própria

O MALDI-TOF está sendo apontado como um potencial substituto para as metodologias atualmente utilizadas na rotina laboratorial ⁽¹⁵⁾. Pois tem a vantagem de rapidez na análise, preparo mínimo de amostras para análise, entre outras.

Apesar do MALDI-TOF ter se tornado uma ferramenta fundamental para a análise de compostos de alto peso molecular, a detecção de moléculas orgânicas de baixa massa, usando MALDI-TOF, é dificultada ⁽¹⁶⁾, pois a matriz geralmente age como interferente na mesma faixa espectral em analitos de baixa massa, o que inclui drogas de abuso e hormônios esteroides. Com isso há vários esforços na literatura para achar matrizes ionizantes que não são interferentes no espectro de baixa massa

2.3. Matrizes ionizantes

Matriz lônica é a denominação dada aos líquidos iônicos que possuem a capacidade de promover a ionização em MALDI ⁽¹⁷⁾. As matrizes no MALDI possuem o principal papel de absorver a energia do laser, para então, dissolver e ionizar o analito, geralmente são compostos orgânicos de baixa massa molecular, e possuem a capacidade máxima de absorção de energia no comprimento de onda do laser utilizado. Estas matrizes devem apresentar algumas características, tais como: ser estáveis nas condições de vácuo utilizadas pelo equipamento e não podem reagir com o analito ⁽¹⁸⁾.

A escolha da matriz de MALDI-TOF/MS é crucial para o sucesso do experimento, suas principais utilidades são: auxiliar no rompimento das células e extrair proteínas; separar as moléculas de proteínas que estão aderidas; absorver a energia do laser e provocar a dessorção das moléculas (extração da placa sólida onde estão aderidas para o estado gasoso); e doar íons H⁺ para as moléculas da amostra, que se tornam íons de carga positiva⁽¹⁹⁾.

As matrizes mais utilizadas são derivadas do ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA), ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico (AS) e ácido 3-hidroxi-2-piridinocarboxílico (HPA) que geralmente são empregados nas análises de peptídeos, proteínas, lipídeos, ácido nucleicos entre outros ⁽²⁰⁾, como mostrado na tabela(TABELA 1).

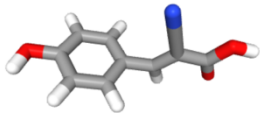
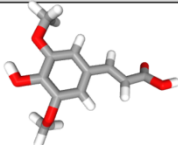
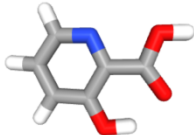
MATRIZ	ESTRUTURA
<p>Ácido α-ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA)</p>	
<p>Ácido sinapínico (AS) Ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinâmico</p>	
<p>Ácido 3-hidroxipicolínico Ácido 3-hidroxi-2-piridinocarboxílico</p>	

Tabela 1: Matrizes mais utilizadas no MALDI-TOF MS

Fonte: Autoria própria

As matrizes orgânicas de alta massa como α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA), vem sendo utilizadas a anos como matriz de análise de compostos orgânicos, mas dificultam interpretação e análise dos espectros de massas já que podem, além de causar a supressão iônica do analito, possuir a mesma razão m/z destes compostos ^(21,22).

Existem grandes esforços para substituir matrizes tradicionais, ou para melhorar suas propriedades, seja pela substituição de compostos orgânicos por nanopartículas de propriedades ópticas e eletroquímicas específicas, seja pela adição de nanopartículas a matrizes orgânicas ^(23,24).

Estudos recentes em nanotecnologia, permitiram avanços significativos no desenvolvimento de matrizes com escala nanométrica, entre eles, nanopartículas de carbono têm sido aplicadas para MALDI-TOF MS para a investigação de espectrometria de massa de várias moléculas, incluindo peptídeos, lipídios, vitaminas, carboidratos, esteroides/hormônios e outros compostos ^(25,26). Onde foram testados como substratos para superar as desvantagens das matrizes orgânicas ⁽²⁷⁾ devido à sua notável mobilidade de carga e propriedade de absorção óptica universal, que alimentam a demanda de uma matriz MALDI ideal ⁽²⁸⁾.

2.4. Carbon Dots (C-Dots)

Os Carbon dots (C-dots), também chamadas de pontos quânticos de carbono são nanopartículas de carbono luminescentes recém-emergidos da família de materiais de nanocarbono ⁽²⁹⁾, são pequenas estruturas, cujo diâmetro compreende o intervalo entre 1 nm e 100 nm⁽⁴⁹⁾, e possuem formas isotrópicas com dimensões ultrafinas, funcionalidades de superfície ajustáveis, pode ser solúvel em água ou solvente orgânico ⁽³¹⁾, biocompatibilidade e grande variedade de rotas sintéticas simples, rápidas e baratas ⁽³²⁾.

Os métodos de produção das nanopartículas de carbono são divididos em duas categorias fundamentais: bottom-up e top-down.

Os processos onde átomos são reunidos sob condições controladas de temperatura e pressões para dar origem ao nanomaterial, são classificados como bottom-up. Neste método, uma característica interessante é o fato de que algumas das porções químicas das moléculas precursoras podem ser encontradas na superfície dos Cdots formados ⁽³⁶⁾. Já os processos onde o ponto de partida é uma estrutura bulk, que são diminuídas até atingir a escala nano, são classificados como top-down.

Exemplos de métodos bottom-up de produção de nanopartículas de carbono são: rotas térmicas e de combustão, micro-ondas e redução química. Já no top-down, tem os métodos de produção via descarga de arco elétrico, oxidação eletroquímica, ablação a laser, dentre outros ⁽⁴⁹⁾.

Os C-dots possuem alta absorvância óptica (>335 nm), e com isso são usados como substratos para a detecção MALDI-TOF MS de compostos de baixa massa em ambos os modos (íons negativos e íons positivos), sozinho ou em combinação com matrizes orgânicas⁽³⁰⁾. O mecanismo mais provável do efeito positivo dos CDs é a melhora das propriedades ópticas, permitindo maior absorção da luz do laser e transferência de energia para o analito ⁽³³⁾.

Em pesquisas recentes, utiliza-se heteroátomos (elementos como N, S, Se, B), para dopar nanoestruturas de carbono como os C-dots, pois tem sido uma estratégia eficaz para modular suas propriedades intrínsecas permitindo a sintonização de suas propriedades químicas e ópticas ^(34,35). Dentre muitos

heteroátomos, o nitrogênio pode ser considerado um dopante ideal, devido a sua densidade eletrônica e ao seu tamanho atômico comparável ao do carbono ⁽³⁶⁾.

Como por exemplo, o p-fenilenodiamina e uréia (N-CdotR), e ácido cítrico e hidróxido de amônio (N-CdotB) (FIGURA 3), que foram utilizados neste estudo elaborados através de um método hidrotérmico ⁽³⁶⁾, onde amostras exibiram um grande número de grupos de superfície hidrofílicos, se mostrando forma mais eficiente do que as matrizes orgânicas convencionais ^(37- 38).

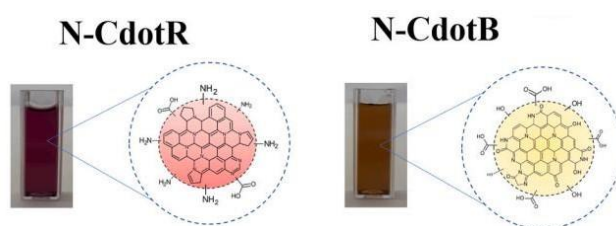


Figura 3 : Nanopartículas de Carbono Cdots - CdotR e CdotB dopados com Nitrogênio

Fonte: Adaptado de A.O da Silva et al. (2021)

3. Justificativa

Nos dias de hoje, o diagnóstico de doenças e exames laboratoriais são realizados por procedimentos invasivos, o que representam desconforto ao paciente, mas com o avanço tecnológico dos métodos de medição de amostras, as amostras capilares tem se tornado promissoras para o uso como amostra biológica e pode ser usada no diagnóstico de doenças, por ser considerado um “dosímetro biológico”, dado que pode ter em sua estrutura um histórico da concentração de determinadas substâncias ao longo do tempo⁽⁸⁾.

Os métodos convencionais utilizados nos laboratórios de análise normalmente necessitam de, pelo menos, 48h para serem realizados ⁽⁵²⁾e, o sistema do MALDI-TOF realiza o processo de identificação num curto período de tempo. Sendo assim, uma tecnologia rápida e confiável para a classificação e identificação de amostras e doenças, juntamente com a nanotecnologia tem permitido avanços revolucionários nos últimos anos em diversas áreas da Ciência, principalmente na saúde, e auxiliando no tratamento, diagnóstico, monitoramento, prevenção e controle de várias doenças humanas, onde se mostra bastante oportuno e inovador principalmente se for combinada e aplicada à amostras capilares.

4. Objetivos

O objetivo da pesquisa é o desenvolvimento de metodologia de identificação de cortisol a partir de amostras capilares obtidas de formas não invasivas, utilizando Cdots como matriz ionizante, juntamente com a espectrometria de massas MALDI-TOF/MS, auxiliando na qualificação, e monitoração de doenças relacionadas a este hormônio.

4.1. Objetivos Específicos

- Estudar metodologia de extração do cortisol de amostra capilar;
- Estudar metodologia de aplicação das amostras na porta amostra MALDI;
- Avaliar diferentes matrizes ionizantes (Matriz ionizante de nanopartículas de carbono (C-DOTS) e α -ciano-4-hidroxicinâmico(HCCA) .

5. Metodologia

5.1 Considerações éticas

O projeto possui aprovação de um Comitê de Ética, onde faz parte do projeto: Uso do cabelo como amostra não invasiva para detecção e prevenção de doenças.

CAAE n° 66549122.0.0000.8093, CEP 72220900)

5.2 Coleta e armazenamento de amostras

As amostras capilares são oriundas da própria pesquisadora e do orientador. Onde foram coletadas de forma não invasivas, onde foi efetuado o corte com auxílio de uma tesoura de aço inox, uma porção de cabelo de aproximadamente 1 cm, o mais próximo do couro cabeludo, na região do vértice posterior, situado na região distal da cabeça ⁽³⁹⁾.

O armazenamento foi feito seguindo o manual de orientação de armazenamento de amostras biológicas, onde o armazenamento deve ser feito em frasco rígido, transparente, descartável e de boca larga e tampa rosqueável⁽⁴⁰⁾

5.3 Extração do cortisol

As amostras seguiram o método de extração padrão de cortisol capilar com modificações ⁽⁵¹⁾, sendo lavadas com isopropanol e secas em temperatura ambiente, seguido de cortes no comprimento da amostra para melhorar extração e análise.

As amostras seguiram para o processo de extração, onde foi adicionado 1 ml de metanol, e colocado em agitação constante no Thermomixer (Eppendorf Thermomixer 5350 Mixer) a 52° C em 200 rpm por 15 horas. Foi adicionado 0,5 ml de acetona e levado ao Vortex (Agitador Vortex Basic 2.800 Rpm Kasvi) para agitação⁽⁵¹⁾. O sobrenadante foi transferido para outro tudo eppendorf e então foi levado a centrifuga (Eppendorf Vacufuge Vacuum Concentrator 5301) por 30 minutos aproximadamente para secagem em temperatura ambiente.

5.4 Preparo da placa do MALDI-TOF

Após a secagem, os resíduos da amostra foram suspensos separadamente com 100 µl de solução de nanopartículas de carbono Cdots B e R e agitados em vórtex até que foram completamente misturados. O cortisol deuterado D4 foi utilizado como padrão interno e suspenso com Cdots B e colocado na placa de Maldi (MaldiOpti-TOF 384 – Well Insert (123x81mm)) onde seguiram para análise no MALDI-TOF (MALDI-TOF AB SCIEX TOF/TOF™ 5800), e seus espectros visualizados no software Data Explorer.

6. Resultados e discussão

Primeiramente foi utilizada a matriz pura de Cdots B, Cdot R e α -ciano-4-hidroxicinâmico(HCCA) (FIGURA 4) para visualização de seus respectivos espectros sem nenhuma amostra.

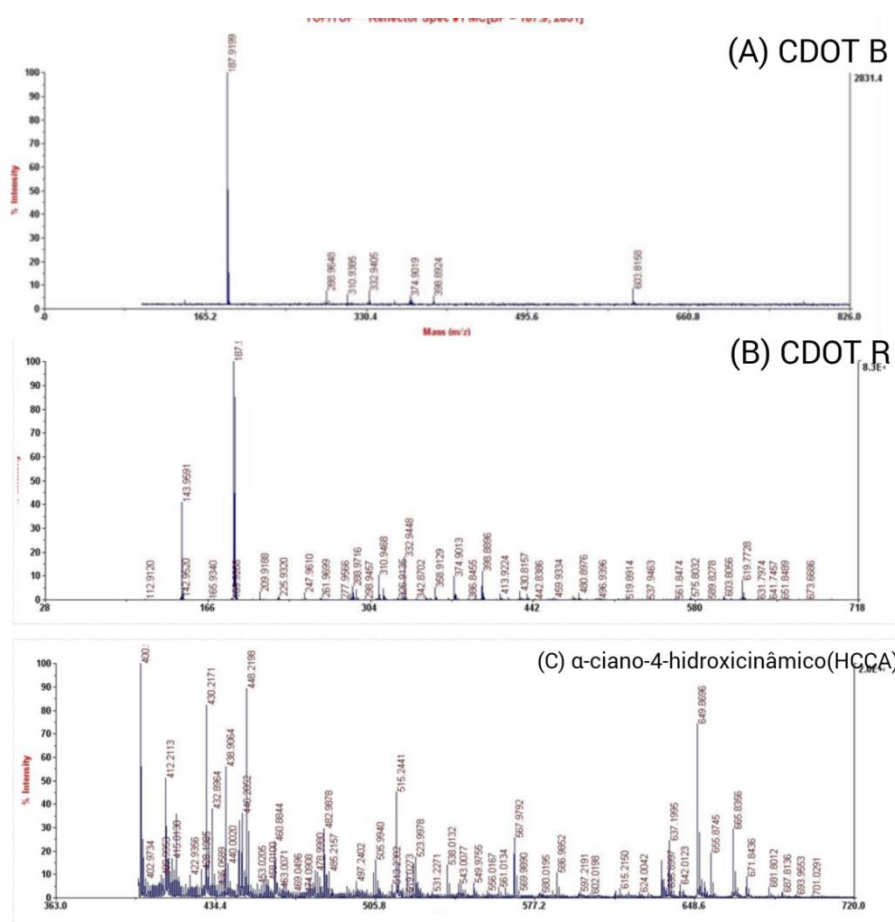


Fig 4: Espectrograma de matriz de Cdots B, Cdot R e α -ciano-4-hidroxicinâmico(HCCA). (A) Espectrograma em faixa de laser 0 nm a 826 nm em modo reflector positivo em matriz de Cdot B. (B) Espectrograma em faixa de laser 28 nm a 718 nm em modo reflector positivo em matriz de Cdot R. (C) Espectrograma em faixa de laser 363 nm a 720 nm em modo reflector positivo em matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmico(HCCA). **Fonte:** Autoria própria.

Na (FIGURA 4A) , foi observado um padrão limpo e sem interferências grandes no espectro de matriz de Cdot B, no espectro de matriz de Cdot R (FIGURA 4B), foi observado bastantes picos e espectro grande, onde pode atrapalhar as analises de cortisol, na (FIGURA 4C) de α -ciano, observa-se varios picos e bastantes interferencias em seu espectros. Com isso, neste estudo foi utilizado apenas com matriz de Cdot B para melhor visualização.

O padrão de cortisol deuterado D4 foi analisado juntamente com a matriz Cdot B assim como as amostras capilares isoladas, que são mostradas nas figuras 5 e 6.

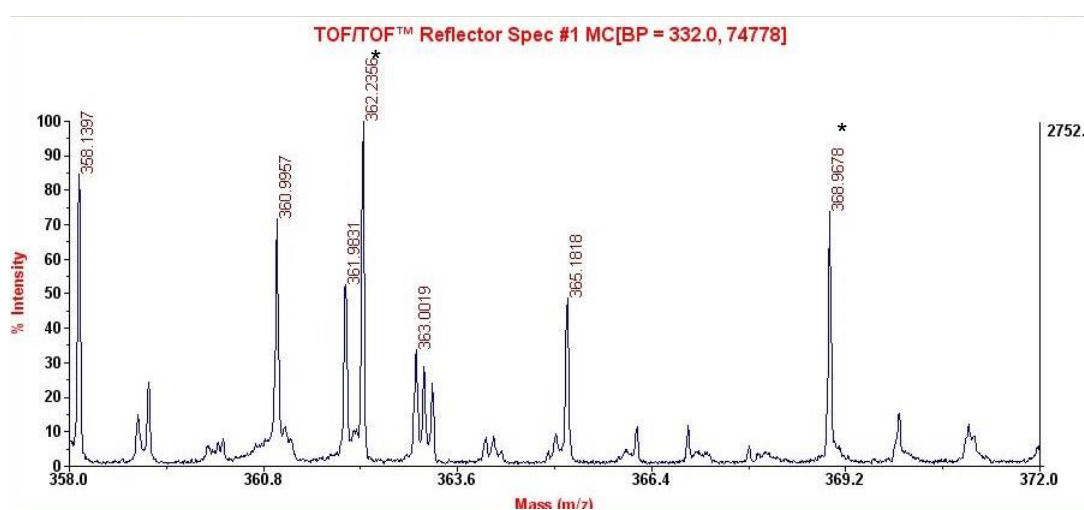


Fig 5: Espectograma em faixa de laser 358 nm a 372 nm em modo refletor positivo em matriz de Cdot B adicionada amostra de cortisol padrão (cortisol deuterado D4) e amostra capilar.

Fonte: Autoria própria

Nesta figura, pode-se observar que no espectro da matriz de Cdot são destacados dois picos, 362 m/z que sugere-se ao cortisol puro e 368 m/z onde mostra o cortisol deuterado. Mas devido sua complexidade, esse espectro foi usado para conhecimento de como o cortisol se comporta neste tipo de analise e para identificar a presença da molécula .

Nas próximas figuras é possível observar como as amostras capilares se comportaram com a matriz de cdot escolhida e comparada com a matriz ionizante de α -ciano-4-hidroxicinâmico(HCCA) que é normalmente utilizada.

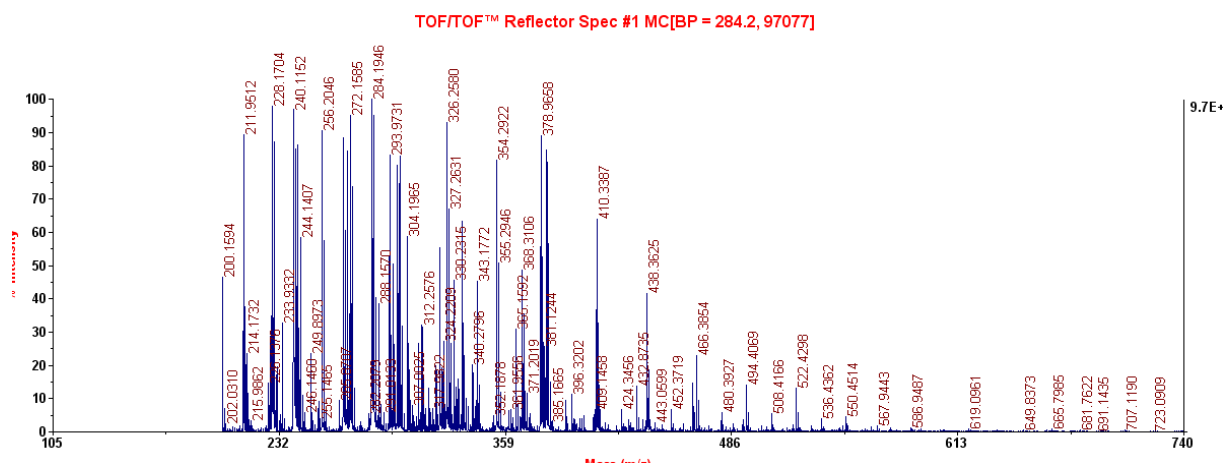


Fig 6: Espectograma em faixa de laser 105 nm a 740 nm em modo refletor positivo em matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmico(HCCA) adicionada amostra capilar.

Fonte: Autoria própria.

Nesta Figura 6, mostra o espectro correspondente a matriz de α -ciano-4-hidroxicinâmico(HCCA) que é amplamente utilizada em MALI-TOF , juntamente com a amostra capilar. Observa-se que há presença de vários picos em sua faixa de laser, mostrando que foi identificado o cortisol , mas em um pico bastante baixo, se mostrando ruim para esse tipo de amostra em comparação com a matriz de Cdot logo mostrada abaixo.

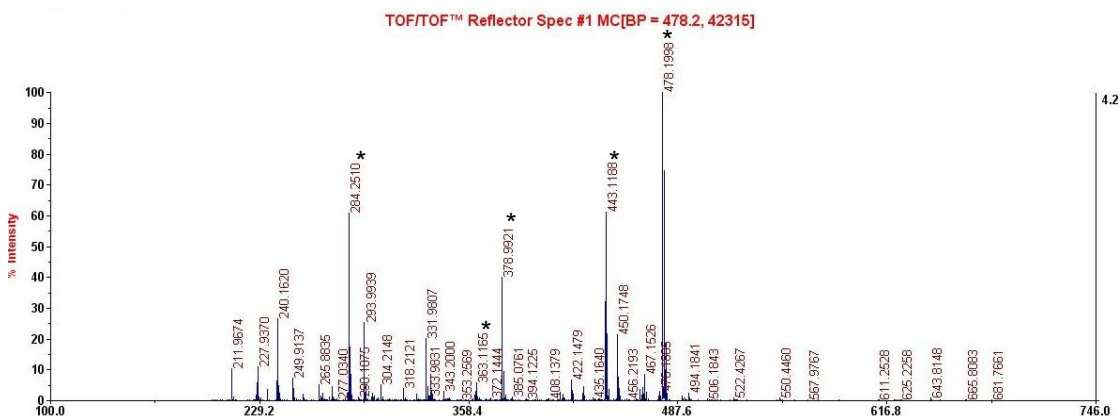


Fig 7: Espectograma em faixa de laser 100 nm a 746 nm em modo refletor positivo em matriz de Cdot B adicionada amostra capilar.

Fonte: Autoria própria

Na figura 7, mostrada acima mostra o espectro completo obtido na análise, onde mostra vários picos distintos, mas também há a presença de cortisol em 363 m/z, com melhor visualização na Figura 8.

O 6β -hidroxicortisol (6β -OHF), é observado no pico 378 m/z , onde trata-se de uma derivação do cortisol, sendo o cortisol metabolizado. O 6β -OHF é obtido a partir

da oxidação do cortisol mediada pelo citocromo p450 (CYP3A4), se tornando único metabólito com um átomo de oxigênio suplementar, o que lhe confere maior polaridade e, por consequência, maior hidrossolubilidade⁽⁵³⁾ sendo assim se tornando mais fácil de ser excretado e mais fácil se encontrar em amostras biológicas.

No pico 443 m/z é observado a presença do 6β-hidroxycortisol juntamente com o zinco. O zinco é um micronutriente essencial para a homeostasia humana, entre as suas funções biológicas, esse elemento é cofator de mais de 300 metaloenzimas, atuando em atividade catalítica de várias enzimas, tais como a anidrase carbônica, álcool desidrogenase, fosfatase alcalina, enzimas que participam do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas⁽⁵⁴⁾.

Após ser metabolizado, o zinco é excretado de várias formas no corpo humano, mas a concentração de zinco no cabelo é maior que outro tecido de excreção⁽⁵⁵⁾. O zinco é co-relacionado com o cortisol, pois com o aumento da síntese do cortisol, que por sua vez induz a expressão da metalotioneína, proteína que favorece a redução de zinco no plasma⁽⁵⁴⁾, fazendo assim sua maior excreção. Sendo encontrado na amostra capilar.

Há a presença de um pico em 284 m/z onde mostra o ácido oleico C₁₈H₃₄O₂, que é um ácido graxo monoinsaturado, pertencente à família ômega 9, obtido a partir da hidrólise da gordura animal e de certos óleos vegetais (óleo de oliva, palma, uva, etc). É muito utilizado como aditivo em base de sabões e sabonetes, e em cremes e emulsões cosméticas. Devido às suas propriedades são bastante utilizados em cremes capilares para dar emoliência e nutrição⁽⁵⁶⁾.

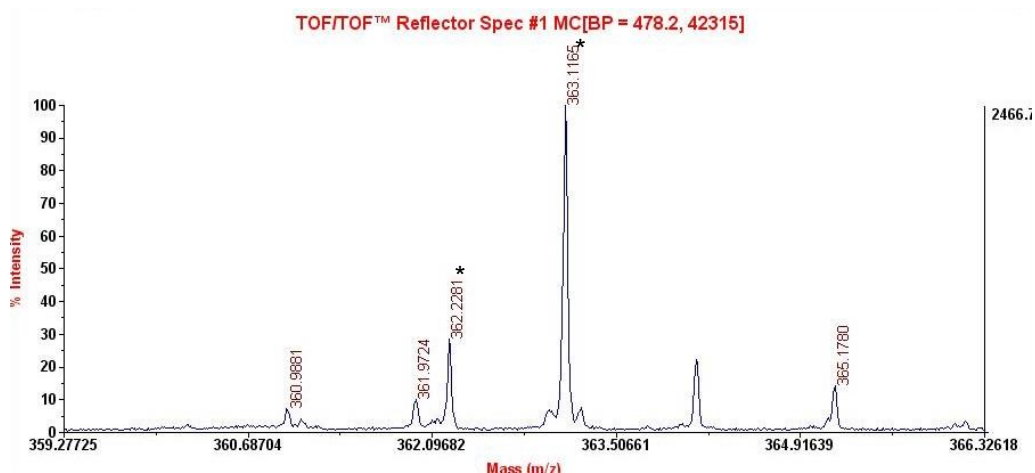


Fig 8: Espectrograma em faixa de laser 359 nm a 366 nm em modo reflector positivo em matriz de Cdot B adicionada amostra capilar.

Fonte: Autoria própria.

A amostra capilar com matriz de Cdot B (FIGURA 8), mostra o mesmo espectro da (FIGURA 7), mas ampliada para melhor visualização do cortisol. Observa-se que há a presença de picos em 362 m/z e em 363 m/z que sugere a amostra de cortisol pela sua massa carga, tanto em sua presença pura $C_{21}H_{30}O_5$, quanto após a interação de um átomo de hidrogénio $[M + H]^+ = 363$ m/z, aumentando sua massa molecular.

Observa-se também a presença de outros picos, onde possa ter ocorrido contaminação no momento da análise.

A espectrometria de massas pode ser considerada uma técnica de análises de maior seletividade entre todas as técnicas analíticas, por isso foi utilizada neste estudo, onde depende do tipo da sua amostra e matriz utilizada. Por isso, novas abordagens vêm sendo desenvolvidas para atender a necessidade de diagnósticos rápidos e precisos para diversas doenças utilizando essa técnica⁽⁵⁷⁾.

Com estes resultados obtidos, foi, portanto, possível confirmar através do experimento, a detecção do cortisol e de outros compostos, pelos experimentos de MALDI-TOF-MS utilizando-se as matrizes iônicas de nanopartículas de carbono Cdots.

7. Conclusões

As nanopartículas de carbono Carbon Dots foram utilizadas como uma nova matriz para análise de MALDI-TOF de moléculas de baixa massa molecular, tanto para íons negativos ou íons positivos. O cortisol foi identificado com a matriz de Cdots B, onde se mostra promissor como matriz ionizante de MALDI.

Os Cdots apresentaram maior sensibilidade de detecção, alta estabilidade, além de baixa interferência de fundo, mostrando que as matrizes ionizantes padrões podem ser completamente substituída por ele para análise em moléculas de baixa massa molecular em comparação com as matrizes convencionais de alfaciano.

Este método possui um potencial de ser aplicado em várias análises de moléculas pequenas, e auxiliar na pesquisa de análise de vários compostos biológicos.

8. Referências Bibliográficas

1. ROSA, Thais G. **Influência dos agentes estressores no aumento dos níveis de cortisol plasmático.** Disponível em: <https://www.unirv.edu.br/conteudos/fckfiles/files/INFLUENCIA%20DOS%20AGENTES%20ESTRESSORES%20NO%20AUMENTO%20DOS%20NIVEIS%20DE%20CORTISOL%20PLASMATICO.pdf>. Acesso em: 14 de jul, 2022
2. Kirou KA, Boumpas DT. **Systemic glucocorticoid therapy in systemic lupus erythematosus.** In: Wallace DJ, Hahn BH, editors. Dubois lupus erythematosus. 7th ed. Philadelphia: Disponível em: http://old.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&pid=S00347167202000130015700010&lng=en. Acesso em : 14 de jul, 2022.
3. West DWD, Phillips SM. **Associations of exercise-induced hormone profiles and gains in strength and hypertrophy in a large cohort after weight training.** Eur J ApplPhysiol. 2012;112(7):2693-702. doi: 10.1007/s00421-011-2246-z. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00421-011-2246-z>. Acesso em : 14 de jul, 2022.
4. Walvekar SS, Ambekar JG, Devaranavadagi BB. **Study on Serum Cortisol and Perceived Stress Scale in the Police Constables.** J ClinDiag Res. 2015;9(2):BC10-BC14. doi: 10.7860/JCDR/2015/12015.5576. Disponível em: https://www.jcdr.net/article_fulltext.asp?issn=0973709x&year=2015&volume=9&issue=2&page=BC10&issn=0973-709x&id=5576.
5. Neumann A, Direk N, Crawford AA, Mirza S, Adams H, Bolton J, et al. **The low single nucleotide polymorphism heritability of plasma and saliva cortisol levels.** Psychoneuroendocrinol. 2017;85: 88-95. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.08.011. Disponível
6. Shonkoff, J. P., & Garner, A. S. (2012). **The life long effects of early child**

hood adversity and toxic stress. Pediatrics, 129(1), 232-246. doi:10.1542/peds.2011-2663. Acesso em : 14 de jul, 2022.

7. Domingues MI da S. **Análise de cabelo – procedimentos e aplicações.** Fac Fernando Pessoa. 2015;1–53. Acesso em : 14 de jul, 2022.

8. Lima EC de, Silva CL da. **Cabelo como Matriz Analítica Alternativa para a determinação de drogas de abuso.** NewsLab. 2007;82:156–69. Acesso em : 14 de jul, 2022.

9. Sauvé B, Koren G, Rn GW, Tokmakejian S, Uum SHM Van. **Measurement of cortisol in human Hair as a biomarker of systemic exposure,** 2007 Clinical&Investigative Medicine.pdf. 2007;30(5):183–91. Acesso em : 15 de jul, 2022.

10. Pozebon D, Dressler VL, Curtius AJ. **Análise de cabelo: Uma revisão dos procedimentos para a determinação de elementos traço e aplicações.** Quim Nova. 1999;22(6):838–46. Acesso em : 15 de jul, 2022.

11 Portal PEBMED: **MALDI-TOF-MS: método proteômico para a identificação rápida e eficaz.** Disponível em: https://pebmed.com.br/maldi-tof-ms-um-metodo-proteomico-para-a-identificacao-rapida-e-eficaz-de-microrganismos-e-moleculas-de-interesse-clinico/?utm_source=artigoportal&utm_medium=copytext. Acesso em : 15 de jul, 2022.

12 . GOULART, V. A. M.; RESENDE, R. R. **MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer.** Nanocell News, Belo Horizonte, v.1, n. 3, nov. 2013. Disponível em: <http://sbsc.org.br/nanocell/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/> . Acesso em : 15 de jul, 2022.

13 . CUNHA, R. B.; CASTRO, M. S.; FONTES, W. **Espectrometria de massa de proteínas – O papel-chave da espectrometria de massa na era pós-genômica.** Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento, Brasília, ano IX, n. 36, P. 40-46jan./jun. 2006.

- 14 .Benagli C, Rossi V, Dolina M, Tonolla M, Petrini O. **Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry for the identification of clinical lyrelevant bacteria.** PLoS One. 2011;6(1):e16424.
15. BIZZINI, A.; GREUB, G. **Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification.** Clinical Microbiology and Infection. v. 16., p. 1614-1619, 2010.
16. Gregor McCombie and, Richard Knochenmuss. **Small-Molecule MALDI Using the Matrix Suppression Effect To Reduce or Eliminate Matrix Background Interferences.** Analytical Chemistry 2004, 76 (17) , 4990-4997. <https://doi.org/10.1021/ac049581r>
17. THOLEY, A.; HEINZLE, E. **Ionic (liquid) matrices for matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry-applications and perspectives.** Analytical and Bioanalytical Chemistry, Heidelberg, v. 386, n. 1, p. 24-37, July 2006.
18. HOSSAIN, M.; LIMBACH, P. A. **Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, practicalities, and biological applications.** 2nd ed. Oxford: Willey, 2010.
19. ALMEIDA JÚNIOR, J. N. **Padronização da espectrometria de massa MALDI-TOF para identificação de cepas de Trichosporon spp. de importância médica.** Tese (Doutorado em Patologia). 2014. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.
20. Luizete, Milena Fontes . **Aplicações de MALDI-MS na análise de peptídeos produzidos por cianobactérias.**
Disponível em:
<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/151215?show=full>. Acesso em: 30 de ago , 2022.
21. HILLEMKAMP, F.; PETER-KATALINIC, J. **MALDI MS: a practical guide to instrumentation, methods and applications.** Weinheim: Wiley, 2014. 459 p.
22. BERGMAN, N.; SHEVCHENKO, D.; BERGQUIST, J. **Approaches for the**

analysis of low molecular weight compounds with laser desorption/ionization techniques and massspectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, Heidelberg, v. 406, n. 1, p. 49-61, Jan. 2014.

23. M. Lu, X. Yang, Y. Yang, P. Qin, X. Wu, Z. Cai, **Nanomaterials as Assisted Matrix of Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight MassSpectrometry for the Analysis of Small Molecules,** Nanomaterials 7 (2017) 87, <https://doi.org/10.3390/nano7040087>.

24. Xu, M. Kliman, J.G. Forsythe, Z. Korade, A.B. Hmelo, N.A. Porter, J.A. McLean, **Profiling and Imaging Ion Mobility-MassSpectrometry Analysis of Cholesterol and 7- Dehydrocholesterol in Cells Via Sputtered Silver MALDI,** J. Am. Soc. MassSpectrom. 26 (2015) 924–933, <https://doi.org/10.1007/s13361-015-1131-0>. Acesso em : 30 de ago , 2022.

25. Q. Shen, W. Dong, M. Yang, J.T. Baibado, Y. Wang, I. Alqouqa, H.-Y. Cheung, **Lipidomic study of olive fruit and oil using TiO₂ nanoparticle-based matrix solid-phase dispersion and MALDI-TOF/MS,** Food Res. Int. 54 (2013) 2054–2061, <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.001>.

26. E. Beasley, S. Francese, T. Bassindale, **Detection and Mapping of Cannabinoids in Single Hair Samples through Rapid Derivatization and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry,** Anal. Chem. 88 (2016) 10328–10334

27. C. Shi, J. Menga, C. Deng, **Facilesynthesis of magneticgraphene and carbon nanotubecomposites as a novel matrix and adsorbent for enrichment and detection of smallmolecules by MALDI-TOF MS,** J. Mater. Chem. 22 (2012)20778–20785, <https://doi.org/10.1039/C2JM34745H>. Acesso em : 30 de ago , 2022..

28. Qu ZB, Zhou X, Gu L, et al. **Boronic acid functionalized graphene quantum dots as a fluorescent probe for selective and sensitive glucose determination in microdialysate.** Chemical Communications (Cambridge, England). 2013 Oct;49(84):9830-9832. DOI: 10.1039/c3cc44393k. PMID: 24030709. Acesso em : 30 de ago , 2022.

29. Baker, S. and Baker, G. (2010), **Luminescent Carbon Nanodots: Emergent Nanolights**. *Angewandte Chemie International Edition*, 49: 6726-6744. <https://doi.org/10.1002/anie.200906623>
30. C. Yongli, G. Dan, B. Hangrui, L. Hongxia, L. Shuo, J. Yuyang, **Carbon Dots and 9AA as a Binary Matrix for the Detection of SmallMolecules by MatrixAssisted Laser Desorption/IonizationMassSpectrometry**, *J. Am. Soc. MassSpectrom.* 27 (2016) 1227– 1235, <https://doi.org/10.1007/s13361-016-1396-y>. Acesso em : 30 de ago , 2022.
31. S.Y. Lim, W. Shen, Z. Gao, **Carbon quantum dots and theirapplications**, *Chem. Soc. Rev.* 44 (2015) 362–381, <https://doi.org/10.1039/C4CS00269E>. Acesso em : 30 de ago , 2022.
33. Dominika Houdová, Juan Soto, Rita Castro, João Rodrigues, M^a Soledad Pino-González, MarijanaPetković, Teresa J Bandosz, Manuel Algarra, **Chemically heterogeneous carbon dots enhanced cholesterol detection by MALDI TOF massspectrometry**, *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 591,2021, Pages 373-383, ISSN 0021-9797, <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.02.004>.
34. J. Wang, Y. Zhu, L. Wang, **Synthesis and applications of red-emissive carbon dots**, *Chem. Rec.* 19 (2019) 2083–2094, <https://doi.org/10.1002/tcr.201800172>.
35. W.-J. Wang, J.-M. Xia, J. Feng, M.-Q. He, M.-L. Chen, J.-H. Wang, **Green preparation of carbon dots for intracellular pH sensing and multicolor live cell imaging**, *J. Mater. Chem. B* 4 (2016) 7130–7137, <https://doi.org/10.1039/C6TB02071B>. Acesso em : 1 de set , 2022.
36. Atilson Oliveira da Silva, Marcelo Oliveira Rodrigues, Marcelo Henrique Sousa, Alex Fabiano Cortez Campos. **pH-Dependent surface properties of N-Cdots obtained by the hydrothermal method with multicolored emissions**, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and EngineeringAspects*, Volume 621,2021,126578,ISSN 0927-7757, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2021>

126578. Acesso em : 1 de set , 2022.

37. W. Xiao, F. Yongqiang, D. Peipei, H. Jianfeng, **A Mini Review on Carbon Quantum Dots: Preparation, Properties, and Electrocatalytic Application**, *Front. Chem.* 7 (2019) 671, <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00671>.

38. S. Sagbas, N. Sahiner, **Carbon dots: preparation, properties, and application**. Cap 22, (Ed A. Khan, M. Jawaid, Inamuddin, A. M. Asiri), *Nanocarbon and its Composites, Preparation, Properties and Applications*. In *Woodhead Publishing Series in Composites Science and Engineering* (2019) 651-676. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102509-3.00022-5>

39. Lebeau, M. A., Montgomery, M. A. e Brewer, J. D. 2011. **The role of variations in growth rate and sample collection on interpreting results of segmental analyses of hair**. *Forensic Science International*, 210, pp. 110-116.

40. LACEN SC – **Manual de orientação para coleta, acondicionamento e transporte de amostras biológicas**. Disponível em: <http://lacen.saude.sc.gov.br/arquivos/MCT01.pdf/>. Acesso em : 1 de set , 2022.

41. Kirschbaum, C., Wüst, S., Faig, H. G., & Hellhammer, D. H. (1992). **Heritability of cortisol responses to human corticotropin-releasing hormone, ergometry, and psychological stress in humans**. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75. doi:10.1210/jcem.75.6.1464659

42. GUYTON, Arthur C.; HALL, John E. **Fisiologia humana e mecanismos de doenças**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008.

43. VAZ, F. C. et al. **Cortisol e atividade física: será o estresse um indicador do nível de atividade física espontânea e capacidade física em idosos?** *Revista Brasília Médica*, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 143-152, 2013. Disponível em: http://ambr.org.br/wp-content/uploads/2014/07/10_Cortisol.pdf . Acesso em: 08 set. de 2022.

43. McEwen, B. S. (1998). **Stress, adaptation, and disease: Allostasis and allostatic load**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840.

44. DRUCKER, DANIEL MD; SHANDLING, MAUREEN MD. **Variable adrenocortical function in acute medical illness**. Critical Care Medicine: June 1985 - Volume 13 - Issue 6 - p 477-479
45. Manenschijn L, Koper JW, Lamberts SW, van Rossum EF. **Evaluation of a method to measure long term cortisol levels**. *Steroids*. 2011. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21515299> . Acesso em: 08 de set de 2022.
46. Russell E, Koren G, Rieder M, Van Uum S. **Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: current status, future directions and unanswered questions**. *Psychoneuroendocrinol.* 2012;37(5):589-601. doi: 10.1016/j.psyneuen.2011.09.009
47. Silva, A. M. B. D., & Enumo, S. R. F. (2014). **Estresse em um fio de cabelo: revisão sistemática sobre cortisol capilar**. *Avaliação Psicológica*, 13. Acesso em: 08 de set de 2022.
48. Stalder, T., Steudte, S., Miller, R., Skoluda, N., Dettenborn, L., & Kirschbaum, C. (2012). **Intraindividual stability of hair cortisol concentrations**. *Psychoneuroendocrinology*, 37. doi:10.1016/j.psyneuen.2011.08.007.
49. DIAS, J. H. ; CASTRO, H. P. S. ; CORREIA, R. R. B. . **Síntese e Caracterização de C- dots em Líquidos Iônicos**. 2015.
50. Facco Stefanello, Joice Mara y Stamm Paza, Diego Leonardo y Furyama, Guilherme Yoshi y Pierozan, Gian Carlo y (2017), "**CORTISOL CAPILAR COMO MEDIDA DE ANÁLISE DO ESTRESSE CRÔNICO**." *Psicologia, Saúde e Doenças*, Vol. 18, núm.3, pp.773- 788. ISSN: 1645-0086. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=36254714012>. Acesso em: 08 de set de 2022.
51. Slominski R, Rovnaghi CR, Anand KJ. **Methodological Considerations for Hair Cortisol Measurements in Children**. *Ther Drug Monit.* 2015 Dec;37(6):812-20. doi: 10.1097/FTD.0000000000000209. PMID: 25811341; PMCID: PMC4581896.
52. Barbosa, Kevin & Vargas, Diva & Ferreira, Graziani & Sá, Nathalia & Cortes,

Matheus & Santos, Gabriel & Damásio, Gabriella & Iglesias, Diego. (2021). **Impacto do MALDI-TOF no diagnóstico da Sepse: uma revisão integrativa** / Impact of MALDI-TOF in the diagnosis of Sepsis: an integrative review. Brazilian Journal of Development. 7. 58556-58574. 10.34117/bjdv7n6-313.

53. Prazeres S. et al / “**Cortisol Livre na Urina: Interferências no seu Doseamento**”, Rev Port Endocrinol Diabetes Metab. 2017;12(1):2-8. Doi : <http://dx.doi.org/10.1016/j.rpedm.2016.10.015>

54. FEITOSA, M. C. P.; LIMA, V. B. S.; MARREIRO, D. N. **Participation of inflammation on zinc metabolism in obesity**. Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr., São Paulo, SP, v. 37, n. 1, p. 93-104, abr. 2012.

55. Person OC, Botti AS, Féres MCLC. **Repercussões clínicas da deficiência de zinco em humanos**. Arq Med ABC.2006;31:46-52.

56. ARAÚJO, Lidiane Advíncula de. **Desenvolvimento de formulações cosméticas contendo óleos vegetais para proteção e reparação capilar**. 2015. Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015. doi:10.11606/D.60.2015.tde-04052015-154442. Acesso em: 2023-02-10.

57. OULART, V. A. M.; RESENDE, R. R. **MALDI-TOF: uma ferramenta revolucionária para as análises clínicas e pesquisa do câncer**. Nanocell News, Belo Horizonte, v.1, n. 3, nov. 2013. Disponível em: <http://sbsc.org.br/nanocell/maldi-tof-uma-ferramenta-revolucionaria-para-as-analises-clinicas-e-pesquisa-do-cancer/>.