

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

**Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação
de espécies de interesse clínico e biológico**

Jaelson Silva Santos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões

Tabuleiro dos Martins

57072-970 - Maceió - AL

Jaelson Silva Santos

**Desenvolvimento de metodologias analíticas para
determinação de espécies de interesse clínico e biológico**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia do Instituto de Química e Biotecnologia - IQB, como requisito para obtenção do grau de Doutor, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas - UFAL.

Orientador: Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos

MACEIÓ/AL

2023

Catálogo na Fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

S237d Santos, Jaelson Silva.
Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de espécies de interesse clínico e biológico / Jaelson Silva Santos. – 2023.
82 f. : il., grafs., tabs. color.

Orientador: Josué Carinhanha Caldas Santos.
Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2023.

Inclui bibliografias.

1. Timerosal. 2. Dispositivos microfluídicos baseados em papel. 3. Corantes fluorescentes. 4. Proteínas totais. 5. Bancos de espécimes biológicos. I. Título.

CDU: 66.09:577.112



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **JAELESON SILVA SANTOS** intitulada: *“Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de espécies de interesse clínico e biológico”*, apresentada, em sessão aberta, ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 30 de agosto de 2023, às 14h, por meio de *videoconferência*.

Maceió, 30 de agosto de 2023.

Comissão Examinadora:

Dr. RODOLFO DE MELO MAGALHÃES SANTANA, UFBA
Examinador Externo à Instituição

Documento assinado digitalmente
gov.br RODOLFO DE MELO MAGALHAES SANTANA
Data: 30/08/2023 18:02:04-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. FRANCISCO ANTONIO DA SILVA CUNHA, UFBA
Examinador Externo à Instituição

Documento assinado digitalmente
gov.br FRANCISCO ANTONIO DA SILVA CUNHA
Data: 31/08/2023 09:33:18-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. JANAINA HEBERLE BORTOLUZZI, UFAL
Examinadora Interna

Documento assinado digitalmente
gov.br JANAINA HEBERLE BORTOLUZZI
Data: 31/08/2023 10:45:59-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. ISIS MARTINS FIGUEIREDO, UFAL
Examinadora Interna

Documento assinado digitalmente
gov.br ISIS MARTINS FIGUEIREDO
Data: 31/08/2023 20:51:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr. JOSUÉ CARINHANHA CALDAS SANTOS, UFAL
Presidente

Documento assinado digitalmente
gov.br JOSUE CARINHANHA CALDAS SANTOS
Data: 12/09/2023 20:08:05-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais,
Sebastião Barbosa dos Santos e
Maria Abilia Silva Santos
A minha esposa Josilaine Santana
A todos os meus irmãos e familiares.

Sem vocês nada seria possível!

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus por todas as graças derramadas em minha vida, não somente nestes anos como universitário, mas em todos os momentos.

Ao meu pai Sebastião Barbosa da Silva por tudo que me ensinou e por ser um exemplo de pai e amigo sempre.

A minha Mãe Maria Abília Silva Santos por todo amor, carinho e atenção durante toda a minha vida.

A minha esposa Josilaine Santana por todo amor, incentivo e paciência.

Aos meus irmãos que sempre estiveram ao meu lado e acreditaram em mim.

A minha sobrinha Rafaela Carvalho por sempre me incentivar e sempre me apoiar.

Ao meu Orientador, Professor Josué Carinhonha Caldas Santos por ter me ajudado nessa etapa tão importante na minha vida.

Aos Professores Rodolfo Magalhães, Francisco Cunha, Janaína Bortoluzzi e Isis Figueiredo por aceitarem fazer parte dessa banca.

A todos os professores que já passaram pela minha vida, tiveram sua importância e sempre terão o meu respeito e meu reconhecimento.

Aos meus amigos-irmãos Woodland Sousa, Ari, Janaína Oliveira, Amanda Luise, Aryana e pela paciência e companheirismo em todos esses anos. A amizade de vocês é muito valiosa para mim.

Aos meus amigos que passaram e que estão no LINQA, Allysson Roberto, Guimarães, Marina Magalhães, Maria Celia, Elysson, entre outros. Obrigado pela amizade e por serem incentivos aos meus estudos.

Aos meus colegas e alunos da escola padre Aurélio Góis (Junqueiro-Al), por tudo o que foi vivido neste ano de convivência. Obrigada por tudo.

A todos muito obrigada!

RESUMO

O desenvolvimento de novas metodologias analíticas para determinação de espécies de interesse clínico e biológico são demandas constantes da Sociedade. Sendo assim, o primeiro trabalho descreve um método colorimétrico para determinação de timerosal (TM) em vacinas usando dispositivos analíticos baseados em papel (PADs) como uma plataforma analítica. O TM é um composto orgânico de mercúrio que é convertido quantitativamente em Hg(II) após oxidação por KMnO_4 em meio ácido, assim, o Hg(II) reage com a ditizona para gerar um complexo colorido. O método proposto apresentou limite de detecção de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ e faixa linear de $1,7 - 11 \text{ mg L}^{-1}$ com desvio padrão relativo (RSD) $< 3,6\%$, sendo seletivo para quantificação de TM na presença de espécies comumente encontrados em vacinas como Al(III), Na^+ , K^+ , Cl^- , sulfato e sais de fosfato. O método foi aplicado para determinar TM em diferentes vacinas, com 89 a 112% de recuperação. Os resultados obtidos foram estatisticamente concordantes com o procedimento de referência baseado na digestão ácida por micro-ondas e na determinação de mercúrio total por espectroscopia de fluorescência atômica a vapor frio (CV AFS). O método proposto para determinar TM como mercúrio inorgânico total foi simples, rápido, de baixo custo, preciso e ambientalmente correto (verde); por proporcionar baixa geração de resíduos, além de ser passível de aplicação no controle de qualidade de vacinas. No segundo trabalho, foi desenvolvido um método simples, rápido e preciso para determinação de proteínas totais, em função da concentração de albumina do soro humano (HSA) em amostras biológicas empregando uma sonda fluorescente derivada de cianina heptametina (SHP) baseada no mecanismo *off-on* com emissão no infravermelho próximo (NIR). O método proposto foi baseado na ausência de fluorescência da sonda livre (SHP), no entanto, o complexo formado com a proteína (HSA-SHP) apresenta elevada emissão no NIR ($\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm} / \lambda_{\text{em}} = 674 \text{ nm}$), nas condições otimizadas (pH 8,0 em tampão PIPES a 10 mM). A estequiometria do complexo HSA-SHP foi definida como 1:1 aplicando o método de Job. A faixa linear foi de $0,05$ a $6,0 \text{ }\mu\text{M}$ (equivalente a $3,4 - 408 \text{ mg L}^{-1}$) com limite de detecção de $0,014 \text{ }\mu\text{M}$ ($0,95 \text{ mg L}^{-1}$) e RSD $< 3,6\%$, sendo seletivo para quantificação de HSA na presença de espécies comumente encontradas em amostras biológicas como íons metálicos, ácidos graxos, glicose e aminoácidos. Por fim, a metodologia desenvolvida foi aplicada para determinação de HSA em amostras de plasma e de urina, com recuperações de 91 a 118%, sendo os resultados obtidos concordantes estatisticamente ($\alpha = 0,05$) com o método de Bradford (método de referência). Dessa forma, o método proposto para a determinação de proteínas totais em função de HSA, mostrou-se versátil e passível de aplicação na determinação de proteínas totais com finalidade clínica.

Palavras-chaves: Timerosal; PADs; sondas fluorescentes; proteínas totais; amostras biológicas.

ABSTRACT

The development of new analytical methodologies for the determination of species of clinical and biological interest are constant demands of the Society. Therefore, the first work describes a colorimetric method for the determination of thimerosal (TM) in vaccines using paper-based analytical devices (PADs) as an analytical platform. TM is an organic mercury compound that is quantitatively converted to Hg(II) after oxidation by KMnO₄ in an acid medium, thus Hg(II) reacts with dithizone to generate a colored complex. The proposed method presented a detection limit of 0,5 mg L⁻¹ and a linear range of 1,7 - 11 mg L⁻¹ with a relative standard deviation (RSD) < 3.6%, being selective for TM quantification in the presence of species commonly found in vaccines as Al(III), Na⁺, K⁺, Cl⁻, sulfate and phosphate salts. The method was applied to determine TM in different vaccines, with 89 to 112% recovery. The results obtained were statistically in agreement with the reference procedure based on microwave acid digestion and determination of total mercury by cold vapor atomic fluorescence spectroscopy (CV AFS). The proposed method to determine TM as total inorganic mercury was simple, fast, low cost, accurate and environmentally friendly (green); for providing low waste generation, in addition to being amenable to application in the quality control of vaccines. In the second work, a simple, fast and precise method was developed for the determination of total proteins, as a function of the concentration of human serum albumin (HSA) in biological samples using a fluorescent probe derived from heptamethine cyanine (SHP) based *off-on* mechanism with near infrared (NIR) emission. The proposed method was based on the absence of free probe fluorescence (SHP), however, the complex formed with the protein (SHP-HSA) shows high emission in NIR ($\lambda_{ex} = 580 \text{ nm} / \lambda_{em} = 674 \text{ nm}$) under optimized conditions (pH 8.0 in 10 mM PIPES buffer). The stoichiometry of the HSA-SHP complex was defined as 1:1 applying Job's method. The linear range was 0,05 to 6,0 μM (equivalent to 3,4 - 408 mg L⁻¹) with a detection limit of 0,014 μM (0,95 mg L⁻¹) and RSD < 3.6%, being selective for quantification of HSA in the presence of species commonly found in biological samples such as metal ions, fatty acids, glucose and amino acids. Finally, the developed methodology was applied to determine SAH in plasma and urine samples, with recoveries from 91 to 118%, with the obtained results statistically concordant ($\alpha = 0,05$) with the Bradford method (reference method). Thus, the proposed method for the determination of total proteins as a function of SAH proved to be versatile and amenable to application in the determination of total proteins for clinical purposes.

Keywords: Thimerosal; PADs; fluorescent probes; total proteins; biological samples.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número de publicações ao longo dos últimos 15 anos, associadas a palavra-chave “ <i>paper-based device</i> ”.....	14
Figura 2	Estrutura química do timerosal (TM) e produtos de degradação em meio aquoso, ácido tiosalicílico (ATS) e etilmercúrio ($C_2H_5Hg^+$).....	17
Figura 3	Representação esquemática de uma sonda fluorescente <i>off-on</i> . Modo desligado (<i>off</i>) analito (proteína) e a sonda separados e modo ligado (<i>on</i>) sonda - analito emitindo fluorescência.	20
Figura 4	Estrutura da albumina do soro humano (HSA) mostrando os locais de ligação.....	22
Figura 5	Estrutura genérica dos derivados de cianina.	23
Figura 6	Formação do complexo colorido (a) TM-ditizona e (b) Hg(II)-ditizona, ambos os sistemas em PAD (n = 6). No interior da Figura 6a, a reação entre TM e ditizona em uma solução aquosa é mostrada.	38
Figura 7	Parâmetros químicos para determinação de mercúrio total usando sensibilidade analítica (parâmetro de decisão): A) ditizona, B) H_2SO_4 e C) concentrações de HCl. Condições experimentais: Hg(II) de 1 a 12 $mg L^{-1}$, e medidas realizadas no canal de cor RGB (n = 5). O PAD mostrado em cada figura corresponde à curva analítica na condição selecionada.	40
Figura 8	Efeito do volume de ditizona no PAD após adição (linha B).	41
Figura 9	Influência na sensibilidade do método analítico utilizando PAD para os seguintes parâmetros: (a) tempo de secagem da ditizona, (b) volume de Hg(II), e (c) tempo de secagem da amostra (n = 6).	41
Figura 10	(A) Dispositivo PAD com alterações cromáticas correspondentes à variação da concentração de Hg(II) até a saturação; (B) Faixa linear de resposta de intensidade de cor em função da concentração de mercúrio iônico (n = 6).....	43
Figura 11	A) Avaliação de possíveis interferências do método sem a etapa de digestão utilizando padrão Hg(II) e B) Avaliação de possíveis interferências do método proposto com a etapa de digestão ($KBr/KBrO_3$ e $KMnO_4$) utilizando padrão TM. Condições: $C_{ditizona} = 0,75 mg L^{-1}$, $C_{Hg(II)} = 5,0 mg L^{-1}$, $C_{TM} = 10 mg L^{-1}$ e $[HCl] = 1,0 M$	45
Figura 12	Comparação da intensidade verde usando a calculadora AGREENess para comparar os métodos proposto e de referência utilizados neste trabalho: A) método proposto usando PAD e B) método de referência (MW e CV AFS).....	48
Figura 13	Análise preliminar da sonda SHP. (A) com diferentes proteínas. (B) Seletividade da sonda SHP. (C) Espectros de absorção da sonda SHP na ausência e na presença de HSA. (D) Espectros de emissão da sonda SHP na ausência e na presença de HSA. Condições: tampão Britton-Robinson (pH 7,0), concentração da sonda SHP e de HSA foram fixadas em 10 e 5 μM , respectivamente, e $\lambda_{ex} = 580 nm$	62

Figura 14	Formação do complexo fluorescente (a) SHP-HSA e (b) Perfil gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração de HSA. Condições: [SHP] = 10 μ M, [HSA] = 0,25 - 25 μ M, tampão Britton-Robinson (20 mM) e $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 580 / 675nm.....	63
Figura 15	Otimização dos parâmetros analíticos. (A) Influência do pH; (B) Influência da natureza do tampão; (C) Concentração do tampão PIPES, e (D) concentração da sonda SHP. Condições: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 580 / 675nm. Os dados foram avaliados por ANOVA (<i>one-way</i>), onde cores e letras diferentes indicam diferença estatística a partir do teste de Tukey (a 95% de confiança).....	65
Figura 16	Efeito da força iônica no método proposto pela adição de NaCl. Condições: [SHP] = 10 μ M, [HSA] = 0,25- 25 μ M, tampão PIPES (10 mM) e NaCl até 300 mM. $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 580 / 675nm.....	66
Figura 17	Influência de diferentes solventes na sensibilidade do método analítico. Condições: [SHP] = 5 μ M, [HSA] = 0,25- 25 μ M, tampão PIPES (10 mM) e proporção dos solventes: 10, 25 e 50% (v/v). $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 580 / 675nm.....	67
Figura 18	Rendimento quântico de fluorescência para o complexo SHP-HSA em diferentes proporções sonda-proteína empregando vermelho do Nilo como referência. Condições: [SHP] = 5 μ M, proporção de HSA = 1:1, 1:200 e 1:500, tampão PIPES (10 mM) e $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 580 / 675nm. Vermelho do Nilo λ_{ex} = 554 nm; λ_{em} = 631 nm, Φ = 38% em metanol.	69
Figura 19	Caracterização do complexo SHP-HSA. (A) Método de Job de SHP e HSA; (B) Fotoestabilidade da onda SHP na ausência e na presença de HSA; (C) Tempo de vida e (D) Avaliação dos sítios de ligação da proteína. Condições: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 580 / 675nm, C_{SHP} = 5 μ M, C_{HSA} = 5 μ M, $C_{marcador}$ = 5, 10, 15 e 20 μ M.	70
Figura 20	Espectros de emissão de fluorescência de SHP na presença de diferentes concentrações de HSA sob os parâmetros experimentais otimizados. A inserção mostra a curva de calibração correspondente.	71
Figura 21	Determinação da constante de ligação (K_b) por meio da equação de Benesi-Hildebrand (a) a partir da saturação do complexo SHP-HSA (b) linearização do gráfico $1/[HSA]$ vs $1/(F_{max} - F_{min})$. Condições: [SHP] = 5 μ M, [HSA] = 0,25- 100 μ M, tampão PIPES (10 mM) e $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 580 / 675nm.	72
Figura 22	Sensibilidade da sonda SHP para HSA (3 μ M) na presença de espécies interferentes: 1- Ca(II), 2- Zn(II), 3- Fe(II), 4- Mg(II), 5- Se(VI), 6- Fosfato, 7- ácido oleico, 8- ácido linoleico, 9- ácido mirístico, 10- ácido esteárico a 30 μ M e 11- Cisteína (25 μ M), 12- glicose (20 μ M), 13- Fe(III) (7,5 μ M) e 14- Cu(II) (3,5 μ M).	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	O programa de aquecimento usado na digestão assistida por micro-ondas de amostras de vacinas.....	35
Tabela 2	Comparação dos parâmetros analíticos de diferentes metodologias para determinação de mercúrio usando PAD com diferentes sistemas de detecção.....	44
Tabela 3	Determinação de Hg(II) total e TM em amostra de vacina pelo método proposto após digestão com KMnO_4 ($n = 3$), ensaio de adição e recuperação e comparação dos resultados com o método de referência (CV AFS). Todas as amostras de vacina foram diluídas 1:2 com água ultrapura antes da análise.....	47
Tabela 4	Rendimento quântico (Φ) para diferentes proporções entre a sonda SHP e HSA. A concentração da sonda SHP foi fixada em $5 \mu\text{M}$ em todos os experimentos.....	68
Tabela 5	Comparação de diferentes sondas fluorescentes na detecção de HSA.....	73
Tabela 6	Determinação de HSA em amostra de urina e plasma.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TM	Timerosal
PADs	Dispositivos microfluídicos fabricados em plataforma de papel
PCD	Dispositivo colorimétrico baseado em papel
SHP	Sonda derivada de cianina heptametina
HSA	Albumina do soro humano
BSA	Albumina do soro bovino
ICP OES	Espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado
HPLC-UV	cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica
AAS	Espectrometria de absorção atômica
GF AAS	espectrometria de absorção atômica em forno de grafite
EtHg ⁺	Etilmercúrio
MetHg ⁺	Metilmercúrio
ATS	Ácido tiosalicílico
NIR	infravermelho próximo
TICT	Transferência de carga intramolecular torcida
PET	Transferência fotoinduzida de elétrons
CHEF	Aumento do sinal de fluorescência por quelação
FRET	Transferência de energia de ressonância de fluorescência
ESIPT	Transferência de prótons intramoleculares de estado excitado
K _b	Constante de ligação
LOD	Limite de Detecção
RSD	Desvio padrão relativo
IR	Espectroscopia no infravermelho
RMN ¹ H e ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono
MS	Espectrometria de massas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	13
1.1	Tendências modernas em análise química.....	13
1.2	Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos baseados em papel (PADs).....	14
1.3	Importância da determinação de espécies de mercúrio.....	16
1.4	Determinação de timerosal em vacinas com dispositivos baseados em papel (PADs).....	17
1.5	Desenvolvimento de Sondas Fluorescentes.....	19
1.6	Planejamento de novas sondas fluorescentes (<i>off-on</i>)	19
1.7	Sondas fluorescentes para determinação de proteínas.....	21
1.8	Justificativa do trabalho.....	25
1.9	Objetivo geral.....	25
	Referências.....	26
2	DETERMINAÇÃO DE TIMEROSAL, UM COMPOSTO ORGÂNICO DE MERCÚRIO EM VACINAS, USANDO UM DISPOSITIVO ANALÍTICO BASEADO EM PAPEL COM DETECÇÃO COLORIMÉTRICA.....	31
2.1	Introdução.....	31
2.2	Objetivos específicos.....	32
2.3	Experimental.....	33
2.3.1	Reagentes e soluções.....	33
2.3.2	Fabricação de dispositivos analíticos baseados em papel (PAD).....	33
2.3.3	Determinando TM usando o método proposto.....	34
2.3.4	Método de referência (CV AFS)	35
2.3.5	Análise estatística.....	36
2.4	Resultados e Discussão.....	36
2.4.1	Princípio do método e avaliação preliminar.....	36
2.4.2	Otimização das condições do método.....	38
2.4.2.1	Concentração da Ditizona.....	38
2.4.2.2	Efeitos da acidez (H ₂ SO ₄ e HCl) na sensibilidade.....	39
2.4.2.3	Avaliação do volume (amostra/ditizona) e tempo de secagem.....	40
2.4.3	Figuras de mérito.....	42
2.4.4	Avaliação de espécies interferentes em vacinas e conversão de TM para Hg(II).....	45
2.4.5	Aplicação do método em amostras de vacinas.....	46
2.4.6	Comparação do perfil verde da metodologia desenvolvida usando μ PAD com o método de referência (CV AFS)	48
2.5	Conclusão.....	49
	Referências.....	50
3	APLICAÇÃO DE SONDA FLUORESCENTE PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS COM EMISSÃO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	54
3.1	Introdução.....	54
3.2	Objetivos específicos.....	55
3.3	Experimental.....	56
3.3.1	Reagentes e preparo das soluções.....	56
3.3.2	Instrumentação.....	55
3.3.3	Síntese e caracterização da sonda fluorescente.....	57
3.3.4	Determinação de proteínas totais (HSA) pelo método proposto.....	57
3.3.5	Caracterização do complexo sonda SHP-HSA.....	58
3.3.6	Método de referência (Bradford)	59

3.3.7	Análise estatística dos resultados.....	60
3.4	Resultados e discussões.....	60
3.4.1	Estudos preliminares: seletividade da sonda SHP com diferentes proteínas.....	60
3.4.2	Otimização dos parâmetros analíticos.....	63
3.4.2.1	Avaliação do pH e o tipo de solução tampão.....	63
3.4.2.2	Efeito do tipo de solução tampão.....	64
3.4.2.3	Avaliação da concentração da sonda SHP e influência da força iônica.....	64
3.4.3	Avaliação de diferentes solventes na sensibilidade do método.....	66
3.4.4	Caracterização do complexo SHP-HSA.....	67
3.4.5	Figuras de mérito do método e constante de ligação SHP-HSA.....	71
3.4.6	Interferentes.....	74
3.4.7	Aplicação em amostras reais.....	75
3.5	Conclusão.....	77
	Referencias.....	78
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Tendências modernas em análise química

A análise química desempenha um papel fundamental em nossa sociedade, e pode ser observado com os avanços na pesquisa e fabricação de medicamentos, controle de processos na indústria, monitoramento ambiental em tempo real, diagnósticos médicos, produção de alimentos e em pesquisas forenses, entre outras aplicações (BERGQUIST; TURNER, 2018). Assim, é de grande importância em variadas áreas de pesquisa, visto que está voltada para a criação de novos conhecimentos, de modo que possa ser aprimorada para responder a demandas novas e crescentes da sociedade (ZOLOTOV, 2020).

A evolução da análise química está contribuindo para o melhoramento das tarefas realizadas no cotidiano, sendo assim, sem esses avanços não poderíamos tomar nenhuma decisão importante sobre problemas reais, como questões importantes relacionadas com a agricultura como a correção do solo, questões relacionadas à poluição ambiental, identificação de marcadores clínicos de interesse médico e biológico fornecendo procedimentos analíticos rápidos para reconhecer numerosas biomoléculas, dentre outros (SARGAZI *et al.*, 2022).

Atualmente, há uma tendência crescente em miniaturizar as técnicas clássicas para responder ao problema da pequena quantidade de amostra, ou questões relacionadas a química verde (MERONE *et al.*, 2020), no desenvolvimento de procedimentos não invasivos (GAO *et al.*, 2017), sondas fluorescentes aplicadas ao imageamento *in vivo* em tempo real (KOBAYASHI *et al.*, 2010), além de utilização de novas plataformas analíticas, que sejam mais eficientes e/ou mais baratas, como o papel (COSTA *et al.*, 2014). Essas novas tendências levam a um efeito sinérgico das vantagens dos procedimentos já estabelecidos com novas aplicações, obtendo-se um melhor desempenho analítico (SARI *et al.*, 2019).

Nesse sentido, busca-se a obtenção de métodos analíticos mais rápidos, mais sensíveis, simples, informativos e ambientalmente sustentáveis (NAWAZ *et al.*, 2022). Esses novos métodos são impulsionados pelas principais demandas da sociedade, como as da medicina, da biologia, da indústria e do meio ambiente, visando sempre aprimorar as metodologias já existentes, desenvolver novas metodologias mais eficientes e resolver os problemas do coletivo (BERGQUIST; TURNER, 2018).

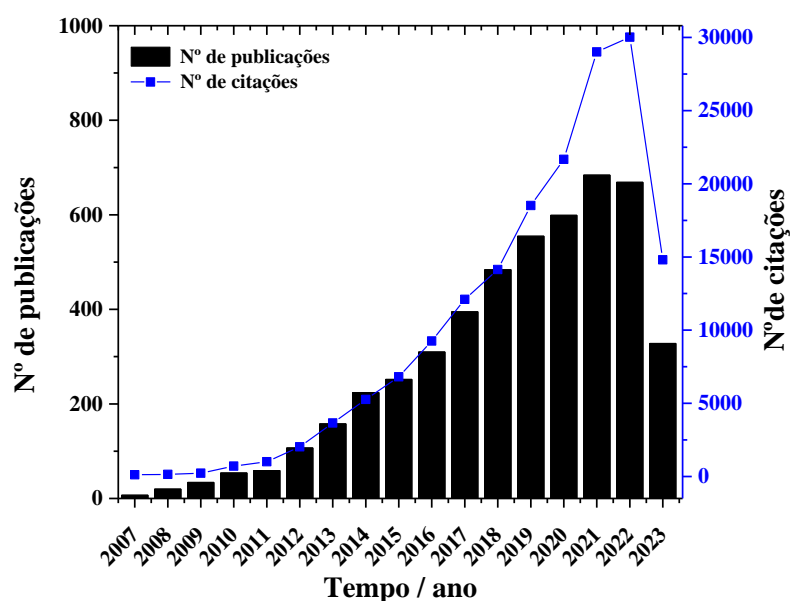
1.2 Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos baseados em papel (PADs)

Com relação as demandas crescentes de análise química, as metodologias baseadas no desenvolvimento de dispositivos microfluídicos fabricados em plataforma de papel (PADs), técnica que foi introduzida por pelo Prof. George M. Whitesides e colaboradores (2007), têm recebido enorme atenção nos últimos anos, principalmente devido ao seu baixo custo, acessibilidade global de substratos de papel, capacidade natural de transporte de fluidos por capilaridade, biodegradabilidade/biocompatibilidade, elevada área superficial, dentre outros aspectos (SOUSA; DUARTE; COUTRO, 2020; CAI *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2014).

As vantagens do desenvolvimento de dispositivos PADs, permite o uso de microfluídica nas áreas de saúde, análise forense, diagnóstico médico e aplicações de monitoramento ambiental, além de poder ser integrada com outras técnicas de detecção já conhecidas, como a eletroquímica, fluorescência, espalhamento Raman e a Colorimetria (SURESH *et al.*, 2017).

Com relação as publicações em revistas científicas, o uso de papel como suporte em dispositivos miniaturizados apresentou um aumento considerável até o ano de 2022. Assim, realizando-se uma busca na base de dados ISI “*Web of Science*” com as palavras – chaves “*paper-based device*”, foram encontrados 5002 trabalhos indexados a partir de 2007, mostrando um crescimento no uso e aplicações. Na Figura 1 são mostradas as publicações realizadas em revistas indexadas nos últimos 15 anos.

Figura 1– Número de publicações ao longo dos últimos 15 anos, associadas a palavra-chave “*paper-based device*”.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Nos últimos três anos, o número de publicações estabilizou-se entre 599 e 669. Contudo, o número de citações continua crescente, chegando 30016 no ano de 2022. Esse elevado número de publicações e citações está relacionado com as diferentes as aplicações, que estão cada vez mais atraentes e desafiadoras, e ocorrem, principalmente devido às matrizes de papel serem mais baratas, prontamente disponíveis em vários formatos/propriedades, e sua estrutura porosa natural pode ser utilizada em diversos tipos de ensaios, além de dispositivos bidimensionais e tridimensionais, onde a cera pode ser usada como barreira hidrofóbica (COSTA *et al.*, 2014; NOGUEIRA *et al.*, 2019).

Entre essas estratégias, os métodos colorimétricos estão bem estabelecidos porque são simples, rápidos de executar e baixo custo. Vários dispositivos colorimétricos baseados em papel (PCDs) foram desenvolvidos com sucesso nos últimos anos. Grande parte dos trabalhos desenvolvidos são voltados para o uso de *smartphones*, câmeras digitais e *scanners* de mesa como uma nova tecnologia para a colorimetria em papel, além de métodos para a quantificação visual. CAI *et al.*, (2017) desenvolveram um dispositivo PADs para determinação de mercúrio inorgânico com detecção visual baseado na distância, usando a ditizona como reagente colorimétrico e que não exigia instrumentação complexa ou cara (CAI *et al.*, 2017).

Comparado com as outras técnicas de análise, o método de detecção colorimétrica se destaca por ser simples, ter um alto valor custo-benefício e ser de fácil implementação em PADs. Nos métodos colorimétricos, a reação cromogênica ocorre entre o analito e o reagente cromogênico para formar um produto colorido. Nesse caso, a concentração do analito está diretamente relacionada a intensidade de cor, que pode ser convertida em um número, por exemplo, com o uso de *scanner*, câmeras digitais ou pela comparação da intensidade da cor com as intensidades de uma série padrão de concentração conhecida (FELISITA *et al.*, 2019).

Nesse sentido, o uso de *scanner* de mesa é uma ferramenta importante no desenvolvimento de metodologias empregando PADs, sendo assim, com essa ferramenta os dados colorimétricos podem ser rapidamente convertidos em uma imagem digital, e conseqüentemente em um número que é diretamente proporcional a concentração do analito, (CHEN *et al.*, 2016).

Dessa forma, os dispositivos baseados em papel (PADs) podem ser empregados para determinação de diferentes analitos simultaneamente e de forma independente, visto que podem ser utilizadas múltiplas zonas de detecção. Essas características possibilitam a aplicação desses dispositivos em diversos campos, além de análises de rotina na determinação de vários analitos (por exemplo, íons metálicos, proteínas, enzimas, anticorpos, explosivos, entre outras) (ARAÚJO *et al.*, 2018).

1.3 Importância da determinação de espécies de mercúrio

O mercúrio é um elemento químico que ocorre naturalmente na crosta terrestre, sendo liberado para o meio ambiente por processos naturais como atividade vulcânica, desgaste das rochas, e como atividades antrópicas resultado da atividade humana (GAUTAM *et al.*, 2016). A atividade humana é a principal causa de liberação de mercúrio, principalmente em termoelétricas a carvão, queima residencial de carvão para aquecimento e cozimento, processos industriais, incineradores de resíduos e como resultado da mineração de mercúrio, ouro e outros metais (O'CONNOR *et al.*, 2019). O mercúrio existe em várias formas: elementar ou metálico (Hg^0), inorgânico (Hg^{2+}); e orgânico (metilmercúrio ($MetHg^+$), etilmercúrio ($EtHg^+$), entre outros, os quais os seres humanos podem ser expostos através do ar, dieta ou de forma natural) (BOLLEN *et al.*, 2008).

De forma geral, uma população pode ser exposta ao mercúrio em qualquer uma de suas formas e em diferentes circunstâncias. No entanto, a exposição ocorre principalmente pela inalação de vapores de mercúrio elementar por trabalhadores durante processos industriais e pelo consumo de alimentos contaminados, como peixes e mariscos, com metilmercúrio (EKINCI, *et al.*, 2014). Essas formas de mercúrio diferem em seu grau de toxicidade e em seus efeitos em diferentes órgãos do corpo humano, principalmente no sistema nervoso (NAYFEH *et al.*, 2018). No entanto, os compostos orgânicos (alquilados) apresentam uma toxicidade maior que a forma elementar e que a forma inorgânica, devido, no caso do metilmercúrio, por exemplo, ter uma maior absorção na corrente sanguínea e bioacumulação em diferentes órgãos, causando danos irreparáveis, principalmente ao sistema nervoso central. No entanto outras espécies orgânicas de mercúrio, como o etilmercúrio, fenilmercúrio e timerosal, são negligenciadas (CARRASCO *et al.*, 2009; BERLIN *et al.*, 2015; MAHBUB *et al.*, 2017).

A toxicidade do mercúrio afeta, principalmente os fetos, pois a exposição ao metilmercúrio no útero afeta adversamente o cérebro em crescimento e o sistema nervoso de um bebê. O efeito primário do metilmercúrio na saúde é o desenvolvimento neurológico prejudicado. Portanto, o pensamento cognitivo, a memória, a atenção, a linguagem e as habilidades motoras finas e espaciais visuais podem ser afetadas em crianças que foram expostas ao metilmercúrio durante a gestação (PICHICHERO *et al.*, 2002). Outro grupo que apresentam altos níveis de toxicidade ao mercúrio é formado por pessoas regularmente expostas, ou seja, com exposição crônica, como as populações que dependem da pesca de subsistência ou pessoas em decorrência de sua atividade laboral (GEIER *et al.*, 2016). Entre as populações de pesca de subsistência selecionadas, as crianças apresentaram comprometimento cognitivo

(retardo mental leve) causado pelo consumo de peixe contendo mercúrio (BLANCHFIELD *et al.*, 2022).

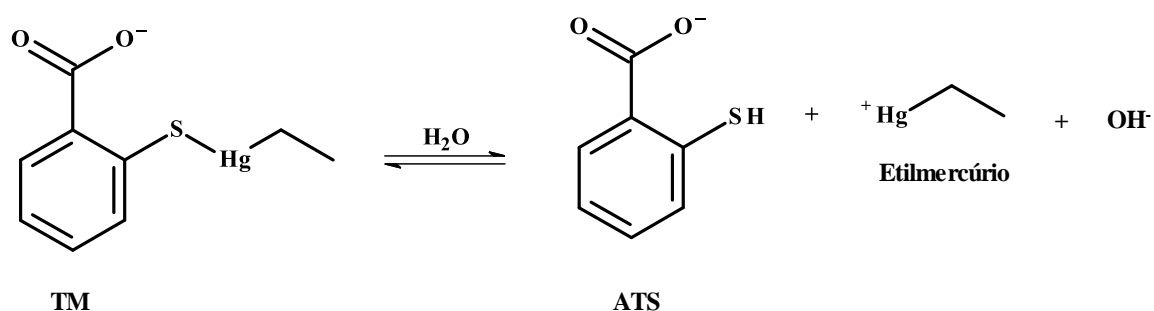
1.4 Determinação de timerosal em vacinas com dispositivos baseados em papel (PADs)

O timerosal é um composto orgânico de mercúrio e compreende cerca de 49% (m/m) de mercúrio. Essa substância é utilizada desde a década de 1930 como conservante devido a propriedades bactericidas e antifúngicas (ACOSTA *et al.*, 2015). Essas características proporcionam a aplicação desse composto como conservante em formulações farmacêuticas, como vacinas, soluções oftálmicas, medicamentos tópicos, entre outras. Em vacinas, a concentração de timerosal pode ser de até 0,01% (m/v), ou seja, 50 mg de timerosal por dose de 0,5 mL da vacina (XU *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2010).

Diferentemente de outros conservantes de vacinas, o timerosal foi amplamente utilizado devido a estudos que demonstraram que a potência das vacinas não era reduzida pelo uso desse conservante, no entanto estudos mais recentes demonstram que as vacinas que usam TM como conservante pode apresentar afeitos adversos, como autismo (GEIER *et al.*, 2016). Mesmo assim, até hoje o TM vem sendo usado, principalmente em vacinas multidoses (SANTOS *et al.*, 2010).

No corpo humano, o timerosal pode ser hidrolisado em etilmercúrio ($C_2H_5Hg^+$) e ácido tiosalicílico (ATS) através da reação/interação com HSA no subdomínio IB (SANTOS *et al.*, 2018; TALL *et al.*, 2021). Assim, as propriedades bactericidas e antifúngicas estão diretamente relacionadas aos produtos de hidrólise em meio aquoso, principalmente o etilmercúrio. Embora todas as formas de mercúrio possam ser potencialmente tóxicas aos seres humanos, os compostos de mercúrio (di- ou mono alquilado) são de preocupação especial devido à sua fácil penetração através das membranas biológicas, bioacumulação eficiente, alta volatilidade e eliminação de longo prazo dos tecidos (ACOSTA *et al.*, 2015).

Figura 2 – Estrutura química do timerosal (TM) e produtos de degradação em meio aquoso, ácido tiosalicílico (ATS) e Etilmercúrio ($C_2H_5Hg^+$).



Fonte: adaptado de SANTOS *et al.*, 2018.

No entanto, distúrbios do desenvolvimento neurológico, como autismo e hiperatividade, em crianças vacinadas com vacinas contendo timerosal foram evidenciadas em uma análise de acompanhamento (XU *et al.*, 2018). Devidos a essa problemática envolvendo o uso de timerosal como conservante em vacinas, há estudos que recomendam identificar conservantes alternativos, por essa razão, os Estados Unidos, a União Europeia e em outros países desenvolvidos, o timerosal não é mais utilizado como conservante em vacinas, principalmente as vacinas dedicadas a vacinação infantil. No entanto, em alguns países em desenvolvimentos ainda usam timerosal em vacinas prescritas para mulheres grávidas, recém-nascidos e crianças pequenas devido aos menores custos, quando relacionados a vacinas monodoses (HASEGAWA *et al.*, 2018).

A determinação do timerosal em produtos farmacêuticos é realizada de duas maneiras distintas: a primeira esta relacionada diretamente como timerosal e a segunda esta relacionada com Hg total (ZAREBA; SANECKI; RAWSKI, 2016). Dentre os métodos para determinação TM a partir de mercúrio total requerem que as amostras sejam mineralizadas para formar o mercúrio inorgânico, no entanto, existem também outros métodos em que TM é determinado diretamente (LAZO; KUCUKU, 2012; ZAREBA; SANECKI; RAWSKI, 2016).

Nesse sentido, várias técnicas analíticas, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), amperometria, espectrometria de absorção atômica (AAS), espectrometria de fluorescência atômica (AFS), emissão atômica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) ou espectrometria de massa (ICP-MS) e colorimetria foram desenvolvidas para determinação de timerosal, no entanto, essas técnicas instrumentais apresentam desvantagens, como alto custo de equipamentos e manutenção, uso de gases, reagentes e ácidos em grande quantidade e com alto grau de pureza além de produzir resíduos com potencial de toxicidade (CARRERA; SANTIAGO; VEJA, 2016; WU *et al.*, 2012). Nesse sentido, o desenvolvimento de métodos analíticos que sejam simples, fáceis de usar, precisos, sensíveis e de baixo custo é um grande desafio visando o uso em análises de rotina.

Devido a necessidade de monitorar o TM em amostras como vacinas, nos últimos anos os dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (PADs) receberam grande destaque, principalmente devido às vantagens relacionadas ao baixo custo, facilidade de fabricação e de uso, velocidade de análise e baixo consumo de amostra e reagente. Devido a essas vantagens, os PADs podem ser usados como plataformas para determinação de mercúrio inorgânico, como já descrito na literatura, de maneira econômica e fácil de usar, e indiretamente, a determinação de timerosal (CAI *et al.*, 2018).

1.5 Desenvolvimento de sondas fluorescentes

O desenvolvimento de novas metodologias analíticas para determinação de espécies de interesse biológico e clínico que apresentem elevada sensibilidade e propriedades físicas que sejam passíveis de serem monitoradas por meio de técnicas simples, constitui uma tarefa desafiadora para a investigação em diferentes sistemas (VALEUR, 2012; LUO *et al.*, 2018).

O desenvolvimento e a aplicação das sondas fluorescentes visando informações mais seguras, em menor tempo e empregando procedimentos menos invasivos está se tornando muito importante. Neste sentido, o emprego de novas moléculas com propriedades fluorescentes tem sido amplamente explorado para gerar informações de diferentes sistemas biológicos, em especial, que possuam comportamento espectral diferente na presença/ausência do alvo de interesse. Dessa forma, tem-se como interesse o desenvolvimento de moléculas fluorescentes latentes, as quais alteram suas propriedades ópticas após reagir/interagir com os sistemas alvo (LEE *et al.*, 2013; ZHANG; SONG; YUAN, 2018; TIAN *et al.*, 2016).

Assim, uma sonda fluorescente é simplificada, um fluoróforo que está preparado para responder a um estímulo específico ou localizar uma determinada região em um sistema biológico considerando mudanças fotofísicas, como a emissão ou supressão de fluorescência, permitindo assim, detectar diferentes espécies, como íons, moléculas, componentes particulares de arranjos biomoleculares complexos, incluindo biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos e até mesmo tecidos e células vivas, garantindo sensibilidade e seletividade (CHEN *et al.*, 2021).

A partir das características como sensibilidade e seletividade, o desenvolvimento de novas moléculas para atuar como sondas fluorescentes podem ser usadas visando a descoberta de medicamentos, melhoramento do diagnóstico por imageamento celular de diferentes doenças, análise ambiental e em diversas aplicações médicas, as quais estão mudando dramaticamente as potencialidades da análise química (FU; FINNEY, 2018; ZHU; HAMACHI, 2020).

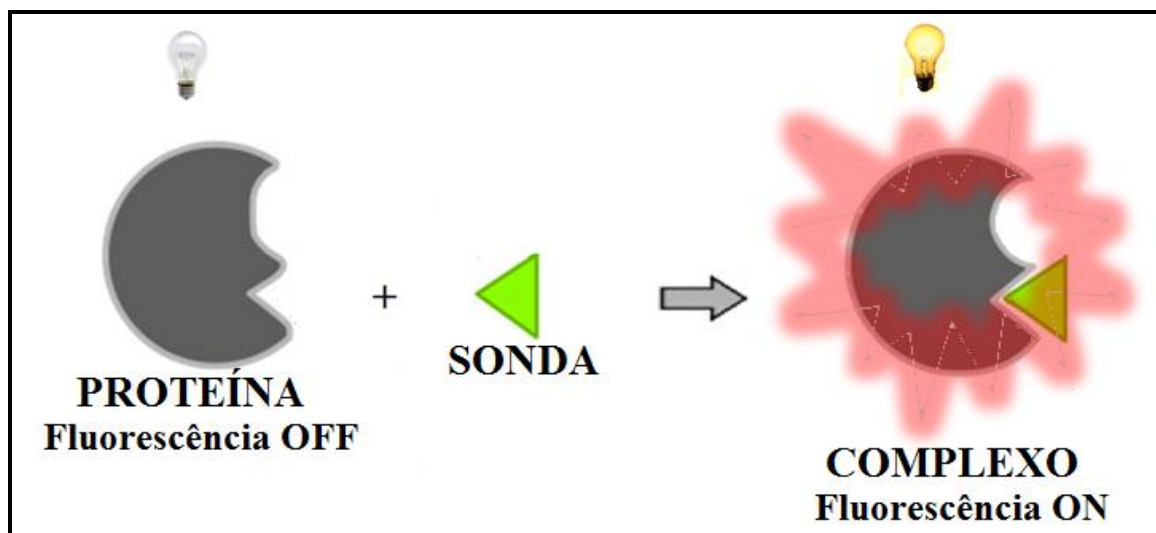
1.6 Planejamento de novas sondas fluorescentes (*off-on*)

No planejamento de novas sondas fluorescentes, a estrutura molecular pode ser modificada para controlar parâmetros importantes como o comprimento de onda de excitação e o comprimento de onda de emissão, a afinidade de ligação ao alvo, a reatividade química e a localização subcelular (JUN; CHENOWETH; PETERSSON, 2020). Neste sentido, estas sondas podem ser projetadas baseando-se em diferentes tipos de mecanismos, sendo que os

principais são: transferência de carga intramolecular torcional (TICT), transferência fotoinduzida de elétrons (PET), aumento do sinal de fluorescência por quelação (CHEF), transferência de energia de ressonância de fluorescência (FRET), e transferência de prótons intramolecular de estado excitado (ESIPT), em que, a depender do mecanismo, as propriedades da sonda podem ser influenciadas diretamente (FAN *et al.*, 2014; GONÇALVES; MARSAIOLI, 2014).

A depender das propriedades fotofísicas, as sondas fluorescentes podem atuar de formas distintas, ou seja, com modos de ação diferenciados, sendo que os principais são o modo de ação *off-on* ou o modo de ação *on-off*. Dessa maneira, uma sonda com o modo de ação *off-on* atua devido a interação do analito com um reagente não fluorescente, formando um complexo fluorescente ou provocando uma mudança na conformação da molécula receptora. Esse modo de ação também é denominado como sistema “desligado-ligado”. Uma sonda *on-off* está associada à redução de fluorescência, o qual é resultante da interação do analito com reagente fluorescente, o modo de ação “*on-off*” também pode ser denominado como sistema “ligado-desligado” (BONNACCHI, 2011; MENG *et al.*, 2018). Na literatura, sondas com o modo de ação *off-on* são mais desejadas devido a maior aplicabilidade, como sensores químicos em amostras biológicas e em imageamento celular, por exemplo (XU *et al.*, 2016). Assim, na Figura 3 é mostrado um esquema de uma sonda com o modo de ação *off-on* aplicado na determinação de proteínas.

Figura 3- Representação esquemática de uma sonda fluorescente *off-on*. Modo desligado (*off*) analito (proteína) e a sonda separados e modo ligado (*on*) sonda - analito emitindo fluorescência.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Para um melhor entendimento desse modo de ligação *off-on*, na Figura 3 pode ser visualizado um exemplo uma sonda que se liga seletivamente a proteínas. Nesse caso, a

proteína a sonda apresentam baixa intensidade de fluorescência, mas quando o complexo sonda-proteína é formado, há um aumento do rendimento quântico da sonda, e conseqüentemente, um aumento da fluorescência. Assim, em proteínas, como as albuminas, que possuem sítios de ligação característicos e específicos para certas classes de moléculas, a sonda se liga somente nesse sítio de ligação e a partir das interações, há a formação do complexo fluorescente sonda- proteína.

1.7 Sondas fluorescentes para determinação de proteínas

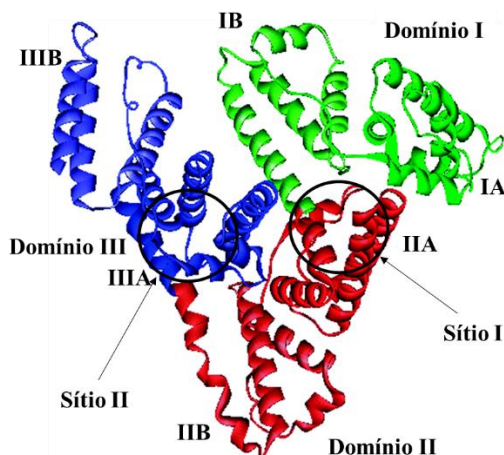
A albumina do soro humano (HSA) é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, tendo por isso, múltiplas funções no corpo humano, como a manutenção da pressão oncótica e transporte de várias drogas e metabólitos, sendo assim, os níveis normais dessa proteína no corpo humano são: 35 a 55 g L⁻¹ no soro e 100 mg L⁻¹ na urina (STANYON; VILES, 2012; XU *et al.*, 2018). Assim, um nível anormal de HSA em um fluido corporal pode estar associado a problemas de saúde, como a hipoalbuminemia (baixo nível de HSA no soro) e a microalbuminúria (alto nível de HSA na urina), que podem estar associadas a doenças coronárias, mieloma múltiplo, diabetes mellitus, doenças renais, distúrbios neurometabólicos e cirrose hepática. Portanto, a determinação de HSA em fluidos corporais é um potencial parâmetro no diagnóstico pré-clínico (ZHENG *et al.*, 2018; GATTA *et al.*, 2012).

Dentre as substâncias que a HSA transporta pelo corpo humano, destacam-se os hormônios da tireóide, hormônios solúveis em lipídios, bilirrubina não conjugada, ácidos graxos livres, cátions divalentes (Ca(II) e Mg(II)) e diversos fármacos (LARSEN *et al.*, 2016). O transporte de fármacos é uma propriedade de grande interesse farmacêutico, pois, ao se ligar à HSA, tanto as propriedades farmacocinéticas quanto a farmacodinâmica das drogas são afetadas (KIM *et al.*, 2020). A HSA além de apresentar importância no organismo, pode ainda ser disponível para uso terapêutico, onde é frequentemente usada para repor o fluido perdido, devido a doenças, como cirrose e ajudar a restaurar o volume de sangue em pacientes com trauma, queimaduras e cirurgia (FAN *et al.*, 2014).

A HSA é constituída por 585 aminoácidos, sendo 17 resíduos de tirosina e apenas um resíduo de triptofano. Estruturalmente apresenta regiões preferenciais de ligações com fármacos. Essas regiões são classificadas em três grandes domínios que são estruturalmente similares, denominados de I, II e III, e cada domínio contém dois subdomínios, classificados de A e B. O sítio I está posicionado no subdomínio IIA e o sítio II está posicionado no subdomínio IIIA e esse sítios são os principais locais de ligação da proteína, como pode ser mostrado na

Figura 4, embora determinadas moléculas se ligam a outros locais da proteína, como no subdomínio IB (MOREIRA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2018).

Figura 4. Estrutura da albumina do soro humano (HSA) mostrando os locais de ligação.



Fonte: adaptado de RAMEZANI E RAFII-TABAR, 2014.

Na literatura existem vários métodos para a determinação de proteínas totais, mas esses métodos apresentam várias desvantagens, entre as quais: baixa sensibilidade, faixa linear estreita, procedimentos de análise difíceis, baixa seletividade, resultados nem sempre reprodutíveis devido ao grau de pureza do corante BG-250 (Bradford) e o envolvimento de várias etapas (método de coloração com prata). Devidos a essas características, é de suma importância estudos que possibilitem o desenvolvimento de novos métodos capazes de determinar, não só proteínas totais, mas também proteínas individuais ou classes de proteínas, como a HSA (RAMEZANI *et al.*, 2012; ARISTOVA *et al.*, 2020).

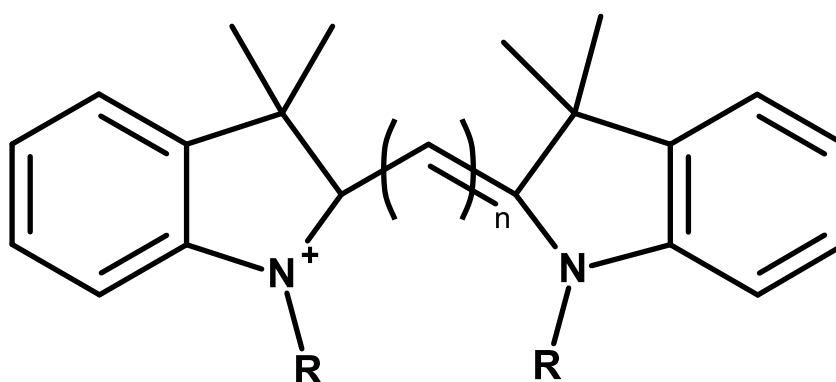
Neste sentido, o desenvolvimento de procedimentos analíticos rápidos, simples e com baixos limites de detecção para determinação de proteínas totais expressas em função de HSA em amostras biológicas como sangue, urina e extratos celulares é de fundamental importância. Por essa razão, diversas metodologias têm sido desenvolvidas para quantificar HSA, empregando métodos espectrofotométricos (JIANG; LUO, 2004), imunquímicos (LABIB *et al.*, 2016), eletroquímicos (CIEPLAK *et al.*, 2015), eletroforese capilar com detecção no UV (HASELBERG *et al.*, 2007) e fluorescência molecular (LEE *et al.*, 2019; ZAIA *et al.*, 2005; PATONAY *et al.*, 2005). Entre essas metodologias destaca-se a utilização de sondas fluorescentes por apresentarem características como alta sensibilidade, seletividade e natureza não destrutiva das amostras, além de serem aplicadas no imageamento celular.

Mesmo com as vantagens da fluorescência molecular e das várias sondas fluorescentes para determinação de albumina sérica desenvolvidas nos últimos anos, a maioria delas

apresentam limitações, como síntese complexa e características espectrais que impossibilitam a aplicação em sistemas biológicos, pois possuem comprimentos de onda de excitação (<500 nm) e de emissão (<600 nm) são na região do UV- visível, não podendo evitar a interferência da autofluorescência biológica. Nesse sentido, sondas que possuem comprimentos de onda de excitação e emissão na região do infravermelho próximo (NIR), se destacam para a determinação direta de albuminas em amostras biológicas, devido à característica como a da maioria dos tecidos não serem afetados pela radiação e não apresentarem autofluorescência nessa região do espectro, de 600 a 900 nm, bem como pela maior penetrabilidade nos tecidos, aproximadamente 5 mm. (ARISTOVA *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2016). Dessa forma, o desenvolvimento e síntese de sondas fluorescentes HSA que possam emitir na região do infravermelho próximo (NIR) é um grande desafio.

Assim, dentre as sondas fluorescentes que são sensíveis a albumina e tem a capacidade de emitir na região do infravermelho próximo (NIR), destacam-se os derivados de cianina, pois estes apresentam grande capacidade para diagnóstico em pesquisas médicas (REJA *et al.*, 2013; LUO *et al.*, 2018). As sondas derivadas de cianina são moléculas catiónicas (um nitrogênio terminal) nas subunidades heterocíclicas que são ligadas por uma ponte de polimetina, com átomos de carbono com hibridização sp^2 que liga dois átomos de nitrogênio, ou seja, apresentam ligações conjugadas. Na Figura 5 é mostrado uma estrutura genérica para um derivado de cianina.

Figura 5. Estrutura genérica dos derivados de cianina.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Na Figura 5, o valor de “n” pode ser: 1, 3, 5 e 7 e tem nomenclatura diferentes conforme o seu valor, sendo: monometina (Cy1) para $n = 1$, trimetina (Cy3) para $n = 3$, pentametina (Cy5) para $n = 5$ e Heptametina (Cy7) para $n = 7$. Os derivados de cianina possibilitam a determinação de albuminas em meios biológicos, devido a características moleculares como a

conjugação de ligações, empilhamento dos elétrons π (π) e acoplamento ao sítio de ligação da proteína impedindo a rotação molecular devido aos fenômenos de transferência de carga intramolecular torcida (TICT) (ZHANG *et al.*, 2013).

Derivados de cianina podem ser usados na determinação de HSA através da inibição de seu comportamento de TICT, ou seja, esses derivados apresentam baixa fluorescência devido a rotação molecular, mas quando acontece a interação com algum sítio de ligação da proteína, como o domínio hidrofóbico, a TICT fica impedida e a sonda fica estabilizada adotando uma geometria plana, passando, assim a emitir fluorescência (ZHAO *et al.*, 2019). Além disso, as sondas têm como características a emissão na região do infravermelho, o que é um parâmetro importante para aplicação em amostras biológicas. Dessa forma, o desenvolvimento e síntese de sondas fluorescentes para íons determinação de HSA que possam ser aplicados em solução aquosa com mínimo de solventes orgânicos é um grande desafio.

Nesse sentido, projetar sondas fluorescentes para propor alternativas mais eficientes e seletivas, menos susceptíveis a variações nos resultados, e por consequência mais confiáveis, para detecção de HSA em sistemas biológicos apresenta grande relevância. Uma vez que, moléculas capazes de exibir fluorescência (*off-on*), principalmente no infravermelho próximo (NIR), após interagir ou reagir com uma macromolécula alvo de interesse, como a HSA, constituem um papel importante no desenvolvimento de estratégias analíticas para aplicações biomédicas (GAO *et al.*, 2017; KOBAYASHI *et al.*, 2010).

1.8 Justificativa do trabalho

O que justifica esse trabalho está relacionado a necessidade de desenvolver novas metodologias que venham a ajudar no diagnóstico de determinadas doenças ou que possam ser utilizadas para o controle de espécies de interesse em amostras clínicas. Sendo assim, devido a alguns métodos descritos na literatura apresentarem desvantagens, como alto consumo de reagentes, elevado custo de análise e manutenção de equipamentos, dentre outras, novas metodologias são propostas para suprir essas limitações e serem empregadas em análises de rotina.

1.9 Objetivo geral

Diante da importância de monitorar espécies de importância biológica, visando melhorar o diagnóstico de doenças ou controle de qualidade de produtos, os objetivos deste trabalho foram:

- (i) O desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de timerosal em vacinas utilizando dispositivos em papel como plataformas analíticas.
- (ii) O desenvolvimento uma metodologia analítica empregando uma sonda fluorescente baseada no conceito *off-on* com emissão no infravermelho próximo (NIR) para a determinação de HSA em amostras biológicas;

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, G., *et al.* Determination of thimerosal in pharmaceutical industry effluents and river waters by HPLC coupled to atomic fluorescence spectrometry through post-column UV-assisted vapor generation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 106, p. 79-84, 2015.
- ARAUJO, W. R., *et al.* Portable analytical platforms for forensic chemistry: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1034, p. 1-21, 2018.
- ARISTOVA, D., *et al.* Far-red pentamethine cyanine dyes as fluorescent probes for the detection of serum albumins. **Royal Society Open Science**, v. 7: 1-14, 2020.
- BERGQUIST, J., TURNER, C. Analytical chemistry for a sustainable society – trends and implications. **Anal Bioanal Chem**, 410, 3235–3237 (2018).
- BERLIN, M.; ZALUPS, R. K.; FOWLER, B. A. Mercury. *In*: NORDBERG, G.; FOWLER, B.; NORDBERG, M. (Ed.). **Handbook on the Toxicology of Metals**. 4. ed. Elsevier, 2015. Chapter 46, p. 1013-1075.
- BLANCHFIELD, P.J., RUDD, J.W.M., HRENCHUK, L.E. *et al.* Experimental evidence for recovery of mercury-contaminated fish populations. **Nature** **601**, 74–78 (2022).
- BOLLEN, A., WENKE, A., BIESTER, H. Mercury speciation analyses in HgCl₂-contaminated soils and groundwater--implications for risk assessment and remediation strategies. **Water Res.** 2008 Jan;42(1-2):91-100.
- BONACCHI, S., *et al.* Luminescent Silica Nanoparticles: Extending the Frontiers of BRIGHTNESS. **Angew. Chem. Int. Ed. Italia**, v. 50, p. 4056-4066, 2011.
- CAI, L., *et al.* Visual quantification of Hg on a microfluidic paper-based analytical device using distance-based detection technique. **AIP Advances**, v. 7, p. 2158-3226, 2017.
- CARRASCO, L.; DÍEZ, S.; BAYONA, J. M. Simultaneous determination of methyl- and ethyl-mercury by solid-phase microextraction followed by gas chromatography atomic fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 51, p. 8828–8834, 2009.
- CARRERA, S., SANTIAGO, G., VEJA, M., *et al.* Spectrophotometric determination of dithizone–mercury complex by solid phase microextraction in micropipette tip syringe packed with activated carbon xerogel. **Microchemical Journal**, v. 129, p. 133-136, 2016.
- CHEN, W. *et al.* Fluorescent probes for pH and alkali metal ions. **Coordination Chemistry Reviews**, v.427, p. 213584, 2021 (No prelo).
- CHEN, W., *et al.* A Simple Paper-Based Colorimetric Device for Rapid Mercury (II) Assay. **Scientific Reports**, v.6, p. 1-8, 2016.
- COSTA, M. N., *et al.* A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper. **Nanotechnology**, v. 25, 0. 1-12, 2014.
- EKINCI, M.; CEYLAN, E.; KELEŞ, S.; ÇAĞATAY, H. H.; APIL, A.; TANYILDIZ, B.; ULUDAG, G. Toxic effects of chronic mercury exposure on the retinal nerve fiber layer and

macular and choroidal thickness in industrial mercury battery workers. **Medical Science Monitor**, v. 20, p. 1284–1290, 2014.

FAN, L., *et al.* 4-(8-Hydroxyquinolin-7'-yl) -1-phenyl-2,3-dimethyl-5-pyazole as a fluorescent chemosensor for aluminum ion in acid aqueous medium. **Sensors and Actuators B.**, v. 205, p. 249-254, 2014.

FELISITA, Y., *et al.* Microfluidic Paper-based Analytical Devices (μ PADs) For Analysis Lead Using Naked Eye and Colorimetric Detections, **Materials Science and Engineering**, v. 546, p. 32033-32041, 2019.

FU, Y.; FINNEY, N. S. Small-molecule fluorescent probes and their design. **RSC Adv.**, v. 8, p. 29051–29061, 2018.

GAO M. *et al.* Fluorescent chemical probes for accurate tumor diagnosis and targeting therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 46, p. 2237-2271, 2017.

GAUTAM, P. K.; GAUTAM, R. K.; BANERJEE, S.; CHATTOPADHYAYA, M. C.; PANDEY, J. D. Heavy Metals: Sources, Toxicity and Remediation Techniques. In: Heavy Metals in the Environment: Fate, Transport, Toxicity and Remediation Technologies. USA: Nova Science Publishers, 2016.

GATTA, A., VERARDO, A., BOLOGNESI, M. Hypoalbuminemia. **Intern. Emerg. Med.**, v. 7, p. 193-199, 2012.

GEIER, D. A.; KERN, J. K.; SYKES, L. K.; GEIER, M. R.; HOOKER, B. S.; KING, P. G. A longitudinal cohort study of the relationship between Thimerosal-containing hepatitis B vaccination and specific delays in development in the United States: Assessment of attributable risk and lifetime care costs. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 6, n. 2, p. 105–118, 2016.

GONÇALVES, C. C. S., MARSAIOLI, A. J. Monitorando atividades enzimáticas com sondas fluorogênicas. **Química Nova**, v. 37, n. 6, p. 1028-1036, 2014.

HASEGAWA, Y.; CURTIS, B.; YUTUC, V.; RULIEN, M.; MORRISROE, K.; WATKINS, K.; FERRIER, C.; ENGLISH, C.; HEWITSON, L.; SLUPSKY, C. M. Microbial structure and function in infant and juvenile rhesus macaques are primarily affected by age, not vaccination status. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.

JIANG, C., LUO, L. Spectrofluorimetric Determination of Human Serum Albumin Using a Tetracycline–Europium Complex, **Analytical Letters**, 37:6, (2004) 1129-1137.

JUN, J. V., CHENOWETH, D. M., PETERSSON, E. J. Rational design of small molecule fluorescent probes for biological applications. **Org. Biomol. Chem.**, v. 18, p. 2020, 5747-5763, 2020.

KIM, Y., *et al.* A Near-infrared Turn-on Fluorescent Sensor for Sensitive and Specific Detection of Albumin from Urine Samples. **Sensors**, v. 20, p. 1232- 1245, 2020.

KOBAYASHI, H. *et al.* New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. **Chemical Review**, v. 110, p. 2620-2640, 2010.

- LABIB, M., SARGENT, E. H., KELLEY, S. O. Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant biomolecules. **Chem. Rev.** 2016, 116, 16, 9001–9090.
- LAZO, P.; KUCUKU, M. Analysis of Mercurial Preservatives in Different Vaccines by Cold Vapor Atomic Absorption Spectrophotometry. **Journal of Analytical Science & Technology**, v. 3, n. 1, 121-127, 2012.
- LEE, H., *et al.* Pyrazole-substituted Near-infrared Cyanine Dyes Exhibit pH dependent Fluorescence Lifetime Properties. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 89, n. 2, 2013.
- LEE, S., *et al.* Development of Human Serum Albumin Selective Fluorescent Probe Using Thieno[3,2-b]pyridine-5(4H)-one Fluorophore Derivatives. **Sensors**, v.19, p. 5298-5311, 2019.
- LUO, Z., *et al.* An environment-sensitive fluorescent probe for quantification of human serum albumin: Design, sensing mechanism, and its application in clinical diagnosis of hypoalbuminemia. **Dyes and Pigments**, v. 152, p. 60-66, 2018.
- LUO, Z., *et al.* Paper-Based Ratiometric Fluorescence Analytical Devices towards Point-of-Care Testing of Human Serum Albumin. **Angewandte Chemie**, v. 59 ,p. 3131-3136, 2020.
- LUO, Z., *et al.* An environment-sensitive fluorescent probe for quantification of human serum albumin: Design, sensing mechanism, and its application in clinical diagnosis of hypoalbuminemia. **Dyes and Pigments**, v.152, p. 60-66, 2018.
- MAHBUB, K. R.; KRISHNAN, K.; NAIDU, R.; ANDREWS, S.; MEGHARAJ, M. Mercury toxicity to terrestrial biota. **Ecological Indicators**, v. 74, p. 451–462, 2017.
- MOREIRA, M. B., *et al.* Investigação da supressão de fluorescência de soro albumina bovina e humana por complexo de rutênio. **Química Nova**, v. 38, n. 2, p. 227-232, 2015.
- MERONE, G.M., TARTAGLIA, A., LOCATELLI, M., D'OVÍDIO, C., ROSATO, E., DE GRAZIA, U., SANTAVENERE, F., ROSSI, S., SAVINI, F. Química Analítica no Século XXI: Desafios, Soluções e Perspectivas Futuras das Análises Quantitativas de Matrizes Complexas no Campo Biológico/Clinico. **Analytica**, 2020, 1, 44-59.
- NAWAZ, H., ZHANG, X., CHEN, S., YOU, T., XU, F. Recent studies on cellulose-based fluorescent smart materials and their applications: a comprehensive review, **carbohydrate polymers**, volume 267, 2021, 118135.
- NAYFEH, A.; KASSIM, T.; ADDASI, N.; ALGHOULA, F.; HOLEWINSKI, C.; DEPEW, Z. A Challenging Case of Acute Mercury Toxicity. **Case Reports in Medicine**, v. 2018, p. 1010678, 2018.
- NOGUEIRA, S. A., *et al.* Redox titration on foldable paper-based analytical devices for the visual determination of alcohol content in whiskey samples. **Talanta**, v. 194, p. 363-369, 2019.
- O'CONNOR, D., HOU, D., OK, Y.S., MULDER, J., DUAN, L., WU, Q., WANG, S., TACK, F. M. G., RINKLEBE, J. Mercury speciation, transformation, and transportation in soils, atmospheric flux, and implications for risk management: A critical review. **Environ Int.** 2019 May;126: 747-761.

- PATONAY, G., *et al.* Spectroscopic Study of a Novel Bis(heptamethine cyanine) Dye and Its Interaction with Human Serum Albumin. **Appl Spectrosc**, v. 59. n. 5, p. 682-690, 2005.
- PICHICHERO, M. E.; CERNICHIARI, E.; LOPREIATO, J.; TREANOR, J. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: a descriptive study. **The Lancet**, v. 360, n. 9347, p. 1737–1741, 2002.
- RAMEZANI, A. M., *et al.* Spectrofluorimetric Determination of Human SerumAlbumin Using Terbium-Danofloxacin Probe. **The ScientificWorld Journal**, v. 2012, p. 1-9, 2011.
- RAMEZANI, F.; RAFII-TABAR, H. An in-depth view of human serum albumin corona on gold nanoparticles. **MolecularBioSystems**, v. 11., p. 454-462, 2014.
- REJA, S. I., *et al.* A TICT based NIR-fluorescent probe for Human Serum Albumin: A pre-clinical diagnosis in blood serum. **ChemComm.**, v. 52, 1182-1185, 2016.
- SANTOS, E. J., *et al.* Determination of thimerosal in human and veterinarian vaccines by photochemical vapor generation coupled to ICP OES. **Anal. At. Spectrom.**, v. 25, p. 1627-1632, 2010.
- SANTOS, J. C. N., *et al.* Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA). **International Journal of Biological Macromolecules**,v. 113, 1032-1040, 2018.
- SARGAZI, A., FATIMA, I., KIANI, M. H., MOHAMMADZADEH, V., ARSHAD, R., BILAL, M., RAHDAR, A., DÍEZ-PASCUAL, A. M., BEHZADMEHR, R. Fluorescent-based nanosensors for selective detection of a wide range of biological macromolecules: A comprehensive review. **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 206, 2022, Pages 115-147,
- SARI, E., ÜZEK, R., MERKOÇI, A. Paper Based Photoluminescent Sensing Platform with Recognition Sites for Tributyltin. **ACS Sensors**, 4 (3), 645-653, 2019.
- SOUSA, L. R., DUARTE, L. C., COLTRO, W. K. T. Instrument-free fabrication of microfluidic paper-based analytical devices through 3D pen drawing. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 312, p. 1-8, 2020.
- STANYON, H.F.; VILES, J.H. Human Serum Albumin Can Regulate Amyloid- β Peptide Fiber Growth in the Brain Interstitium implications for alzheimer disease. **J. Biol. Chem.**,v. 287, p. 28163–28168, 2012.
- SURESH, V., *et al.* Non-invasive paper-based microfluidic device for ultra-low detection of urea through enzyme catalysis. **R. Soc. open sci.**,v. 5, p. 1-9, 2018.
- TALL, A., DA COSTA, K.R., DE OLIVEIRA, M.J., TAPSOBA, I., ROCHA, U., SALES, T.O., GOULART, M.O.F., SANTOS, J.C.C. Photoluminescent nanoprobe based on thiols capped CdTe quantum dots for direct determination of thimerosal in vaccines, **Talanta**, 221, 121545, 2021.
- TIAN, J. *et al.* A novel turn-on Schiff-base fluorescent sensor for aluminum (III) ions in living cells. **RSC Advances**. v. 5, p. 107012-107019, 2015.

VALEUR, Bernard. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications**. 2 ed. Ingleterra: Wiley-VCH, 2013.

WU, Y.Y.*et al.* A selective and sensitive fluorescent albumin probe for the determination of urinary albumin. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 11507–11510.

WU, Q., *et al.* Dielectric barrier discharge-plasma induced vaporization for the determination of thiomersal in vaccines by atomic fluorescence spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, v. 27, p. 496-500, 2012.

XU, Y. *et al.* A fluorescent sensor for discrimination of HSA from BSA through selectivity evolution. **Analytica Chimica Acta**, v. 1043, p. 123-31, 2018.

ZAREBA, M.; SANECKI, P. T.; RAWSKI, R. Simultaneous Determination of Thimerosal and Aluminum in Vaccines and Pharmaceuticals with the Use of HPLC Method. **Acta Chromatographica**, v. 28, n. 3, p. 299–311, 2016.

ZENG, X., *et al.* A Near Infrared Fluorescent Probe for Sensitive Determination of Human Serum Albumin. **Anal Sci.**, v. 32, n. 12, p. 1291-1294, 2016.

ZHANG, R.; SONG, B.; YUAN, J. Bioanalytical methods for hypochlorous acid detection: Recent advances and challenges. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 99, 1-33, 2018.

ZHANG, J., *et al.* Oligo(phenothiazine)s: Twisted Intramolecular Charge Transfer and Aggregation-Induced Emission. **J. Phys. Chem. C**, v.117, n. 44, 23117–23125, 2013.

ZHAO, R., *et al.* A versatile probe for serum albumin and its application for monitoring wounds in live zebrafish. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, p. 2782-2789, 2019.

ZHENG, D., *et al.* A small, steady, rapid and selective TICT based fluorescent HSA sensor for pre-clinical diagnosis. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 271, 82-89, 2018.

ZOLOTOV, Y. A. Evolution of chemical analysis methods. **Her. Russ. Acad. Sci.** 90, 56–62 (2020).

2 DETERMINAÇÃO DE TIMEROSAL, UM COMPOSTO ORGÂNICO DE MERCÚRIO EM VACINAS, USANDO UM DISPOSITIVO ANALÍTICO BASEADO EM PAPEL COM DETECÇÃO COLORIMÉTRICA

2.1 Introdução

O timerosal (TM) é um composto orgânico mercurial que contém 49,6% de mercúrio em massa, e tem sido amplamente utilizado como agente antimicrobiano e antifúngico em uma grande variedade de produtos, incluindo soluções antissépticas tópicas, cosméticos, produtos de limpeza para lentes de contato e outros produtos biológicos injetáveis (ACOSTA *et al.*, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2010). Em vacinas como a da hepatite B, difteria tripla, tétano e coqueluche, o TM tem sido usado como conservante desde a década de 1930 devido às suas propriedades antibacterianas e antifúngicas (SANTOS *et al.*, 2018). No entanto, tem-se comprovado que a hidrólise do TM em meio biológico leva à formação de ácido tiosalicílico e etilmercúrio (EtHg⁺), sendo que esse último possui elevado potencial tóxico devido à sua fácil penetração nas membranas, bioacumulação, volatilidade e longo prazo para eliminação dos tecidos, fato este, que pode levar a distúrbios neurológicos, como autismo e hiperatividade em crianças (GEIER *et al.*, 2015; XU *et al.*, 2018). Dessa forma, a incorporação de TM em vacinas constitui a terceira maior fonte de exposição ao mercúrio em seres humanos, portanto a quantificação desta espécie em diferentes matrizes tem sido uma demanda atual e continua (DÓREA, 2017; GEIER *et al.*, 2013).

A determinação de TM pode ser realizada preferencialmente explorando duas estratégias distintas, a quantificação diretamente na forma orgânica como TM, ou após mineralização da matriz, e assim, determinando o Hg(II) gerado (PÉREZ-CABALLERO *et al.*, 2016). O TM pode ser determinado diretamente explorando técnicas de separação com diferentes sistemas de detecção, como cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV-vis (PÉREZ-CABALLERO *et al.*, 2016; ZAREBA *et al.*, 2015), detecção eletroquímica (PROCOPIO *et al.*, 1992) e acoplada a espectrometria de fluorescência atômica (AFS) (ACOSTA *et al.*, 2016), cromatografia gasosa acoplada a ICP-MS (QVARNSTRÖM *et al.*, 2003), eletroforese capilar com detecção no UV (JAWORSKA *et al.*, 2005), ICP OES por meio de geração fotoquímica de vapor frio (HE *et al.*, 2011), e por fluorescência molecular associada a supressão do sinal de quantum dots de CdTe (TALL *et al.*, 2021). A decomposição da matriz seguida da determinação de Hg total [como Hg(II)] pode ser realizada empregando técnicas como a espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica (GF AAS) (LAZO, KUCUKU, 2012), AFS (OLIVEIRA *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2012), voltametria (PEDROZO-PENAFIEL *et al.*, 2012; PENAGOS-LLANOS *et al.*, 2019), além de colorimetria (CARRERA

et al., 2016). No entanto, algumas destas técnicas apresentam desvantagens como o elevado número de etapas no preparo da amostra, tempo de análise, custo operacional e de manutenção dos equipamentos, além em muitos casos, de pessoal especializado (TAKAHASHI *et al.*, 2009).

Nos últimos anos os dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (PADs) receberam grande destaque, principalmente devido às vantagens relacionadas ao baixo custo, facilidade e versatilidade na fabricação e uso, velocidade de análise e baixo consumo de amostra e reagente (química verde), possibilitando a sua aplicação em diversas áreas e determinação de diferentes analitos, como mercúrio inorgânico (WANG *et al.*, 2014; WISANG *et al.*, 2019). Nesse sentido, CAI *et al.* (2017) desenvolveram um PAD para determinação de Hg(II) em amostras de água sintéticas com detecção visual baseado na distância, usando a ditizona como reagente colorimétrico. O uso de diferentes nanomateriais (modificados ou não) como nanopartículas de platina (CHEN *et al.*, 2016), de prata (FIRDAUS *et al.*, 2019; MEELAPSOM *et al.*, 2016), ouro (CHEN *et al.*, 2014), e curcumina (POURREZA *et al.*, 2016) como sonda colorimétrica têm sido associados a PAD para determinação de Hg(II) em diferentes tipos de água.

Assim, esse trabalho tem como objetivo quantificar o TM em amostras de vacinas após a conversão do composto orgânico de mercúrio a Hg(II). Neste sentido, foram usados diferentes sistemas oxidantes (KBr / KBrO₃ e KMnO₄) e ácido diluído em sistema aberto associado a um PAD com detecção colorimétrica explorando a reação entre ditizona e Hg(II). Por fim, a metodologia proposta mostrou-se rápida, de fácil uso, reproduzível, aplicável a análise de rotina e os resultados foram concordantes com o método de referência.

2.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar a metodologia quanto aos parâmetros químicos, como: concentração de ditizona, concentração e tipo de ácido utilizando Hg (II) como padrão;
- b) Otimizar a digestão do TM utilizando como soluções oxidantes KBr/KBrO₃ e KMnO₄;
- c) Avaliar os possíveis interferentes;
- d) Determinar as figuras de mérito para validação da metodologia
- d) Aplicar as estratégias de digestões otimizadas em amostras de vacinas;
- e) Validar a metodologia utilizando a técnica de fluorescência atômica como método de referência.

2.3 Experimental

2.3.1 Reagentes e soluções

Todos os reagentes usados são de pureza analítica, e água ultrapura ($< 1 \mu\text{S cm}^{-1}$) usando um purificador Master System MS2000 (Gehaka, Brasil) foi empregada para preparar as soluções. Uma solução estoque de ditizona 50 mg L^{-1} (reagente cromogênico) foi preparada pela dissolução direta do sólido em 10 mL de etanol, sendo refrigerada a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. As diluições subsequentes (quando necessárias) foram realizadas em etanol, uma vez que as soluções aquosas de ditizona são instáveis (CAI et al, 2017). Uma solução de mercúrio de 1000 mg L^{-1} em HNO_3 1% (v/v) (rastreadibilidade Specsol[®] 92786-62-4, NIST, EUA) foi usado para preparar as soluções padrão de mercúrio inorgânico. A solução estoque de timerosal (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) a 50 mg L^{-1} foi preparada pela dissolução da massa apropriada em água e completada até um volume final de 10 mL. O KMnO_4 (QUIMIBRAS, Brasil) a 1% (m/v) foi preparado diretamente na água, enquanto a mistura KBr/KBrO_3 (ambos Vetec, Brasil) foi preparada combinando volumes idênticos de soluções diluídas de KBr (0,11 M) / KBrO_3 (0,017 M) em meio HCl (Vetec, Brasil) a 1 M. A solução de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) foi preparada diretamente em água a 12% (m/v). O estudo dos interferentes foi realizado simulando as espécies presentes nas vacinas. Os seguintes compostos foram avaliados: NaCl (Vetec, Brasil), $\text{KAl(SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Alemanha) e $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, Brasil).

As amostras de vacinas foram adquiridas em unidades básicas de saúde (Jequiá da Praia, Alagoas, Brasil) e armazenadas de acordo com as instruções do fabricante de 2 a $8 \text{ }^\circ\text{C}$. As vacinas utilizadas para otimizar e validar o método foram contra difteria e tétano (DT), hepatite B (HB) e difteria, tétano e coqueluche (DTP).

2.3.2 Fabricação de dispositivos analíticos baseados em papel (PAD)

O PAD foi produzido usando a técnica de impressão em cera descrita por CARRILHO *et al.* (2009). O layout do dispositivo foi projetado usando o software Corel Draw[™] versão X8 para conter 60 microzonas (7 mm de diâmetro cada) dispostas em 6 colunas e 10 linhas. A impressão foi realizada em papel cromatográfico (Whatman N^o 1, 20 cm \times 20 cm) em uma impressora de cera Xerox (modelo ColorQube 8570, Xerox Corporation, Rochester, NY, EUA). O dispositivo impresso em cera foi aquecido a 150°C por 2 minutos até que a cera derretesse completamente para formar barreiras hidrofóbicas no substrato de papel. Finalmente, um lado do dispositivo de papel foi coberto com fita adesiva para evitar vazamento de amostra (NOGUEIRA *et al.*, 2019; TAVARES *et al.*, 2021).

2.3.3 Determinando TM usando o método proposto

A metodologia para determinação do TM foi baseada na reação do Hg(II) com a ditizona formando um complexo com estequiometria 1:2 em meio ácido (PRASERTBOONYAI *et al.*, 2016). Em cada zona de detecção de PAD foi adicionado 0,75 µL do reagente cromogênico e o aparelho foi deixado secar por 1 min. Em seguida, 1,5 µL da solução padrão ou amostra contendo Hg(II) foi adicionado e deixado secar completamente a zona de detecção no PAD. As imagens das zonas de reação foram obtidas por digitalização (600 dpi), e a intensidade de cor de cada reservatório contendo a ditizona e Hg(II) foi analisada usando o software Corel Photo-Paint™ nos canais de cor vermelho, verde e azul (RGB).

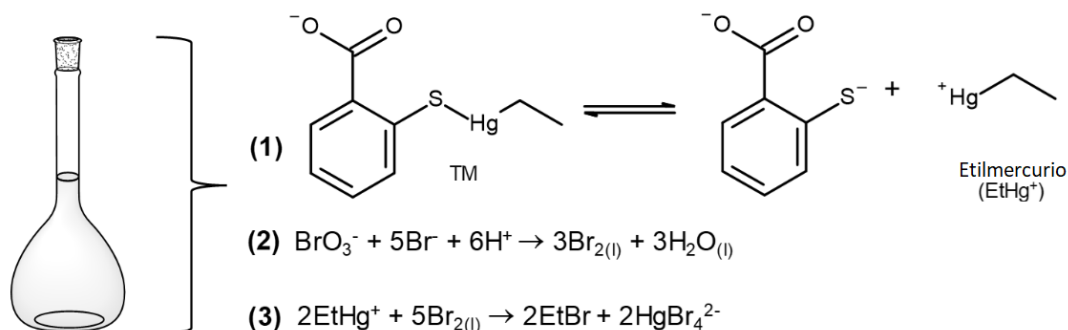
A metodologia para determinação do TM foi baseada na reação do Hg(II) com a ditizona formando um complexo com estequiometria 1:2 em meio ácido (PRASERTBOONYAI *et al.*, 2016). Em cada zona de detecção de PAD, 0,75 µL do reagente cromogênico foi adicionado e o dispositivo foi deixado secar por 1 min. Em seguida, 1,5 µL da solução padrão ou amostra contendo Hg(II) foi adicionado e deixado secar completamente a zona de detecção no PAD. As imagens das zonas de reação foram obtidas por digitalização (600 dpi), e a intensidade de cor de cada reservatório contendo a ditizona e Hg(II) foi analisada usando o software Corel Photo-Paint™ nos canais de cor vermelho, verde e azul (RGB).

Como o princípio do método colorimétrico é baseado na reação entre ditizona e Hg(II) e não diretamente com TM, foi necessário converter o composto orgânico de mercúrio para sua respectiva forma inorgânica (Esquema 1). Assim, foram avaliados sistemas oxidantes para promover a digestão do TM nas soluções padrão e nas amostras de vacina utilizando a mistura KBr/KBrO₃ ou KMnO₄ descrita por Oliveira et al. (2021). O protocolo de digestão foi realizado utilizando diferentes sistemas oxidantes. Inicialmente, em um balão volumétrico adicionou 1,2 mL de HCl 6 M e 1,00 mL de solução padrão TM ou as amostras (vacinas). As amostras de vacina foram previamente diluídas em água para ajustar as concentrações. Ao utilizar o sistema oxidante KBr/KBrO₃, 0,75 mL da mistura foi adicionado ao balão volumétrico contendo TM em meio ácido (solução padrão ou amostra), e 5 min foram deixados para o processo de oxidação. Em seguida, adicionou-se 0,12 mL de ácido ascórbico 12% (m/v) para retirar o excesso de bromo do meio reacional (conversão de Br₂ em Br⁻). Finalmente, o volume total foi completado para 5,00 mL com água ultrapura. Quando KMnO₄ foi usado como oxidante, as mesmas etapas iniciais foram realizadas; no entanto, para oxidação de TM, 1,0 mL de 1,0% (m/v) de KMnO₄ foi adicionado e, após 5 min, 0,54 mL de 12% (m/v) de ácido ascórbico foi

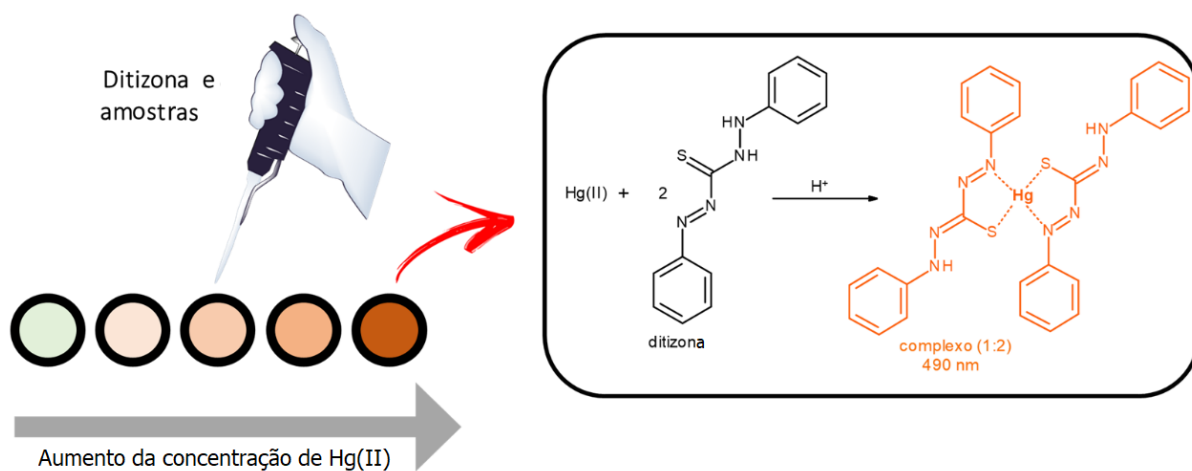
adicionado para reduzir qualquer excesso de MnO_4^- para Mn(II) (TALL *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2012).

Esquema 1. (A) Reações envolvidas no procedimento de digestão de TM para formação de Hg(II) em meio ácido e (B) Reação de íons inorgânicos de mercúrio com ditizona (meio ácido) no PAD.

(A) Digestão (preparação da amostra): conversão de TM (Etilmercúrio) em Hg(II)



(B) Formação do complexo colorido no PAD



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

2.3.4 Método de referência (CV AFS)

O método de referência foi realizado conforme descrito por Oliveira *et al.* (2021). As amostras de vacina foram mineralizadas em um sistema de micro-ondas pressurizado e fechado, equipado com dez rotores (SK-10) e sensores de temperatura e pressão (Ethos One, Milestone, Itália). As digestões por micro-ondas foram realizadas em triplicata ($n = 3$) de acordo com o seguinte procedimento: 0,50 mL de cada amostra de vacina foi introduzido no recipiente de reação; em seguida, foram adicionados 6,0 mL de HNO_3 65% (m/m), 2,0 mL de H_2O_2 30% (m/m) e 3,0 mL de água ultrapura, seguindo as condições do programa de aquecimento (Tabela 1). Medições da concentração total de mercúrio resultante da oxidação do TM foram realizadas em um espectrômetro de fluorescência atômica com módulo de vapor frio

(CV AFS) (modelo PSA 10.025 Millennium Merlin, PS Analytical, Orpington, Reino Unido). O método empregando CV AFS apresentou uma curva analítica de 1,0 a 20 µg L⁻¹ usando o padrão de mercúrio inorgânico. Finalmente, as soluções das amostras digeridas foram analisadas e a concentração de TM foi obtida a partir da concentração total de mercúrio usando a relação estequiométrica.

Tabela 1. O programa de aquecimento usado na digestão assistida por micro-ondas de amostras de vacinas.

Etapas	Tempo (min)	Potência (W)	Temperatura (°C)
I	15	700	TA* - 130
II	20	700	130
III	15	1000	130 - 180
IV	20	1000	180

*TA = temperature ambiente

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

2.3.5 Análise estatística

Neste trabalho, todos os parâmetros foram otimizados com base na sensibilidade analítica de cada condição. Assim, todas as curvas analíticas foram construídas com um mínimo de cinco pontos ($n = 5$) de acordo com a equação:

$$IP = a \times C_{Hg} + b \quad \text{Equação (1)}$$

onde IP é o valor total da intensidade do pixel, C_{Hg} é a concentração de mercúrio inorgânico; a é a inclinação da curva analítica, e b é a interceptação. O coeficiente de correlação linear (r) foi calculado para avaliar o arranjo dos pontos em termos de comportamento linear (MILLER *et al.*, 2018). O limite de detecção (LOD) foi estimado usando a equação $LOD = (3 \times sb)/a$, onde sb corresponde ao desvio padrão do branco analítico ($n = 10$). A reprodutibilidade foi avaliada usando o desvio padrão relativo (RSD) de dez medições independentes. O teste de hipótese (teste t de Student) foi utilizado para avaliar os resultados em um intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) para todos os procedimentos.

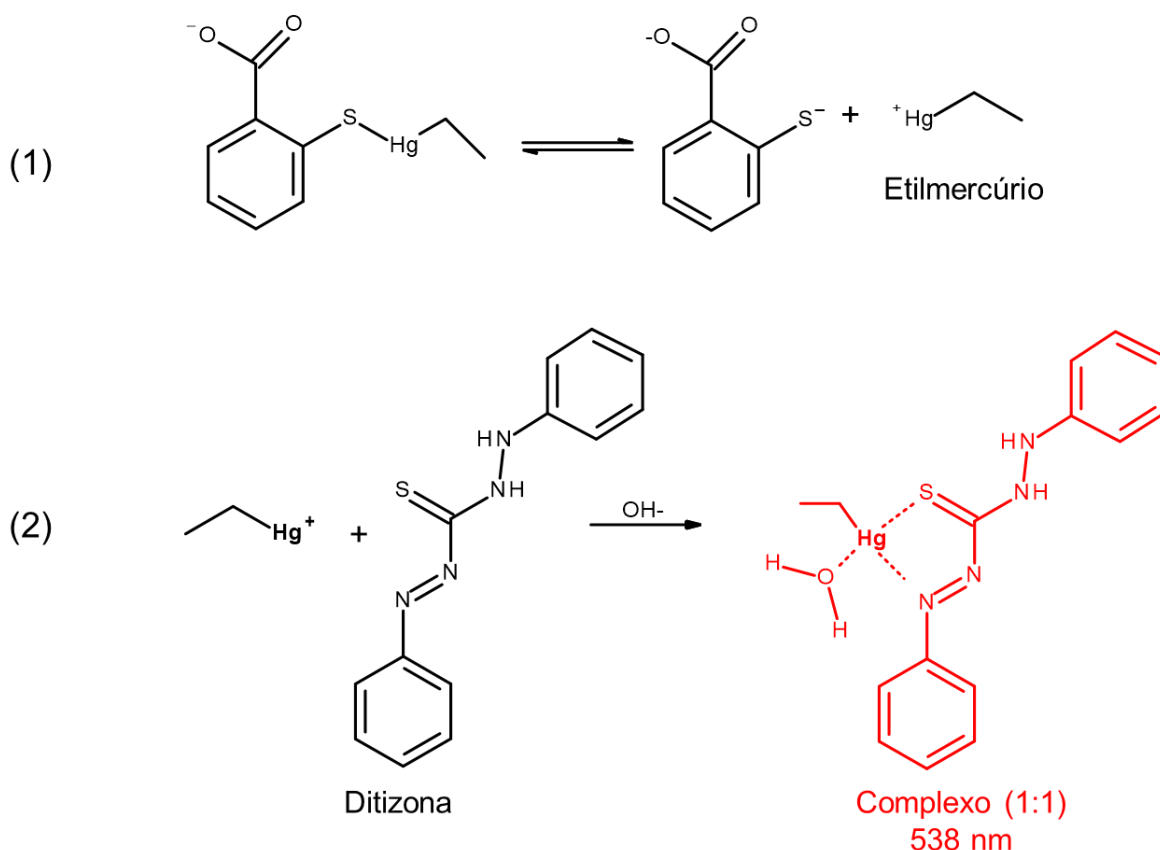
2.4 Resultados e Discussão

2.4.1 Princípio do método e avaliação preliminar

A determinação colorimétrica de TM pode ser realizada direta ou indiretamente [degradação de TM para Hg(II)] usando ditizona como reagente. A reação entre TM e ditizona ocorre em meio básico (método direto, $\lambda_{max} = 538$ nm, Esquema 2), (ZAREBA *et al.*, 2015; SHRIVASTAW *et al.*, 1995), bem como com Hg(II) (método indireto, $\lambda_{max} = 490$ nm,

Esquema S1) (KHAN *et al.*, 2005), levando à formação de complexos estáveis com estequiometrias de 1:1 e 1:2, respectivamente. No entanto, dependendo das condições de reação e instrumentação, o método TM-ditizona pode ser 10-20 vezes menos sensível do que o procedimento Hg(II)-ditizona (PÉREZ-CABALLERO *et al.*, 2016).

Esquema 2. (1) O equilíbrio de TM em meio aquoso leva à formação de derivados do ácido tioossalicílico e etilmercúrio. (2) Reação de etil mercúrio com ditizona em meio básico.

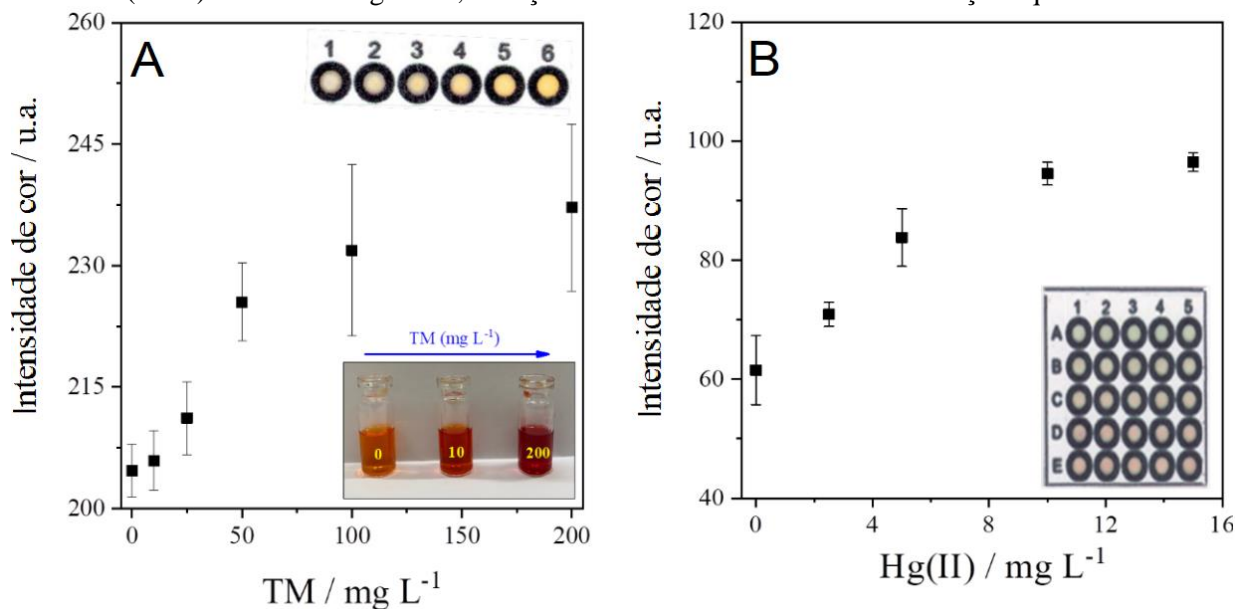


Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Assim, os sistemas TM-ditizona e Hg(II)-ditizona em papel foram avaliados para selecionar qual reação produziria um cromóforo estável e um método sensível. Em cada PAD, uma quantidade adequada de reagente cromogênico (ditizona, em meio básico ou ácido) foi adicionado à zona de reação e seco à temperatura ambiente. Uma solução padrão contendo TM ou Hg(II) foi então depositada na mesma zona de reação com outra etapa de secagem. Após a formação do complexo colorido TM-ditizona (Figura 6A) ou Hg(II)-ditizona (Figura 6B), a intensidade da cor foi medida no canal de cor RGB. Em ambos os sistemas, em condições não otimizadas, percebeu-se que houve variação de cor. No entanto, o método empregando a reação do Hg(II) apresentou uma sensibilidade 11 vezes maior do que a reação TM-ditizona. Assim, para desenvolver uma metodologia de determinação de TM de forma simples, sensível, de

baixo custo, portátil e ecologicamente correta, foi selecionada a reação entre Hg(II) e ditizona em meio ácido com detecção colorimétrica, utilizando PADs como uma plataforma analítica (WANG *et al.*, 2014; CAI *et al.*, 2017). O meio ácido garante a seletividade para medição de mercúrio em amostras de vacinas (que contêm AlCl_3) e não compromete a sensibilidade do método.

Figura 6. Formação do complexo colorido (A) TM-ditizona e (B) Hg(II)-ditizona, ambos os sistemas em PAD (n = 6). Dentro da Figura 6a, a reação entre TM e ditizona em uma solução aquosa é mostrada.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

2.4.2 Otimização das condições do método

2.4.2.1 Concentração da Ditizona

As etapas de otimização do sistema foram realizadas com soluções de Hg(II), uma vez que esta espécie de mercúrio foi gerada após a digestão do TM e apresentou maior sensibilidade para o método aplicado. A concentração do reagente cromogênico (ditizona) afeta drasticamente a sensibilidade do método, uma vez que controla a quantidade do complexo colorido de Hg(II)-ditizona formado na zona de detecção do μ PAD. A concentração de ditizona foi avaliada de 0,25 a 3 mM, e as condições de maior sensibilidade foram alcançadas em 0,75 mM (Figura 7A). Valores acima de 0,75 mM reduziram em até 83% a sensibilidade do método. Essa variação negativa na sensibilidade foi possivelmente causada por uma diminuição na solubilidade da ditizona (formação de agregados moleculares) através do aumento da concentração em meio aquoso (PEDROZO-PENAFIEL *et al.*, 2012). Além disso,

concentrações colorimétricas de reagentes inferiores a 0,75 mM reduziram a sensibilidade devido à formação limitada de complexos (PEDROZO-PENAFIEL *et al.*, 2012; PENAGOS-LLANOS *et al.*, 2019).

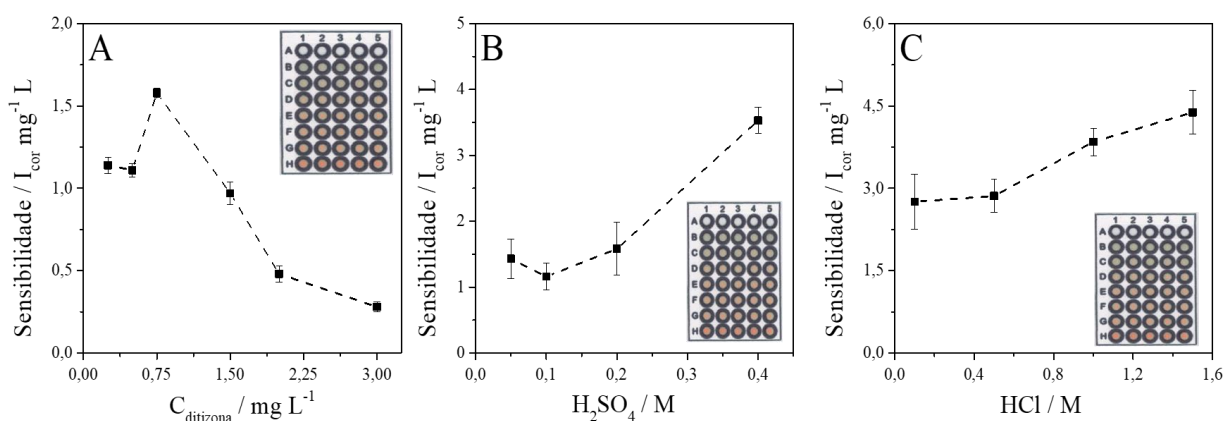
2.4.2.2 Efeitos da acidez (H₂SO₄ e HCl) na sensibilidade

Em geral, a formação de complexos metálicos com ligantes orgânicos depende do pH da solução, que influencia na constante de formação (Kf) e na seletividade do método. Entretanto, o sistema Hg(II)-ditizona apresenta alto Kf mesmo em meio ácido (logKf = 40,34, em HCl de 0,6 a 2,7 M) (MARTELL *et al.*, 1952), permitindo assim a determinação dessa espécie com boa seletividade frente a outras cátions metálicos.

O controle da acidez do meio na reação entre Hg(II) e ditizona é geralmente realizado pela adição de H₂SO₄ (CAI *et al.*, 2017; CAMPANELLA *et al.*, 2013). A influência da concentração de H₂SO₄ na sensibilidade do método foi avaliada de 0,05 a 0,4 M (Figura 7B), e aumentando a concentração de ácido proporciona aumento de sensibilidade. Esse perfil foi possivelmente obtido devido à disponibilidade de íons Hg(II) no meio ácido, pois, em meio neutro a básico, o Hg(II) pode formar hidroxicomplexos (CHEN *et al.*, 2016). Embora a sensibilidade do método tenha aumentado cerca de 2,5 vezes na condição de acidez máxima em relação ao estado inicial ([H₂SO₄] = 0,05 M), não foram avaliadas maiores concentrações de ácido, pois pode ocorrer degradação do papel e levar à formação de buracos na superfície devido à capacidade desidratante do ácido sulfúrico (TAKAHASHI *et al.*, 2009).

Além disso, foram avaliados os efeitos da concentração de HCl no meio reacional (Figura 7C), e a sensibilidade aumentou 63% quando a acidez variou de 0,1 a 1,5 M. No entanto, não foi observada diferença estatística (95% de confiança) entre HCl 1,0 a 1,5 M. No procedimento de digestão de amostras de vacina adotado para determinação de TM (WU *et al.*, 2012), o HCl apresentou os melhores resultados (usando KBr-KBrO₃ ou KMnO₄); além disso, a acidez residual após as digestões das vacinas foi igual a 1,0 M. Assim, foi utilizado HCl 1,0 M no método proposto.

Figura 7. Parâmetros químicos para determinação de mercúrio total usando sensibilidade analítica (parâmetro de decisão): A) ditizona, B) H_2SO_4 e C) concentrações de HCl. Condições experimentais: Hg(II) de 1 a 12 $mg\ L^{-1}$, e medidas realizadas no canal de cor RGB ($n = 5$). O PAD mostrado em cada figura corresponde à curva analítica na condição selecionada.

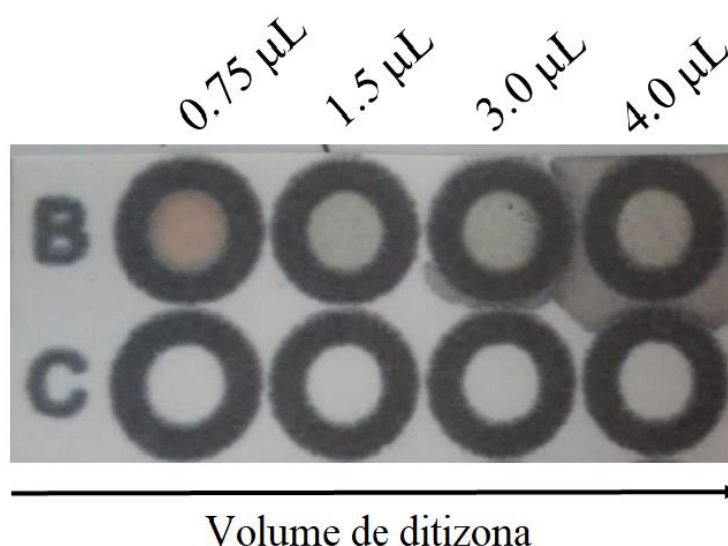


Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

2.4.2.3 Avaliação do volume (amostra/ditizona) e tempo de secagem

O volume total da amostra/reagente e o tempo de secagem são parâmetros importantes para o desenvolvimento de metodologias utilizando PAD. O volume do reagente cromogênico na zona de detecção foi avaliado de 0,75 a 4,0 μL . Uma vez que a solução de ditizona foi preparada em etanol, notou-se que o aumento do volume de 1,5 μL causou uma redução acentuada na formação de cor. Em comparação, para 3,0 e 4,0 μL , ocorreu a ruptura da barreira hidrofóbica do PAD (Figura 8), impossibilitando a análise. Portanto, o volume da solução de ditizona de 0,75 μL foi selecionado porque houve uma variação acentuada de cor além de não quebrar a barreira hidrofóbica. A influência do tempo de secagem da solução de ditizona (0,5 a 3 min) na sensibilidade do método foi avaliada (Figura 9a). A partir de 1 min não houve variação significativa da sensibilidade; assim, este tempo foi selecionado para as etapas subsequentes.

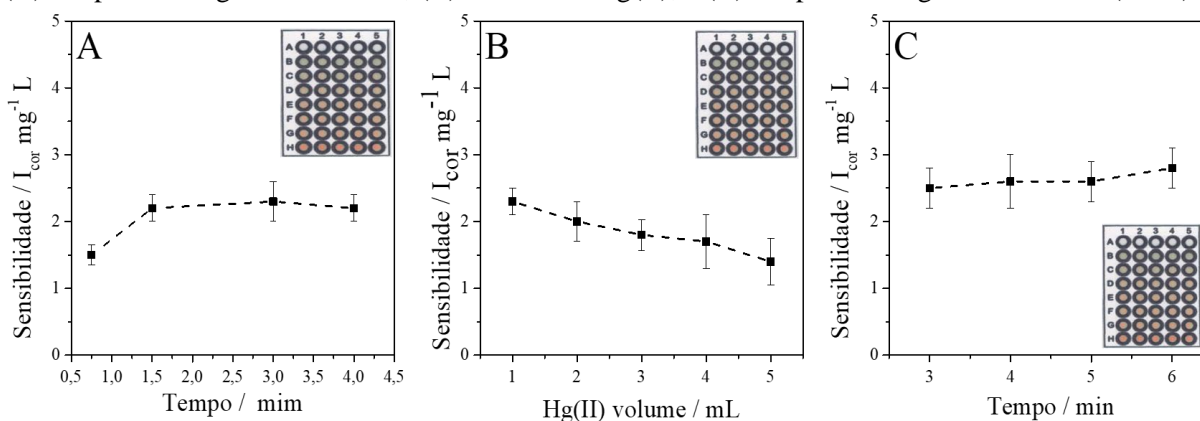
Figura 8. Efeito do volume de ditizona no PAD após adição (linha B).



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

O volume da solução padrão de Hg(II) foi avaliado de 1,0 a 5,0 μL (Figura 9b). O aumento do volume da amostra levou a uma redução de sensibilidade de 40% (5,0 μL) e aumentou o tempo de análise, pois é necessário um tempo de secagem maior. Um volume de solução de analito de 1,0 μL foi, portanto, selecionado. O tempo de secagem (3 - 6 min) da solução de Hg(II) no PAD (Figura 9c) também foi avaliado. Nesta etapa, foi necessário um intervalo maior do que para a secagem da solução de ditizona, pois a amostra foi preparada em meio aquoso (HCl 1,0 M). No entanto, a solução de ditizona foi preparada em um solvente orgânico (etanol). Portanto, 3 min foi o tempo mínimo para garantir a secagem da zona de detecção, sem variação significativa (95% de confiança) do intervalo de tempo avaliado. Em última análise, o tempo de secagem de 3 minutos para a zona de amostra foi usado na versão otimizada do método desenvolvido.

Figura 9. Influência na sensibilidade do método analítico utilizando PAD para os seguintes parâmetros: (A) tempo de secagem da ditizona, (B) volume de Hg(II), e (C) tempo de secagem da amostra (n = 6).



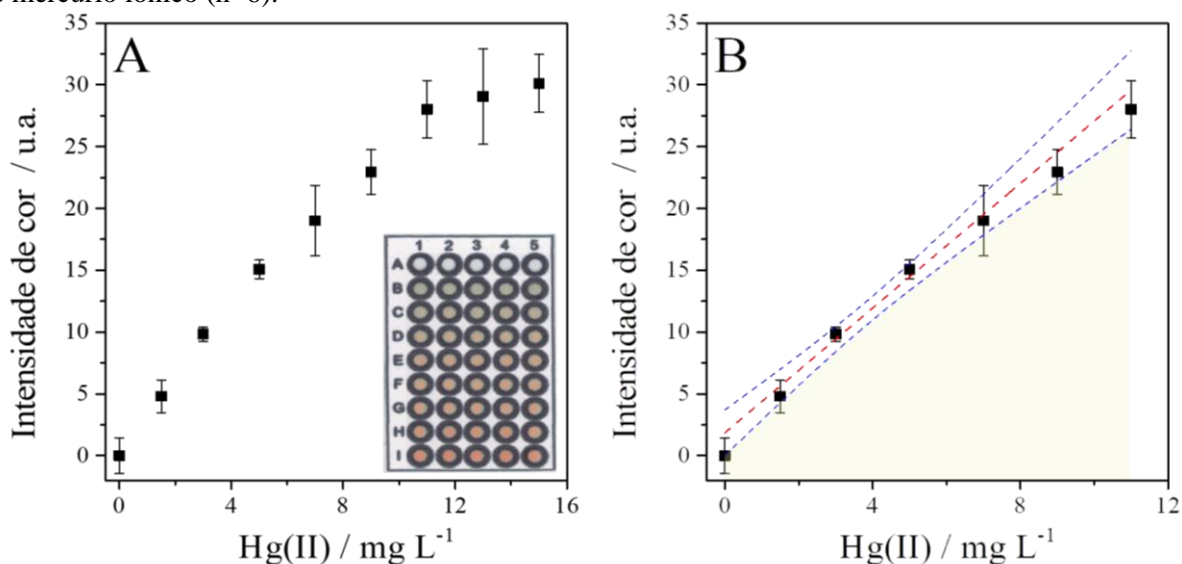
Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

2.4.3 Figuras de mérito

As figuras mérito do método foram estabelecidos após a otimização das principais variáveis químicas e físicas a serem utilizadas com mercúrio inorgânico como padrão. O método proposto apresentou uma faixa linear de 1,7 - 11 mg L⁻¹, descrita pela equação $IP = 2,0(\pm 0,1) \times C_{Hg} + 1,3(\pm 0,7)$ com $r = 0,9950$ ($n = 7$) (Figura 10), e um limite de detecção (LOD, 3σ) de 0,5 mg L⁻¹ ($n = 10$). O desvio padrão relativo (RSD, $n = 10$), considerando os níveis de concentração nos extremos da curva analítica de 3,6% (3 mg L⁻¹) e 0,59% (9 mg L⁻¹), indicou que a metodologia proposta apresenta boa precisão. Além disso, o método proposto forneceu parâmetros analíticos comparáveis a outras metodologias descritas na literatura para determinação de mercúrio inorgânico (Tabela 2). Em alguns casos, o método proposto mostrou-se menos sensível do que outros estudos relatados; no entanto, mais simples em relação ao sistema de reação e fabricação do dispositivo. Neste contexto, deve-se considerar que a aplicação do método desenvolvido visa a determinação de TM e não de Hg(II); assim, os valores de mérito obtidos são adequados quanto ao nível de analito normalmente encontrado nas amostras (até 100 mg L⁻¹) (GONZALEZ *et al.*, 2018).

O método proposto revelou melhores parâmetros analíticos do que o método que emprega a estratégia de medição baseada em distância, que também utilizou ditizona como reagente colorimétrico e foi semelhante ao método que utilizou nanopartículas de curcumina. Os demais métodos apresentaram limites inferiores de detecção e faixa linear. Embora demonstrem boa sensibilidade, apresentam desvantagens, como instrumentação mais complexa, necessidade de síntese de nanopartículas e pontos quânticos e custos mais elevados do que o método proposto.

Figura 10. (A) Dispositivo PAD com alterações cromáticas correspondentes à variação da concentração de Hg(II) até a saturação; (B) Faixa linear de resposta de intensidade de cor em função da concentração de mercúrio iônico (n=6).



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Considerando a faixa linear obtida para o método proposto, a determinação de TM em vacinas é viável, pois os níveis de concentração dessa espécie de mercúrio nesse tipo de amostra geralmente estão entre 50 - 100 mg L⁻¹ (GONZALEZ *et al.*, 2018; ABDOLLAHIYAN *et al.*, 2021). Assim, para uso em estudos posteriores, as condições otimizadas de detecção de mercúrio no PAD foram mantidas, potenciais interferências nas amostras de vacina foram avaliadas e a conversão de TM para Hg(II) usando diferentes estratégias de oxidação química em um sistema aberto.

Tabela 2. Comparação dos parâmetros analíticos de diferentes metodologias para determinação de mercúrio usando μ PAD com diferentes sistemas de detecção.

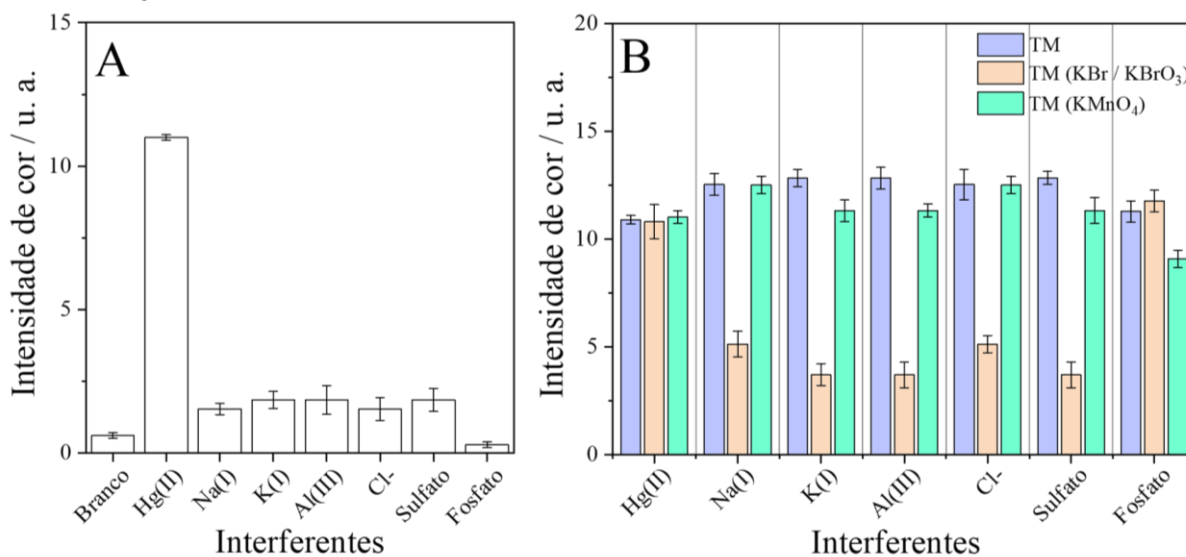
Parâmetro de medição	LOD	Faixa Linear	RSD (%)	Sistema de reação	Amostras	Referência
Distance	0.93 mg L ⁻¹	1 - 30 mg L ⁻¹	-	Ditizona em NaOH	Amostra de água sintética	(CAI <i>et al.</i> , 2017)
Colorimétrico	2.07 μ g L ⁻¹	5.2 - 103 μ g L ⁻¹	-	Nanopartículas de platina	Águas da lagoa e da torneira	(CHEN <i>et al.</i> , 2016)
Colorimétrico	0.86 μ g L ⁻¹	1 - 4 μ g L ⁻¹	2.4	Nanopartículas de prata	Água de rio	(FIRDAUS <i>et al.</i> , 2016)
Colorimétrico	1 μ g L ⁻¹	0.05 - 7 μ g L ⁻¹	4.1	Nanopartículas de prata	Água potável e de torneira	(MEELAPSOM <i>et al.</i> , 2016)
Colorimétrico	10 μ g L ⁻¹	20 - 150 μ g L ⁻¹	-	Nanopartículas de ouro	Águas de lagoa e de rios	(CHEN <i>et al.</i> , 2014)
Colorimétrico	0.17 mg L ⁻¹	0.5 - 20 mg L ⁻¹	4.5	Nanopartículas de Curcumina	Águas de torneira e industriais	(POURREZA <i>et al.</i> , 2016)
Colorimétrico	0.49 mg L ⁻¹	1.0 - 7.2 mg L ⁻¹	-	Nanopartículas de ouro	Amostra de urina	ABDOLLAHIYAN <i>et al.</i> , 2021
Fluorimétrico	0.18 μ g L ⁻¹	0.51 - 20 μ g L ⁻¹	3.1	Quantum dots de CdTe	Água de rio e de mar	(WANG <i>et al.</i> , 2022)
Colorimétrico	0.01 mg L ⁻¹	0.02 - 1 mg L ⁻¹	3.5	Nanopartículas de prata	Águas de lagoa, rio e industriais	(MONISHA <i>et al.</i> , 2021)
Colorimétrico	0.5 mg L ⁻¹	1.5 - 11 mg L ⁻¹	3.6	Ditizona em ethanol	Vacinas (determinação de TM)	Este trabalho

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

2.4.4 Avaliação de espécies interferentes em vacinas e conversão de TM para Hg(II)

No ensaio de efeito de matriz, a composição da amostra foi utilizada para avaliar se as espécies presentes nas vacinas podem interferir na aplicação da metodologia proposta. As principais espécies descritas nas amostras foram: Na^+ (8 g L^{-1}), K^+ (100 mg L^{-1}), Cl^- (8 g L^{-1}), Al(III) na forma de hidróxido de alumínio (Al(OH)_3 , 173 mg L^{-1}), sulfato (SO_4^{2-} , 50 mg L^{-1}) e sais de fosfato ($\text{H}_2\text{PO}_4^- + \text{HPO}_4^{2-}$, 1150 mg L^{-1}). Os efeitos dessas espécies foram avaliados de duas maneiras considerando as concentrações presentes nas vacinas: (i) um padrão inorgânico de mercúrio e potenciais interferentes foram usados sem realizar o procedimento de digestão (Figura 11A); e (ii) o padrão TM e as espécies a serem avaliadas foram adicionados ao meio reacional, e dois sistemas de digestão KBr/KBrO_3 e KMnO_4 foram então testados, usando ácidos diluídos (Figura 11B).

Figura 11. A) Avaliação de possíveis interferências do método sem a etapa de digestão utilizando padrão Hg(II) e B) Avaliação de possíveis interferências do método proposto com a etapa de digestão (KBr/KBrO_3 e KMnO_4) utilizando padrão TM. Condições: $C_{\text{ditizona}} = 0,75 \text{ mg L}^{-1}$, $C_{\text{Hg(II)}} = 5,0 \text{ mg L}^{-1}$, $C_{\text{TM}} = 10 \text{ mg L}^{-1}$ e $[\text{HCl}] = 1,0 \text{ M}$.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

O primeiro passo foi avaliar possíveis interferências quanto ao efeito frente ao reagente colorimétrico já que a ditizona não é um reagente seletivo. Os resultados demonstraram que as espécies não interferiram quando comparado com o padrão de mercúrio inorgânico; ou seja, a ditizona não reagiu com as espécies avaliadas para formar um produto colorido (Figura 11A). Esta baixa interferência deve-se principalmente à presença de íons Al(III) , e deve estar relacionada à reação ocorrendo em meio ácido. Entretanto, a intensidade da coloração foi reduzida quando a digestão do TM foi realizada com as misturas KBr/KBrO_3 (para a maioria dos interferentes avaliados), e apenas para o fosfato não houve redução na

intensidade da cor (Figura 11B). Em contraste, quando KMnO_4 foi usado como solução digestora, as intensidades de cor foram semelhantes ao procedimento usando apenas TM (sistema de referência) (Figura 11B). ANOVA one-way foi aplicada e nenhuma diferença significativa foi encontrada em um nível de confiança de 95% para o sistema usando o oxidante KMnO_4 .

Variações nos resultados (dependendo do tipo de sistema oxidante utilizado) podem ser explicadas pelas espécies formadas no meio reacional e pelos potenciais padrões de redução. Na mistura KBr/KBrO_3 , o agente oxidante é o Br_2 ($E^\circ = +1,08 \text{ V}$) formado em solução; entretanto, o uso de KMnO_4 ($E^\circ = +1,51 \text{ V}$), que atua na oxidação do TM em meio ácido (HCl), pode levar à formação de cloro gasoso ($\text{Cl}_{2(g)} + 2e^- \rightarrow 2\text{Cl}^-$, $E^\circ = +1,36 \text{ V}$) como oxidante auxiliar, que apresentaria oxidação mais forte que o bromo (LAMBLE., HILL, 1996; WALLAU *et al.*, 2015). Assim, usar KMnO_4 em meio ácido para digerir TM na presença dos interferentes foi mais eficaz em convertê-lo em mercúrio inorgânico. Portanto, as digestões das amostras de vacina foram realizadas apenas com a solução de KMnO_4 para determinação de TM.

2.4.5 Aplicação do método em amostras de vacinas

O método proposto foi aplicado em amostras de vacinas contra difteria-tétano (DT), hepatite B (HB) e difteria, tétano e coqueluche (DTP). Segundo o fabricante, essas vacinas contêm 100 mg L^{-1} de TM em sua composição. A aplicação do método segue duas estratégias relacionadas aos ensaios de dependência e recuperação para avaliar potenciais efeitos de matriz associados à adição de mercúrio inorgânico e TM em amostras de vacinas (Tabela 3).

Independentemente da espécie de mercúrio adicionada, as recuperações foram quantitativas para todas as vacinas em função da adição de Hg(II) (92 a 107%) e TM (89 a 112%). Os resultados obtidos neste estudo foram comparados com o método de referência: digestão. Aplicando o teste t de Student pareado para comparar os resultados obtidos pelo método proposto em relação ao método de referência, foi possível concluir (com nível de confiança de 95%) que não houve diferença significativa. Os resultados mostram que o KMnO_4 degrada efetivamente o mercúrio orgânico, embora a matriz (vacina) seja um sistema heterogêneo e complexo. A utilização do KMnO_4 na etapa de digestão demonstrou que o método desenvolvido com o PAD foi eficaz para determinação de mercúrio total (timerosal) em vacinas, além de ser rápido, simples, exato e preciso.

Tabela 3. Determinação de Hg(II) total e TM em amostra de vacina pelo método proposto após digestão com KMnO₄ (n = 3), ensaio de adição e recuperação e comparação dos resultados com o método de referência (CV AFS). Todas as amostras de vacina foram diluídas 1:2 com água ultrapura antes da análise.

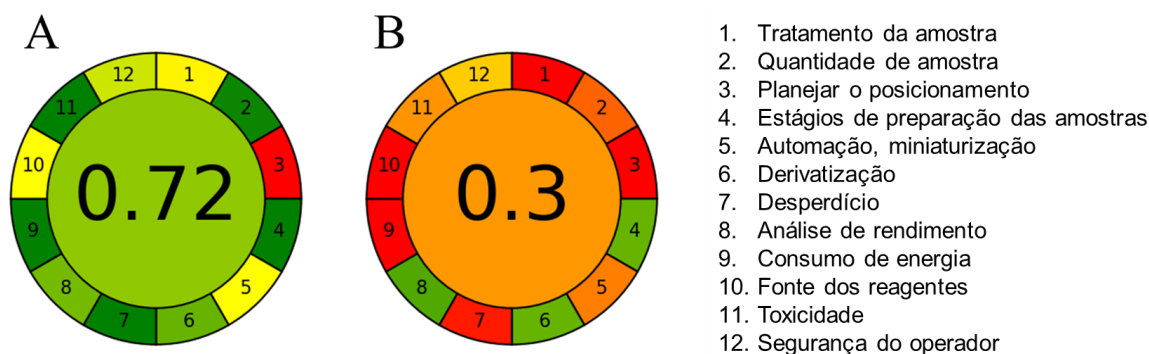
Especies de mercúrio	Vacina	Adicionado (mg L ⁻¹)	Determinado (mg L ⁻¹)	RSD (%)	Recuperado (%)	Concentração (mg L ⁻¹)		
						Este trabalho	CV AFS	¹ Declarado
Hg(II)	HB	0	3.60	1.97	-	45.0 ± 1.0	44.5 ± 5.0	50
		1.5	5.07	0.99	98			
		3.0	6.68	0.75	102			
		5.0	8.70	1.03	102			
	DT	0	3.85	1.85	-	47.5 ± 3.5	47.1 ± 1.3	50
		1.5	5.13	1.93	92			
		3.0	6.89	0.86	101			
		5.0	8.80	1.71	100			
	DTP	0.0	4.14	1.89	-	51.5 ± 3.0	56.1 ± 0.5	50
		1.5	5.75	2.81	107			
		3.0	7.64	2.85	92			
		5.0	9.47	3.02	106			
TM	HB	0.0	6.90	1.47	-	86.2 ± 2.0	88.9 ± 11.2	100
		3.0	9.18	1.51	96			
		6.0	14.44	0.96	97			
		10.0	17.16	1.38	103			
	DT	0.0	7.68	1.92	-	88.5 ± 8.0	93.9 ± 2.6	100
		3.0	10.18	1.08	103			
		6.0	14.44	1.43	112			
		10.0	18.32	1.41	106			
	DTP	0.0	8.08	1.47	-	101 ± 8	102 ± 1	100
		3.0	10.74	2.07	89			
		6.0	14.70	2.53	110			
		10.0	18.82	1.32	107			

¹A concentração declarada nas amostras de vacina foi apenas para o TM, enquanto a concentração de mercúrio iônico foi estimada.

2.4.6 Comparação do perfil verde da metodologia desenvolvida usando PAD com o método de referência (CV AFS)

Devido à necessidade de desenvolver métodos ecológicos e ecologicamente corretos, buscamos reduzir os impactos da geração de resíduos, manipulação humana e exposição a reagentes tóxicos. A química analítica visa desenvolver procedimentos baseados nos princípios da química verde, metodologias com menos etapas, menor gasto de energia, uso de solventes não tóxicos e não poluentes e menores volumes de reagentes e amostras (MERONE *et al.*, 2021). A metodologia proposta neste estudo usando PAD foi comparada aos métodos de referência (MW e CV AFS) relativos aos 12 princípios da química analítica verde através da calculadora Analytical GREENness desenvolvida por Pena-Pereira et al (PENA-PEREIRA *et al.*, 2020). Esta calculadora permite afirmar que o método PAD proposto, com uma pontuação de 0,72 (máximo = 1), em comparação com a metodologia de referência (pontuação de 0,3), é, de fato, um procedimento mais verde que segue mais perfeitamente os princípios da sustentabilidade (Figura 12).

Figura 12. Comparação da intensidade verde usando a calculadora AGREENess para comparar os métodos proposto e de referência utilizados neste trabalho: A) método proposto usando PAD e B) método de referência (MW e CV AFS).



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

2.5 Conclusão

Foi desenvolvida uma metodologia para quantificar TM como mercúrio total em vacinas utilizando PADs, na qual foi explorada a reação colorimétrica entre Hg(II) e ditizona em meio ácido. Após otimização dos parâmetros experimentais, o método foi aplicado com sucesso em amostras de vacinas para obtenção de recuperações quantitativas. Os resultados foram validados estatisticamente pelo CV AFS (referência), e os valores obtidos não diferiram significativamente (95% de confiança) dos valores de referência, demonstrando que o método é preciso. Além disso, o método proposto pode ser considerado mais ecológico que o método de referência. A metodologia desenvolvida apresenta potencial para determinação de mercúrio em amostras de vacinas, viável para análises de rotina com vantagens como simplicidade, rapidez e baixo custo.

Referências

- ACOSTA, G., SPISSO, A., FERNÁNDEZ, L. P., MARTINEZ, L. D., PACHECO P.H., GIL, R. A. Determination of thimerosal in pharmaceutical industry effluents and river waters by HPLC coupled to atomic fluorescence spectrometry through post-column UV-assisted vapor generation, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 106, 79–84, 2015.
- ACOSTA, G., TORRES, S., KAPLAN, M., FERNÁNDEZ, L.P., PACHECO, P.H., GIL, R.A. Liquid chromatography coupled to molecular fluorescence with post-column UV sensitization for Thimerosal and derivative compounds monitoring in environmental samples: Liquid Phase Separations, **Electrophoresis**, 37, 2531–2537, 2016.
- DÓREA, J.G. Low-dose Thimerosal in pediatric vaccines: Adverse effects in perspective, **Environmental Research**, 152, 280–293, 2017.
- DOS SANTOS, E.J., HERRMANN, A.B., DOS SANTOS, A.B., BAIKA, L.M., SATO, C.S., TORMEN, L., STURGEON, R.E., CURTIUS, A.J. Determination of thimerosal in human and veterinarian vaccines by photochemical vapor generation coupled to ICP OES, **J. Anal. At. Spectrom.** 25, 1627–1632, 2010.
- GEIER, D.A., KING, P.G., HOOKER, B.S., DÓREA, J.G., KERN, J.K., SYKES, L.K., GEIER, M.R., Thimerosal: Clinical, epidemiologic and biochemical studies, **Clinica Chimica Acta**, 444, 212–220, 2015.
- GEIER, D.A., HOOKER, B.S., KERN, J.K., KING, P.G., SYKES, L.K., GEIER, M.R. A two-phase study evaluating the relationship between Thimerosal-containing vaccine administration and the risk for an autism spectrum disorder diagnosis in the United States, **Transl Neurodegener**, 2, 25, 2013.
- PÉREZ-CABALLERO, G., MURO-HIDALGO, N., MORALES-HIPÓLITO, E.A., VILLASEÑOR, A., LÓPEZ-ARELLANO, R., PÉREZ-CABALLERO, G., MURO-HIDALGO, N., MORALES-HIPÓLITO, E.A., VILLASEÑOR, A., LÓPEZ-ARELLANO, R. Development and ICH validation of a RP-HPLC-UV method for the quantification of thimerosal in topic creams, **Journal of the Mexican Chemical Society**, 60, 188–193, 2016.
- QVARNSTRÖM, J., LAMBERTSSON, L., HAVARINASAB, S., HULTMAN, P., FRECH, W. Determination of methylmercury, ethylmercury, and inorganic mercury in mouse tissues, following administration of thimerosal, by species-specific isotope dilution GC–Inductively coupled plasma-MS, **Anal. Chem.**, 75, 4120–4124, 2003.
- SANTOS, J.C.N., DA SILVA, I.M., BRAGA, T.C., DE FÁTIMA, Â., FIGUEIREDO, I.M., SANTOS, J.C.C. Thimerosal changes protein conformation and increase the rate of fibrillation in physiological conditions: Spectroscopic studies using bovine serum albumin (BSA), **International Journal of Biological Macromolecules**, 113, 1032–1040, 2018.
- XU, Q., WANG, Z., JIN, L., LIU, P., TIAN, Y., ZHANG, S., ZHANG, C. Non-chromatographic separation and determination of Thimerosal and inorganic mercury in vaccines by Fe³⁺-induced degradation with cold vapor atomic fluorescence spectrometry, **Anal. Methods**, 10, 2144–2150, 2018.
- ZARĘBA, M., SANECKI, P.T., RAWSKI, R. Simultaneous determination of Thimerosal and aluminum in vaccines and pharmaceuticals with the use of HPLC method, **Acta Chromatographica**, 28, 299–311, 2016.

PROCOPIO, J.R., DA SILVA, M.P., DEL CARMEN ASENSIO, M., SEVILLA, M.T., HERNANDEZ, L. HPLC analysis of Thimerosal and its degradation products in ophthalmic solutions with electrochemical detection, **Talanta**, 39, 1619–1623, 1992.

JAWORSKA, M., SZULIŃSKA, Z., WILK, M. Application of a capillary electrophoresis method for simultaneous determination of preservatives in pharmaceutical formulations, **J. Sep. Science**, 28, 137–14, 2005.

HE, H., ZHU, Z., ZHENG, H., XIAO, Q., JIN, L., HU, S. Dielectric barrier discharge microplasma emission source for the determination of thimerosal in vaccines by photochemical vapor generation, **Microchemical Journal**, 104, 7–11, 2012.

TALL, A., DA COSTA, K.R., DE OLIVEIRA, M.J., TAPSOBA, I., ROCHA, U., SALES, T.O., GOULART, M.O.F., SANTOS, J.C.C. Photoluminescent nanoprobe based on thiols capped CdTe quantum dots for direct determination of thimerosal in vaccines, **Talanta**, 221, 121545, 2021.

LAZO, P., KUCUKU, M. Analysis of mercurial preservatives in different vaccines by cold vapor atomic absorption spectrophotometry, **JAST**, 3, 2012.

DE OLIVEIRA, M.J., CUNHA, F.A.S., SANTOS, J.C.C. Determination of mercury (thimerosal) in vaccines using different oxidants and cold vapor atomic fluorescence spectrometry in dilute acids, **J. Anal. At. Spectrom**, 36, 740–746, 2021.

WU, Q., ZHU, Z., LIU, Z., ZHENG, H., HU, S., LI, L. Dielectric barrier discharge-plasma induced vaporization for the determination of thiomersal in vaccines by atomic fluorescence spectrometry, **J. Anal. At. Spectrom**, 27, 496–500, 2012.

PEDROZO-PENAFIEL, M.J., MIRANDA-ANDRADES, J.R., GUTIERREZ-BELEÑO, L.M., LARRUDÉ, D.G., AUCELIO, R.Q. Indirect voltammetric determination of thiomersal in influenza vaccine using photo-degradation and graphene quantum dots modified glassy carbon electrode, **Talanta**, 215, 120938, 2020.

PENAGOS-LLANOS, J., CALDERÓN, J.A., NAGLES, E., HURTADO, J.J. Voltammetric determination of thiomersal with a new modified electrode based on a carbon paste electrode decorated with La₂O₃, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 833, 536–542, 2019.

CARRERA, S., SANTIAGO, G., VEGA, M. Spectrophotometric determination of dithizone–mercury complex by solid-phase microextraction in micropipette tip syringe packed with activated carbon xerogel, **Microchemical Journal**, 129, 133–136, 2016.

TAKAHASHI, Y., DANWITTAYAKUL, S., SUZUKI, T. M. Dithizone nanofiber-coated membrane for filtration-enrichment and colorimetric detection of trace Hg(II) ion, **Analyst**, 134, 1380–1385, 2009.

WANG, H., LI, Y., WEI, J., XU, J., WANG, Y., ZHENG, G. Paper-based three-dimensional microfluidic device for monitoring of heavy metals with a camera cellphone, **Anal Bioanal Chem**, 406, 2799–2807, 2014.

WISANG, Y. F., SULISTYARTI, H., ANDAYANI, U., SABARUDIN, A. Microfluidic paper-based analytical devices (μPADs) for analysis lead using naked eye and colorimetric detections, IOP Conf. Ser.: **Mater. Sci. Eng**, 546, 032033, 2019.

- BENDICHO, C.; LAVILLA, I.; PENA-PEREIRA, F.; LA CALLE, I.D.; ROMERO, V. Paper-based analytical devices for colorimetric and luminescent detection of mercury in waters: An overview. **Sensors**, 21, 7571, 2021.
- CAI, L., FANG, Y., MO, Y., HUANG, Y., XU, C., ZHANG, Z., WANG, M. Visual quantification of Hg on a microfluidic paper-based analytical device using distance-based detection technique, **AIP Advances**, 7, 085214, 2017.
- CHEN, W., FANG, X., LI, H., CAO, H., KONG, J. A simple paper-based colorimetric device for rapid mercury(ii) assay, **Sci Rep**, 6, 31948, 2016.
- FIRDAUS, M., APRIAN, A., MEILEZA, N., HITSMI, M., ELVIA, R., RAHMIDAR, L., KHAYDAROV, R. Smartphone coupled with a paper-based colorimetric device for sensitive and portable mercury ion sensing, **Chemosensors**, 7, 25, 2019.
- MEELAPSOM, R., JARUJAMRUS, P., AMATATONGCHAI, M., CHAIRAM, S., KULSING, C., SHEN, W. Chromatic analysis by monitoring unmodified silver nanoparticles reduction on double layer microfluidic paper-based analytical devices for selective and sensitive determination of mercury(II), **Talanta**, 155, 193–201, 2016.
- CHEN, G. H., CHEN, W. Y., YEN, Y. C., WANG, C. W., CHANG, H.T., CHEN, C. F. Detection of mercury(II) ions using colorimetric gold nanoparticles on paper-based analytical devices, **Anal. Chem**, 86, 6843–6849, 2014.
- POURREZA, N., GOLMOHAMMADI, H., RASTEGARZADEH, S. Highly selective and portable chemosensor for mercury determination in water samples using curcumin nanoparticles in a paper-based analytical device, **RSC Adv**, 6, 69060–69066, 2016.
- CARRILHO, A.W. MARTINEZ, G.M. WHITESIDES, Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics, **Anal. Chem**, 81, 7091–7095, 2009.
- NOGUEIRA, S.A., LEMES, A.D., CHAGAS, A.C., VIEIRA, M.L., TALHAVINI, M., MORAIS, P.A.O., COLTRO, W.K.T. Redox titration on foldable paper-based analytical devices for the visual determination of alcohol content in whiskey samples, **Talanta**, 194, 363–369, 2019.
- TAVARES, M.C., OLIVEIRA, K.A., DE FÁTIMA, Â., COLTRO, W.K.T., SANTOS, J.C.C. Paper-based analytical device with colorimetric detection for urease activity determination in soils and evaluation of potential inhibitors, **Talanta**, 230, 122301, 2021.
- PRASERTBOONYAI, K., LIAWRAUNGRATH, B., POJANAKAROON, T., LIAWRAUNGRATH, S. Mercury(II) determination in commercial cosmetics and local Thai traditional medicines by flow injections spectrophotometry, **Int J Cosmet Sci**, 38, 68–76, 2016.
- J.N. MILLER, J.C. MILLER, R.D. MILLER, Statistics and chemometrics for analytical chemistry, Seventh edition, Pearson Education Limited, Harlow, United Kingdom, 2018.
- SHRIVASTAW, K.P., SINGH, S. A new method for spectrophotometric determination of thiomersal in biologicals, **Biologicals**, 23, 65–69, 1995.
- KHAN, H., AHMED, M. J., BHANGER, M. I. A simple spectrophotometric determination of trace level mercury using 1,5-diphenylthiocarbazone solubilized in micelle, **Anal. Sci**, 21, 507–512, 2005.

MARTELL, A.E., CALVIN, M., LATIMER, W.M. Chemistry of the Metal Chelate Compounds, Prentice-Hall, 1952.

CAMPANELLA, B., ONOR, M., MASCHERPA, M.C., D'ULIVO, A., FERRARI, C., BRAMANTI, E. Determination of thiomersal by flow injection coupled with microwave-assisted photochemical online oxidative decomposition of organic mercury and cold vapor atomic fluorescence spectroscopy, **Analytica Chimica Acta**, 804, 66–69, 2013.

GONZALEZ, C., GARCÍA-BELTRÁN, O., NAGLES, E. A new and simple electroanalytical method to detect thiomersal in vaccines on a screen-printed electrode modified with chitosan, **Anal. Methods**, 10, 1196–1202, 2018.

ABDOLLAHIYAN, P., HASANZADEH, M., PASHAZADEH-PANAHI, P., SEIDI, F. Application of CysA@AuNPs supported aminoacids towards rapid and selective identification of Hg(II) and Cu(II) ions in aqueous solution: An innovative microfluidic paper-based (μ PADs) colorimetric sensing platform, **Journal of Molecular Liquids**, 338, 117020, 2021.

WANG, L. LI, B. WANG, J. QI, J. LI, J. MA, J., CHEN, L. A Rotary multi-positioned cloth/paper hybrid microfluidic device for simultaneous fluorescence sensing of mercury and lead ions by using ion-imprinted technologies, **Journal of Hazardous Materials**. 428, 128165, 2022.

MONISHA, K., SHRIVAS, T., KANT, S., PATEL, R., DEVI, N. S., DAHARIYA, S., PERVEZ, M. K., DEB, M. K., RAI, J. Inkjet-printed paper-based colorimetric sensor coupled with smartphone for determination of mercury (Hg^{2+}), **Journal of Hazardous Materials**, 414, 125440, 2021.

LAMBLE, K.J., HILL, S. J. Determination of mercury in slurried samples by both batch and on-line microwave digestion–cold vapor atomic fluorescence spectrometry, **J. Anal. At. Spectrom**, 11, 1099–1103, 1996.

WALLAU, M., BIANCHINI, D., EBERSOL, C.P., DOS SANTOS JÚNIOR, J.A., BARBOZA, T.M. Truly green chemistry - Chlorine's chemical properties and its presentation by experiments on a miniaturized scale, **Química Nova**, 38, 436–445, 2015.

MERONE, G.M., TARTAGLIA, A., ROSSI, S., SANTAVENERE, F., BASSOTTI, E., D'OVIDIO, C., BONELLI, M., ROSATO, E., DE GRAZIA, U., LOCATELLI, M., SAVINI, F. Fast quantitative lc-ms/ms determination of illicit substances in solid and liquid unknown seized samples, **Anal. Chem**, 93, 16308-16313, 2021.

PENA-PEREIRA, F., WOJNOWSKI, W., TOBISZEWSKI, M. AGREE-Analytical GREEnness metric approach and software, **Anal. Chem**. 92, 10076-10082, 2020.

3 APLICAÇÃO DE SONDA FLUORESCENTE PARA DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS COM EMISSÃO NO INFRAVERMELHO PRÓXIMO (NIR) EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

3.1 Introdução

As albuminas séricas são as mais abundantes e mais importantes, dentre as proteínas presentes no plasma sanguíneo, pois constituem aproximadamente 52% da composição proteica desse sistema e desempenham muitas funções fisiológicas, como o transporte de diferentes espécies endógenas e exógenas. Assim, a albumina sérica humana (HSA) atua como o principal transportador para uma variedade de pequenas moléculas, ácidos graxos, cátions e drogas diversas (ZHU *et al.*, 2007; HOU *et al.*, 2007).

Por essa razão, a concentração de HSA é um indicador chave relacionado à saúde humana, sendo assim, os níveis normais dessa proteína no corpo humano variam de 3,5 a 5,5 g dL⁻¹ no soro e até 100 mg L⁻¹ na urina (GATTA *et al.*, 2012; STANYON *et al.*, 2012). Portanto, um nível anormal de HSA em um fluido corporal pode estar associado a problemas de saúde, como a hipoalbuminemia (baixo nível de HSA no soro), que é frequentemente observada em pacientes com desnutrição e cirrose e a hiperalbuminemia (alto nível de HSA na urina) está relacionada à doença renal, diabetes *mellitus* e hipertensão. Portanto, a determinação de HSA em fluidos biológicos é de grande importância e com potencial direto para o diagnóstico clínico (STANYON *et al.*, 2012; XIAO *et al.*, 2023).

Os métodos tradicionais para a determinação de proteínas, como o ensaio de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951), o método de Bradford (BRADFORD, 1976), o método de Kjeldahl (ZOR., SELINGER, 1996) e o método de biureto (SHRIVASTAW *et al.*, 1995) apresentam várias desvantagens relacionadas a baixa seletividade e sensibilidade, além de serem procedimentos onerosos e com várias etapas (MORI *et al.*, 1995; GUO *et al.*, 2000). Neste sentido, o desenvolvimento de procedimentos analíticos rápidos, simples e com baixos limites de detecção para determinação de proteínas totais expressas em função de HSA em amostras biológicas como sangue, urina e extratos celulares é de fundamental importância. Por essa razão, diversas metodologias e sondas analíticas têm sido desenvolvidas para quantificar HSA, empregando métodos espectrofotométricos (JIANG., LUO, 2004), imunoquímicos (LABIB *et al.*, 2016), eletroquímicos (CIEPLAK *et al.*, 2015), eletroforese (HASELBERG *et al.*, 2007) e por fluorescência molecular (LEE *et al.*, 2019; ZAIA *et al.*, 2005; PATONAY *et al.*, 2005).

Entre as técnicas mencionadas, a fluorescência molecular tem se destacado como uma ferramenta para detecção de HSA e outras proteínas em amostras biológicas, devido sua

elevada sensibilidade, rapidez e eficiência, permitindo também o monitoramento por meio de técnicas de imageamento em diferentes sistemas celulares (CHEN *et al.*, 2020). Assim, nos últimos anos, diversas sondas fluorescentes têm sido desenvolvidas com diferentes modos de ação para determinação de HSA e outras proteínas, dentre esses mecanismos destaca-se o modo *off-on*. Uma sonda com o modo de ação *off-on* atua devido a interação do analito com um reagente não fluorescente, formando um complexo fluorescente supramolecular ou provocando uma mudança na conformação da molécula receptora, sem a formação de ligações covalentes. Dentre essas sondas, destacam-se os derivados de cianina, pois apresentam características como alta seletividade e sensibilidade e emissão na região do infravermelho próximo (NIR) (BRAGA *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2022). Nesse sentido, sondas que podem ser excitadas e emitem nas regiões no NIR se destacam para a determinação direta de HSA em amostras biológicas complexas, pois não afetam a maioria dos tecidos pela exposição à radiação eletromagnética, por não apresentarem autofluorescência (600 a 900 nm), e possuem maior penetrabilidade nos tecidos, aproximadamente 5 mm (WANDERI *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2018), além de respostas rápidas, fotoestabilidade, sensibilidade e seletividade. Dessa forma, o desenvolvimento e síntese de sondas fluorescentes para determinação de HSA que possam emitir no NIR é um grande desafio com campo vasto de aplicações biotecnológicas.

Desta maneira, o desenvolvimento de sondas fluorescentes para quantificação de HSA explorando o conceito *off-on* com emissão no NIR apresentam grande relevância, constituindo assim um avanço na obtenção de informações químicas e biológicas, e sobretudo, no estabelecimento de protocolos para diagnóstico e aplicações terapêuticas. Portanto, este trabalho avaliou uma sonda derivada do núcleo cianina heptametina com emissão no NIR para quantificação de proteínas totais expressas em função da concentração de HSA em amostras de urina e plasma, visando um procedimento analítico rápido, seletivo, sensível e simples.

3.2 Objetivos específicos

- a) Otimizar a metodologia quanto aos parâmetros químicos e físicos: pH do meio, composição da solução tampão, concentração da solução tampão, força iônica e concentração da sonda, entre outros;
- b) Determinar a constante de ligação, estequiometria sonda-HSA, Sítio de ligação, seletividade e possíveis interferentes;

c) Estabelecer as principais figuras de mérito e validar o método analítico;

e) Aplicar o método otimizado em amostras biológicas (soro e urina);

3.3 Procedimento experimental

3.3.1 Reagentes e preparo das soluções

Todas as soluções foram preparadas com água (condutividade $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) obtida pelo sistema Master System 2000 (Brasil, Gehaka). Os reagentes utilizados no desenvolvimento dessa metodologia são de grau analítico ou foram sintetizados, sem necessidade de etapas de purificação adicional. A solução estoque da sonda SHP a 2 mM foi preparada a partir da dissolução direta do sólido em 2 mL de DMSO, sendo conservada sob refrigeração a 4 °C. As diluições subsequentes quando necessárias foram realizadas em tampão PIPES (10 mM, pH 8,0). A solução estoque de HSA (Sigma-Aldrich, USA) a 0,73 mM foi preparada a partir de dissolução direta do sólido em água ultrapura. A partir desse estoque, foram realizadas diluições sequenciais das soluções de trabalho para estabelecer a curva analítica. A solução tampão PIPES (Sigma-Aldrich, USA) a 10 mM foi preparada pela dissolução de massa apropriada diretamente em água ajustado para pH 8,0 com solução de NaOH 0,1 M (Merck, Alemanha). As soluções de varfarina, ibuprofeno, diazepam, ácido salicílico, bilirrubina, digitoxina, hemina e tiroxina (Sigma-Aldrich, USA) utilizadas para determinação do sítio de ligação preferencial foram preparadas dissolvendo diretamente quantidade adequada do sólido em DMSO e posterior diluição em solução tampão. O estudo dos interferentes foi realizado simulando as espécies presentes nas amostras biológicas. Assim, foram avaliados os seguintes compostos: MgSO_4 (Vetec, Brasil), FeCl_3 (Sigma-Aldrich, USA), $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, Brasil), ZnSO_4 (Synth, Brasil), CaCl_2 (Synth, Brasil), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec, Brasil), cisteína (Vetec, Brasil), glicose (Vetec, Brasil), ácido oleico (Sigma-Aldrich, USA), ácido linoleico (Sigma-Aldrich, USA), ácido mirístico (Sigma-Aldrich, USA), ácido esteárico (Sigma-Aldrich, USA). Todas as soluções estoques foram preparadas em água ultrapura. As amostras de soro e urina analisadas foram a partir de voluntários sendo armazenadas em sob refrigeração (4 °C) com permissão do Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE 57998116.8.0000.5013).

3.3.2 Instrumentação

As medidas de pH foram realizadas utilizando medidor de pH Gehaka (PG 1800, Brazil) incerteza de $\pm 0,01$ acoplado a um eletrodo combinado de vidro. As massas dos

reagentes foram medidas em balança analítica Mettler Toledo (AG245, Estados Unidos) com precisão de 0,01 mg. As medidas espectrofluorimétricas foi realizada empregado espectrofluorímetro (Shimadzu 5301 PCRF, Japão) com cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico. As medidas espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro de varredura com duplo feixe (Micronal AJX-6100PC, Brasil), utilizando cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico.

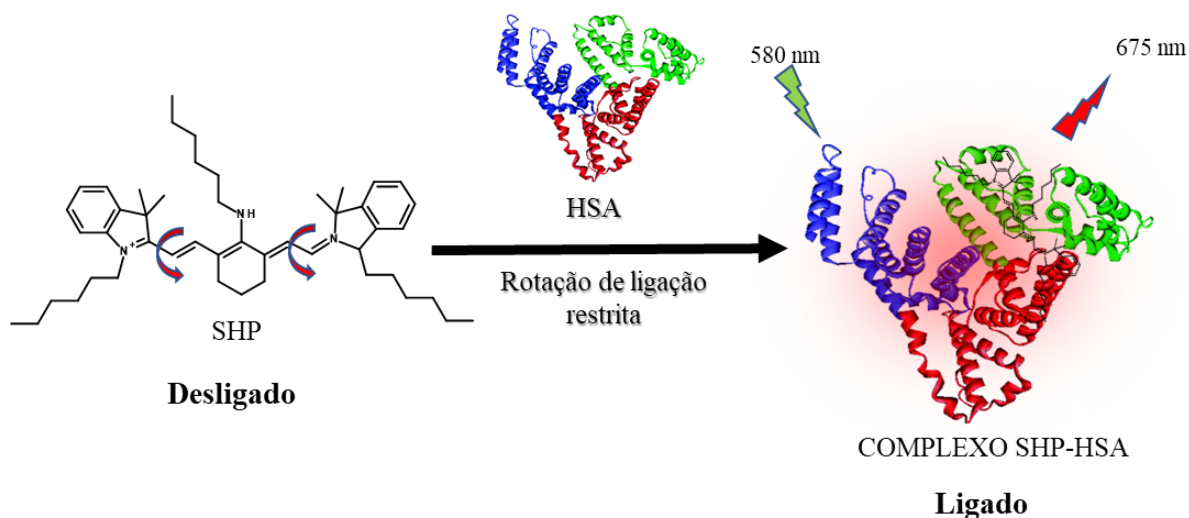
3.3.3 Síntese e caracterização da sonda fluorescente

A sonda (SHP) utilizada nesse estudo foi preparada por reação de condensação em três etapas conforme descrito por BRAGA *et al.* (2019). Em seguida o produto sintetizado foi purificado por cromatografia em coluna usando sílica gel e acetona/metanol (99:1) como eluente. A sonda SHP sintetizada foi caracterizada utilizando técnicas espectroscópicas (IR, ^1H e ^{13}C RMN e MS), apresentando rendimento mínimo de 67%.

3.3.4 Determinação de proteínas totais (HSA) pelo método proposto

Após as etapas de otimização do método envolvendo vários parâmetros físico-químicos, a metodologia foi otimizada para determinação de proteínas totais (HSA) em amostras de soro e urina. O procedimento geral ocorreu da seguinte maneira: foram adicionados 50 μL de SHP a 400 μM , perfazendo uma concentração final de 10 μM após diluição, em seguida, se adicionou diferentes volumes da solução estoque de HSA a 0,73 mM, e por fim, o volume final foi ajustado para 2,0 mL com solução tampão PIPES 10 mM (pH 8). As medições espectrofotométricas (400 a 1100 nm) e espectrofluorimétricas ($\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 675 \text{ nm}$) foram então realizadas (Esquema 3). O sinal analítico de referência foi obtido a partir de uma solução sem a adição de HSA, e contendo todos os outros reagentes.

Esquema 3. Formação do complexo SHP com HSA evidenciando a restrição da rotação das ligações.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

3.3.5 Caracterização do complexo sonda SHP-HSA

A estequiometria do complexo SHP-HSA foi determinada pelo método das variações contínuas (método de Job). Assim, foram preparadas soluções contendo a sonda SHP e HSA, onde variou-se a fração molar das duas espécies de 0 a 1 mantendo a soma das concentrações constante igual a 1. A partir do gráfico entre a intensidade de fluorescência em função da fração molar foi estabelecida a proporção estequiométrica em função do valor máximo (MORI *et al.*, 1995).

Para a avaliação dos sítios de ligação da HSA com a sonda SHP foram utilizados como marcadores a varfarina e ácido salicílico (sítio 1), ibuprofeno e diazepam (sítio 2), o subdomínio IB foi monitorado empregando os marcadores hemina e bilirrubina e o subdomínio IIIB foi monitorado empregando digitoxina, além da tiroxina que pode se ligar aos sítio 1, sítio 2 e ao subdomínio IIIB (GUO *et al.*, 2000). As concentrações de SHP e de HSA foram mantidas constantes (5 μM), variando-se a concentração dos marcadores até 20 μM .

Para análise da cinética de reação e fotoestabilidade do complexo formado foram realizadas medidas fluorimétricas em função do tempo nas condições otimizadas. O ensaio cinético e de fotoestabilidade do complexo formado foi realizado até 60 min com exposição direta da fonte de radiação (lâmpada de Xe de 150 W) durante todo tempo de análise.

Os tempos de vida de fluorescência (τ) foram realizadas usando um espectrofluorímetro NanoLog™ (HORIBA, Japão) equipado com uma lâmpada de Xe (pulsada) como fonte de excitação. O comprimento de onda de excitação e emissão foram ajustados para 580 e 675 nm, respectivamente. A emissão de fluorescência emitida pelas amostras foi registrada por monocromador equipado com uma grade de difração Horiba com 600 sulcos mm^{-1} e *blaze* em 1000 nm para a seleção de comprimentos de onda específicos, e então detectada usando uma fotomultiplicadora (modelo R928P) sob a configuração TCSPC (*Time Correlated Single Photon Counting*). Todas as medições de tempo de vida foram realizadas em temperatura ambiente e com os mesmos parâmetros instrumentais. As curvas experimentais de decaimento do tempo de vida foram ajustadas ao modelo monoexponencial de acordo com a equação (2):

$$I_F(t) = I_{F_0} \exp\left(\frac{-t}{\tau}\right) \quad \text{equação (2)}$$

$I_F(t)$ e I_{F_0} indicam a intensidade de fluorescência em um tempo específico t e no tempo zero para a sonda SHP e para HSA, respectivamente.

O rendimento quântico (Φ) do complexo sonda SHP-HSA foi determinado por um método comparativo, usando vermelho do Nilo (0,16 mM em metanol, $\Phi = 38\%$) como referência (JOSE; BURGESS, 2006). O Φ foi calculado de acordo com a equação (3):

$$\Phi_C = \Phi_{ref} \left(\frac{m_C}{m_{ref}} \right) \times \left(\frac{\eta_C}{\eta_{ref}} \right)^2 \quad \text{equação (3)}$$

onde os termos “C” e “*ref*” representam o complexo sonda SHP-HSA (C) e o composto vermelho do Nilo, respectivamente; “ m ” representa a inclinação da regressão linear do gráfico intensidade de fluorescência integrada vs. absorvância e “ η ” o índice de refração do solvente (1,33 neste caso). O efeito do filtro interno foi minimizado usando soluções com intensidades de absorção menor que 0,1.

3.3.6 Método de referência (Bradford)

O método de referência foi realizado em amostras de urina e soro e seguiram o seguinte procedimento. Todas as amostras de urina e soro foram centrifugadas a 5000 rpm (20 min) e 1400 rpm (10 min), respectivamente; em seguida, a parte sólida foi descartada e o sobrenadante diluído na proporção de 1:40. Após obtenção das amostras estas foram acondicionadas sob refrigeração a 4°C por no máximo 48 h, antes das análises. As medições referentes a concentração de proteínas totais (HSA) foram realizadas em um

espectrofotômetro de varredura com duplo feixe (Micronal AJX-6100PC, Brasil), utilizando cubetas de quartzo com 10 mm de caminho óptico. Em seguida as soluções centrifugadas das amostras foram analisadas e a concentração de proteínas totais foi expressa em função da concentração de HSA a partir da extrapolação da curva analítica.

3.3.7 Análise estatística dos resultados

Todos os parâmetros foram otimizados baseados na sensibilidade analítica de cada condição. Assim, curvas analíticas foram construídas com o mínimo de cinco pontos ($n = 5$) de acordo com a equação (4):

$$I_F = a \times C_{HSA} + b \quad \text{equação (4)}$$

em que I_F corresponde ao valor de intensidade de fluorescência, C_{HSA} concentração de HSA, a o coeficiente angular da curva analítica e b o coeficiente linear. O coeficiente de correlação linear (r) foi calculado visando avaliar a disposição dos pontos quanto à adequação ao comportamento linear (MILLER; MILLER, 2005). O limite de detecção (LOD) foi calculado usando a relação $LOD = 3 \times s_b / a$, onde, s_b corresponde ao desvio padrão do branco analítico ($n = 10$). Por fim, a reprodutibilidade foi avaliada empregando-se o desvio padrão relativo (RSD) para dez medidas independentes ($n = 10$). O teste t de Student pareado e análise de variância (ANOVA) foram aplicados, quando necessário, para avaliar se as médias obtidas para os parâmetros do método proposto apresentavam diferenças significativas um intervalo de confiança de 95% ($p = 0,05$) para todos os procedimentos. Por fim, quando ocorria diferença estatística para ANOVA ($p = 0,05$) o teste das comparações múltiplas (teste de Tukey) foi utilizado.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.4.1 Estudos preliminares: seletividade da sonda SHP com diferentes proteínas

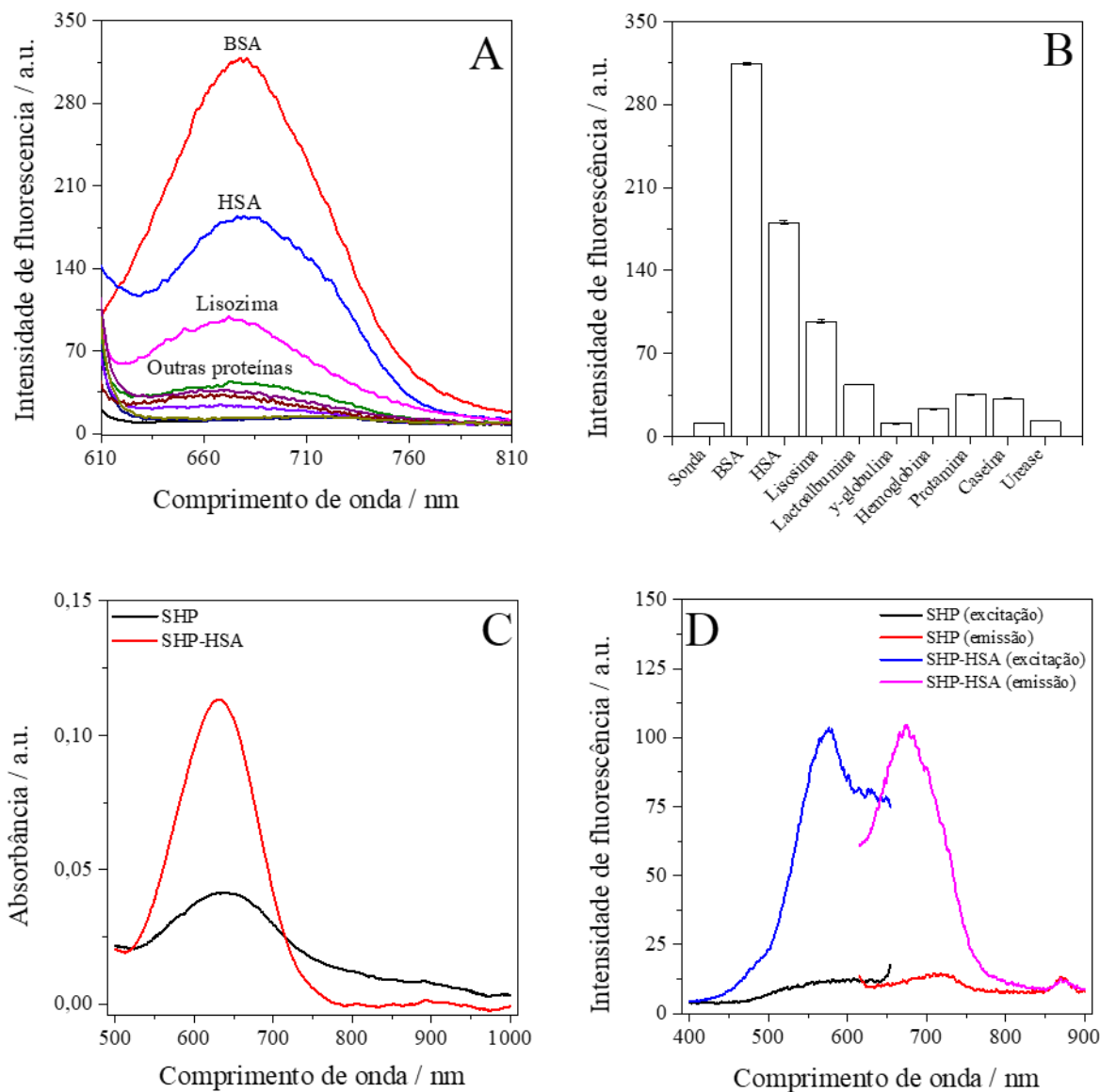
Os estudos iniciais foram baseados em condições experimentais da literatura (ZHAO *et al.*, 2019; EBIHARA *et al.*, 2016) para sondas fluorescentes derivadas do núcleo cianina heptametina. Inicialmente, a seletividade da sonda SHP foi avaliada frente a diferentes proteínas (BSA, HSA, lisozima, lactoalbumina, hemoglobina, protamina, γ -globulina, caseína e urease) em condições fisiológicas, na proporção 2:1 (sonda-proteína) (Figura 13A-B). De forma geral, a sonda SHP na forma livre não apresentou fluorescência significativa, no entanto, na presença das proteínas, principalmente as albuminas (BSA e HSA), houve um

aumento significativo da intensidade de fluorescência (28 e 16 vezes, respectivamente). O processo de interação de SHP com as albuminas ocorre, pois, a sonda interage preferencialmente nos sítios hidrofóbicos das proteínas (XING *et al.*, 2020).

A sonda SHP, devido a suas características apresentada potencial para ser usada na quantificação de proteínas totais em fluidos biológicos humanos, neste caso, empregando HSA como proteína modelo. A sonda SHP na ausência e na presença de HSA apresentou máxima absorção (λ_{\max}) em 630 nm, e na presença da proteína, a intensidade do sinal analítico aumentou ~ 3 vezes em comparação a SHP livre (Figura 13C). No ensaio de fluorescência molecular o complexo SHP-HSA apresentou $\lambda_{\text{ex}} = 580$ e $\lambda_{\text{em}} = 675$ (Figura 13D), similarmente a sonda livre. A sonda SHP apresentou emissão de fluorescência no infravermelho próximo (NIR) devido, principalmente a sua estrutura molecular ser altamente conjugada. O aumento da intensidade de fluorescência da sonda na presença da proteína deve-se a maior restrição conformacional, uma vez que ocorre redução da livre rotação anéis indólicos de SHP devido a interação com HSA, levando ao alinhamento dos orbitais π (π) no complexo proteína-ligante (XING *et al.*, 2020; AMIOT *et al.*, 2008).

Assim, sondas que fluorescem na região do infravermelho próximo apresentam características importantes quando comparados com as demais (emitem no UV-vis), tais como: a não interferência associada a autofluorescência de alvos biológicos, pois os tecidos, proteínas ou outros biomarcadores podem emitir fluorescência naturalmente na região do UV-visível, tem maior penetração da radiação em tecidos, fotoestabilidade e maiores rendimentos quânticos (RAJASEKHAR *et al.*, 2017; KABATC *et al.*, 2015). Sendo assim, o desenvolvimento de uma metodologia para determinação de proteínas totais usando a sonda SHP foi otimizada e aplicada em amostra biológicas de urina e plasma.

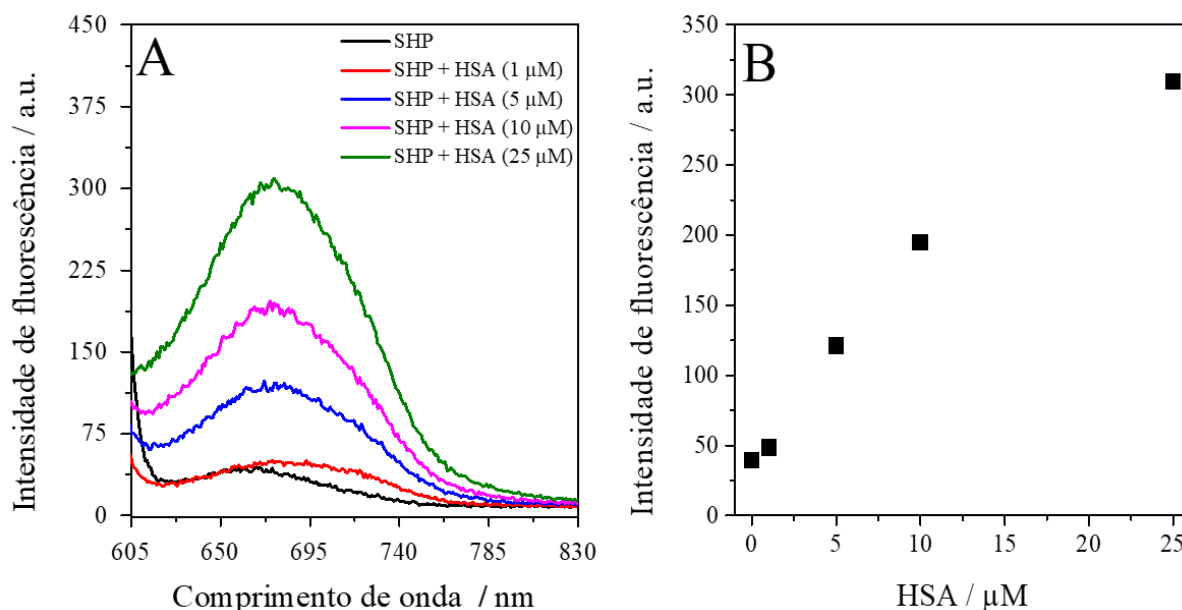
Figura 13. Análise preliminar da sonda SHP. (A) com diferentes proteínas. (B) Seletividade da sonda SHP. (C) Espectros de absorção da sonda SHP na ausência e na presença de HSA. (D) Espectros de emissão da sonda SHP na ausência e na presença de HSA. Condições: tampão Britton-Robinson (pH 7,0), concentração da sonda SHP e de HSA foram fixadas em 10 e 5 μM , respectivamente, e $\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm}$.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Quando se variou a concentração de HSA frente a SHP (concentração constante), obteve-se um perfil linear proporcional entre intensidade de emissão e concentração da proteína (Figura 14A-B). Neste sentido, SHP pode ser explorada como sonda *off-on* para determinação espectrofluorimétrica de HSA. O princípio do método está relacionado ao fato de SHP apresentar baixa intensidade de fluorescência na forma livre (*off*), no entanto, com a adição de concentrações crescentes de HSA, há a formação do complexo supramolecular com o aumento do sinal de emissão fluorescência (*on*).

Figura 14. Formação do complexo fluorescente (a) SHP-HSA e (b) Perfil gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração de HSA. Condições: [SHP] = 10 μM , [HSA] = 0,25- 25 μM , tampão Britton-Robinson (20 mM) e $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}= 580 / 675\text{nm}$.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

3.4.2 Otimização dos parâmetros analíticos

3.4.2.1 Avaliação do pH e o tipo de solução tampão

O pH do meio tem um efeito importante na formação do complexo SHP -HSA, uma vez que a sonda é derivada de um ácido fraco, assim, contém em sua estrutura grupos ionizáveis, como amina secundária ($\text{pK}_a \sim 9,0$) e anéis indólicos carregados positivamente. O estado fundamental e excitado de moléculas protonadas (ou respectivos complexos com proteínas) podem ser drasticamente diferentes de moléculas (e complexos) desprotonadas, por isso, o rendimento quântico pode ser modificado em função do grau de ionização e do pH do meio (RAJASEKHAR *et al.*, 2017; KABATC *et al.*, 2015). Além disto, o pH do meio influencia na formação do complexo SHP -HSA, pois as cadeias laterais dos aminoácidos constituintes da proteína possuem grupos passíveis de protonação o que afeta a estrutura tridimensional da macromolécula (LAKOWICZ, 2016).

Para estabelecer as melhores condições para aplicação da sonda, avaliou-se a sensibilidade analítica de pH de 4 a 10 (Figura 15A), sendo um intervalo de pH fisiologicamente relevante, pois, em $10 < \text{pH} < 4$ a HSA pode desnaturar, sendo a maior sensibilidade do método em meio básico ($\text{pH} > 8$). A menor sensibilidade apresentada em meio ácido ocorre devido à protonação dos grupos derivados de ácidos fracos na sonda e proteína, afetando a formação do complexo SHP -HSA, e por conseguinte no sinal analítico.

O ponto isoelétrico (pI) da HSA é 4,7; portanto, quando o pH < pI, a proteína possui uma maior quantidade de sítios carregados positivamente, o que aumenta a repulsão entre a macromolécula e a sonda, a qual em sua estrutura possui um anel indólico com amina quaternária (LAKOWICZ, 2016; VLASOVA, SALETSKY, 2009). Com o aumento do pH, a carga global da proteína torna-se negativa (pH > pI), assim, há favorecimento na formação do complexo SHP-HSA (MIKHAIL *et al.*, 2011; CHOUDHURY *et al.*, 2019; LE GUERN *et al.*, 2020). Dessa forma, a partir de pH 8 houve máxima sensibilidade analítica do método, desta forma, esta condição de concentração hidrogeniônica foi selecionada.

3.4.2.2 Efeito do tipo de solução tampão

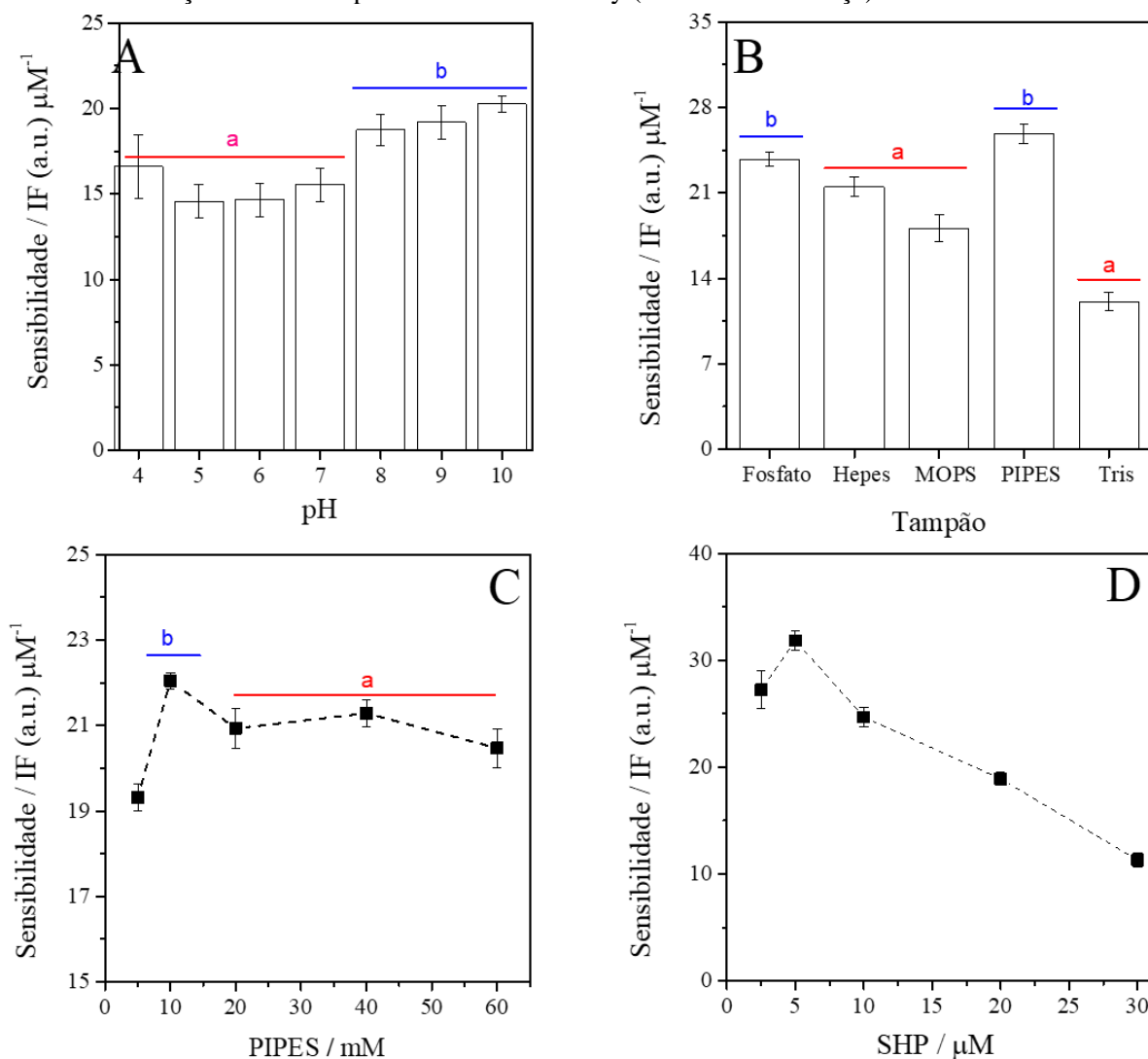
Após estabelecer o pH do meio, avaliou-se a influência do tipo de solução tampão no sistema. Para tanto, cinco soluções tampão foram avaliadas considerando que a máxima capacidade tamponante ($\text{pH} = \text{pK}_a \pm 1$) atendesse a condição de pH 8. Desta forma, selecionou-se tampão fosfato ($\text{pK}_{a2} = 7,2$), Tris-HCl ($\text{pK}_a = 8,1$), PIPES ($\text{pK}_a = 6,8$), HEPES ($\text{pK}_{a2} = 7,5$) e MOPS ($\text{pK}_a = 7,2$) todos a 20 mM (Figura 15B). O tampão PIPES foi o que apresentou maior sensibilidade, seguindo a ordem: PIPES \approx Fosfato > HEPES > MOPS > Tris. O tampão PIPES apresentou sensibilidade ligeiramente superior ao tampão fosfato (~8%), mas não diferindo estatisticamente (ANOVA, 95% de confiança), contudo, este sistema tampão é menos propenso a formação de sais de baixa solubilidade, interação com componentes da amostra e estabilidade da estrutura proteica (LEE *et al.*, 2013; FERREIRA *et al.*, 2015; SOKOŁOWSKA *et al.*, 2010). Dessa forma, o tampão PIPES foi selecionado para os estudos posteriores. O efeito da concentração da solução tampão PIPES foi avaliada quanto a sensibilidade analítica (Figura 15C) de 5 a 60 mM. A máxima sensibilidade foi obtida a partir de 10 mM, se mantendo constante para as maiores concentrações. Logo, esta concentração foi adotada na otimização do procedimento. Esse comportamento está relacionado a instabilidade da proteína da proteína e do complexo formado pelo aumento da quantidade de cargas negativas e ao bloqueio da superfície da proteína pela solução tampão, impossibilitando assim a interação sonda-proteína. (SOKOŁOWSKA *et al.*, 2010).

3.4.2.3 Avaliação da concentração da sonda SHP e influência da força iônica

A concentração de SHP foi avaliada de 2,5 a 30 μM visando obter a condição de máxima sensibilidade e menor sinal do branco analítico (Figura 15D). A maior sensibilidade do método foi observada na concentração de 5 μM de SHP, sendo que para menores valores houve redução da sensibilidade, devido, principalmente menor extensão da formação do

complexo sonda SHP-HSA e consequente diminuição do sinal de emissão de fluorescência. Contudo, perfil similar foi obtido para maiores concentrações de SHP, o qual foi atribuído *auto-quenching* da sonda devido a formação de agregados moleculares (LUO *et al.*, 2020; BECKER *et al.*, 2000).

Figura 15. Otimização dos parâmetros analíticos. (A) Influência do pH; (B) Influência da natureza do tampão; (C) Concentração do tampão PIPES, e (D) concentração da sonda SHP. Condições: $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=580/675\text{nm}$. Os dados foram avaliados por ANOVA (*one-way*), onde cores e letras diferentes indicam diferença estatística a partir do teste de Tukey (a 95% de confiança).

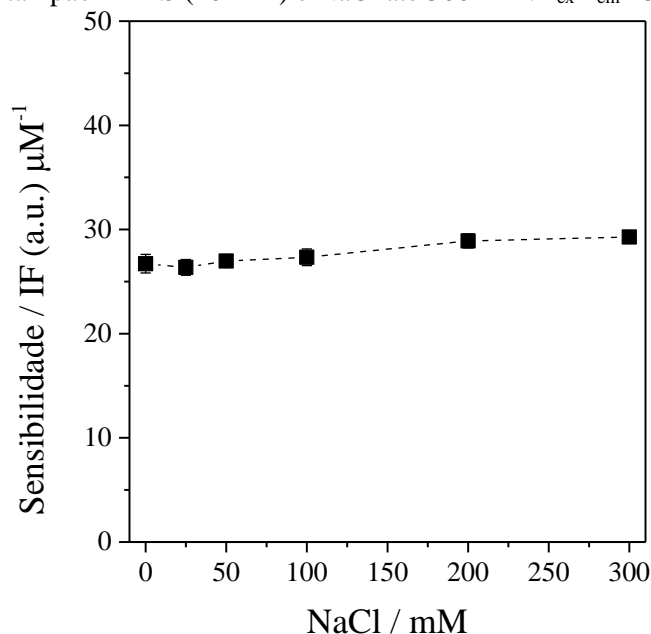


Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Uma vez que a atividade das espécies que formam o complexo sonda SHP-HSA pode ser modificada pela força iônica do meio este parâmetro foi avaliado no desenvolvimento do método proposto pela adição de NaCl até 300 mM (Figura 16). O aumento da concentração de NaCl não interfere diretamente na sensibilidade do método. Este resultado indica que as interações eletrostáticas não são as principais forças que atuando na estabilização do

complexo proteína-ligante, assim, devido as características estruturais, SHP deve se ligar a sítios hidrofóbicos da proteína (XU *et al.*, 2018).

Figura 16. Efeito da força iônica no método proposto pela adição de NaCl. Condições: [SHP] = 5 μM , [HSA] = 0,25- 25 μM , tampão PIPES (10 mM) e NaCl até 300 mM. $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}= 580 / 675\text{nm}$.



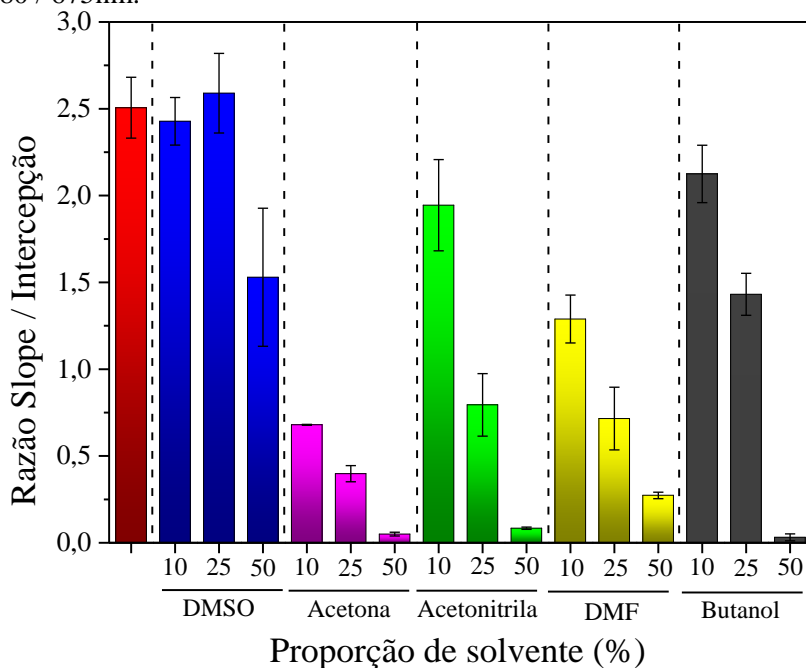
Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

3.4.3 Avaliação de diferentes solventes na sensibilidade do método

De forma geral, sondas usadas para determinação de proteínas (HSA) não são solúveis em água e suas soluções são preparadas geralmente em solventes orgânicos ou meio aquo-orgânicos. Além disso, algumas classes de sondas têm facilidade de gerar agregados em meio aquoso, levando a diminuição da intensidade de fluorescência (LEVITZ *et al.*, 2018). Sendo assim, neste estudo, avaliou-se a influência de diferentes solventes orgânicos (DMSO, etanol, acetona, acetonitrila, butanol e álcool isoamílico) em três níveis de concentração 10, 25 e 50% (v/v) do solvente na composição final da solução tampão (Figura 17). Como critério de avaliação se empregou a razão da sensibilidade e do branco analítico (S/b), uma vez que permite avaliar simultaneamente dois parâmetros relacionados. A presença dos solventes orgânicos nas proporções avaliadas não levou a efeito relevante na razão S/b do método. O DMSO nas proporções 10 e 25% (v/v) teve resultados similares ao sistema apenas com solução tampão. Por outro lado, a sonda SHP foi imiscível em álcool isoamílico. Os solventes provocam alterações na intensidade de fluorescência do sistema, pois afetam o estado fundamental e excitado de forma diferente, embora aumentem a solubilidade da sonda, esses

solventes podem mudar a estrutura da proteína, principalmente nos sítios mais hidrofóbicos (YANG *et al.*, 2017). Dessa forma, baseado nos resultados obtidos selecionou-se a condição em meio aquoso sem a presença de solvente orgânico adicional, exceto o DMSO presente proveniente da solução estoque da sonda, o qual após diluição no sistema representa cerca de 1% (v/v). Assim, o procedimento contribui com os princípios da química verde, com uso reduzido de solventes orgânicos sem comprometer a sensibilidade analítica, a qual pode ser atribuída a melhor estabilização do complexo proteína-sonda em meio aquoso (LUO *et al.*, 2020).

Figura 17. Influência de diferentes solventes na sensibilidade do método analítico. Condições: [SHP] = 5 μ M, [HSA] = 0,25- 25 μ M, tampão PIPES (10 mM) e proporção dos solventes: 10, 25 e 50% (v/v). $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ = 580 / 675nm.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

3.4.4 Caracterização do complexo SHP-HSA

A estequiometria do complexo formado entre SHP-HSA foi determinada pelo método das variações contínuas (método de Job) (RENNY *et al.*, 2013). Para tanto, foram preparadas soluções com diferentes frações molares da sonda (SHP) e da proteína (HSA), e a intensidade de fluorescência dos diferentes sistemas foi medida sendo construído um gráfico da fração molar da sonda em função da intensidade de fluorescência (Figura 18A). A análise do gráfico de Job revelou uma fração molar equivalente a 0,5 entre a sonda e a proteína nas condições

estabelecidas do método, sugerindo a estequiometria de 1:1 (SHP:HSA) para o complexo formado (TERPETSCHING *et al.*, 1993).

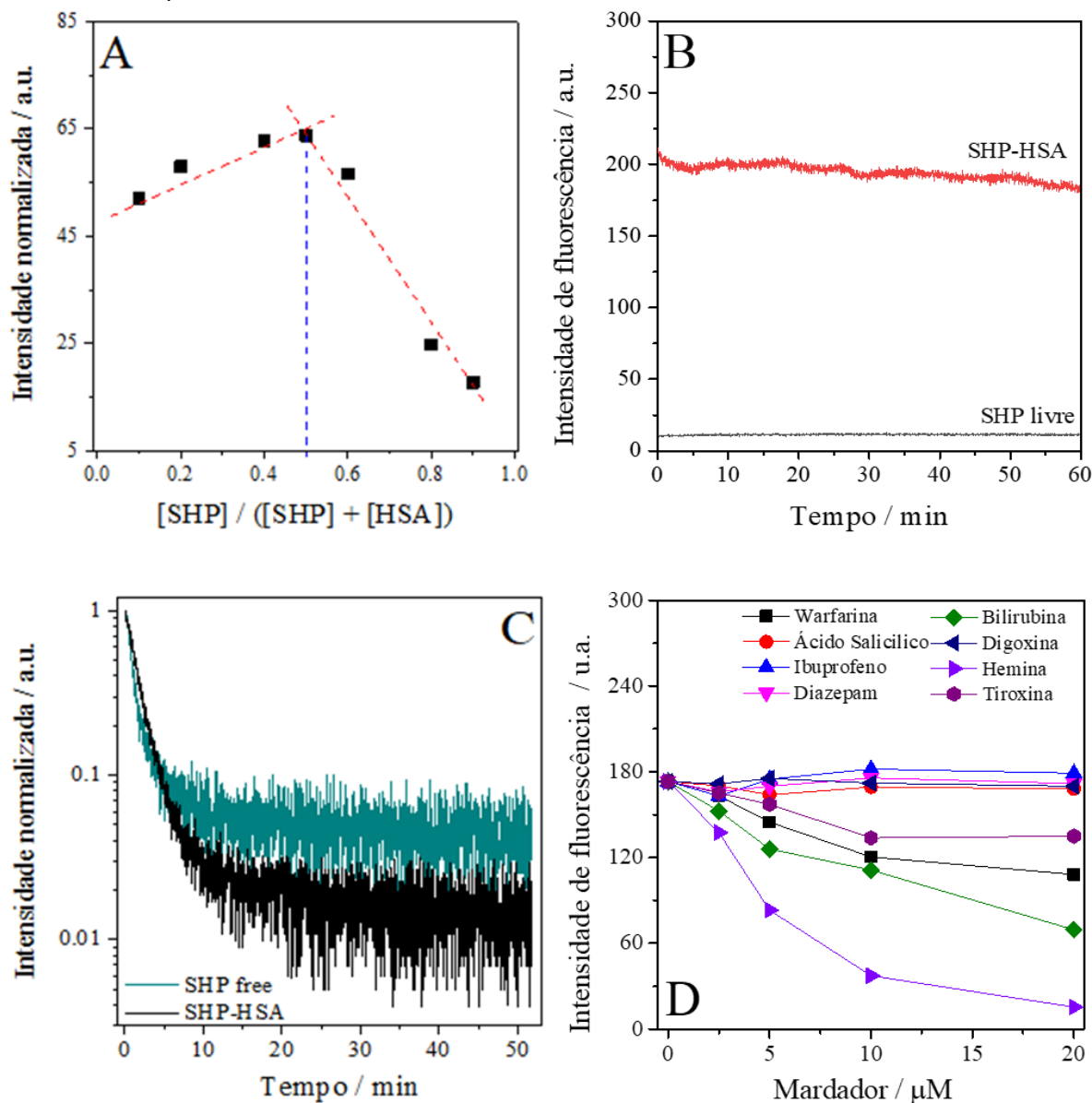
A fotoestabilidade da onda SHP na ausência e na presença de HSA foi avaliada nas condições experimentais otimizadas. A intensidade de fluorescência da sonda SHP e do complexo SHP-HSA foram registradas sob exposição constante a radiação eletromagnética ($\lambda_{\text{ex}} = 580 \text{ nm}$, 150 W) por 1 h (Figura 18B), indicando variação máxima do sinal analítico de 2% para a SHP livre (referência), e de 6% para o sistema SHP-HSA, indicando desta forma, uma elevada fotoestabilidade para ambos os sistemas.

O perfil do tempo de vida do estado excitado (fluorescência) seguiu um decaimento típico exponencial para ambos os sistemas avaliados, SHP e SHP-HSA (Figura 18C). Os valores dos tempos de vida de fluorescência foram $1,51 \pm 0,03$ e $1,95 \pm 0,01$ ns para SHP livre e para o complexo SHP-HSA (1:1), respectivamente. Estes valores de tempo de vida da sonda SHP estão de acordo com os derivados de cianina, os quais foram de 4,03 a 0,47 (LEE *et al.*, 2008; BEREZIN *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2020) descritos na literatura e pode estar relacionado com a polaridade do solvente e a presença de íons no meio, pois afeta o tempo de vida do estado excitado (ANTARIS *et al.*, 2017).

A HSA possui sítios preferenciais de ligação de pequenas moléculas (sítios I e II), nos quais, a maioria das sondas fluorescentes interagem de forma seletiva (WANG *et al.*, 2018). Da mesma forma, para verificar qual sítio de ligação preferencial a sonda SHP se liga, foi realizado por meio de ensaios de competição com compostos marcadores desses sítios, como varfarina e ácido salicílico (sítio I, subdomínio IIA), ibuprofeno e diazepam (sítio II, subdomínio IIIA), hemina e bilirrubina (subdomínio IB), digoxina (subdomínio IIIB) e tiroxina, pode se ligar ao sítio I, II e ao subdomínio IIIB (Figura 18D) (FAN *et al.*, 2014). A intensidade de fluorescência do complexo formado entre a sonda SHP-HSA não foi afetada pela adição de concentrações crescentes de ibuprofeno e diazepam (sítio II), ácido salicílico (sítio I) e digitoxina (subdomínio IIIB), sugerindo que a sonda SHP e esses marcadores não competem pelo mesmo sítio de ligação (ZENG *et al.*, 2016). Em contrapartida, após a adição dos marcadores hemina, bilirrubina, varfarina e tiroxina, a intensidade de fluorescência do complexo SHP-HSA diminuiu de 5 a 91%, sugerindo que a sonda compete com esses marcadores pelos mesmos sítios de ligação na proteína. Como a bilirrubina e a hemina são marcadores do subdomínio IB, e houve uma diminuição acentuada na intensidade de fluorescência (60 a 91% de redução para 20 μM do competidor, respectivamente), pode ser sugerido que a sonda SHP se ligue preferencialmente ao subdomínio IB. No entanto, para a

varfarina e o ácido salicílico, embora ambos sejam marcadores do sítio I, na presença de varfarina houve redução da intensidade de fluorescência de SHP de 6 a 37%, enquanto para o ácido salicílico não houve variação do sinal analítico. Assim, esse comportamento pode ser explicado pelo fato do ácido salicílico se ligar preferencialmente no sítio I, contudo, em um local diferente da varfarina, logo, é possível que em menor proporção SHP também possa se ligar ao sítio I da HSA (ZHU *et al.*, 2016). Condição semelhante pôde ser verificada para a tiroxina (marcador do sítio I, II e subdomínio IIIB) (LI *et al.*, 2016), sendo observado, uma variação máxima de 23%. Por fim, presume-se que a sonda SHP se liga preferencialmente no subdomínio IB da HSA, e no sítio I, em menor proporção, concordando com alguns estudos da literatura para derivados de cianina (XU *et al.*, 2018).

Figura 18. Caracterização do complexo SHP-HSA. (A) Método de Job de SHP e HSA; (B) Fotoestabilidade da onda SHP na ausência e na presença de HSA; (C) Tempo de vida e (D) Avaliação dos sítios de ligação da proteína. Condições: $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 580 / 675\text{nm}$, $C_{SHP} = 5 \mu\text{M}$, $C_{HSA} = 5 \mu\text{M}$, $C_{\text{marcador}} = 5, 10, 15 \text{ e } 20 \mu\text{M}$.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

O rendimento quântico de fluorescência para o complexo SHP-HSA foi calculado empregando vermelho do Nilo como referência ($\lambda_{ex} = 554 \text{ nm}$; $\lambda_{em} = 631 \text{ nm}$, $\Phi = 38\%$ em metanol) (CSER *et al.*, 2002; MARTINEZ *et al.*, 2016; HORNUM *et al.*, 2021). As intensidades de fluorescência integradas dos sistemas de referência e SHP-HSA registrados (Figura 19) e comparados em função de diferentes proporções da proteína (Tabela 4). Com o aumento da proporção da HSA, mantendo fixa a concentração da sonda, se observou um aumento também nos Φ calculados, indicando que o rendimento quântico do complexo SHP-HSA é modificado de acordo com a proporção entre a sonda e a proteína. Os valores de

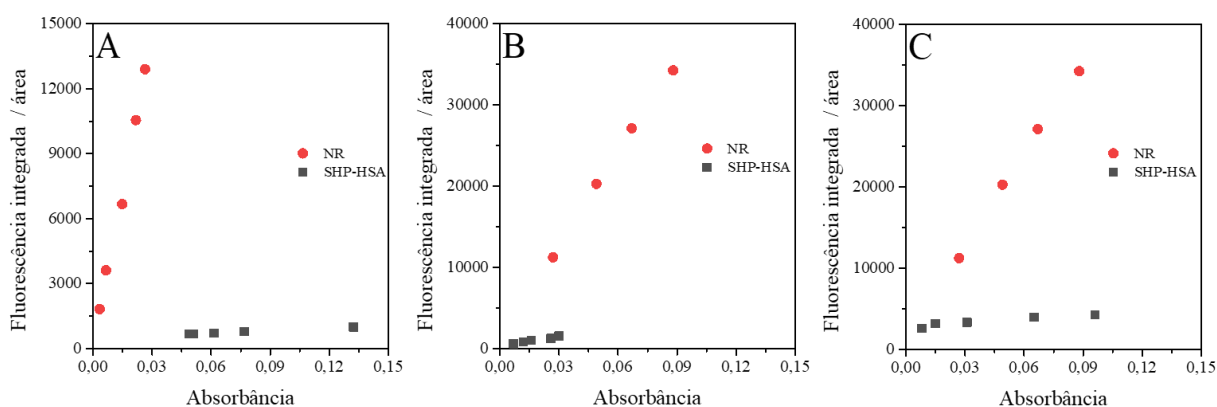
rendimento quântico calculados foram comparados com os derivados de cianina e albuminas (ZHENG *et al.*, 2018), sendo, aproximadamente 10 vezes menores, indicando que a além da proporção entre SHP e HSA, outros fatores pode influenciar neste parâmetro, seriam a estrutura e concentração da sonda, polaridade do solvente e força iônica.

Tabela 4. Rendimento quântico (Φ) para diferentes proporções entre a sonda SHP e HSA. A concentração da sonda SHP foi fixada em 5 μM em todos os experimentos.

Condição	Proporção SHP-HSA	Rendimento quântico (%)
1	1:1	0,89
2	1:200	4,00
3	1:500	7,80

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Figura 19. Rendimento quântico de fluorescência para o complexo SHP-HSA em diferentes proporções sonda-proteína empregando vermelho do Nilo como referência. Condições: [SHP] = 5 μM , proporção de HSA = 1:1, 1:200 e 1:500, tampão PIPES (10 mM) e $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ = 580 / 675nm. Vermelho do Nilo λ_{ex} = 554 nm; λ_{em} = 631 nm, Φ = 38% em metanol.

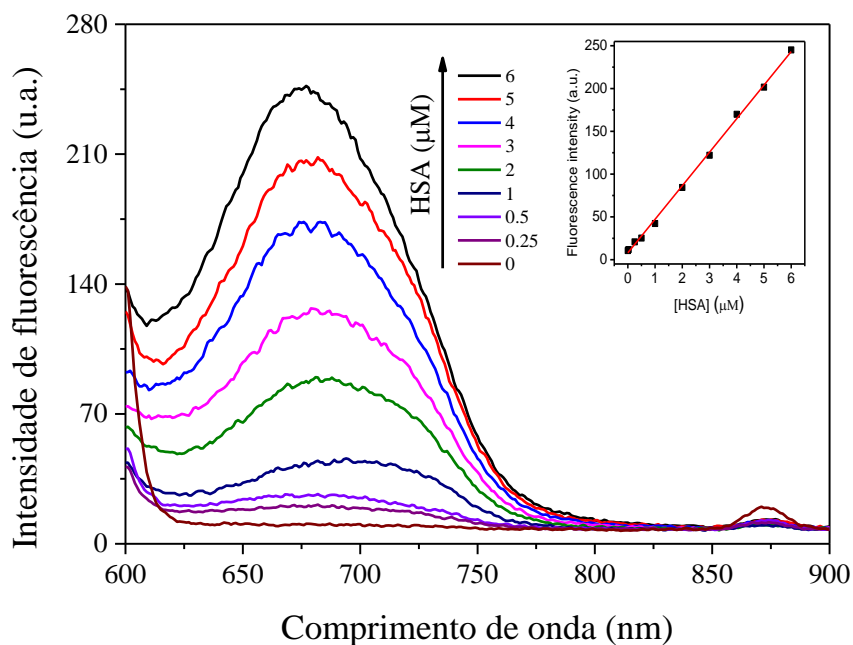


Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

3.4.5 Figuras de mérito do método e constante de ligação SHP-HSA

Após a otimização dos parâmetros experimentais relativos ao desenvolvimento da metodologia para determinação de proteínas totais (HSA), foram estabelecidas as principais figuras de mérito do método. O aumento da concentração de HSA é seguido pelo aumento da intensidade de fluorescência (Figura 20) correspondente à uma faixa linear de 0,05 - 6,0 μM (3,4 - 408 mg L^{-1}), que corresponde a curva analítica descrita pela equação $IF = 39,18(\pm 0,55) \times C_{\text{HSA}} + 8,07(\pm 1,7)$ ($n = 10$) com $r = 0,9992$. O limite de detecção (LOD) calculado para o método (3σ) foi 14 nM (0,95 mg L^{-1}) com $\text{RSD} \leq 3,6\%$ ($n = 10$), indicando que a metodologia proposta possui boa precisão.

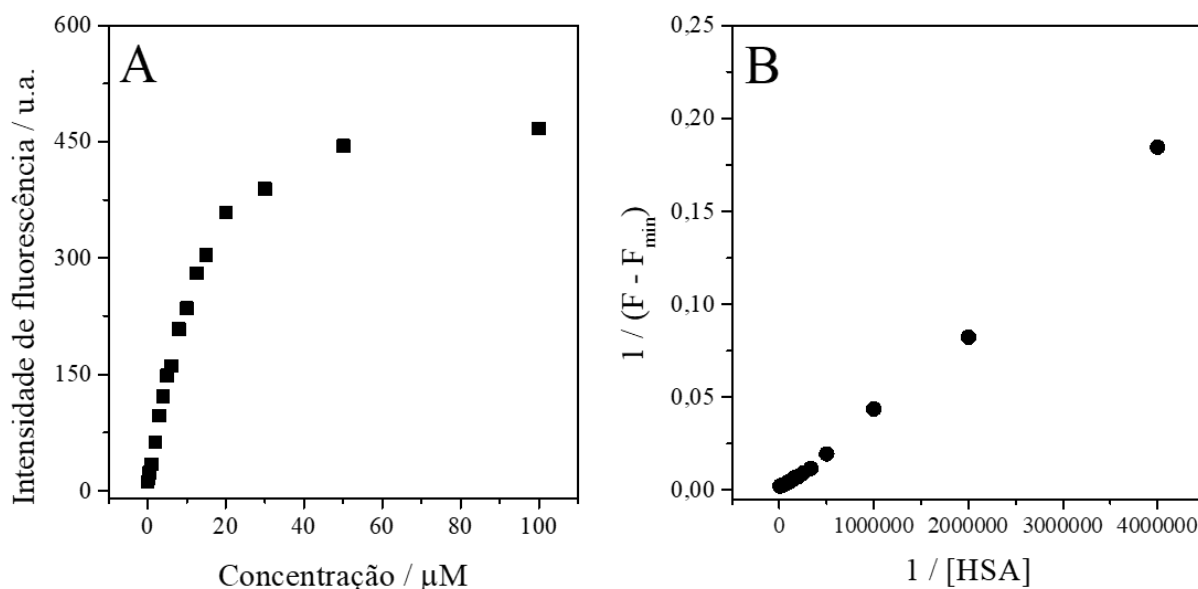
Figura 20. Espectros de emissão de fluorescência de SHP na presença de diferentes concentrações de HSA sob os parâmetros experimentais otimizados. A inserção mostra a curva de calibração correspondente.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

O valor da constante de ligação (K_b) foi estabelecida por meio da equação de Benesi-Hildebrand a partir da linearização do gráfico $1/[HSA]$ vs $1/(F_{\max} - F_{\min})$ (Figura 21), sendo igual a $2,21(\pm 0,07) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, comparável com outras sondas para proteínas totais usando derivados de cianina (PRONKIN *et al.*, 2020). Pela análise das figuras de mérito do método proposto, se verificou que os parâmetros analíticos obtidos são comparáveis a outras metodologias descritas na literatura para determinação proteínas totais (Tabela 5).

Figura 21. Determinação da constante de ligação (K_b) por meio da equação de Benesi-Hildebrand (a) a partir da saturação do complexo SHP-HSA (b) linearização do gráfico $1/[HSA]$ vs $1/(F_{\max} - F_{\min})$. Condições: $[SHP] = 5 \mu\text{M}$, $[HSA] = 0,25\text{-}100 \mu\text{M}$, tampão PIPES (10 mM) e $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 580 / 675\text{nm}$.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

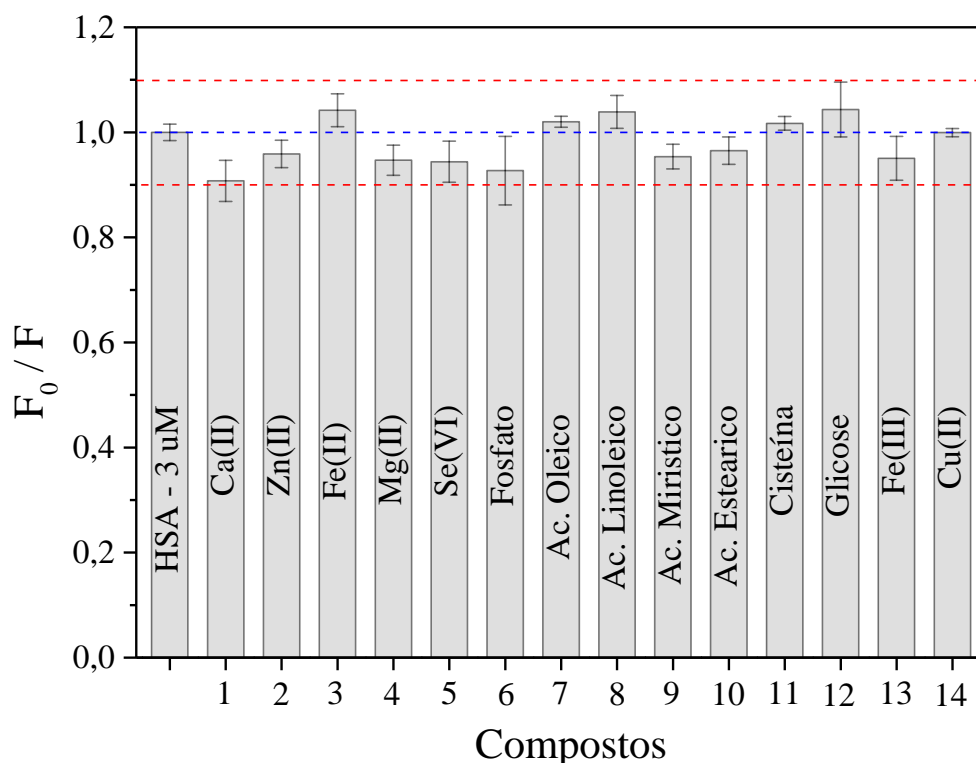
Tabela 5. Comparação de diferentes sondas fluorescentes na detecção de HSA.

Sensor	Proteína	pH	Meio	K_b (M^{-1})	$\lambda_{ex} / \lambda_{em}$	LOD ($mg L^{-1}$)	Faixa line (mg L^{-1})	estequiometria	Amostras	Referencia
Derivado de Chalcona	HSA	7,4	PBS	–	400 / 535	0,57	0 – 60	1:1	Soro humano	LEVITZ <i>et al.</i> , 2018
Derivado de Chalcona	BSA	7,4	PBS	$0,6 \times 10^6$	460 / 596	9,1	100 – 100	1:1	Soro bovino	YANG <i>et al.</i> , 2017
Derivado de Rodamina	HSA	7,4	PBS	$1,1 \times 10^5$	436 / 508	300	0 – 500	–	Urina e bioimagem	KIM <i>et al.</i> , 2020
Derivados de flavonoides	HSA	7,4	HEPES	–	400 / 508	5,6	0 – 600	1:1	–	TERPETSCHING <i>et al.</i> , 1993
Derivado de α -cianoacetofenona	HSA	7,4	PBS	$2,5 \times 10^{15}$	600 / 730	0,72	0 – 600	1:1	Urina	ANTARIS <i>et al.</i> , 2017
2-dicianometileno-3-ciano-4,5,5-trimetil-2,5-di-hidrofurano	HSA	7,4	TRIS-etanol (95:5, v/v)	–	600 / 660	0,61	0 – 13,3	–	Soro humano	REJA <i>et al.</i> , 2016
Derivados de tieno[3,2-b]piridina-5(4H)-ona	HSA	9,0	Tris-DMSO (9:1, v/v)	$2,5 \times 10^6$	440 / 550	0,48	0 – 60	1:1	Urina artificial	LIU <i>et al.</i> , 2017
Derivado de cianina	HSA	7,2	PBS	$3,0 \times 10^5$	710 / 794	–	0 – 600	1:1	Urina artificial	PATONAY <i>et al.</i> , 2005
Derivado de cianina	HSA/ BSA	7,9	TRIS-HCl	$3,0 \times 10^4$	689 / 698	4,0	4 – 2000	1:1	–	ARISTOVA <i>et al.</i> , 2020
Derivado de cianina	BSA	7,4	PBS	$1,2 \times 10^5$	755 / 800	85,8	0 – 102	1:1	–	KUZMIN <i>et al.</i> , 2016
Derivado de dicianometileno-4H-cromeno	HSA	7,4	PBS	–	520 / 620	0,6	0 – 12	–	Urina	KASPCHAK <i>et al.</i> , 2018
Derivado indolico	HSA	7,4	HEPES	–	550 / 680	0,66	0 – 1,2	1:1	Soro humano	LUO <i>et al.</i> , 2018
Derivado de cianina	HSA	8,0	PIPES	$2,21 \times 10^7$	580 / 675	0,84	3,4 - 408	1:1	Urina e plasma	Este trabalho

3.4.6 Interferentes

Várias espécies presentes em amostras biológicas, como urina e plasma podem se ligar à sonda ou da proteína e, assim, interferir na determinação de HSA. Portanto, foi avaliada a influência de 15 espécies considerando uma condição fisiológica normal (BONACCHI *et al.*, 2011). Inicialmente foi avaliado excesso de 10 vezes de cada espécie (a 30 μM) em relação a concentração molar de HSA (3 μM) (Figura 22). Como critério para indicar que a espécie não influenciou na formação do complexo SHP-HSA se considerou uma variação máxima $\pm 10\%$ em relação a intensidade do sinal de fluorescência na condição sem o interferente.

Figura 22. Sensibilidade da sonda SHP para HSA (3 μM) na presença de espécies interferentes: 1- Ca(II), 2- Zn(II), 3- Fe(II), 4- Mg(II), 5- Se(VI), 6- Fosfato, 7- ácido oleico, 8- ácido linoleico, 9- ácido mirístico, 10- ácido esteárico a 30 μM e 11- Cisteína (25 μM), 12- glicose (20 μM), 13- Fe(III) (7,5 μM) e 14- Cu(II) (3,5 μM).



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

Sendo assim, é possível inferir que algumas espécies podem influenciar no resultado do método, desta forma o limites máximo para algumas espécies foram cisteína (25 μM), glicose (20 μM), Fe(III) (7,5 μM) e Cu(II) (3,5 μM), as quais, pode estar competindo com a sonda SHP pelo sitio de ligação na proteína ou podem estar agindo no sitio, causando mudanças estruturais na biomolécula e dificultando a interação com sonda (KASPCHAK *et*

al., 2018). Porém, mesmo nestas condições o método se mostrou seletivo para determinação de HSA em condições fisiológicas.

3.4.7 Aplicação em amostras reais

Dado o desempenho analítico do método, a determinação de proteínas totais (em função de HSA) em amostras reais foi avaliada. Para tanto, amostras de urina e plasma de diferentes voluntários foram coletadas, e enriquecidas com níveis de concentração de HSA (60, 120 e 240 mg L⁻¹) e submetidas a ensaios de recuperação. As amostras de urina e de sangue (para obtenção do plasma) foram inicialmente centrifugadas para posteriormente serem analisadas (KIM *et al.*, 2013). O método não apresentou efeito de matriz uma vez que os ensaios de recuperação para amostras biológicas complexas (urina e plasma) as recuperações variam de 91 a 118% (Tabela 6). Os resultados pelo método proposto não difeririam estatisticamente do método de referência (Bradford) para proteínas totais empregando teste *t*-pareado de Student (intervalo de confiança de 95%). Assim, o método foi exato e confiável para análise de amostras biológicas, além disto, empregando uma sonda com emissão em 675 nm, se evita o efeito de filtro de amostras coloridas como a urina, por exemplo.

Tabela 6. Determinação de HSA em amostra de urina e plasma.

Amostras ¹	Adicionado (mg L ⁻¹)	Determinado (mg L ⁻¹)	Recuperado (%)	RSD (%)	Concentração (mg L ⁻¹) ²	
					Este trabalho ³	Bradford
Urina 1	0	6,13 ± 0,20	-	3.3	245 ± 6	266 ± 9
	60	63,4 ± 0,1	95	0.2		
	120	116 ± 1	91	0.9		
	180	184 ± 1	98	0.5		
Urina 2	0	12,16 ± 0,4	-	3.3	486 ± 1	412 ± 9
	60	74,5 ± 0,5	103	0.7		
	120	121 ± 1	91	0.8		
	180	174 ± 1	90	0.6		
Plasma 1	0	54,7 ± 0,5	-	0.9	21900 ± 30	25900 ± 16
	60	119 ± 1	107	0.9		
	120	196 ± 1	118	0.5		
	180	257 ± 1	112	0.4		
Plasma 2	0	138 ± 5	-	3.6	55100 ± 21	50100 ± 32
	60	202 ± 3	104	1.5		
	120	256 ± 6	98	2.3		
	180	321 ± 4	102	1.2		
Plasma 3	0	51,1 ± 2,5	-	4.9	20400 ± 19	23000 ± 27
	60	119 ± 2	114	1.7		
	120	187 ± 1	113	0.5		
	180	236 ± 5	102	1.7		

¹As amostras de urina e plasma foram diluídas 20 e 40 vezes, respectivamente. ²Os valores de referência para concentração de HSA são até 100 mg L⁻¹ (urina) e de 35000 – 55000 mg L⁻¹ (plasma). ³Teste *t*-pareado de Student para intervalo de confiança de 95%, sendo $t_{\text{cr}} = 0,1377$ (p -valor = 0,8971 > $\alpha = 0,05$).

Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

3.5 Conclusão

A determinação de proteínas totais é uma demanda constante para diferentes demandas (bio)químicas. Neste sentido, este trabalho explorou SHP como uma alternativa a quantificação de HSA, uma vez que métodos com emissão no NIR, apresentam menor possibilidade de interferência espectral. Além disto, o método mostrou-se seletivo para quantificação de HSA na presença de diferentes espécies, incluindo outras proteínas. Por fim, a metodologia desenvolvida tem potencial para a ser implementada em análise de rotina, empregando uma quantidade reduzida de SHP (5 μ M) visando quantificação de proteínas totais em diferentes amostras biológicas, além disto, mostrou simplicidade, precisão, exatidão e rapidez.

Referências

- ZHU, X. SUN, J., HU, Y. Determination of protein by hydroxypropyl- β -cyclodextrin sensitized fluorescence quenching method with erythrosine sodium as a fluorescence probe. **Analytica Chimica Acta**, Volume 596, Issue 2, 23 July, Pages 298-302, 2007.
- HOU, X. TONG, X., DONG, W., DONG, C., SHUANG, S. Synchronous fluorescence determination of human serum albumin with methyl blue as a fluorescence probe. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. Volume 66, Issue 3, March, Pages 552-556, 2007.
- GATTA, A., VERARDO, A., BOLOGNESI, M. Hypoalbuminemia. **Intern. Emerg. Med.** v. 7, p. 193-199, 2012.
- STANYON, H.F.; VILES, J.H. Human Serum Albumin Can Regulate Amyloid- β Peptide Fiber Growth in the Brain Interstitium implications for alzheimer disease. **J. Biol. Chem.**, v. 287, p. 28163-28168, 2012.
- XIAO, W., LI, Y., XIONG, Y. *et al.* Fluorescence turn-on detection of human serum albumin based on the assembly of gold nanoclusters and bromocresol green. **Anal Bioanal Chem**, 415, 3363–3374, 2023.
- RAMEZANI, A. M., MANZOORI, J. L., AMJADI, M., JOUYBAN, A. Spectrofluorimetric Determination of Human Serum Albumin Using Terbium-Danofloxacin Probe. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-9, 2011.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A. L., RANDALL R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, 193, p. 265, 1951.
- M.M. BRADFORD. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72, p. 248, 1976.
- T. ZOR, Z. SELINGER. Linearization of the Bradford Protein Assay Increases Its Sensitivity: Theoretical and Experimental Studies. **Anal. Biochem.**, 236, p. 302, 1996.
- HUI, R.H., HOU, D.Y., LI, X.C., LIU, X.Y., ZHU, Y.Q. Determination of protein in Fagopyrum. **Food Sci**, 25(10), 230–232, 376, 2004.
- SHRIVASTAW, K. P., SINGH, S., SHARMA, S.B., SOKHEY, J. Quantitation of protein content by biuret method during production of Yellow Fever Vaccine. **Biologicals**. 1995 Dec; 23(4): 299-300, 1995.
- MORI, I., TAGUCHI, K., FUJITA, Y., MATSUO, T. Sensitive spectrophotometric determination of human serum albumin (HSA) with (2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(N-phenyl-N-sulfopropylamino) phenol) (5-Br. PAPS)-cobalt (II) complex. **Analytical Letters**, v. 28, n. 2, p. 225-237, 1995.
- GUO, Z.X., HAO, Y.M., CONG, X., SHEN, H.X. Application of the dibromohydroxyphenylfluorone–molybdenum (VI) complex to the sensitive spectrophotometric determination of protein. **Anal. Chim. Acta**, V. 403, Issues 1–2, 3 January, Pages 225-233, 2000.

- JIANG, C., LUO, L. Spectrofluorimetric Determination of Human Serum Albumin Using a Tetracycline–Europium Complex, **Analytical Letters**, 37:6, (2004) 1129-1137.
- LABIB, M., SARGENT, E. H., KELLEY, S. O. Electrochemical Methods for the Analysis of Clinically Relevant biomolecules. **Chem. Rev.** 2016, 116, 16, 9001–9090.
- CIEPLAK, M., SZWABINSKA, K., SOSNOWSKA, M. et al. Selective electrochemical sensing of human serum albumin by semi-covalent molecular imprinting. **Biosensors and Bioelectronics**. Volume 74, 2015, Pages 960-966.
- HASELBERG, R., DE JONG, G. J., SOMSEN, G. W. Capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of intact proteins. Volume 12, Issue 4, December 1977, Pages 1133-1142. **Journal of Chromatography A**. Volume 1159, Issues 1–2, 3 August, Pages 81-109, 2007.
- MIKHAIL, Y.B., Guo, K, Akers, W., et al. Near-infrared fluorescence lifetime pH-sensitive probes. **Biophysical Journal**. V. 100, ISSUE 8, P. 2063-2072, 2011.
- CHOU DHURY, R., PATEL, S R., GHOSH, A., et al. . **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**.v. 376, p. 100-107, 2019.
- LE GUERN, F., MUSSARD, V., GAUCHER, A., ROTTMAN, M., PRIM, D. Fluorescein Derivatives as Fluorescent Probes for pH Monitoring along Recent Biological Applications. **Int J Mol Sci**. Dec, 3;21(23):9217, 2020.
- LEE, H., BEREZIN, M. Y., TANG, R., ZHEGALOVA, N., ACHILEFU. S. Pyrazole-substituted Near-infrared Cyanine Dyes Exhibit pH dependent Fluorescence Lifetime Properties. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 89, n. 2, 2013.
- FERREIRA, C. M. H., PINTO, I. S. S., SOARES, E, V., SOARES, H. M. V. (Un)suitability of the use of pH buffers in biological, biochemical and environmental studies and their interaction with metal ions – a review. **RSC Adv.**, v. 5, p. 30989-31003, 2015.
- SOKOŁOWSKA, M., PAWLAS, K., BAL, W. Effect of Common Buffers and Heterocyclic Ligands on the Binding of Cu (II) at the Multimetal Binding Site in Human Serum Albumin. **Bioinorg Chem Appl**. v. 2010; p. 1-7, 2010.
- LUO, Z., LV, T., ZHU, K., YI LI, WANG, L., GOODING, J. J., LIU, G., BIN LIU. Paper-Based Ratiometric Fluorescence Analytical Devices towards Point-of-Care Testing of Human Serum Albumin. **Angewandte Chemie**, v.59 , p. 3131-3136, 2020.
- BECKER, A., Riefke, B., Ebert, B., Sukowski, U., Rinneberg, H., Semmler, W., Licha, K. Macromolecular contrast agents for optical imaging of tumors: comparison of indotricarbocyanine-labeled human serum albumin and transferrin. **Photochem. Photobiol.** V. 72, 234, 2000.
- XU, Y., SU, M., LI, H., LIU, Q., XU, C., YANG, Y., ZHU, H. A fluorescent sensor for discrimination of HSA from BSA through selectivity evolution. **Analytica Chimica Acta**, v. 1043, p. 123-31, 2018.

LEVITZ, A., MARMARCHI, F., HENARY, M. Introduction of Various Substitutions to the Methine Bridge of Heptamethine Cyanine Dyes *Via* Substituted Dianil Linkers. **Photochem Photobiol Sci.** October 10; 17(10): 1409–1416, 2018.

YANG, W., LIU, C., LU, S., CHENG, S., DU, J., GAO, Q., SHEN, P., LUO, H., LIU, Y., YANG, C. Red-emitting benzo[e]indolium probes for HSA based on the TICT characteristics. **Journal of Luminescence.** Volume 192, Pages 478-485, 2017.

RENNY, J. S., MASEVICH, L. L., TALLMADGE, E.H, COLLUM. D.B. Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry [**]. **Angew Chem Int Ed Engl.**, v. 52, n. 46, p. 11998-12013, 2013.

TERPETSCHING, E., SZMACINSKI, H., LAKOWICZ, J. R. Synthesis, spectral properties and photostabilities of symmetrical and unsymmetrical squarines; a new class of flourophores with long-wavelength excitation and emmission, **Analytica Chimica Acta**, Volume 282, Issue 3, Pages 633-641, 1993.

LEE, H., BEREZIN, M. Y., HENARY, M., STREKOWSKI, L., ACHILEFU, S. Fluorescence lifetime properties of near-infrared cyanine dyes in relation to their structures, **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Volume 200, Issues 2–3, 2008, Pages 438-444.

BEREZIN MY, LEE H, AKERS W, NIKIFOROVICH G, ACHILEFU S. Ratiometric analysis of fluorescence lifetime for probing binding sites in albumin with near-infrared fluorescent molecular probes. **Photochem Photobiol.** 2007 Nov-Dec;83(6):1371-8.

KIM, Y., SHIN, E., W., KIM, M. K., CHONG, Y. A Near-infrared Turn-on Fluorescent Sensor for Sensitive and Specific Detection of Albumin from Urine Samples. **Sensors**, v. 20, p. 1232- 1245, 2020.

ANTARIS, A., CHEN, H., DIAO, S. *et al.* A high quantum yield molecule-protein complex fluorophore for near-infrared II imaging. **Nat Commun**, 8, 15269, 2017.

CSER, A., NAGY, K., BICZÓK, L. Fluorescence lifetime of Nile Red as a probe for the hydrogen bonding strength with its microenvironment, **Chemical Physics Letters**, Volume 360, Issues 5–6, Pages 473-478, 2002.

MARTINEZ, V., HENARY, M. Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues. **Chemistry.** Sep 19;22(39):13764-13782, 2016.

HORNUM, M., MULBERG, M.W., SZOMEK, M., REINHOLDT, P., BREWER, J.R., WÜSTNER, D., KONGSTED, J., NIELSEN, P. Substituted 9-Diethylaminobenzo[a]phenoxazin-5-ones (Nile Red Analogues): Synthesis and Photophysical Properties. **J Org Chem.** Jan 15;86(2):1471-1488, 2021.

ZHENG, D., XU, J., SU, M., SUN, Z., JIAO, Q., YANG, Y., ZHU, H. A small, steady, rapid and selective TICT based fluorescent HSA sensor for pre-clinical diagnosis. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 271, p. 82-89, 2018.

WANG, Q., FAN, J., ZHOU, Y., XU, S. Development of a human serum albumin structure-based fluorescent probe for bioimaging in living cells. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Volume 269, 120769, 2022.

FAN, J., SUN, W., WANG, Z., PENG, X., LI, Y., CAO, J. A fluorescent probe for site I binding and sensitive discrimination of HSA from BSA. **Chem. Commun.**, v. 50, p. 9573-9576, 2014.

ZENG, X., MA, M., ZHU, B., ZHU, L. A Near Infrared Fluorescent Probe for Sensitive Determination of Human Serum Albumin. **Anal Sci.**, v. 32, n. 12, p. 1291-1294, 2016.

ZHU, T., DU, J., CAO, W., FAN, J., PENG, X. Microenvironment-Sensitive Fluorescent Dyes for Recognition of Serum Albumin in Urine and Imaging in Living Cells. **Ind. Eng. Chem. Res.** 55, 3, 527–533, 2016.

LI, Y., LI, K., HE, J. A ‘turn-on’ fluorescent chemosensor for quantification of serum albumin in aqueous solution at neutral pH. **Luminescence**, 31: 905– 910, 2016.

PRONKIN, P.G., SHVEDOVA, L.A., TATIKOLOV A.S. Comparative study of the interaction of some meso-substituted anionic cyanine dyes with human serum albumin. **Biophysical Chemistry**, Volume 261, 106378, 2020.

REJA, S. I., KHAN, I. A., BHALLA, V., MANOJ. K. A TICT based NIR-fluorescent probe for Human Serum Albumin: a preclinical diagnosis in blood serum. **Chem. Commun**, 52, 1182-1185, 2016.

LIU, C., YANG, W., DU, J., P., YANG, C. A Boron 2-(20- pyridyl) Imidazole Fluorescence Probe for Bovine Serum Albumin: Discrimination over Other Proteins and Identification of Its Denaturation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 93, p. 1414-1422, 2017.

PATONAY, G., KIM, J. S., KODAGAHALLY, R., STREKOWSKI, L. Spectroscopic Study of a Novel Bis (heptamethine cyanine) Dye and Its Interaction with Human Serum Albumin. **Appl Spectrosc.**, v. 59, n. 5, p. 682-690, 2005.

ARISTOVA, D., VOLYNETS, G., CHERNII, S., LOSYTSKYI, M., BALANDA, A., SLOMINSKII, Y., MOKHIR, A., YARMOLUK, S., KOVALSKA, V. Far-red pentamethine cyanine dyes as fluorescent probes for the detection of serum albumins. **Royal Society Open Science**, v. 7: 1-14, 2020.

KUZMIN, V., NEKIPELOVA, T. D., PODRUGINA, T. A., GOLOVINA, G. V., KOSTYUKOV, A. A., TEMNOV, V. V., DOROSHENKO, I. A., RADCHENKO, E. V., PALYULIN, V. A., ZEFIROV, N.S. Complex formation of albumin with tricyanobenzene dyes containing phosphonate groups. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 1377-1384, 2016.

BONACCHI, S., GENOVESE, D., JURIS, R., MONTALTI, M., PRODI, L., RAMPAZZO, E., ZACCHERONI, N. Luminescent Silica Nanoparticles: Extending the Frontiers of brightness. **Angew. Chem. Int. Ed. Italia**, v. 50, p. 4056-4066, 2011.

KASPCHAK, E., MAFRA, L. I., MAFRA, M. R. Effect of heating and ionic strength on the interaction of bovine serum albumin and the antinutrients tannic and phytic acids, and its influence on in vitro protein digestibility. **Food Chem.**, v. 252, p. 108, 2018.

LUO, Z., LIU, B., ZHU, K., Huang, Y., Pan, C., Wang, B., Wang, L. An environment-sensitive fluorescent probe for quantification of human serum albumin: Design, sensing mechanism, and its application in clinical diagnosis of hypoalbuminemia. **Dyes and Pigments**, v. 152, 60-66, 2018.

KIM S., RHEE, H. W., PARK, H. J., KIM, H. Y., KIM, H. S., HONG, J. Fluorescent probes designed for detecting human serum albumin on the basis of its pseudo-esterase activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 23, n. 7, p. 2093-2097, 2013.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Considerando as hipóteses deste trabalho, pode-se inferir que:

(Trabalho 1) De forma geral, a determinação de timerosal foi possível de ser realizada utilizando dispositivos baseados em papel (PADs) de forma simples, rápida, precisa e exata. A necessidade de redução de custos e de resíduos foram os pontos mais positivos. Nesse processo, a otimização dos principais parâmetros foi importante pois tínhamos como objetivos a redução no consumo de reagentes e amostras, além de obter a melhor resposta analítica possível. Por fim, a utilização de KMnO_4 como agente oxidante se mostrou efetiva na degradação do timerosal em vacinas obtendo o mercúrio inorgânico no meio, sendo este determinado, tanto pela metodologia desenvolvida quanto pelo método de referência, obtendo-se boas recuperações. Diante disto, pode-se observar a importância de desenvolver novas metodologias para determinação de analitos de interesse da sociedade, de baixo custo e que sejam ambientalmente amigáveis.

(Trabalho 2) De acordo com os resultados obtidos, a sonda SHP mostrou-se sensível a HSA e apresentou as condições, como pH 8, LOD = $0,84 \text{ mg L}^{-1}$ e emissão na região do infravermelho próximo (NIR). Assim, possibilitando o desenvolvimento de um método espectrofluorimétrico simples, rápido, e sensível para determinação de proteínas totais em função d HSA. Neste estudo, outras proteínas plasmáticas não foram interferentes, foi possível estabelecer os principais locais de ligação da sonda com a proteína e os principais parâmetros como pH, tampão, concentração, força iônica, entre outros. Nas condições otimizadas a metodologia permitiu a determinação de HSA em amostras de urina e de plasma e comparação com o método de referência obtendo recuperações quantitativas.

(Perspectiva) Otimizar os parâmetros químicos e instrumentais para uma sonda derivada de cianina, semelhante a sonda SHP, usando a colorimetria para determinação de HSA. Essa metodologia apresenta grande potencial, visto que, nos ensaios preliminares, os resultados foram comparáveis com a sonda desenvolvida neste trabalho, SHP.