



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

ELTON ELIAS MELO COSTA

**DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NEUROATIVOS EM AMOSTRAS DE
MICRODIÁLISE UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR E MICROCHIPS COM
DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA**

**Maceió – AL
Fevereiro de 2016**

ELTON ELIAS MELO COSTA

**DETERMINAÇÃO DE AMINOÁCIDOS NEUROATIVOS EM AMOSTRAS DE
MICRODIÁLISE UTILIZANDO ELETROFORESE CAPILAR E MICROCHIPS COM
DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção de título de doutor em Química Analítica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiane Caxico de Abreu
Galdino

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Susan M. Lunte

Maceió – AL
Fevereiro de 2016

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

C837d	<p>Costa, Elton Elias Melo. Determinação de aminoácidos neuroativos em amostras de microdiálise utilizando eletroforese capilar e microchips com detecção por fluorescência / Elton Elias Melo - 2016. 140. : il. tabs., graf.</p> <p>Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino. Coorientadora: Susan M. Lunte. Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2016.</p> <p>Bibliografia: f. 130-140.</p> <p>1. Aminoácidos. 2. Eletroforese capilar. 3. NDA/CN. 5. Microdiálise. 6. Detecção por fluorescência. I. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 547.466:543.545.2</p>
-------	--



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA



BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (32) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando **Elton Elias Melo Costa** intitulada: “**Determinação de aminoácidos neuroativos em amostras de microdialise utilizando eletroforese capilar e microchips com detecção por fluorescência**” apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 17 de fevereiro de 2016, às 08h30, na Sala de Reuniões do IQB, na Universidade Federal de Alagoas.

COMISSÃO JULGADORA

Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Prof. Dr. Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Orientadora (PPGQB/IQB/UFAL)

Diógenes Menezes dos Santos
Prof. Dr. Diógenes Menezes dos Santos
(Penedo/UFAL)

Marcos Vinicius Dias Vermelho
Prof. Dr. Marcos Vinicius Dias Vermelho
(IF/UFAL)

Janaína Heberle Bortoluzzi
Prof. Dr. Janaína Heberle Bortoluzzi
(PPGQB/IQB/UFAL)

Josué Carinhanha Caldas Santos
Prof. Dr. Josué Carinhanha Caldas Santos
(PPGQB/IQB/UFAL)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha amiga e esposa, Nadia Melo, pelo companheirismo e apoio incondicional. Apesar de todas as dificuldades, sempre estive presente, mesmo a distância, trazendo paz, carinho e uma perspectiva positiva para o futuro.

Agradeço também a professora Fabiane Caxico por fazer parte de toda minha trajetória na pesquisa, desde a iniciação científica até o doutorado.

Agradeço a todos os componentes do grupo de pesquisa da professora Susan M. Lunte, especialmente ao Abdullah Al-Hossaini, a Leena Suntornsuk e o Nathan Oborny, por terem me recebido muito bem e ajudado de maneira extraordinária na execução do meu projeto de doutorado no período que estive na The University of Kansas, Estados Unidos.

Agradeço em especial, a professora Susan M. Lunte por todas as contribuições para o meu trabalho de doutorado e por me receber em seu laboratório de braços abertos.

Por fim, agradeço a minha mãe, Severina M. da Conceição, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

RESUMO

Aminoácidos específicos (arginina, citrulina, ácido aspártico, histamina, ácido glutâmico e a taurina) apresentam funções importantes em vários processos fisiológicos, tais como neurotransmissão, inflamação e proliferação celular. Métodos analíticos que são capazes de quantificar estes compostos utilizando baixo volume de amostra são importantes para estratégias de amostragem *in vivo* e análises de célula única. Métodos baseados em eletroforese, como eletroforese capilar (EC) e microchip eletroforético (ME), com detecção por fluorescência têm sido utilizados para determinar vários compostos biológicos, devido à elevada eficiência de separação, simplicidade, baixo consumo de amostra, volume do solvente e o curto tempo de análise. Neste estudo, os aminoácidos selecionados foram derivatizados *off-line* com naftaleno-2,3-dicarboxaldeído/cianeto (NDA / CN⁻). NDA não é por si só fluorescente, mas pode reagir com aminas primárias na presença de cianeto para produzir 1-cianobenz[f]isoindoline N-substituídos (CBI), que são derivados fluorescentes. As condições de execução, incluindo aditivos no tampão, solvente orgânico e voltagem de separação foram otimizados para ambos os métodos (EC e ME) visando obter adequada resolução de separação para seis analitos. A excitação foi conseguida utilizando um laser de diodo ($\lambda_{ex} = 445 \text{ nm}$ e $\lambda_{em} = 490 \text{ m}$). Com base nas curvas analíticas com cinco pontos, os dois métodos demonstraram uma boa linearidade no intervalo de 10 a 0,1 μmolL^{-1} para cada aminoácido. Precisão com RSD% menor do que 6,9 e 13,2% foram obtidos a partir da técnica de EC e ME, respectivamente. Para EC, o número de pratos teóricos (N) foi maior do que 150 000 / m, com valores de resolução maiores que 3,4; sendo que o tempo de migração variou entre 11,2-18,2 min. ME ofereceu uma melhor eficiência (N > 300 000 / m) e resolução ($R_s > 3,9$) com um tempo de análise muito mais curto (3,8 minutos) do que o método aplicando EC. Os limites de detecção e quantificação para ambos os métodos foram significativamente menores do que as concentrações medidas nas amostras de microdiálise (MD). De acordo com os resultados com MD, foi possível identificar e quantificar todos os analitos usando o método de EC e ME. Um sistema portátil de detecção de fluorescência para ser utilizado com microchip eletroforético foi desenvolvido. Usando o sistema portátil com o ME, os limites de detecção para os analitos de interesse foram 250 nmolL^{-1} – 1,3 μmolL^{-1} , que são adequados para a detecção da maioria dos analitos nas amostras de microdiálise cerebral.

Palavras-chave: Aminoácidos, eletroforese capilar, microchip, NDA/CN, amostra de microdiálise, detecção por fluorescência.

ABSTRACT

Specific amino acids (i.e. arginine, citrulline, aspartic acid, histamine, glutamic acid and taurine) play significant roles in a number of physiological processes such as neurotransmission, inflammation and cell proliferation. Analytical methods that are capable of measuring these compounds in small volumes are important for in vivo sampling strategies and single cell analysis. Electrophoresis-based methods (e.g. capillary (CE) and microchip (ME) electrophoresis) with fluorescence detection have been applied to determine various biological compounds due to the high separation efficiency, simplicity, very low sample and solvent volume consumption and short analysis time. In this study, selected amino acids were off-line derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/cyanide (NDA/CN⁻). NDA itself is not fluorescent, but can react with primary amines in the presence of cyanide to produce N-substituted 1-cyanobenz[f]isoindole (CBI) derivatives, which are fluorescent. Run conditions (e.g. buffer additives, organic solvent and separation voltage) were optimized for both methods (CE and ME) to obtain baseline separation of the six analytes. Excitation was accomplished using a diode laser ($\lambda_{\text{ex}} = 445 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 490 \text{ nm}$). Based on five-point calibration curves, both methods showed good linearity in the range of 10 to 0.1 μmolL^{-1} for each amino acid. Precision with %RSDs of less than 6.9 and 13.2% was obtained from CE and ME, respectively. For CE, the number of plates (N) was greater than 150 000/m, resolution values were more than 3.4 and migration time was between 11.2 to 18.2 min. ME offered a better efficiency (N > 300 000/m) and resolution ($R_s > 3.9$) with a much shorter analysis time (3.8 min) than the CE method. Limits of detection and quantification were significantly lower than the concentrations measured in microdialysis sample (MD) for both methods. According to the results with MD, it was possible to identify and quantify all analytes using CE and ME method. A portable fluorescence detection system for use with microchip electrophoresis was developed. Using the portable system with ME, limits of detection for the analytes of interest were 250 nmolL^{-1} – 1.3 μmolL^{-1} , which were adequate for most analyte detection in brain microdialysis samples.

Keywords: Amino acids, capillary electrophoresis, microchip, NDA/CN, microdialysis sample, fluorescence detection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estruturas dos aminoácidos investigados neste estudo.....	23
Figura 2	- Processo de amostragem na microdiálise utilizando uma sonda com membrana semipermeável.....	29
Figura 3	- Reação de aminas primárias com OPA em presença de um tiol.....	31
Figura 4	- Mecanismo da reação de derivatização utilizando NDA na presença de CN.....	33
Figura 5	- Esquema de um sistema de eletroforese capilar convencional. R_1 e R_2 , e_1 e e_2 são os reservatórios e eletrodos, respectivamente. D representa o detector e C é o computador para obtenção dos dados..	35
Figura 6	- Representação do fluxo eletrosmótico.....	36
Figura 7	- Representação do fluxo pressurizado e do fluxo eletrosmótico.....	37
Figura 8	- Dispositivo miniaturizado de cromatografia a gás. Primeiro microsistema em química analítica com 5 cm de diâmetro.....	40
Figura 9	- Número de publicações relacionadas com ME entre 1992 e 2013.....	41
Figura 10	- Principais etapas de fabricação de microchips utilizando o processo fotolitográfico. (I) Deposição da camada metálica e do fotorresiste na superfície do substrato, (II) adição da fotomáscara e aplicação da radiação UV na região exposta do fotorresiste, (III) transferência da imagem fotogravada para o fotorresiste, (IV) corrosão da camada metálica exposta, (V) corrosão do substrato e (VI) selagem do microchip.....	45
Figura 11	- Esquema de separação utilizando eletroforese de zona em solução livre em ME.....	47
Figura 12	- Ilustração da instrumentação necessária para o método ME-LIF.....	51
Figura 13	- Ilustração da instrumentação utilizando o sistema portátil de detecção por fluorescência para análises dos aminoácidos investigados com ME.....	52
Figura 14	- Processo cirúrgico para obtenção da amostra real a partir do cérebro de rato.....	59
Figura 15	- Ilustração do microchip de vidro.....	63

Figura 16 - Etapa de condicionamento do microchip.....	64
Figura 17 - Montagem do sistema para análises envolvendo microchips com detecção por fluorescência.....	65
Figura 18 - Ilustração do microchip de vidro contendo a identificação dos reservatórios. S refere-se à amostra (<i>sample</i>), B o tampão (<i>buffer</i>), SW o resíduo da amostra (<i>sample waste</i>) e BW refere-se ao resíduo do tampão (<i>buffer waste</i>).....	66
Figura 19 - Ilustração do sistema portátil de detecção por fluorescência. (1) placa do circuito de corrente personalizada, (2) espelho dicróico, LED, lente objetiva e filtro óptico, (3) fotodiodo e quadro do pré-amplificador, (4) motores de posicionamento e (5) amplificador e conversor digital conectado ao pré-amplificador via cabo USB branco.....	68
Figura 20 - Reação de derivatização da arginina com o NDA/CN.....	70
Figura 21 - Eletroferogramas de uma solução de arginina $0,02 \text{ mmolL}^{-1}$ após diferentes tempos de derivatização (a. 10 e b. 15 min, respectivamente) com NDA/CN em tampão borato pH 9,2.....	71
Figura 22 - Eletroferogramas do ácido aspártico e da mistura arginina e ácido aspártico, respectivamente, após derivatização com NDA/CN.....	72
Figura 23 - Diferentes proporções do agente derivatizante reagindo com uma solução de arginina e ácido aspártico com concentração de $6,6 \mu\text{molL}^{-1}$. I. 10 μ de NDA e 10 μL de CN II. 20 μL de NDA e 20 μL de CN III. 30 μL de NDA e 30 μL de CN.....	73
Figura 24 - Eletroferogramas da citrulina e da mistura arginina, citrulina e ácido aspártico, respectivamente, após derivatização com NDA/CN.....	74
Figura 25 - Influência das diferentes voltagens de separação no tempo de análise de uma mistura de arginina, citrulina e ácido aspártico.....	76
Figura 26 - Avaliação da estabilidade dos produtos fluorescentes em uma amostra contendo arginina, citrulina e ácido aspártico. Análise realizada após a. 30 min e b. duas horas após a reação de derivatização.....	77
Figura 27 - Eletroferograma da histamina após derivatização com NDA/CN em tampão borato pH 9,2.....	78
Figura 28 - Análise de uma amostra contendo arginina, histamina, citrulina e ácido aspártico em diferentes voltagens de separação: a. 25 kV e b. 18 kV.....	80

Figura 29 - Estrutura da sulfobutileter β -ciclodextrina.....	81
Figura 30 - Eletroferograma de uma solução contendo arginina e histamina utilizando SBE- β -CD 1,4 mmolL ⁻¹ e DMSO 4% (v/v) em tampão borato 20 mmolL ⁻¹	83
Figura 31 - Eletroferograma de uma solução contendo arginina (1), citrulina (2), histamina (3) e ácido aspártico (4) utilizando SBE- β -CD 1,4 mmolL ⁻¹ e DMSO 4% (v/v) em tampão borato 20 mmolL ⁻¹	84
Figura 32 - Eletroferogramas da taurina e ácido glutâmico, respectivamente.....	85
Figura 33 - Eletroferograma dos aminoácidos após derivatização com NDA/CN em presença de SBE- β -CD e DMSO. A voltagem de separação aplicada foi de 25,0 kV. Picos: arginina (1), citrulina (2), taurina (3), histamina (4), ácido glutâmico (5) e ácido aspártico (6).....	86
Figura 34 - Eletroferogramas da mistura dos aminoácidos após derivatização com NDA/CN em presença de SBE- β -CD e DMSO. As voltagens de separação aplicadas foram de 20 e 15 kV.....	87
Figura 35 - Eletroferogramas dos aminoácidos após derivatização com NDA/CN em presença de SBE- β -CD 1,4 mmolL ⁻¹ e DMSO 7 e 10% (v/v), respectivamente.....	88
Figura 36 - Eletroferograma dos aminoácidos após derivatização com NDA/CN em presença de DMSO 7% (v/v).....	91
Figura 37 - Curvas analíticas (n= 5) dos aminoácidos avaliados. A) arginina, B) citrulina, C) taurina, D) histamina, E) ácido glutâmico e F) ácido aspártico.....	93
Figura 38 - Estudo comparativo envolvendo amostras de microdiálise variando entre 1 a 3 meses de armazenamento, respectivamente.....	95
Figura 39 - Eletroferograma da amostra de microdiálise dois dias após a cirurgia.....	96
Figura 40 - Eletroferograma da amostra de microdiálise sete dias após a cirurgia. Neste caso, foi utilizado a metade do volume da amostra real em relação as amostras anteriormente investigadas.....	97
Figura 41 - Estudo de identificação dos analitos na amostra real. A) Eletroferograma da amostra de microdiálise (dois dias armazenada) e B) Eletroferograma referente a adição de 1 μ molL ⁻¹ dos padrões dos aminoácidos investigados na amostra real.....	98
Figura 42 - Concentrações dos aminoácidos nas amostras de microdiálise. Uma relação entre a concentração e o período de armazenamento da	

	amostra.....	99
Figura 43 -	Design característico de um microchip eletroforético (formato de “T”). S refere-se à amostra (<i>sample</i>), B o tampão (<i>buffer</i>), SW o resíduo da amostra (<i>sample waste</i>) e BW refere-se ao resíduo do tampão (<i>buffer waste</i>).....	102
Figura 44 -	Design do microchip com os reservatórios laterais alinhados.....	102
Figura 45 -	Eletroferograma de uma solução de arginina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL ⁻¹ (pH = 9,2).....	104
Figura 46 -	Eletroferograma de uma solução de arginina, taurina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL ⁻¹ (pH = 9,2).....	105
Figura 47 -	Eletroferograma de uma solução de arginina, histamina, taurina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL ⁻¹ (pH = 9,2).....	107
Figura 48 -	Eletroferograma de uma solução contendo arginina, histamina, taurina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL ⁻¹ (pH = 9,2), com um tempo de injeção da amostra de 0,5 s e com voltagem de separação de 7 e 4 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.....	108
Figura 49 -	Eletroferograma de uma solução contendo arginina, histamina, taurina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL ⁻¹ (pH = 9,2) e DMSO 10% (v/v), com um tempo de injeção da amostra de 0,5 s e com voltagem de separação de 9 e 6 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.....	109
Figura 50 -	Eletroferograma de uma solução contendo arginina, histamina, taurina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL ⁻¹ (pH = 9,2) e DMSO 20% (v/v), com um tempo de injeção da amostra de 0,5 s e com voltagem de separação de 9 e 6 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.....	110
Figura 51 -	Eletroferograma de uma solução contendo arginina, histamina, taurina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL ⁻¹ (pH = 9,2) e DMSO 10% (v/v) e SBE-β-CD 1,4 mmolL ⁻¹ . Para tal estudo, aplicou-se um tempo de injeção da amostra de 0,5 s e voltagem de separação de 9 e 6 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.....	111

Figura 52 - Eletroferograma de uma solução contendo arginina, citrulina, taurina, histamina, ácido glutâmico e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL ⁻¹ (pH = 9,2), DMSO 10% (v/v) e SBE-β-CD 1,4 mmolL ⁻¹ . Para tal estudo, aplicou-se um tempo de injeção da amostra de 0,5 s e voltagem de separação de 9 e 6 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.....	112
Figura 53 - Eletroferograma de uma solução contendo arginina, citrulina, taurina, histamina, ácido glutâmico e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 10 mmolL ⁻¹ (pH = 9,2), DMSO 10% (v/v) e SBE-β-CD 1,4 mmolL ⁻¹	113
Figura 54 - Eletroferograma de uma solução contendo arginina, citrulina, taurina, histamina, ácido glutâmico e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 15 mmolL ⁻¹ (pH = 9,2), DMSO 10% (v/v) e SBE-β-CD 1,4 mmolL ⁻¹	114
Figura 55 - Eletroferograma de uma solução contendo arginina, citrulina, taurina, histamina, ácido glutâmico e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 15 mmolL ⁻¹ (pH = 9,2), DMSO 10% (v/v) e SBE-β-CD 1,4 mmolL ⁻¹ . Para tal estudo, aplicou-se uma voltagem de separação de 10 e 7 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.....	115
Figura 56 - Curvas analíticas (n = 5) dos padrões dos aminoácidos investigados utilizando o método ME-LIF. A) arginina, B) citrulina, C) taurina, D) histamina, E) ácido glutâmico e F) ácido aspártico.....	116
Figura 57 - Eletroferograma da amostra de microdiálise utilizando o método ME-LIF.....	120
Figura 58 - Eletroferograma dos padrões dos analitos em uma concentração de 5 μmolL ⁻¹ utilizando o método ME-LIF.....	121
Figura 59 - Eletroferograma de uma amostra de microdiálise spiked com os padrões dos analitos em uma concentração de 5 μmolL ⁻¹	122
Figura 60 - A. Amostra de microdiálise após adição padrão dos aminoácidos investigados. B. Eletroferograma da amostra de microdiálise derivatizada com NDA/CN usando o sistema portátil de detecção por fluorescência.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Comparação do efeito da voltagem na separação dos analitos investigados.....	88
Tabela 2	- Comparação do efeito da quantidade de solvente orgânico (DMSO) no tampão de corrida para a separação dos aminoácidos. A voltagem aplicada foi de 25 kV.....	89
Tabela 3	- Parâmetros de validação para os padrões dos aminoácidos investigados.....	94
Tabela 4	- Concentrações dos aminoácidos investigados nas amostras de microdiálise.....	99
Tabela 5	- Estudo de recuperação dos analitos.....	100
Tabela 6	- Parâmetros de validação para os padrões dos aminoácidos investigados usando o método CHIP-LIF.....	116
Tabela 7	- Estudo comparativo dos tempos de migração dos analitos em uma amostra contendo os padrões e na amostra de microdiálise.....	120
Tabela 8	- Comparação dos parâmetros analíticos entre os métodos desenvolvidos.....	123
Tabela 9	- Parâmetros analíticos do método utilizando ME com o sistema portátil de detecção por fluorescência.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Arg	Arginina
Asp	Ácido aspártico
AVC	Acidente vascular cerebral
B	<i>Buffer</i> (tampão)
BW	<i>Buffer waste</i> (resíduo do tampão)
C	Computador
CBI	1-cianobenz[<i>f</i>]isoindoline N-substituídos
Cit	Citrulina
cm	centímetro
CN	Cianeto
D	Detector
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dpi	<i>dots per inch</i> (pontos por polegada)
e ₁	Eletrodo 1
e ₂	Eletrodo 2
EC	Eletroforese capilar
EC-LIF	Eletroforese capilar com detecção por fluorescência
EC-MS	Eletroforese capilar com detecção por espectrometria de massa
EOF	<i>Electroosmotic flow</i> (fluxo eletrosmótico)
F	Fonte de alta tensão
Glu	Ácido glutâmico
His	Histamina
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografia líquida de alta eficiência)

IACUC	<i>Institutional Animal Care and Use Committee</i>
KHz	Quilohertz
kV	Quilovolt
LCA	Líquido cefalorraquidiano artificial
LED	<i>Light emitting diode</i> (diodo emissor de luz)
LIF	<i>Laser induced fluorescence detection</i> (detecção de fluorescência induzida por laser)
MD	Microdiálise
ME	Microchip eletroforético
ME-LIF	Microchip eletroforético com detecção por fluorescência
MS	Espectrometria de massa
MΩ	Megaohm
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NDA	Naftaleno-2,3-dicarboxaldeído
nL	Nanolitro
nm	Nanômetro
NO	Óxido nítrico
OPA	Ortoftaldeído
PDMS	Polidimetilsiloxano
PETG	Tereftalato de polietileno
PMMA	Polimetilmetacrilato
PS	Poliestireno
PVC	Cloreto de polivinil
pH	Potencial hidrogeniônico

pL	Picolitro
R ₁	Reservatório 1
R ₂	Reservatório 2
RNA	Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
S	<i>Sample</i> (amostra)
SBE-β-CD	Sulfobutileter β-ciclodextrina
SW	Sample waste (resíduo da amostra)
Tau	Taurina
UV-VIS	Radiação ultravioleta visível
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μTAS	Microssistemas de análise total

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 Aminoácidos neuroativos.....	24
1.2 Microdiálise cerebral e processo de derivatização.....	27
1.2.1 Microdiálise cerebral e processo de derivatização.....	27
1.2.2 Derivatização.....	30
1.3 Técnicas analíticas de separação para a análise de aminoácidos neuroativos em amostras de microdiálise.....	33
1.3.1 Eletroforese capilar (EC).....	34
1.3.2 Microchip eletroforético (ME).....	37
1.3.2.1 Miniaturização de sistemas analíticos.....	38
1.3.2.2 Microfabricação.....	41
1.3.2.3 Operação dos microchips.....	45
1.4 Estratégias de detecção.....	48
1.4.1 Detecção eletroquímica.....	48
1.4.2 Detecção por fluorescência.....	50
2 OBJETIVOS.....	53
2.1 Gerais.....	53
2.2 Específicos.....	53
3 EXPERIMENTAL.....	54

3.1 Estudo de otimização do processo de derivatização usando NDA/CN.....	54
3.1.1 Reagentes e soluções.....	54
3.1.2 Derivatização.....	54
3.2 Eletroforese capilar com detecção por fluorescência (EC-LIF).....	55
3.2.1 Avaliação das condições experimentais no estudo de otimização do método EC-LIF.....	55
3.2.2 Adição de Sulfobutileter β -ciclodextrina (SBE- β -CD) e DMSO no tampão de corrida.....	56
3.2.3 Validação do método EC-LIF.....	57
3.2.4 Análise de amostras de microdiálise.....	58
3.2.4.1 Obtenção da amostra real.....	58
3.2.4.2 Cirurgia.....	58
3.2.4.3 Estudo comparativo considerando diferentes tempos de armazenamento de amostras de microdiálise.....	59
3.2.4.4 Teste de recuperação dos aminoácidos investigados nas amostras de microdiálise.....	60
3.3 Microchip eletroforético (ME-LIF).....	60
3.3.1 Processo de microfabricação do microchip de vidro.....	60
3.3.2 Manuseio e condicionamento do microchip de vidro.....	63
3.3.3 Operação e sistema de detecção.....	65
3.3.4 Desenvolvimento do método de separação e análise da amostra de microdiálise cerebral.....	66
3.4 Sistema portátil de detecção por fluorescência.....	67

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 Estudo de otimização do método de separação dos aminoácidos investigados usando EC-LIF	69
4.1.1 Estudo de otimização do processo de derivatização com NDA/CN.....	69
4.1.2 Diferentes voltagens de separação.....	74
4.1.3 Estabilidade dos produtos da derivatização.....	77
4.1.4 Adição da histamina.....	78
4.1.5 Adição de Sulfobutileter β -ciclodextrina (SBE- β -CD) e solvente orgânico (DMSO) no tampão de corrida.....	80
4.2 Validação do método EC-LIF	91
4.3 Análise de amostras de microdiálise	94
4.4 Quantificação dos analitos na amostra de microdiálise e estudo de recuperação	98
4.5 Microchip eletroforético com detecção por fluorescência (ME-LIF)	100
4.5.1 Processo de microfabricação e operação do microchip de vidro.....	100
4.5.2 Otimização do método de separação.....	103
4.5.3 Validação do método ME-LIF.....	116
4.5.4 Análises de amostras de microdiálise cerebral.....	119
4.6 Estudo comparativo entre os métodos investigados (EC-LIF vs ME-LIF)	123
4.7 Investigação dos aminoácidos neuroativos selecionados utilizando microchip eletroforético com um sistema portátil de detecção por fluorescência	124
5 CONCLUSÕES	127

PERSPECTIVAS..... 129

REFERÊNCIAS..... 130

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, um dos principais focos da química analítica está relacionado ao estudo e desenvolvimento de métodos para análises de espécies químicas de interesse biológico (CULBERTSON et al., 2014). Dentre tais espécies, podemos destacar os aminoácidos neuroativos, pois são substâncias que desempenham funções vitais em vários processos biológicos, farmacológicos e físicos no cérebro e fluidos corporais (MA et al., 2015; NESTLER; KRISHNAN, 2008). Em termos gerais, as medições neuroquímicas têm levado a muitas melhorias em nossa compreensão da relação entre a química no sistema nervoso central e o estado comportamental, cognitivo e emocional de um organismo (PERRY; LI; KENNEDY, 2010).

Contudo, estudos têm demonstrado que variações significativas nas concentrações de determinados aminoácidos neuroativos estão correlacionadas a um grande número de doenças neurológicas (SARIEGO-JAMARDO et al., 2015), como Alzheimer (GREENAMYRE; YOUNG, 1989), Parkinson (WILEY, 1996), acidente vascular cerebral (VAJDA, 2002), epilepsia (MELDRUM, 1985) e esquizofrenia (CARLSSON, 1990).

Considerando a importância de um monitoramento contínuo de biomoléculas para o entendimento de uma série de eventos biológicos, incluindo desordens neurológicas, a microdiálise cerebral surge como a estratégia de amostragem mais eficiente para esta finalidade (UNGERRSTEDT, 1991; SHARP; ZETTERSTROM, 2007). A microdiálise (MD) é uma poderosa técnica de amostragem que permite o monitoramento contínuo de múltiplos analitos em matrizes biológicas por períodos de tempo prolongados, onde o experimento pode ser conduzido *in vivo* ou *in vitro* (NANDI; LUNTE, 2009). Deste modo, a microdiálise se caracteriza como uma ferramenta extremamente útil e eficaz para a análise e estudo de processos dinâmicos em sistemas vivos (SAYLOR; LUNTE, 2015).

As técnicas analíticas que usualmente são aplicadas para a determinação de aminoácidos neuroativos incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - *High performance liquid chromatography*), ensaios enzimáticos, biossensores, microeletrodos e eletroforese capilar (EC), aplicando diferentes estratégias de detecção (DU et al., 2004; COUDERC et al., 2012). Considerando o baixo volume de amostra requerida, a seletividade, sensibilidade e simplicidade instrumental e operacional, a eletroforese capilar com detecção por fluorescência (EC-LIF) tem sido

o método mais aplicado para a detecção e quantificação dos analitos investigados (DENOROY; ZAPATA et al., 2009; KOWALSKI et al., 2014; CASADO et al., 2014).

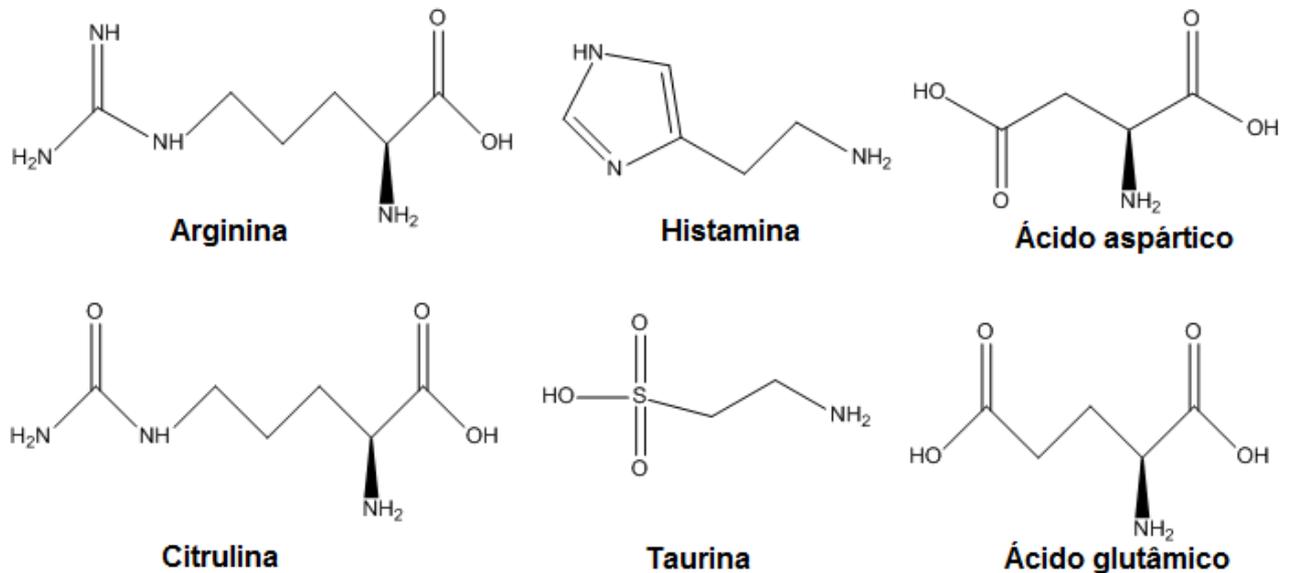
Ao longo dos últimos anos tem havido um impulso significativo para a miniaturização dos sistemas analíticos (CASTRO; MANZ, 2015). As principais vantagens associadas a miniaturização são a redução do volume de reagentes e amostras (da ordem de pL-nL), baixo custo de fabricação, possibilidade de integração de todas as etapas analíticas em um único dispositivo e análise em tempo reduzido (CULBERTSON et al., 2014). Além disso, a miniaturização de sistemas de análise proporciona uma melhoria no desempenho analítico, sendo possível separar e analisar compostos em amostras complexas com elevada eficiência de separação e baixos limites de detecção (DAWOD; CHUNG, 2011). Deste modo, os microchips analíticos podem ser considerados como poderosos instrumentos para a análise de matrizes biológicas, entre outras aplicações.

Assim, o objetivo desta tese consiste no desenvolvimento de dois métodos para a detecção e quantificação de 7 aminoácidos neuroativos (Figura 1) em amostras de microdiálises obtidas a partir de cérebros de ratos. O primeiro método baseia-se na aplicação do sistema de eletroforese capilar convencional, enquanto o segundo método baseia-se na utilização de microchips eletroforéticos. Em ambos os casos, foi utilizado o sistema de detecção por fluorescência. Como os aminoácidos investigados não são por si só fluorescentes, uma etapa de derivatização antes das análises foi necessária para a obtenção de produtos fluorescentes, permitindo a devida detecção das espécies químicas de interesse.

Por fim, os aminoácidos analisados foram investigados utilizando microchip eletroforético com um sistema portátil de detecção por fluorescência desenvolvido no laboratório da professora Susan M. Lunte. Neste estudo, curvas analíticas foram construídas para cada analito e experimentos com amostras de microdiálise foram conduzidos a partir das condições experimentais ótimas estabelecidas no método envolvendo o microchip com o sistema de detecção por fluorescência convencional.

Vale ressaltar que toda a parte experimental deste trabalho foi realizada na *The University of Kansas*, durante meu doutorado sanduíche em um período de um ano sob a supervisão da professora Dr^a. Susan M. Lunte, contando com o apoio de colaboradores pertencentes ao grupo da referida professora americana, no que diz respeito à processos de fabricação de materiais necessários para o desenvolvimento da pesquisa e tratamento de dados analíticos.

Figura 1 – Estruturas dos aminoácidos investigados neste estudo.



Fonte: Autor, 2016.

Todo o procedimento de derivatização, além do estudo de otimização, validação analítica e a análise de amostras reais de cada método foram detalhadamente descritos nesta tese. Posteriormente, os parâmetros analíticos de ambos os métodos foram comparados no intuito de determinar qual dos sistemas propostos é o mais atraente para a análise dos aminoácidos investigados. Em seguida, foram apresentados os resultados obtidos com o microchip eletroforético utilizando o sistema portátil de detecção por fluorescência, enfatizando os parâmetros analíticos obtidos a partir das curvas dos aminoácidos neuroativos e os resultados obtidos com as amostras de microdialise. Considerando que o sistema portátil de detecção por fluorescência está em etapa de desenvolvimento, os resultados aplicando tal sistema não serão apresentados como um terceiro método analítico de análise das espécies químicas de interesse deste estudo, mas sim, como uma possibilidade alternativa e atraente, visto que os resultados preliminares foram bastante promissores.

1.1 Aminoácidos neuroativos

Aminoácidos são bases orgânicas que desempenham funções importantes em diversos processos fisiológicos, tal como neurotransmissão, inflamação e divisão celular (FARBER; NEWCOMER; OLNEY, 1998; SALVADORE et al., 2012). Além disso, a análise quantitativa de alguns aminoácidos vem sendo considerando uma condição importante para o diagnóstico de doenças (SANLI; TAGUE; LUNTE, 2015). Para o estudo em questão, enfatizaremos a função desempenhada por 7 aminoácidos (arginina, citrulina, histamina, taurina, ácido aspártico e ácido glutâmico) no sistema nervoso central dos mamíferos.

Os aminoácidos presentes no sistema nervoso podem atuar como neurotransmissores ou como intermediários para a biossíntese de espécies químicas que possam atuar como neurotransmissores. Os aminoácidos neurotransmissores estão diretamente envolvidos na regulação de processos associados ao sono, aprendizagem, memória e sensação da dor (GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al., 2013). Entretanto, vale ressaltar que tais compostos estão também implicados em vários processos patológicos (BAK; SCHOUSBOE; WAAGEPETERSEN, 2006).

O sistema de neurotransmissão tem como base molecular as interações existentes entre os canais iônicos, os receptores que regulam esses canais e os aminoácidos que se ligam aos receptores pós-sinápticos, pelo qual tais aminoácidos assumem a função de neurotransmissores (AKAIKE et al., 2015). Os aminoácidos neurotransmissores podem ser divididos em excitatórios e inibitórios (COOPER; BLOOM; ROTH, 2003). Tal classificação se baseia na alteração promovida por tais aminoácidos na condutância de um ou mais canais iônicos seletivos. Os neurotransmissores inibitórios deflagram uma corrente de saída seletiva, contribuindo para uma hiperpolarização do neurônio que inibe a propagação do impulso nervoso. Já os neurotransmissores excitatórios produzem uma corrente efetiva de entrada, gerando uma despolarização do neurônio a partir do aumento da concentração de íons positivos (GOLAN, 2009). Em relação aos aminoácidos abordados neste estudo, o ácido glutâmico e o ácido aspártico atuam como neurotransmissores excitatórios, enquanto a taurina atua como neurotransmissor inibitório (CHEN et al., 2009). A histamina pode atuar como neurotransmissor excitatório e inibitório. Já a arginina e a citrulina são agentes intermediários para a

produção de compostos capazes de atuar como neurotransmissores (GOLAN, 2009).

Como já mencionado no parágrafo anterior, o ácido glutâmico (Glu) e o ácido aspártico (Asp) são aminoácidos neurotransmissores excitatórios responsáveis por acelerar determinadas funções do cérebro (HIMMELREICH et al., 2005). O ácido glutâmico é um aminoácido não essencial que está presente em mais da metade de todas as sinapses do sistema nervoso dos mamíferos, sendo o principal neurotransmissor excitatório (RAFFA et al., 2006; EIDE; STANISIC, 2010). Ele é produzido na mitocôndria, transportado até o citoplasma e “empacotado” em vesículas sinápticas (ROBERTS; ROCHE; MCCULLUMSMITH, 2014). Acredita-se que o ácido glutâmico esteja relacionado com as funções cognitivas do cérebro, como o aprendizado e a memória (GOLAN, 2009). Assim como o ácido glutâmico, o ácido aspártico é um aminoácido não essencial que é um produto do ciclo de Krebs. Como neurotransmissor, há indícios que o ácido aspártico possa conferir resistência à fadiga. Entretanto, elevado níveis de glutamato e aspartato no espaço extracelular estão implicados em danos neuronais e até mesmo morte celular (COOPER; BLOOM; ROTH, 2003; NESTLER; HYMAN; MALENKA, 2001). Com isso, o Glu e o Asp têm sido utilizados como biomarcadores para prever problemas neurológicos, sendo que, como tais aminoácidos também causam danos às atividades cerebrais, eles são alvos promissores para intervenção farmacêutica (CHAMOUN et al., 2010).

Arginina (Arg) e a citrulina (Cit) não são aminoácidos neurotransmissores por si só, porém, tais aminoácidos são relevantes para a regulação da pressão sanguínea através da reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase, produzindo óxido nítrico (NO), que por sua vez atua como neurotransmissor no sistema nervoso (FLORA; ZILBERSTEIN, 1998). Além disso, a proporção de arginina e citrulina podem ser utilizadas com uma forma indireta para mensurar a produção de óxido nítrico (MORITA et al., 2014).

A histamina (His) é uma amina vasodilatadora derivada da descarboxilação da histidina. No sistema nervoso central, a histamina se encontra no hipotálamo posterior ventral, em pequenas quantidades. Esta amina está envolvida em funções como despertar, o apetite, a manutenção do ritmo cardíaco, aprendizagem e memória (ICHIKAWA; TANAKA, 2012). A histamina é um neurotransmissor que não possui mecanismo de captura, logo, tal aminoácido é degradado na fenda sináptica

por um processo de metilação mediado pela enzima *N*-metil transferase, formando produtos inativos (MIRANDA; ARIAS, 2012).

A taurina (Tau) é um neurotransmissor inibitório que é essencial para a estabilização da membrana e regulação do sódio e potássio dentro das células, sendo também responsável pela regulação dos níveis de magnésio entre as células, auxiliando no controle da atividade elétrica celular (BROSNAN, 2006).

A regulação dos neurotransmissores citados acima é normalmente obtida por enzimas específicas ou transportadores de membrana que permitem a receptação destas espécies. Estes processos fazem com que as concentrações de todos os neurotransmissores sejam mantidas praticamente constantes no fluido extracelular. Este equilíbrio obtido no meio extracelular é conhecido como homeostase. Muitas condições patológicas estão relacionadas a distúrbios na homeostase dos aminoácidos neurotransmissores (HASSEL; IVANOVIC; DAHLBERG, 2014), incluindo Alzheimer, Parkinson, acidente vascular cerebral (AVC), epilepsia e esquizofrenia (LEON et al., 2009).

O AVC, por exemplo, é tipicamente provocado pela ruptura ou obstrução de um vaso sanguíneo, no qual tal condição é responsável por desencadear uma série de danos secundários, incluindo inflamação, morte celular e falta de oxigênio na região cerebral afetada pelo AVC. Este processo de falta de oxigênio no cérebro é conhecido como isquemia cerebral (NISHIZAWA, 2001). Sabe-se que sob tal condição, tem-se um aumento significativo na concentração de ácido glutâmico e ácido aspártico e este aumento na concentração destes aminoácidos excitatórios pode ser tóxico para os neurônios (GINSBERG et al., 2006). Contudo, os mecanismos pelos quais ocorrem o aumento nas concentrações de Glu e o Asp não estão totalmente elucidados, sendo provável o envolvimento de outros aminoácidos neuroativos no processo de danos secundários no sistema nervoso central (HUANG et al., 2010).

Com isso, entende-se a importância de se desenvolver métodos analíticos capazes de investigar continuamente os referidos aminoácidos, pois o monitoramento da dinâmica das concentrações dos aminoácidos neuroativos no espaço extracelular do cérebro pode desempenhar um papel importante na explicação e elucidação dos mecanismos de várias doenças neurológicas (BI et al., 2012), auxiliando no desenvolvimento de novos fármacos e diferentes abordagens terapêuticas para o tratamento de tais doenças (GRECO et al., 2013).

1.2 Microdiálise cerebral e processo de derivatização

1.2.1 Aplicação da microdiálise para a análise de amostras biológicas

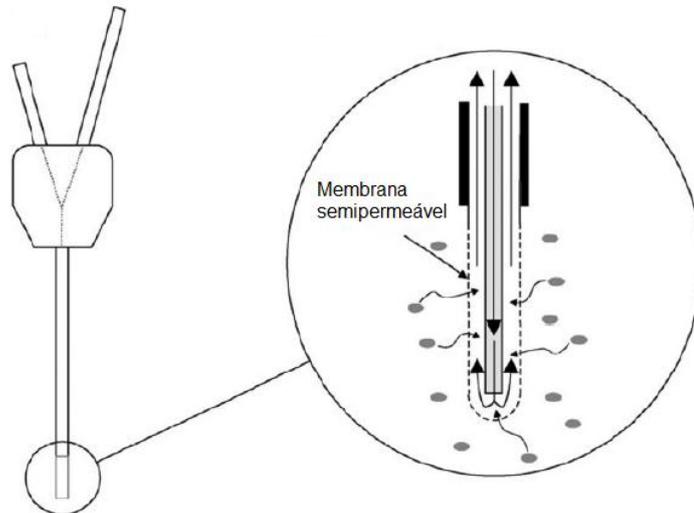
Existem poucas ferramentas que podem ser utilizadas para monitorar continuamente eventos biológicos. Entre tais ferramentas, podemos citar a utilização de sensores. Os sensores podem ser classificados em duas categorias: sensores químicos e biossensores. Os biossensores são semelhantes aos sensores químicos, exceto que os biossensores têm pelo menos um elemento biológico de reconhecimento, tal como uma enzima, que pode aumentar a seletividade e, em alguns casos, melhorar o limite de detecção (WILSON; GIFFORD, 2005).

Em relação às análises neurológicas, os sensores são implantados diretamente no cérebro para detectar a espécie química de interesse. A dimensão e o tipo do sensor irá definir a resolução que poderá ser alcançada. A grande desvantagem associada a aplicação de sensores é que visando manter a seletividade, a maioria dos sensores são capazes de detectar apenas um ou dois analitos. É possível implantar múltiplos sensores no cérebro para aumentar a quantidade de informação e de analitos investigados, no entanto, quanto maior a quantidade de sensores, maior será os danos na região onde os sensores serão implantados, reduzindo a sensibilidade do método (WISNIEWSKI; MOUSSY; REICHERT, 2000).

Microdiálise é uma poderosa técnica de amostragem capaz de monitorar continuamente as concentrações de compostos biológicos *in vivo* e *in vitro* (NANDI; LUNTE, 2009). Ao contrário dos sensores, a microdiálise se destaca por ser uma técnica que permite o desenvolvimento de métodos capazes de analisar múltiplos analitos (STENKEN; SIDES, 2014). Considerando o campo da neurologia, tal condição é extremamente importante, visto que a maioria das desordens neurológicas envolvem mais do que um aminoácido neurotransmissor. Esta técnica de amostragem tem sido utilizada extensivamente para o monitoramento de aminoácidos neurotransmissores (REINHOUD et al., 2013; GRECO et al., 2013), metabólitos energéticos, como glicose e lactato (BENVENISTE et al., 1987; LONNROTH; JANSSON; SMITH, 1987) compostos farmacêuticos (HAMMARLUND-UDENAES, 2000) e neuropeptídios (WOTJAK et al., 2008).

A coleta da amostra contendo os analitos utilizando a técnica de microdiálise é realizada mediante o implante de uma pequena sonda no tecido de interesse. Os diâmetros das sondas de microdiálise típicos variam na ordem de 100-300 μm , o que torna este procedimento pouco invasivo (GUIHEN; O'CONNOR, 2010). Uma sonda de microdiálise consiste em uma membrana semipermeável que está ligada a ambos os tubos de entrada e de saída do capilar (Figura 2). Deste modo, uma solução com uma composição semelhante à do fluido extracelular de interesse é perfundido através da sonda. Em seguida, a membrana semipermeável permite a entrada de pequenas moléculas presentes no meio extracelular através de um processo de difusão. Devido ao gradiente de concentração entre o fluido extracelular e o perfusato, a amostra contendo as espécies químicas de interesse é recolhida juntamente com a solução de perfusato e, posteriormente, analisada (KREBS-KRAFT; FRANTZ; PARENT, 2007; SAYLOR; LUNTE, 2015). Os compostos também podem mover-se a partir do perfusato para o fluido extracelular, permitindo a entrega localizada de uma determinada substância.

Figura 2 – Processo de amostragem na microdiálise utilizando uma sonda com membrana semipermeável.



Fonte: Modificado de PLOCK; KLOFT (2005).

Trabalhos anteriores vêm demonstrado que as sondas de microdiálise podem ser implantadas em praticamente todos os tecidos e órgãos do corpo, incluindo o fígado (RICHARDS et al., 2007), coração (PRICE; VANDAVEER; LUNTE, 2005) pele (AULT et al., 1994), sangue (TANG et al., 2008), placenta (WARD; POLLACK, 1996), estômago (WOO; LUNTE, 2008) e ouvido (ZHU et al., 2003).

Como já mencionado anteriormente, a solução utilizada para realizar a perfusão deve apresentar uma composição semelhante ao fluido extracelular de interesse. Deste modo, considerando que a maior parte do fluido extracelular no sistema nervoso central é o líquido cefalorraquidiano (COMAR et al., 2009), usualmente, a coleta dos aminoácidos neuroativos é conduzida utilizando uma solução conhecida como líquido cefalorraquidiano artificial (LCA). O LCA é composto por cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, cloreto de cálcio, fosfato monossódico e hidrogenofosfato dissódico (KAUL; FAIMAN; LUNTE, 2011).

As amostras de microdiálise podem ser analisadas *on-line* ou *off-line*. Nas análises *off-line* a amostra é recolhida em um frasco coletor para ser analisada posteriormente. Como as amostras não contêm proteínas, elas não sofrem degradação enzimática, sendo assim, a sua composição não varia em condições adequadas de armazenamento. O processo de coleta é geralmente automatizado,

de modo que cada frasco recolhe uma quantidade fixa (em torno de 1-20 μL) da amostra em um intervalo fixo de tempo. Geralmente, o fluxo de coleta da amostra é de 1 μLmin^{-1} , permitindo que haja tempo suficiente para que seja alcançada uma condição de equilíbrio entre o perfusato e o fluido extracelular (TSAI, 2011). Vale ressaltar que não é recomendado trabalhar com volumes menores que 1,0 μL para análises *off-line*, pois é bastante complicado manipular quantidades muito pequenas de amostra, devido a problemas envolvendo evaporação e tensão superficial (SAYLOR; LUNTE, 2015).

A técnica de microdiálise permite a realização de estudos que exploram correlações com padrões comportamentais com a atividade de um neurotransmissor específico, além de investigar alterações metabólicas em um determinado meio, pois a amostragem pode ser realizada em animais acordados e que se movem livremente. Isto é possível porque as sondas de microdiálise são relativamente não invasivas e podem ser implantadas em regiões específicas do cérebro, permitindo que o animal esteja acordado após a cirurgia (NANDI; LUNTE, 2009).

Em termos gerais, existem várias vantagens associadas à aplicação da microdiálise para amostragem de tecidos e fluidos biológicos, especialmente quando combinada com as técnicas analíticas de separação. Considerando que células e macromoléculas são excluídas pela membrana semipermeável, não se faz necessária a etapa de centrifugação ou precipitação de proteína. Além disso, como o processo de amostragem se dá por difusão, o fluido não é removido e, portanto, é possível monitorar continuamente substâncias no fluido extracelular do cérebro e outros tecidos por vários meses (TSAI, 2011).

1.2.2 Derivatização

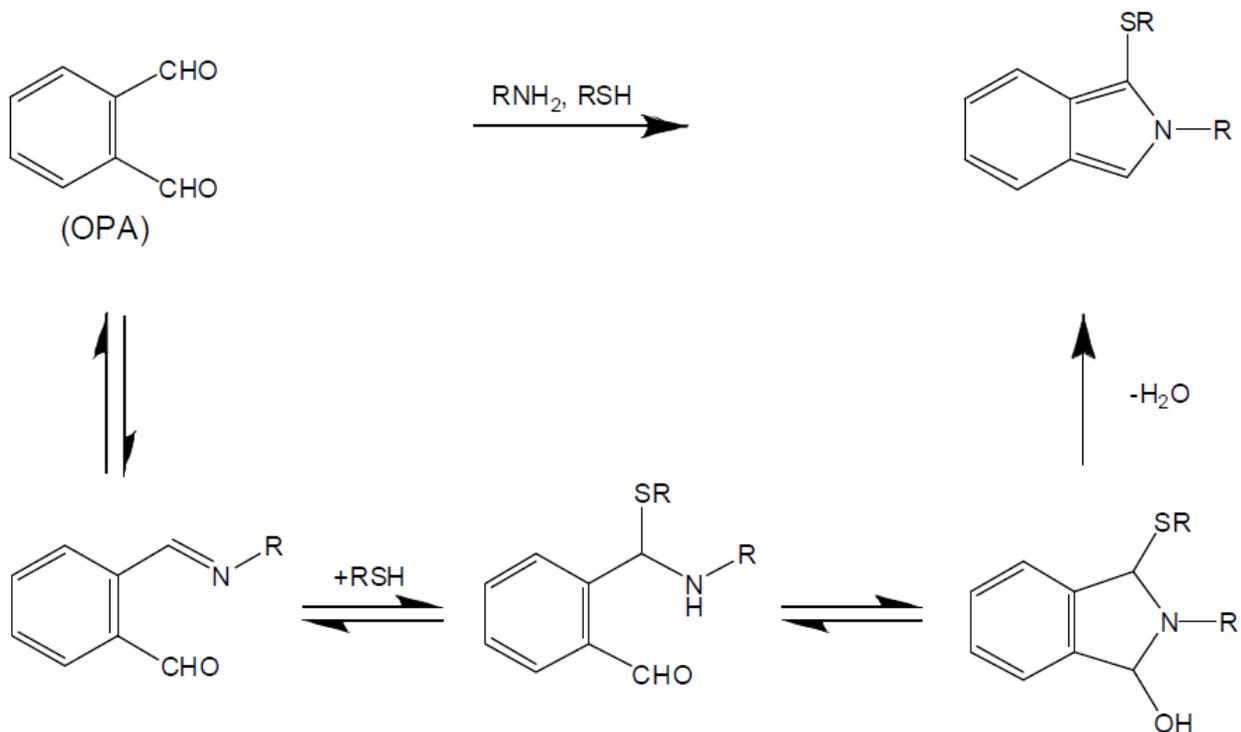
O desenvolvimento de métodos sensíveis e seletivos para a detecção de aminoácidos é uma preocupação crescente na área de bioanalítica. Neste sentido, visto que a maioria dos aminoácidos não são eletroativos e não apresentam absorção ultravioleta natural ou fluorescência, uma etapa de derivatização química se faz necessária para que seja possível analisar tais espécies em amostras biológicas (PRESTES et al., 2007).

A derivatização química corresponde a uma estratégia responsável por converter uma determinada substância em outra de estrutura semelhante, onde o

produto gerado (o derivado) apresenta melhores propriedades que possam facilitar o processo de separação e detecção (MARINS et al., 2002).

A escolha do agente derivatizante, tal como a concentração ótima e o tempo de reação do processo de derivatização, apresenta uma influência decisiva na sensibilidade do método analítico. O ortoftaldeído (OPA) é um agente derivatizante que tem sido amplamente utilizado para a análise de aminoácidos (OATES; JORGENSON, 1989). OPA reage com aminas primárias na presença de um tiol, geralmente o 2-mercaptanol, para gerar produtos tanto fluorescentes como eletroativos (Figura 3).

Figura 3 – Reação de aminas primárias com OPA em presença de um tiol.

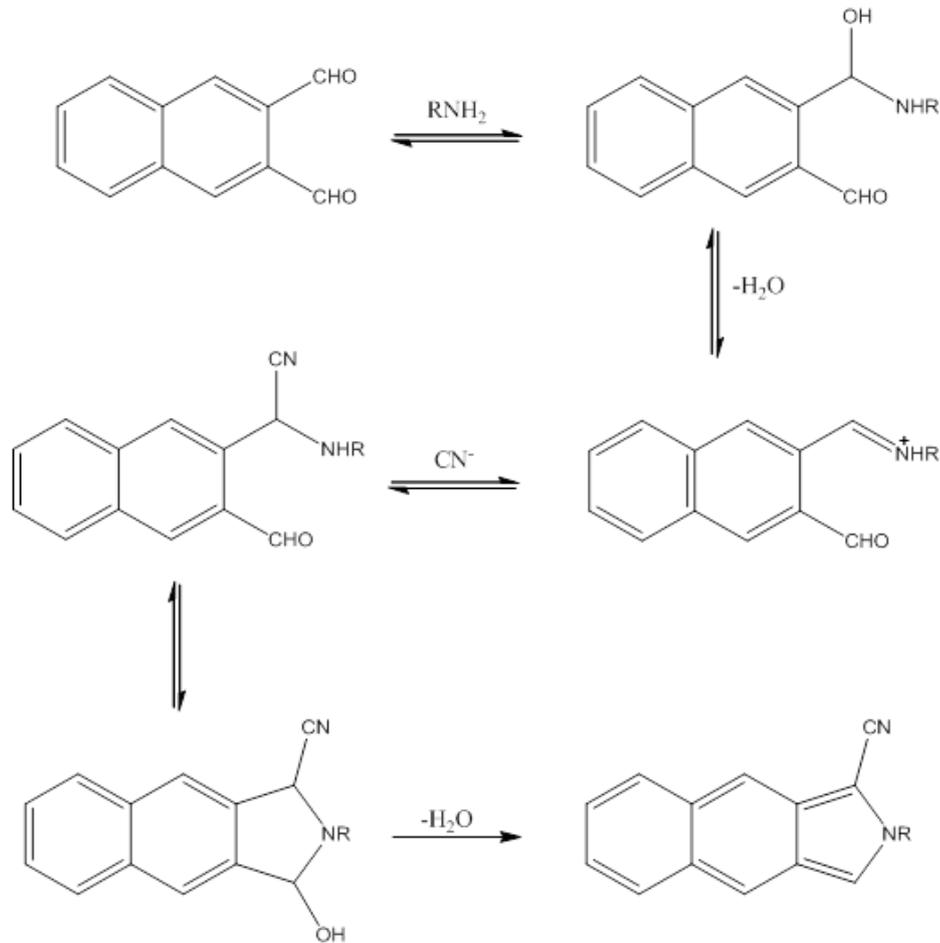


Fonte: Extraído de HIGUCHI et al. (1987).

As principais vantagens associadas a utilização do OPA são: a reação de derivatização é extremamente rápida e é possível realizar a detecção de aminas em baixas concentrações (PRESTES et al., 2007). Entretanto, os derivados fluorescentes da reação com o OPA degradam-se rapidamente, limitando a aplicação deste agente derivatizante quando o método analítico é constituído por derivatização pré-coluna (HIGUCHI et al., 1987).

Devido ao problema de instabilidade do OPA, um grupo de pesquisadores da Universidade de Kansas desenvolveram a aplicação do naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA) como um novo agente derivatizante. NDA reage com aminas primárias na presença de cianeto (CN) para produzir 1-cianobenz[f]isoindoline N-substituídos (CBI), que são derivados fluorescentes e também eletroativos (Figura 4). A grande vantagem associada à aplicação do NDA está relacionada à grande estabilidade dos produtos CBI (GONIL et al., 2014). As reações envolvendo o OPA e NDA são muito semelhantes, porém, embora as reações e as estruturas sejam similares, as propriedades destes dois produtos são bastante diferentes. Ao contrário da reação com o OPA, o produto fluorescente obtido a partir do NDA é bastante estável por várias horas (RILEY et al., 1992).

Figura 4 – Mecanismo da reação de derivatização utilizando NDA na presença de CN.



Fonte: Autor, 2016.

Sendo assim, tem-se que o NDA corresponde ao agente derivatizante mais apropriado para a análise de aminoácidos em amostras biológicas em métodos que se aplica a derivatização pré-coluna.

1.3 Técnicas analíticas de separação para a análise de aminoácidos neuroativos em amostras de microdiálise

As técnicas analíticas aplicadas para a análise de aminoácidos neuroativos em amostras de microdiálise incluem a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), ensaios enzimáticos, biossensores, microeletrodos, eletroforese capilar (EC) e, mais recentemente, os microchips eletroforéticos (LUNTE et al., 2006). A cromatografia líquida e a eletroforese convencional e no microchip correspondem às técnicas de separação que apresentam maior potencial de análise e, por isso, são

as técnicas mais utilizadas para investigar as espécies químicas de interesse neste estudo (CASTRO; MANZ, 2015).

HPLC é uma técnica de separação muito versátil, onde a coluna de separação pode ser constituída por diferentes materiais, além de ser possível aplicar diferentes mecanismos de separação. Devido à natureza aquosa das amostras de microdiálise e a natureza semi-polar de muitos dos analitos analisados, sistemas de fase reversa com colunas contendo grupos alquil são amplamente aplicados (FARO et al., 2013). Apesar de ser uma técnica que permite o monitoramento de uma gama de analitos em amostras de microdiálise, a cromatografia líquida de alta eficiência requer um volume elevado da amostra (2-10 μ L) e os tempos de separação são relativamente longos (KAUL; FAIMAN; LUNTE, 2011), onde tais aspectos limitam a aplicabilidade desta técnica para o monitoramento contínuo dos aminoácidos investigados em amostras de microdiálise cerebral.

Sendo assim, abordaremos neste tópico apenas as principais técnicas envolvendo a análise dos analitos em questão, especialmente, as técnicas de eletroforese capilar e microchip, pois, correspondem as técnicas aplicadas neste trabalho.

1.3.1 Eletroforese capilar (EC)

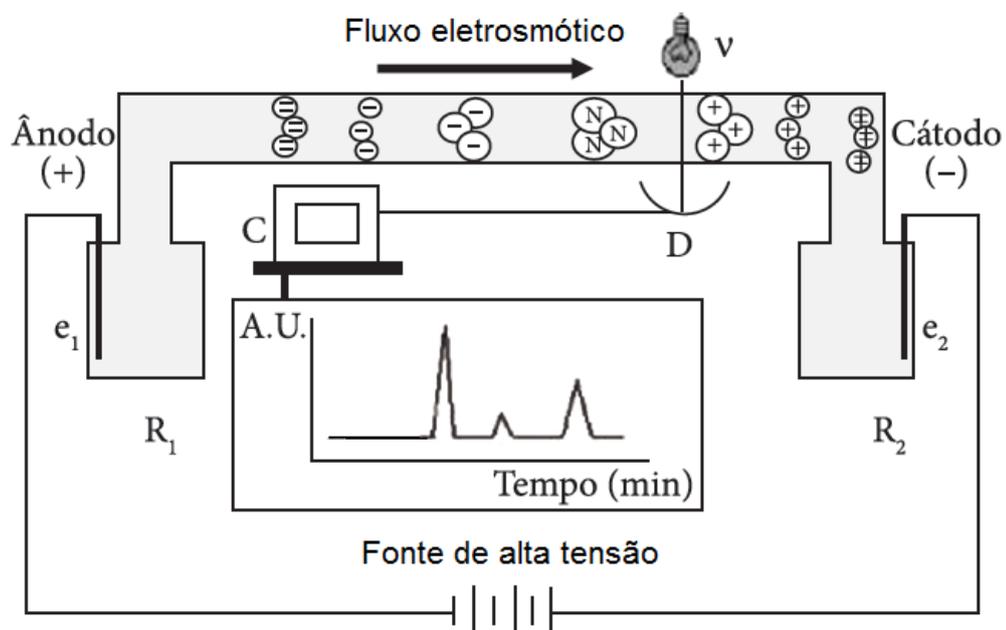
A eletroforese é uma técnica analítica de separação que se baseia na aplicação de campos elétricos para separar espécies químicas com base em seus tamanhos e cargas (LINZ; LUNTE, 2014). Isto é, o processo de separação utilizando a EC ocorre devido à migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis por meio de um campo elétrico (RIEKKOLA et al., 2004). Esta técnica de separação é particularmente atraente para a análise de amostras de microdiálise porque faz uso de um volume muito baixo da amostra (nL - pL) e as separações podem ocorrer em um curto intervalo de tempo. Geralmente, as separações eletroforéticas ocorrem em poucos minutos ou até mesmo em alguns segundos, isto torna possível monitorar continuamente processos biológicos com excelente resolução (COUDERC et al., 2012).

Além de ser uma técnica que utiliza pequenas quantidades de reagentes e de amostra, no qual as separações se processam rapidamente, a EC se destaca por

ser uma técnica que apresenta relativo baixo custo analítico, elevado grau de automação e simplicidade operacional (MICKE; DOLZAN; SPUDEIT, 2012).

A eletroforese capilar possui três componentes básicos, um capilar de separação, uma fonte de alta tensão e um detector (MONNIG; KENNEDY, 1994). A amostra é introduzida em um capilar preenchido com um eletrólito apropriado (o capilar funciona como um canal de migração) por meio de injeções electrocinéticas ou por pressão. Em seguida, um potencial é aplicado em ambos os lados do capilar por uma fonte de alta tensão que está conectada aos reservatórios contendo o eletrólito por meio de eletrodos submersos em tais reservatórios, gerando um campo elétrico. Deste modo, as espécies carregadas na amostra serão separadas de acordo com as suas diferentes mobilidades electroforéticas (LANDERS, 2008). Por fim, um sistema de detecção é disposto no final do capilar, convertendo as informações químicas do sistema em um sinal analítico útil (Figura 5).

Figura 5 – Esquema de um sistema de eletroforese capilar convencional. R_1 e R_2 , e_1 e e_2 são os reservatórios e eletrodos, respectivamente. D representa o detector e C é o computador para obtenção dos dados.

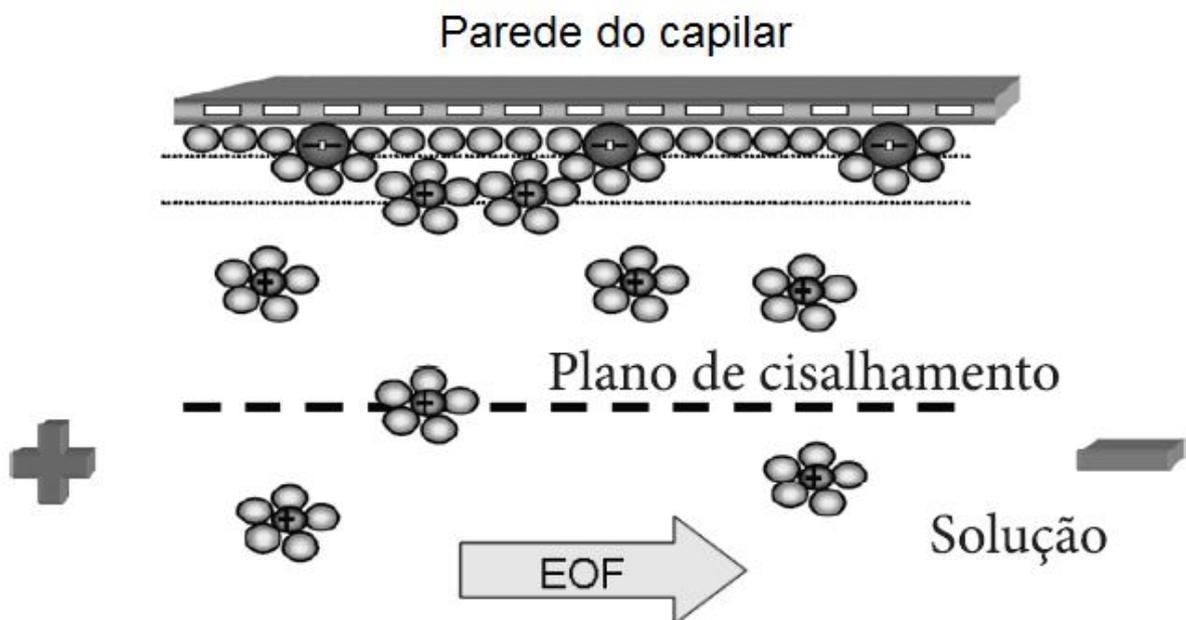


Fonte: Modificado de MICKE; DOLZAN; SPUDEIT (2012).

Como já citado na figura anterior, o fluxo eletrosmótico (EOF) é um fator importante nos experimentos envolvendo a técnica de eletroforese capilar. EOF corresponde a um fluxo de líquido substancial que atravessa o capilar em uma

direção definida em consequência da carga superficial no interior da parede do capilar (TAGLIARO; MANETTO; CRIVELLENTI, 1998). Este fluxo é gerado pelas interações do eletrólito (tampão) com a parede do capilar (GAS, 2009). A sílica fundida possui vários tipos de grupos silanóis ($-\text{SiOH}$), os quais apresentam um caráter ácido. Em contato com o meio aquoso, alguns desses grupos são ionizados, e com isso, a superfície do capilar torna-se negativamente carregada. Deste modo, a parede carregada negativamente do capilar irá atrair eletrostaticamente os cátions do tampão, formando uma dupla camada elétrica (MICKE; DOLZAN; SPUDEIT, 2012). Ao aplicar o campo elétrico, as forças elétricas criam um movimento unilateral dos íons em direção ao eletrodo de carga oposta e, como tais íons se encontram hidratados, eles transportam as moléculas de água do meio, fazendo com que o fluxo da solução como um todo seja induzido para o eletrodo com polo negativo (Figura 6).

Figura 6 – Representação do fluxo eletrosmótico.

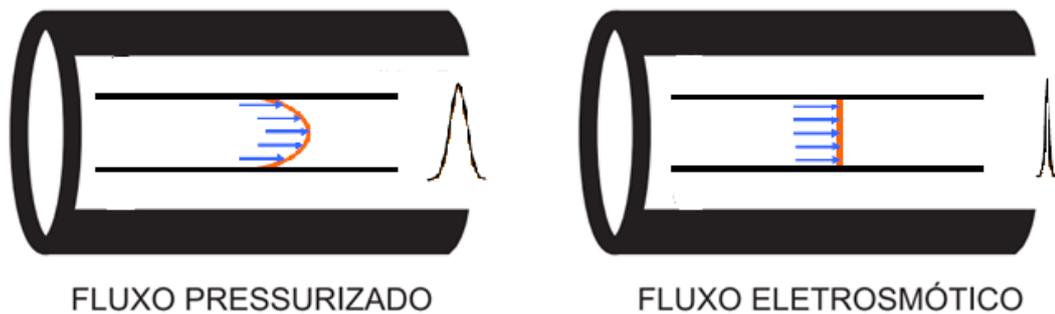


Fonte: Modificado de MICKE; DOLZAN; SPUDEIT (2012).

Uma característica peculiar do fluxo eletrosmótico é o seu perfil radial, permitindo que as componentes da velocidade eletrosmótica dos analitos em diferentes regiões do capilar sejam praticamente iguais, fazendo com que as espécies carregadas de um determinado analito passem juntas pelo detector. No

fluxo laminar (por pressão), os analitos no centro do capilar migram mais rapidamente que aqueles próximos à parede do tubo, gerando um fluxo parabólico (JARDIM; SILVA; SEGATO, 2009), fato este que provoca um alargamento do pico e, conseqüentemente, diminui a eficiência da separação (Figura 7).

Figura 7 – Representação do fluxo pressurizado e do fluxo eletrosmótico.



Fonte: Modificado de JARDIM; SILVA; SEGATO (2009).

A magnitude e a direção do EOF dependem de vários fatores, tais como pH, potencial aplicado, concentração (ou força iônica) do tampão, temperatura, superfície do capilar e adição de solventes orgânicos (WEINBERGER, 1993).

Embora a EC seja uma técnica interessante para a análise dos aminoácidos neuroativos, o procedimento de otimização para a elaboração de um método de separação não é uma tarefa simples, pois amostra de microdialise apresenta força iônica elevada, o que aumenta significativamente a sua condutividade. Se o tampão também tem uma alta condutividade, o aquecimento Joule pode ser gerado, causando a formação de bolhas dentro da coluna e o alargamento dos picos. Sendo assim, ao utilizar um tampão com alta condutividade, deve-se aplicar um campo elétrico baixo, que por sua vez, tal fator leva há uma perda da eficiência de separação e aumento dos tempos de análise (LUNTE et al., 2013).

1.3.2 Microchip eletroforético (ME)

O microchip eletroforético (ME) corresponde a uma forma miniaturizada do sistema de eletroforese capilar convencional (SUNTORNUSUK et al., 2015). Após a introdução desta técnica de separação em 1992 por Manz e colaboradores (MANZ,

et al.,1992), o microchip eletroforético vem apresentando muitas aplicações para análise de diversos compostos químicos (HARRISON et al., 1992; EWING; GAVIN, 1996) e biomoléculas (KUSCHEL; BUHLMANN; PRECKEL, 2005; LIN et al., 2015; WU et al., 2015).

Considerando as espécies químicas de interesse neste estudo, tem-se que o microchip eletroforético (ME) é uma plataforma extremamente interessante para a análise de amostras de microdiálise, pois, esta técnica de separação requer a utilização de pequenos volumes da amostra (nL) e o tempo de análise é extremamente curto. Além disso, o ME apresenta elevada eficiência de separação e alto poder de integração com os sistemas de detecção por fluorescência e eletroquímica (LUNTE et al., 2013; COLTRO et al., 2015). Contudo, o grande diferencial desta técnica é a possibilidade de implementação de várias etapas analíticas, tais como amostragem, separação e detecção, em um único dispositivo (SAYLOR; LUNTE, 2015).

1.3.2.1 Miniaturização de sistemas analíticos

Ao longo dos últimos 20 anos, um grande número de trabalhos em diferentes áreas do conhecimento tem demonstrado o potencial e os benefícios da miniaturização de sistemas, seja para diagnósticos, monitoramento ambiental ou no desenvolvimento de métodos para analisar amostras biológicas (TEMIZ et al., 2015).

O campo dos micro sistemas de análises é regido por um perfil multidisciplinar, exigindo contribuições e conhecimentos na área da biologia, química, informática, física e ciência dos materiais, além das habilidades requeridas no processo de microfabricação dos dispositivos (MOHAMMED; HASWELL; GIBSON, 2015). Atualmente, os microchips podem ser fabricados com precisão sub-micrométrica, os fluxos de líquidos podem ser precisamente controlados e as espécies químicas de interesse podem ser detectadas e quantificadas com elevada sensibilidade devido a possibilidade de integração de tais dispositivos com poderosos sistemas de detecção (CULBERTSON et al., 2014).

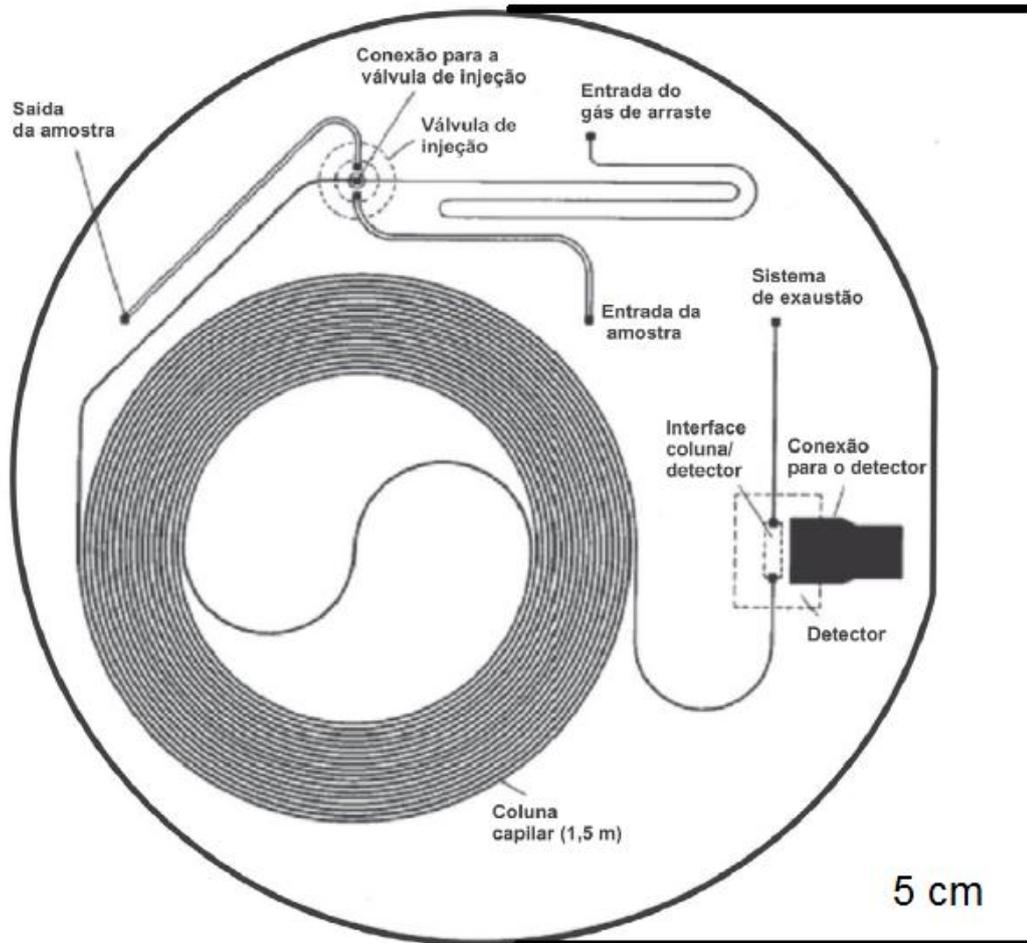
Da mesma maneira que os microchips eletrônicos, a partir da década de 60, revolucionaram o universo dos computadores e da eletrônica, os microchips analíticos são uma nova tendência que está revolucionando a química analítica nos últimos anos (CASTRO; MANZ, 2015). O Conceito de Lab-on-a-Chip (*laboratory on a*

chip) ou Microssistemas de Análise Total (μ TAS) foi introduzido no início da década de 1990 por Andreas Manz (MANZ et al., 1990), visando integrar as principais etapas de uma análise química em um único microdispositivo, isto é, reunir em um único microchip os procedimentos de introdução de amostra, preparação de amostra (filtração, pré-concentração, etc), reações químicas, separação e detecção (NANDI; LUNTE, 2009).

Inicialmente, os microssistemas foram desenvolvidos com o objetivo primordial de aumentar o desempenho analítico, no entanto, com a mudança da escala macro para micro, outras vantagens foram obtidas, como a redução de volume de reagentes e amostras, na ordem de nano a picolitro, baixo custo de fabricação e tempo de análise reduzido (CARRILHO et al., 2007; JOKERST et al., 2012). Outras vantagens associadas aos microssistemas de análise seriam a portabilidade e o alto poder de integração e automação (MANZ et al., 2006). Tais aspectos impulsionaram o crescimento de pesquisas e o desenvolvimento de vários sistemas analíticos em micro-escala nos últimos anos (SUNTORNUSUK et al., 2015).

A primeira miniaturização em química analítica foi um sistema de cromatografia em fase gasosa, proposto por Stephen C. Terry e colaboradores no final na década de 70 (TERRY et al., 1979). O dispositivo foi fabricado em uma lâmina circular de silício com diâmetro de 5 cm, contendo uma válvula de injeção e uma coluna de separação de 1,5 m de comprimento (Figura 8). O desempenho analítico deste sistema de cromatografia miniaturizado foi impressionante, sendo capaz de realizar a separação de uma mistura de hidrocarbonetos em menos de 10 segundos. Mesmo assim, devido à falta de experiência tecnológica em métodos de separação, este sistema não despertou o interesse da comunidade científica (REYES et al., 2002).

Figura 8 – Dispositivo miniaturizado de cromatografia a gás. Primeiro microssistema em química analítica com 5 cm de diâmetro.

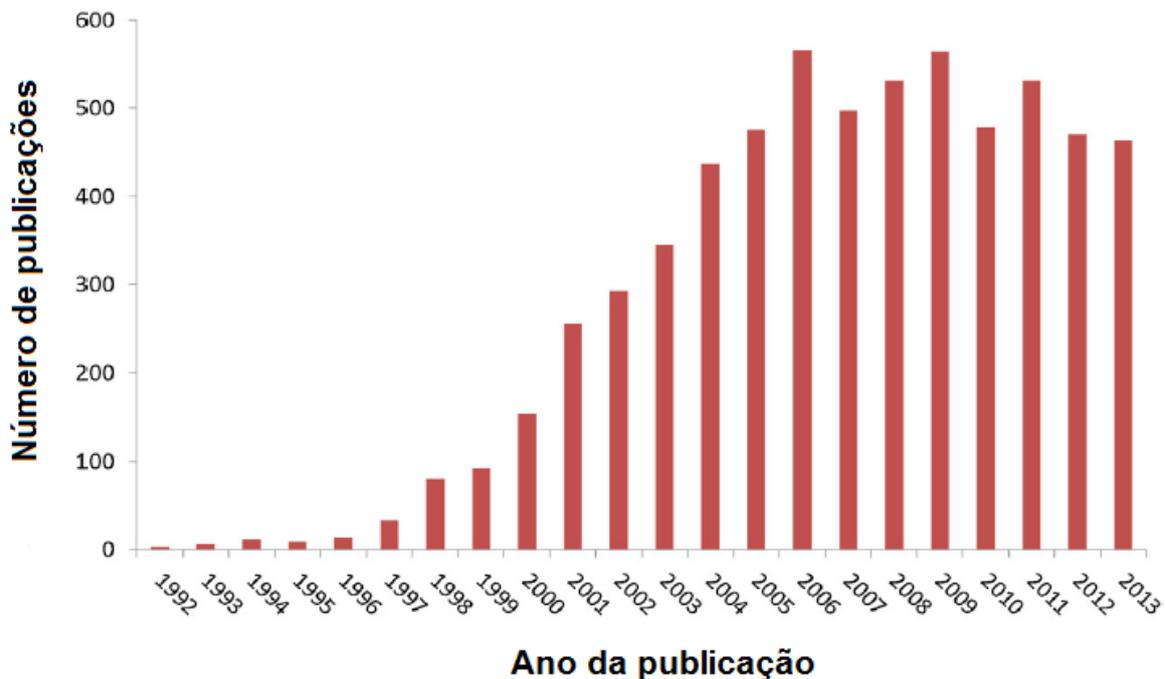


Fonte: Adaptado de CARRILHO et al. (2007).

O avanço tecnológico na área de informática e desenvolvimento de matérias criou condições básicas necessárias para o ressurgimento dos microdispositivos analíticos em 1990 por Manz e colaboradores, como já foi mencionado anteriormente. Desde o seu início, a eletroforese é a técnica de separação mais utilizada em microfluídica (CASTRO; MANZ, 2015). Devido à relativa simplicidade instrumental, a eletroforese capilar é uma técnica particularmente apropriada para a miniaturização e automação. Além disso, a plataforma miniaturizada desta técnica é capaz de realizar análises de amostras complexas sem perda da eficiência de separação e em um tempo significativamente menor do que a técnica de eletroforese capilar convencional (JACOBSON; RAMSEY, 1995).

A maioria dos trabalhos envolvendo microfluídica tem focado no desenvolvimento, caracterização e aplicação dos microchips eletroforéticos. Entre 2001 e 2006, o número de publicações relacionadas com ME aumentou significativamente (CASTRO; MANZ, 2015), desde então, tem-se mantido intenso a quantidade de trabalhos envolvendo tais dispositivos (Figura 9).

Figura 9 – Número de publicações relacionadas com ME entre 1992 e 2013.



Fonte: Extraído de CASTRO; CARRILHO (2015).

1.3.2.2 Microfabricação

Diferentes substratos têm sido utilizados para a confecção dos microchips eletroforéticos, tais como vidro e alguns polímeros (JACOBSON; RAMSEY; MOORE, 1995; KIM; XIA; WHITESIDES, 1995). Em geral, as características básicas que os substratos devem apresentar para obter uma boa separação são: (1) EOF estável, (2) boa claridade óptica no comprimento de onda de monitoramento (para detectores ópticos), (3) compatibilidade com o eletrólito e (4) boas propriedades térmicas e elétricas (SHADPOUR; MUSYIMI; CHEN, 2006).

Polímeros como o tereftalato de polietileno (PETG), polidimetilsiloxano (PDMS), polimetilmetacrilato (PMMA), poliestireno (PS), cloreto de polivinil (PVC) e

polycarbonato, têm sido utilizados como substratos alternativos para a fabricação de microdispositivos eletroforéticos. A escolha do substrato está fundamentada na aplicação desejada, pois, cada polímero tem suas próprias propriedades físico-químicas, e tais propriedades podem afetar decisivamente na separação dos analitos (DOLNÍK, 2004).

Dentre os polímeros utilizados na fabricação de ME, o PDMS sem dúvida é o mais popular e, portanto, o mais amplamente utilizado. O PDMS apresenta as vantagens de ser um material de baixo custo, opticamente transparente, não tóxico e relativamente simples de fabricar utilizando procedimentos básicos, que normalmente não necessitam de uma sala limpa (KIM; XIA; WHITESIDES, 1995). Além disso, o PDMS é bastante flexível, permitindo fácil integração com os sistemas de injeção e detecção, especialmente para detecção eletroquímica (SAYLOR; LUNTE, 2015). Entretanto, como substrato, o PDMS possui algumas limitações, por exemplo, os microcanais produzidos em PDMS não possuem cargas elétricas uniformes, fazendo com que o EOF seja fraco e pouco reprodutível (ROMAN; MCDANIEL; CULBERTSON, 2006). Um EOF forte é necessário para mover de forma rápida todos os analitos para o detector, bem como para controlar eletrocineticamente o fluxo do fluido. Outro problema é a adsorção de analitos hidrofóbicos em PDMS, criando inconsistências no tempo de migração ou até mesmo o desaparecimento completo do pico da espécie química investigada (COLTRO; LUNTE; CARRILHO, 2008).

O vidro é o material mais comumente usado como substrato no ME uma vez que proporciona uma excelente transparência óptica e EOF reprodutível (WHITESIDES, 2006). Além disso, o vidro apresenta propriedades químicas semelhantes aos capilares de sílica fundida que são utilizados no sistema de eletroforese convencional (MANZ et al., 1992). O dispositivo de vidro pode ser fabricado utilizando tecnologias de fotolitografia padrão. Ao contrário do PDMS, o processo de fabricação dos dispositivos microfluídicos de vidro é mais complexo, envolvendo mais etapas e consumindo mais tempo, ou seja, ME de vidro são mais difíceis de serem fabricados em comparação com os ME utilizando PDMS, porém, eles proporcionam melhores separações analíticas (CASTRO; MANZ, 2015). Deste modo, a escolha do material do substrato está condicionada com a aplicação e o grau de eficiência de separação e confiabilidade analítica desejada. Se um

determinado experimento requer elevado grau de precisão e resolução, o vidro deverá ser o substrato escolhido para a construção do microdispositivo.

A maioria das aplicações envolvendo microchips de vidro emprega detecção de fluorescência, uma vez que a luz do laser pode ser focalizada diretamente no canal (WHITESIDES, 2006). A detecção eletroquímica também pode ser empregada nos dispositivos de vidro, entretanto, a necessidade de aplicar altas temperaturas para selar o ME limita o poder de integração com os eletrodos (SAYLOR; LUNTE, 2015).

Existem diferentes tecnologias de microfabricação para microchips, contudo, os métodos fotolitográficos são os mais relevantes e amplamente utilizados (KUMAR, 2010). Os processos litográficos utilizam uma fonte de energia (radiação UV ou raios-X) para desenvolver estruturas em microescala (10 – 100 μm) em um substrato sólido (MADOU, 2002). A fotolitografia foi desenvolvida na década de 70 pela a indústria de microeletrônica para a construção de circuitos integrados e, posteriormente, esta técnica foi devidamente adaptada para a preparação dos primeiros dispositivos microfluídicos (CARRILHO et al, 2007).

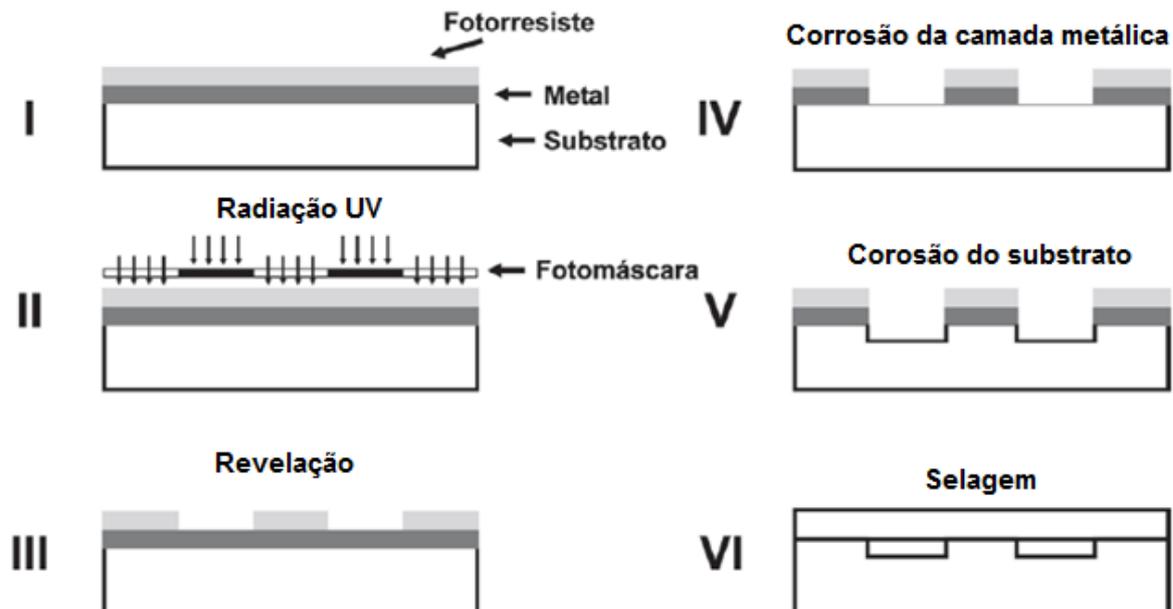
As principais etapas envolvidas em um processo litográfico (Figura 10) incluem (LANDERS, 2008; NGUYEN; NAM-TRUNG; WERELEY, 2006):

- Escolha e limpeza do substrato sólido: Como já foi dito anteriormente, vários materiais podem ser utilizados para construir o microdispositivo, como o vidro e alguns polímeros, incluindo o PDMS. Usualmente, a limpeza do substrato é realizada com água, detergentes, solventes orgânicos (isopropanol e acetona) e soluções altamente oxidantes, tais como $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2$ e $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ (solução piranha);
- Deposição de um filme metálico na superfície do substrato: Nesta etapa, a técnica de “*sputtering*” ou evaporação térmica é aplicada para revestir a superfície do substrato com uma camada metálica, usualmente, composta por Cr/Au para atuar como uma espécie de máscara no processo de corrosão do substrato;
- Transferência da imagem dos microcanais para um polímero fotossensível (fotorresiste): Através da técnica de “*spin coating*”, um filme de fotorresiste é depositado sobre o filme metálico. Em seguida, uma fotomáscara possuindo o desenho dos microcanais é colocada entre a fonte energética e o fotorresiste,

deste como, apenas regiões específicas do fotorresiste relacionadas a geometria dos microcanais existentes na fotomáscara serão expostas à radiação. As fotomáscaras convencionais são fabricadas em uma placa de vidro recoberta por filme fino de Cr. Devido a radiação, a estrutura química do fotorresiste exposto é afetada, alterando a sua solubilidade e proporcionando a revelação da imagem fotogravada;

- Corrosão do substrato: Inicialmente, a camada metálica exposta é corroída com solução de KI/I_2 ou HCl/HNO_3 (água régia) para o Au e solução de $K_3Fe(CN)_6$ ou de $Ce(NH_4)_2(NO_3)_6$ para o Cr. Em seguida, o substrato é submetido ao processo de corrosão, que pode ser por via úmida (usando soluções de HF/NH_4F ou HF/HNO_3) ou seca (plasma de íons reativos). Nesta etapa, a imagem dos microcanais é transferida para o substrato, onde a profundidade dos microcanais é estabelecida de acordo com o tempo de corrosão. Para controlar a profundidade do microcanal é preciso definir, previamente, a taxa de corrosão do substrato, no qual depende do material do substrato, da composição química da solução, da concentração analítica e da temperatura;
- Selagem dos microcanais: A selagem dos microcanais é geralmente realizada aplicando processos térmicos. Desta forma, o substrato contendo os microcanais é colocado em contato com uma lâmina que pode ser do mesmo material do substrato ou não. Em seguida, o sistema é submetido a elevadas temperaturas (superior a $500^\circ C$), no qual formam-se ligações covalentes entre o substrato e a lâmina, promovendo a selagem, obtendo assim, o dispositivo microfluídico. A selagem dos microcanais utilizando o processo térmico é uma etapa crítica da microfabricação do dispositivo, pois, altas temperaturas podem causar deformações dos microcanais (WANG et al., 1997). Este tipo de selagem é considerado irreversível, no entanto, é possível obter vedações reversíveis utilizando polímeros na cobertura, neste caso, a selagem ocorre devido à interações de van der Waals (MCDONALD; WHITESIDES, 2002).

Figura 10 – Principais etapas de fabricação de microchips utilizando o processo fotolitográfico. (I) Deposição da camada metálica e do fotorresiste na superfície do substrato, (II) Adição da fotomáscara e aplicação da radiação UV na região exposta do fotorresiste, (III) transferência da imagem fotogravada para o fotorresiste, (IV) corrosão da camada metálica exposta, (V) corrosão do substrato e (VI) selagem do microchip.



Fonte: Modificado de CARRILHO et al. (2007).

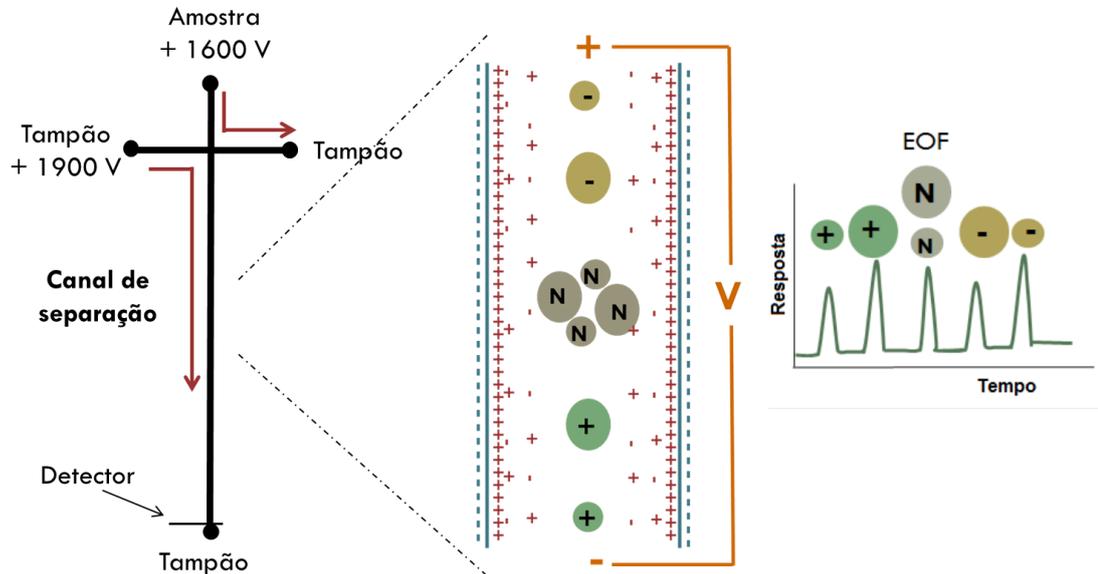
1.3.2.3 Operação dos microchips

O processo de microfabricação dos microchips é apenas uma das etapas para a obtenção de um microsistema de análise. Após o desenvolvimento dos microchips, vários fatores precisam ser considerados para que o dispositivo possa funcionar adequadamente, como por exemplo, as estratégias para a manipulação dos fluídos nos microcanais, a injeção da amostra e implantação do sistema de detecção (GUIHEN; O'CONNOR, 2009). Os microchips eletroforéticos apresentam a possibilidade de integração de todas as etapas analíticas em um único dispositivo, entretanto, esta condição se caracteriza como o grande desafio relacionado a tais sistemas, visto que são poucos os sistemas microfluídicos que foram desenvolvidos apresentando total integração (NGE; ROGERS; WOOLLEY, 2013).

Em termos gerais, a instrumentação básica para um microsistema de análise consiste em um sistema de introdução e bombeamento do fluido nos microcanais e um sistema de detecção (LI et al., 2014). O sistema de introdução da amostra tem grande influência na qualidade da separação analítica e nos parâmetros de precisão do microchip. No sistema de EC convencional, as amostras são injetadas de forma eletrocinética ou hidrodinâmica devido à aplicação de tensão ou pressão, respectivamente (PASQUARELLI, 2008). Entretanto, para microchips eletroforéticos, usualmente a injeção da amostra é realizada por processos eletrocinéticos, pois tais processos podem ser facilmente integrados aos microdispositivos, necessitando apenas da adição dos eletrodos nos reservatórios do microchip para aplicação da tensão para criar o campo elétrico (CHEN; WANG, 2004).

Existem vários modos de separação em ME, incluindo eletroforese de zona em solução livre, cromatografia eletrocinética micelar, eletroforese em gel, focalização isoelétrica e isotacoforese. Cada técnica apresenta um diferente mecanismo de separação e seletividade característica (CASTRO; MANZ, 2015). Dentre tais técnicas de separação, a eletroforese de zona em solução livre é o modo mais utilizado em ME devido à simplicidade de operação e maior facilidade na otimização das condições experimentais (TAVARES, 1997; SAYLOR; LUNTE, 2015). Ao utilizar o modo de eletroforese de zona em solução livre no microchip, a migração das espécies ocorre pela combinação da mobilidade eletroforética específica de cada analito e do fluxo eletrosmótico gerado devido ao campo elétrico aplicado. A mobilidade eletroforética de cada analito está associada a sua densidade de carga, ou seja, da razão entre a carga e o seu raio hidrodinâmico (VILKNER; JANASEK; MANZ, 2004). Desta forma, formam-se zonas distintas de espécies químicas de acordo com as suas respectivas mobilidades no interior dos microcanais, onde pequenos analitos carregados positivamente movem-se mais rapidamente, enquanto, os analitos maiores movem-se mais lentamente (Figura 11).

Figura 11 – Esquema de separação utilizando eletroforese de zona em solução livre em ME.



Fonte: Autor, 2016.

Geralmente, os microchips eletroforéticos apresentam um design em forma de T, como ilustrado na Figura 11, devido à facilidade de fabricação e ampla aplicação para uma variada quantidade de amostras. Entretanto, apesar dos microchips em forma de T serem extremamente úteis, eles não oferecem uma eficiência de separação adequada para amostras de microdiálise cerebral. Amostras de microdiálise correspondem a uma matriz complexa, com muitos componentes, onde vários deles possuem estruturas e propriedades químicas similares, desta forma, se faz necessário utilizar um canal de separação maior, para que seja possível separar todos os componentes da amostra com boa resolução (SUNTORNUSUK et al., 2015; SAYLOR; LUNTE, 2015). Uma forma de obter um canal de separação mais longo e não alterar as dimensões do microchip é usar uma geometria de serpentina, providenciando um comprimento de separação adicional. Os canais em forma de serpentina oferecem uma boa resolução para amostras de microdiálise e preserva o pequeno tamanho do microchip (LANDERS, 2008; QIN et al., 2008).

1.4 Estratégias de detecção

Para o sistema de EC convencional, o sistema de detecção mais utilizado é o UV-VIS, devido à sua natureza quase universal, no entanto, devido ao pequeno caminho óptico do capilar, a grande desvantagem associada a este detector é a baixa sensibilidade, limitando sua aplicação para a análise de aminoácidos neuroativos em amostras de microdiálise (LANDERS, 2008). Contudo, é possível acoplar detectores mais sensíveis ao sistema de EC convencional, como por exemplo, o amperométrico, de condutividade, fluorescência e de espectrometria de massas (SUNTORNUSUK et al., 2015).

A habilidade de realizar análises químicas em sistemas miniaturizados só é uma condição útil se for possível detectar os analitos em baixos níveis de concentração (MORA; STOCKTON; WILLIS, 2012). O desenvolvimento de sistemas de detecção para ME continua sendo um dos grandes desafios nesta área, pois, detectores altamente sensíveis são necessários devido aos pequenos microcanais que limitam o volume da amostra, além disso, deve-se observar a facilidade de integração do detector no microchip, considerando que, preferencialmente, o sistema de detecção deve ser facilmente implantado no microdispositivo (WU; GU, 2011). Os métodos de detecção utilizados em ME podem ser classificados em três classes: métodos ópticos (ARMANI et al., 2007; BORNHOP; SWINNEY, 2000), eletroquímicos (TAKAYAMA et al., 2010; FANGUY; HENRY, 2002) e de espectrometria de massa (HOFFMANN; STROOBANT, 2007; ARMENTA; DAWOUD; LAZAR, 2009). Entre estes métodos, os eletroquímicos e ópticos, mais especificamente a técnica de fluorescência, são os mais utilizados por serem capazes de oferecer alto poder de integração (WU; GU, 2011).

A escolha do sistema de detecção apropriado é essencial para alcançar a sensibilidade e a seletividade requerida para a análise da espécie química de interesse.

1.4.1 Detecção eletroquímica

A detecção eletroquímica pode ser acoplada a várias técnicas de separação, como por exemplo, HPLC, EC e ME. Este tipo de detecção abrange os sistemas amperométricos, voltamétricos, potenciométricos e condutométricos (HENRY, 2006; GHANIM; ABDULLAH, 2011). Em ME, a amperometria é uma das técnicas mais

utilizadas, devido aos baixos limites de detecção que podem ser obtidos, à facilidade de implementação, baixo custo e à boa seletividade (CULBERTSON et al., 2014). Em termos gerais, o sistema amperométrico se baseia na aplicação de um potencial constante em um eletrodo de trabalho, onde as espécies eletroativas contidas na amostra são oxidadas ou reduzidas à medida que alcançam a superfície do eletrodo (LACHER et al., 2001). Esta reação redox gera uma resposta de corrente mensurável que é proporcional à concentração dos analitos que são oxidados ou reduzidos na superfície do eletrodo (BARD; FAULKNER, 2002).

A técnica de detecção eletroquímica é bastante valiosa para ME, porque os detectores eletroquímicos apresentam boa seletividade e aplicação para uma grande variedade de analitos eletroativos, sem a necessidade de utilizar a etapa de derivatização. Microeletrodos podem ser diretamente fabricados no microchip usando o mesmo processo fotolitográfico que é usado para a construção dos dispositivos microfluídicos. Isto pode levar a um sistema totalmente integrado, onde a sensibilidade do analito não é comprometida pelas pequenas dimensões dos microcanais (GHANIM; ABDULLAH, 2011).

Existe uma grande variedade de eletrodos de trabalho que podem ser utilizados para a detecção eletroquímica em ME, incluindo o ouro, cobre, platina, paládio e diferentes tipos de eletrodo de carbono. O tipo de eletrodo de trabalho que deve ser utilizado para uma determinada aplicação depende do método de fabricação disponível, da facilidade de integração e da eletroatividade dos analitos (CHEN; TENG; HAHN, 2011).

Apesar de ser uma técnica promissora e com elevado poder de integração para os microchips eletroforéticos, a detecção eletroquímica ainda possui grandes limitações em termos de seletividade e sensibilidade para a análise de amostras biológicas. Além disso, ao utilizar microchips confeccionados com polímeros, o alinhamento do eletrodo de trabalho com o microcanal de separação é uma etapa crítica do procedimento experimental, gerando, em muitos casos, resultados que não são reprodutíveis (KUBAN; HAUSER, 2009; SAYLOR; LUNTE, 2015).

1.4.2 Detecção por fluorescência

O sistema de detecção por fluorescência foi o primeiro esquema de detecção utilizado em conjunto com microchips eletroforéticos (HARRISON et al., 1992). Ainda hoje este sistema de detecção é largamente utilizado em dispositivos microfluídicos devido à sua alta sensibilidade e simplicidade de operação das análises (YANG et al., 2012; FUNG et al., 2004). A detecção de fluorescência induzida por laser (*Laser induced fluorescence detection*) é a fonte de excitação mais amplamente utilizada por causa da alta intensidade e eficiência do laser em um único ponto. A fluorescência oferece uma sensibilidade superior (até 1000 vezes) em comparação com o detector UV-VIS (JOHNSON; LANDERS, 2004).

Geralmente, a fonte de luz é acoplada a um microscópio por um cabo de fibra óptica para concentrar a luz em um ponto específico do microcanal, permitindo a detecção e quantificação das espécies químicas de interesse após o processo de separação (OCVIRK; TANG; HARRISON, 1998). Uma vantagem ao aplicar a detecção por fluorescência é que o feixe do laser pode ser focalizado em qualquer parte do canal, de modo que o comprimento eficaz de separação pode ser variado simplesmente movendo o ponto focal do laser, facilitando significativamente o estudo de otimização no desenvolvimento de um método analítico, além da possibilidade de controlar facilmente o tempo total da análise (LIANG et al., 1996).

De acordo com as suas características, a detecção por fluorescência tem sido uma poderosa ferramenta de detecção para análise de moléculas de interesse biológico, como aminoácidos, peptídeos, fragmentos de DNA e RNA, etc (WU; GU, 2011; GONDA et al., 2005; CASTRO; MANZ, 2015). Para ME de vidro, a detecção por fluorescência é a ideal, devido à facilidade de integração com o microdispositivo e a simplicidade instrumental e operacional do sistema (SUNTORNUSUK et al. 2015).

Embora o microchip apresente pequenas dimensões, a instrumentação necessária para a detecção por fluorescência é bastante grande (Figura 12), comprometendo a portabilidade do sistema e, com isso, dificultando a possibilidade de análises *on-line* e adequação do sistema em ambientes clínicos.

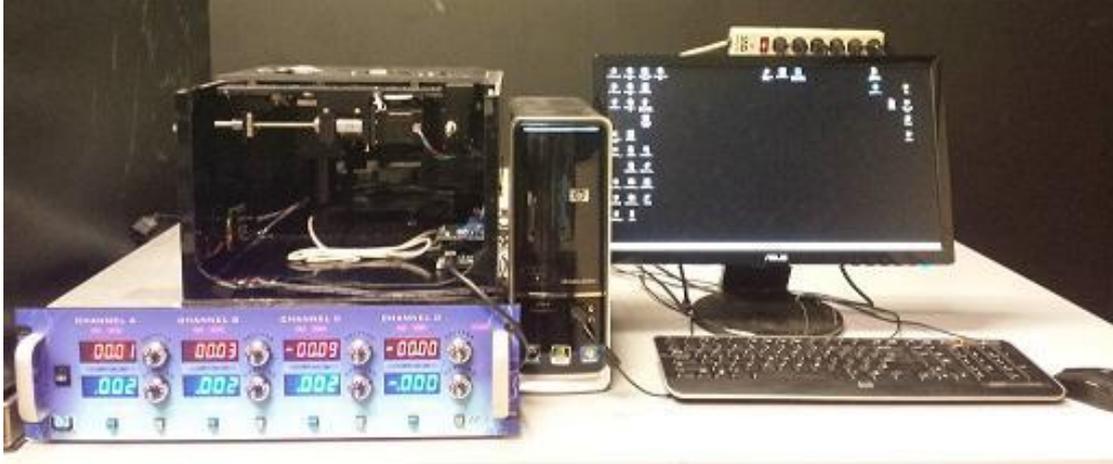
Figura 12 – Ilustração da instrumentação necessária para o método ME-LIF.



Fonte: Autor, 2016.

Deste modo, avaliou-se neste estudo a aplicação de um sistema portátil de detecção por fluorescência (Figura 13) desenvolvido no laboratório da professora Susan M. Lunte na Universidade de Kansas, nos Estados Unidos. O principal objetivo no desenvolvimento do sistema portátil reside na miniaturização do sistema de detecção por fluorescência, visando melhorar a portabilidade do mesmo.

Figura 13 – Ilustração da instrumentação utilizando o sistema portátil de detecção por fluorescência para análises dos aminoácidos investigados com ME.



Fonte: Autor, 2016.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O objetivo geral desta tese se baseia no desenvolvimento de duas plataformas de separação para a determinação de alguns aminoácidos em amostras de microdiálise cerebral, usando a eletroforese capilar convencional e microchip eletroforético com detecção por fluorescência.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Investigar e definir a melhor estratégia de derivatização dos analitos utilizando NDA/CN;
- ✓ Otimizar as condições de separação e fatores operacionais do método envolvendo a EC convencional;
- ✓ Utilizar a técnica EC-LIF para construir curvas analíticas de cada aminoácido investigado e definir os parâmetros analíticos, incluindo linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação do método proposto;
- ✓ Analisar amostras de microdiálise cerebral em diferentes períodos de armazenamento para avaliar a estabilidade da amostra em função do tempo;
- ✓ Estabelecer as condições ótimas de separação aplicando o microchip eletroforético, avaliando fatores como a voltagem de separação, a composição do tampão de corrida e o tempo de injeção da amostra;
- ✓ Determinar os parâmetros analíticos do método ME-LIF a partir da obtenção das curvas analíticas dos analitos;
- ✓ Monitorar as concentrações dos aminoácidos investigados em amostras de microdiálise cerebral;
- ✓ Comparar os resultados obtidos por ambos os métodos elaborados neste estudo e estabelecer o método mais adequado para a análise dos aminoácidos neuroativos em amostras de microdiálise;
- ✓ Analisar os aminoácidos investigados em amostras de microdiálise aplicando ME com um sistema portátil de detecção por fluorescência.

3 EXPERIMENTAL

3.1 Estudo de otimização do processo de derivatização usando NDA/CN

3.1.1 Reagentes e soluções

Arginina, ácido aspártico, ácido glutâmico, citrulina, histamina e taurina foram adquiridos pela Sigma Aldrich, St. Louis, MO. As soluções padrões com esses aminoácidos foram preparadas em uma concentração de 2 mmolL^{-1} utilizando água ultrapura $18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ (Millipore, Billerica, MA). As soluções padrões foram devidamente diluídas para a realização do estudo de otimização do método de separação envolvendo os métodos propostos. As concentrações diluídas avaliadas foram $0,02 \text{ mmolL}^{-1}$ e $6,6 \text{ }\mu\text{molL}^{-1}$ para cada aminoácido. Uma solução estoque de tetraborato de sódio (Sigma Aldrich) 20 mmolL^{-1} foi preparada. Uma solução de NDA (Invitorgen, Carlsbad, CA) foi preparada em acetonitrila em uma concentração de 5 mmolL^{-1} e uma solução de cianeto de sódio 10 mmolL^{-1} foi preparada em meio aquoso. Para as análises, a solução de NDA foi preparada semanalmente, enquanto a solução de CN foi preparada diariamente. A β -ciclodextrina foi adquirida pela Sigma Aldrich e devidamente modificada em nosso laboratório.

3.1.2 Derivatização

Pelo fato dos aminoácidos avaliados não serem fluorescentes, tais analitos foram derivatizados com NDA. NDA reage com aminas primárias na presença de cianeto para produzir derivados fluorescentes (LINZ; LUNTE, 2014). A excitação e emissão máxima desses derivados são 440 nm e 490 nm , respectivamente. Os aminoácidos foram derivatizados pela combinação de uma mistura dos analitos, em diferentes concentrações, com a solução de tetraborato de sódio (20 mmol.L^{-1}), seguidas pela adição de NDA (5 mmolL^{-1}) e CN (10 mmolL^{-1}), em excesso. Para todos os casos, o volume final da mistura após a adição de todos os componentes foi de $1,6 \text{ mL}$. Diferentes tempos de reação do processo de derivatização foram avaliados. A derivatização se processou em temperatura ambiente e em um sistema de pré-coluna.

3.2 Eletroforese capilar com detecção por fluorescência (EC-LIF)

Um instrumento Beckman P/ ACE MDQ EC (Brea, CA) equipado com uma coluna de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) de 77 cm de comprimento (62 cm de comprimento até o detector) e 50 μm de diâmetro interno foi utilizada para realizar a separação dos analitos. Um detector de fluorescência externo Picometrics ZetaLIF (Ramonville, France) com laser de diodo 445 nm (CrystaLaser, Reno, NV) foi utilizado para a detecção dos aminoácidos. Ambos os instrumentos foram controlados pelo software 32-Karat.

3.2.1 Avaliação das condições experimentais no estudo de otimização do método EC-LIF

Os parâmetros inicialmente avaliados foram: tempo de reação entre os analitos e o agente derivatizante, quantidade ótima dos analitos e do derivatizante (para o estudo de otimização), estabilidade dos produtos fluorescentes e diferentes voltagens de separação.

Em relação ao tempo de reação, antes de injetar a amostra no equipamento de EC, a mistura contendo as espécies químicas de interesse ficou reagindo por 10, 15 e 30 minutos para determinar em quanto tempo a reação entre os analitos e o agente derivatizante ocorreria por completo.

Acerca de determinar a melhor quantidade dos analitos para a realização das análises de otimização, 15 μL e 5 μL da solução estoque de cada aminoácido foi misturado com diferentes quantidades de NDA/CN (10, 15 e 30 μL). A amostra foi diluída com tampão borato pH 9,2 até um volume final de 1600 μL . As concentrações finais dos analitos foram 0,02 mmolL^{-1} e 6,6 μmolL^{-1} , respectivamente. Cada aminoácido foi analisado individualmente e, progressivamente com a obtenção dos picos referentes a cada analito, análises com as misturas foram realizadas.

Com o objetivo de investigar a melhor relação entre tempo de análise com a resolução de separação do sistema, diferentes voltagens de separação foram aplicadas. As voltagens avaliadas foram: 15, 18, 20, 22, 25 e 28 kV. Vale ressaltar que o estudo de otimização foi aplicado, inicialmente, para os seguintes aminoácidos: arginina, citrulina, histamina e ácido aspártico. Os demais aminoácidos

foram incorporados ao estudo à medida que as condições experimentais ótimas foram sendo estabelecidas.

Avaliou-se também a estabilidade dos padrões, onde realizou-se uma análise de uma solução contendo os aminoácidos e, duas horas depois, repetiu-se a análise com a mesma solução e nas mesmas condições da análise anterior.

3.2.2 Adição de sulfobutileter β -ciclodextrina (SBE- β -CD) e DMSO no tampão de corrida

Com o intuito de melhorar a resolução de separação dos analitos, foi avaliada a adição de uma ciclodextrina modificada e de um solvente orgânico (STOBAUGH et al., 1994). Diferentes concentrações de SBE- β -CD e DMSO foram consideradas e a condição ótima foi estabelecida. As diferentes composições do tampão de corrida foram: tampão borato pH 9,2 ($M = 20 \text{ mmolL}^{-1}$), SBE- β -CD (10; 5 e $1,4 \text{ mmolL}^{-1}$) e dimetilsulfóxido (DMSO) (25, 10, 7 e 4% v/v). De acordo com os dados obtidos, calculou-se o número de pratos teóricos (N) e a resolução de cada sistema mediante as variações na concentração de DMSO.

O número de pratos teóricos (equação 1) para cada analito e a resolução (equação 2) entre dois padrões de aminoácidos foram determinados a partir das seguintes relações matemáticas (MICKE; DOLZAN; SPUDEIT, 2012):

$$N = 5,54 (T / W)^2 \text{ (Número de pratos teóricos - Equação 1)}$$

$$R_s = 1,18 (T_2 - T_1 / W_1 + W_2) \text{ (Resolução - Equação 2)}$$

Onde T representa o tempo de retenção do pico, ou seja, T_1 e T_2 representam os tempos de retenção dos picos 1 e 2, em segundos. W corresponde a largura do pico tomada em sua base, logo, W_1 e W_2 representam as larguras dos picos 1 e 2.

Neste caso, 5 μL de cada analito foi misturado com 30 μL de NDA ($M = 5 \text{ mmolL}^{-1}$) e 30 μL de CN (10 mmolL^{-1}). Em seguida, a amostra foi diluída com o tampão borato até perfazer um volume de 1600 μL . A concentração final dos analitos foi $6,6 \mu\text{molL}^{-1}$ e a amostra reagiu por 30 minutos em temperatura ambiente antes de ser injetada no equipamento para a realização da análise. Nota-se que o procedimento de derivatização não foi alterado, onde a adição da ciclodextrina modificada e do DMSO foi realizada exclusivamente no tampão de corrida.

Inicialmente, uma amostra contendo apenas arginina e histamina foi avaliada para determinar se a adição de SBE- β -CD iria resolver eventuais problemas de co-eluição. Em seguida, uma amostra contendo todos os analitos foi investigada, considerando a composição ótima do tampão de corrida. A identificação de todos os picos foi realizada mediante a análise de cada aminoácido separadamente.

Posteriormente, mais dois aminoácidos foram adicionados ao sistema: taurina e ácido glutâmico. A taurina e o ácido glutâmico foram avaliados isoladamente e, em seguida, analisou-se uma amostra contendo arginina, histamina, citrulina, taurina, ácido glutâmico e ácido aspártico. Diferentes voltagens de separação e diferentes concentrações de solvente orgânico foram avaliadas neste estudo.

Para observar a influência da ciclodextrina modificada na separação dos aminoácidos, análises foram conduzidas apenas com a presença do solvente orgânico. Neste caso, o tampão de corrida foi composto por tampão borato 20 mmolL⁻¹ (pH 9,2) e DMSO 7% (v/v). O processo de derivatização realizado foi o mesmo já mencionado e o experimento foi conduzido com a presença dos seis analitos.

3.2.3 Validação do método EC-LIF

A validação do método foi conduzido de acordo com as condições otimizadas de separação que foram previamente estabelecidas. Curvas analítica foram construídas para cada analito a partir dos seus respectivos padrões, onde as soluções foram preparadas em meio aquoso. A faixa de concentração aplicada foi de 10 – 10000 nmolL⁻¹ e os parâmetros analíticos, tais como linearidade, precisão, repetitividade (precisão intra-dia), precisão intermediária (precisão inter-dias), limite de detecção e quantificação foram avaliados. Para cada ponto da curva, os experimentos foram conduzidos em triplicata.

3.2.4 Análise de amostras de microdiálise

3.2.4.1 Obtenção da amostra real

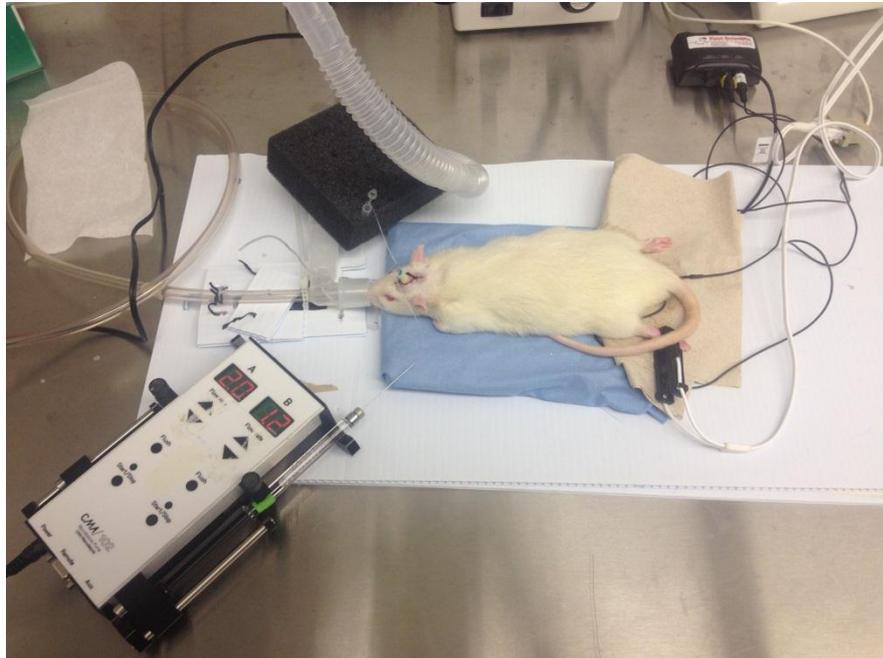
As amostras de microdiálises foram obtidas a partir de cérebros de ratos ao se utilizar uma sonda com membranas de 2 mm. Tais sondas foram obtidas pela CMA (North Chelmsford, MA, USA).

3.2.4.2 Cirurgia

Todos os experimentos foram realizados em conformidade com a IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee). Ratos Dawley machos pesando em torno de 300-400 g foram usados para os experimentos. Os ratos foram alojados em salas com temperatura controlada, com o acesso a comida e água antes da cirurgia. Os ratos foram inicialmente anestesiados por inalação de isoflurano seguido por injeção de uma mistura de cetamina ($67,5 \text{ mgkg}^{-1}$) / xilazina ($3,4 \text{ mg/kg}^{-1}$) / acepromazina ($0,67 \text{ mgkg}^{-1}$). O local de incisão foi preparado ao raspar os pelos do animal na região da cabeça. A temperatura corporal do rato foi controlada e mantida constante durante todo o procedimento por meio do uso de uma plataforma de aquecimento por microondas, no qual o rato ficou disposto.

Os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de uma sonda no hipocampo. As coordenadas geométricas do local de inserção foram (A: + 2,2 mm; L: + 1,5 mm; P: - 6,5 mm) (MAYER; OSORIO; LUNTE, 2013). Após a implantação da sonda, amostras de microdiálise cerebral foram coletadas através da perfusão do cérebro do rato com o líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) usando uma bomba de microinfusão em um fluxo de $1,0 \mu\text{Lmin}^{-1}$ (Figura 14). Ao final da coleta, os animais foram sacrificados e os cérebros retirados para verificação do local de inserção das sondas.

Figura 14 - Processo cirúrgico para obtenção da amostra real a partir do cérebro de rato.



Fonte: Autor, 2016.

O líquido cefalorraquidiano artificial (LCA) foi preparado a partir de uma mistura de cloreto de sódio (145 mmolL^{-1}), cloreto de potássio ($2,7 \text{ mmolL}^{-1}$), cloreto de magnésio ($1,0 \text{ mmolL}^{-1}$), cloreto de cálcio ($1,2 \text{ mmolL}^{-1}$), fosfato monossódico ($0,45 \text{ mmolL}^{-1}$) e hidrogenofosfato dissódico ($2,33 \text{ mmolL}^{-1}$, $\text{pH} = 7,4$). Após o preparo, o LCA foi filtrado e armazenado em temperatura ambiente.

3.2.4.3 Estudo comparativo considerando diferentes tempos de armazenamento de amostras de microdiálise

Inicialmente, possíveis variações na composição de amostras de microdiálise foram avaliadas em função do tempo. Deste modo, foram analisadas amostras armazenadas após 2 dias, 1 semana, 1 mês e 3 meses após o procedimento cirúrgico.

As análises foram conduzidas utilizando $200 \mu\text{L}$ da amostra com a seguinte composição: $40 \mu\text{L}$ da amostra coletada, $100 \mu\text{L}$ de tampão borato (20 mmolL^{-1}), $30 \mu\text{L}$ de NDA e $30 \mu\text{L}$ de CN. Após a adição do NDA e do CN a solução foi deixada em repouso em temperatura ambiente por 30 min antes de ser injetada no equipamento de eletroforese capilar. Considerando os resultados obtidos e a limitação na

obtenção de amostras de microdiálise, em termos de volume de amostra, avaliou-se a utilização de apenas 20 µL da amostra de microdiálise, aumentado, deste modo, o volume de tampão (120 µL) para manter o volume final da amostra constante.

Em todas as análises os experimentos foram realizados em triplicata, onde as análises foram conduzidas sob as mesmas condições experimentais.

3.2.4.4 Teste de recuperação dos aminoácidos investigados nas amostras de microdiálise

No intuito de identificar os analitos nas amostras de microdiálise, padrões dos aminoácidos investigados em uma concentração conhecida ($1 \mu\text{molL}^{-1}$) foram adicionados na amostra de microdiálise já derivatizada. Para a identificação dos picos das espécies químicas de interesse, levou-se em consideração o tempo de migração e a variação da altura dos picos.

Os padrões de aminoácidos foram devidamente derivatizados antes de serem adicionados na amostra de microdiálise. Inicialmente cada aminoácido foi adicionado separadamente e, em seguida, uma mistura contendo todos os analitos foi adicionada na amostra de microdiálise. Em cada caso, as análises foram realizadas em triplicata.

3.5 Microchip eletroforético (ME-LIF)

3.3.1 Processo de microfabricação do microchip de vidro

Para a fabricação do microchip eletroforético foi aplicado os processos fotolitográficos. Todos os procedimentos experimentais para a confecção deste dispositivo foram realizados em uma sala limpa. Os processos fotolitográficos consistem na aplicação de radiação UV ou raios-X para transferir estruturas micrométricas para um determinado substrato sólido. Para este estudo, adotou-se a radiação UV e o substrato utilizado foi o vidro.

O processo de microfabricação do microchip de vidro consistiu nas seguintes etapas: escolha e o desenho do design do chip, limpeza da superfície do substrato, fotogração dos microcanais na superfície de um polímero sensível à radiação utilizada (fotorresiste), corrosão do substrato e, por fim, a selagem dos microcanais.

As fotomáscaras foram desenhadas a partir do programa de computador AutoCAD (Autodesk Inc., San Rafael, CA) e impressas em um filme de transparência com uma resolução de 50.000 dpi. Em cada fotomáscara, foram dispostos três designs idênticos. Inicialmente, o design dos microcanais foi transferido para o fotorresiste. Deste modo, a fotomáscara foi colocada sobre uma placa de vidro revestida com Cr e um filme fotossensível (fotorresiste positivo, tipo AZ 1518), no qual foi depositado sobre a superfície metálica através da técnica de “spin coating”. A placa de vidro foi previamente tratada com água, detergente, isopropanol e acetona. Em seguida, o sistema contendo a placa de vidro revestida com Cr, fotorresiste e com a fotomáscara foi exposto à radiação UV por 4 s utilizando um alinhador de máscara (ABM inc., Scott's Vally, CA). Devido à presença da fotomáscara, apenas algumas regiões do fotorresiste referente ao design do chip são de fato expostas à radiação UV.

Após a exposição à radiação, o fotorresiste foi submetido a um processo de revelação, que envolveu tratamentos térmicos e de corrosão para “cura” e remoção seletiva do fotorresiste foto sensibilizado, expondo regiões da lâmina de vidro com a mesma geometria existente na fotomáscara. Assim, a máscara foi *soft-baked* por 15 minutos em uma temperatura de 110°C e a região metálica exposta foi removida ao utilizar uma solução de $K_3Fe(CN)_6$. Após a remoção do revestimento metálico, o design fotogravado no fotorresiste foi transferido para o substrato de vidro através de um processo de corrosão úmida utilizando uma solução de HF 49%/HNO₃/H₂O (20:16:44 v/v/v) por 15 min. O tempo de corrosão definiu a profundidade dos canais no substrato. Neste caso, o período de corrosão de 15 min produziu canais com 15 µm de profundidade. Uma vez que os canais foram gravados no vidro, o fotorresiste ainda restante e o cromo foram removidos com acetona e $K_3Fe(CN)_6$, respectivamente. Em seguida, os reservatórios foram perfurados usando uma broca com ponta de diamante (diâmetro 1,55 mm), onde tal procedimento foi realizado com a placa de vidro imersa em água. Os reservatórios formados apresentaram um volume de aproximadamente 35 µL (LANDERS, 2008)

A última etapa do processo de fabricação do chip refere-se ao procedimento de selagem da placa de vidro, no qual uma placa de cobertura de vidro foi fixada termicamente ao substrato contendo os microcanais para fornecer o dispositivo devidamente selado. Inicialmente, as placas de vidro foram lavadas com água e detergente. Depois de mais uma lavagem completa com água, as placas de vidro

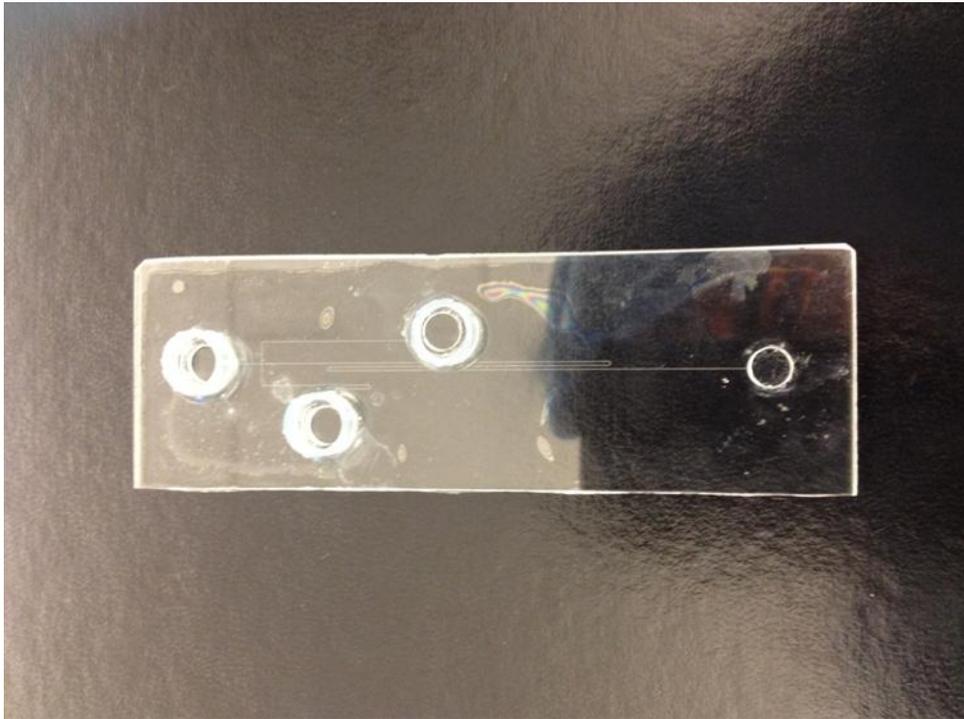
foram revestidas com uma solução de acetato de cálcio 5% (v/v). Em seguida, as placas de vidro foram esfregadas uma contra a outra até a obtenção de uma resistência máxima entre elas. Posteriormente, as placas foram separadas e aplicou-se novamente a solução de acetato de cálcio sobre as placas e, em seguida, as placas de vidros foram atritadas novamente. Após repetir este procedimento por três vezes, as placas foram revestidas com uma fina camada de água e foram fixadas uma contra a outra com o auxílio de grampos.

Após garantir que não havia bolhas de ar entre as placas, o dispositivo foi colocado em um forno de baixa temperatura (80° C) durante 2 horas. Após este período, aumentou-se a temperatura para 110°C, mantendo o dispositivo nesta temperatura durante a noite. Na manhã seguinte, os grampos foram removidos e o dispositivo foi colocado em um forno programável (Série 750, Fisher Scientific, St. Louis, MO) para um ciclo completo de ligação térmica. Adotou-se a seguinte programação para a ligação térmica das placas de vidro (KUMAR, 2010):

- Aumentou-se progressivamente a temperatura partindo de 25° C até 540° C em uma taxa de variação de 3° Cmin⁻¹;
- Partindo da temperatura atingida anteriormente, aumentou-se a temperatura para 630° C em uma taxa de variação de 4° Cmin⁻¹;
- O dispositivo foi mantido a 630° C por aproximadamente 3 horas;
- Diminuiu-se progressivamente a temperatura para 540° C em 4° Cmin⁻¹;
- Partindo de 540° C, a temperatura foi decrescida para 510° C a uma taxa de 1,5° Cmin⁻¹. O dispositivo foi mantido a 510° C por 30 min;
- Em seguida, a temperatura foi vagarosamente diminuída para 460° C em uma taxa de variação de 0,5° Cmin⁻¹;
- Por fim, aplicou-se uma taxa de variação de 5° Cmin⁻¹ para diminuir a temperatura do dispositivo para a temperatura ambiente.

Após a aplicação da ligação térmica, as placas de vidro foram fundidas e, deste modo, obteve-se o microchip de vidro (Figura 15).

Figura 15 - Ilustração do microchip de vidro.



Fonte: Autor, 2016.

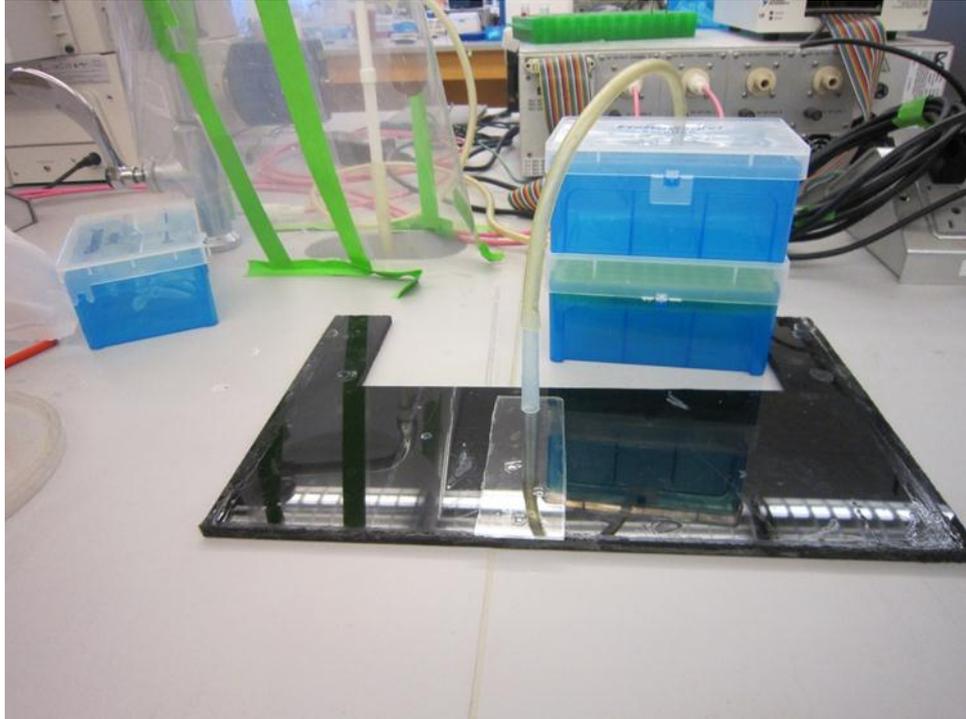
Em suma, o microchip foi obtido com as seguintes características: microcanais com 50 μm de largura e 15 μm de profundidade; canal de separação de 15 μm e os reservatórios laterais foram mantidos distantes um do outro como pode ser observado na figura acima.

3.3.2 Manuseio e condicionamento do microchip de vidro

Após o preparo, o microchip foi submetido a uma limpeza com acetona para remover impurezas em sua superfície. Antes da utilização do microchip nos experimentos, este foi devidamente condicionado (Figura 16). O condicionamento foi realizado através da aplicação das seguintes etapas: adição de uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 molL^{-1} , água, hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 molL^{-1} , água e tampão borato (pH= 9,2), respectivamente. Para cada etapa, foram adicionadas 35 μL de solução em três dos quatro reservatórios do microchip, aplicando a pressão negativa no reservatório vazio para estabelecer a passagem das soluções pelos microcanais. O fluxo para cada solução foi mantido por 10 min e a passagem da solução pelos microcanais foi monitorada com o auxílio de um microscópio, sendo possível observar possíveis entupimentos ou formação de bolhas no interior dos

microcanais. Ao fim dos experimentos, repetiu-se o meu mesmo procedimento para a limpeza dos canais, sem incluir a etapa de adição do tampão.

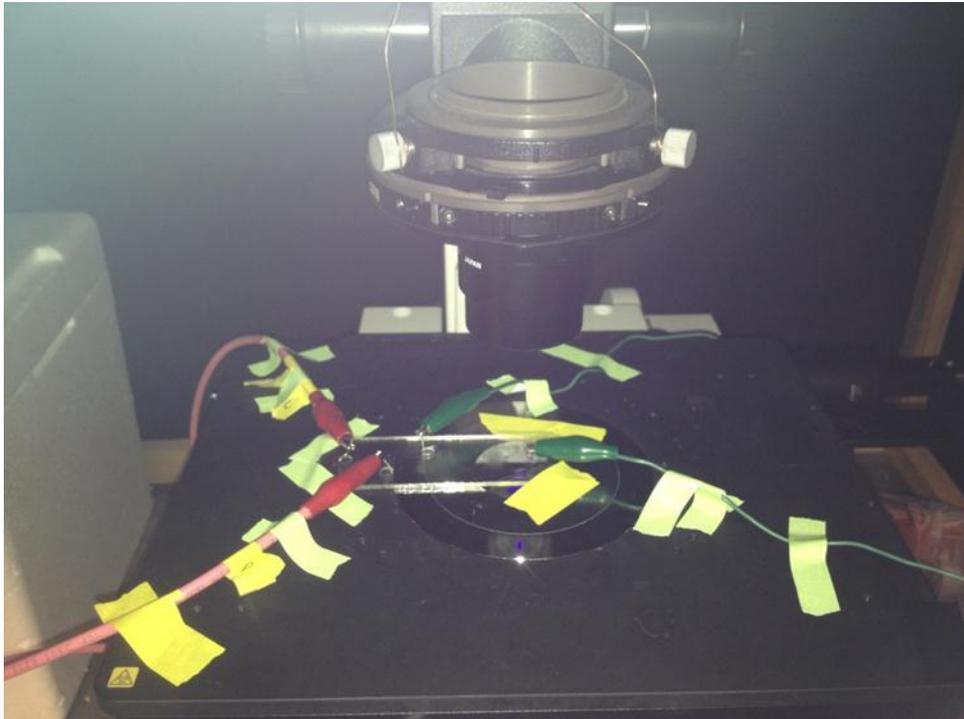
Figura 16 - Etapa de condicionamento do microchip.



Fonte: Autor, 2016.

Após o condicionamento, o microchip foi fixado na base do microscópio com fita adesiva e os eletrodos de platina foram dispostos nos reservatórios (Figura 17). Vale ressaltar que após a aplicação dos eletrodos nos reservatórios, a solução tampão existente em cada reservatório foi substituída por outra nova solução, para evitar problemas de contaminação advinda dos eletrodos.

Figura 17 - Montagem do sistema para análises envolvendo microchips com detecção por fluorescência.



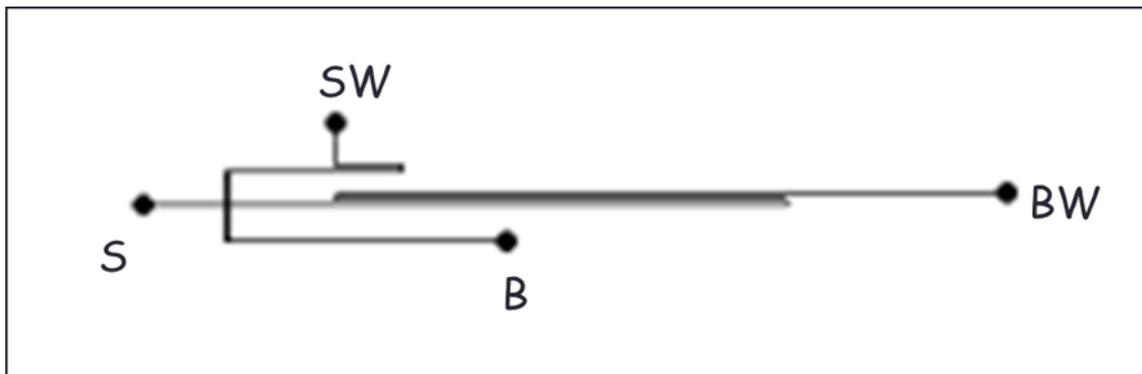
Fonte: Autor, 2016.

3.3.3 Operação e sistema de detecção

A operação do microchip consistiu no preenchimento dos reservatórios, inicialmente, com tampão borato 20 mmolL^{-1} ($\text{pH} = 9,2$). A medida que as análises foram conduzidas, adicionou-se ao tampão de corrida DMSO (10 e 20% v/v) e, posteriormente, $1,4 \text{ mmolL}^{-1}$ SBE- β -CD para proporcionar uma melhoria de resolução na separação dos aminoácidos investigados. Visando encontrar a melhor relação entre tempo e resolução de separação, a concentração do borato foi decrescida para 10 e 15 mmolL^{-1} após a implementação dos aditivos já citados. Uma fonte de alta tensão (Ronkonkoma, NY) foi utilizada para aplicar diferentes voltagens no reservatório do tampão e da amostra para gerar o fluxo eletrosmótico. Neste estudo, avaliaram-se as voltagens de 7, 9 e 10 kV para o reservatório contendo o tampão e 4, 6 e 7 kV para o reservatório da amostra, enquanto os outros dois reservatórios foram mantidos como terra para estabelecer um *gate* robusto (Figura 18). Neste caso, ao aplicar a voltagem no reservatório da amostra, a amostra foi introduzida no microchip pela injeção eletrocinética. Já a aplicação da voltagem no

reservatório do tampão, serviu para produzir o fluxo eletrosmótico para conduzir a amostra para o canal de separação e, posteriormente, para o sistema de detecção.

Figura 18 - Ilustração do microchip de vidro contendo a identificação dos reservatórios. S refere-se à amostra (*sample*), B o tampão (*buffer*), SW o resíduo da amostra (*sample waste*) e BW refere-se ao resíduo do tampão (*buffer waste*).



Fonte: Autor, 2016.

Para a injeção da amostra, foram utilizados os seguintes tempos de injeção: 0,5 e 1 s. Para coletar o sinal de fluorescência a partir do microchip, utilizou-se um microscópio de fluorescência (Nikon, Melville, NY). A excitação foi realizada utilizando um laser de diodo de 445 nm PhoxX (Market Tech, Scotts Valley, CA). A fonte de luz foi acoplada ao microscópio por um cabo de fibra óptica e focado sobre um ponto do canal de separação a cerca de 0,2 centímetros a partir do reservatório localizado no final do canal de separação (BW). Para recolher a emissão a partir dos derivados de NDA (produtos fluorescentes após o processo de derivatização), um tubo fotomultiplicador (Hamamatsu) foi alinhado ao lado do microscópio. Aplicou-se o Origin para analisar os dados obtidos.

3.3.4 Desenvolvimento do método de separação e análise da amostra de microdiálise cerebral

Em termos gerais, assim como aconteceu no método envolvendo a eletroforese capilar, inicialmente, foi realizado um estudo de otimização de separação utilizando os padrões. Como já foi mencionado anteriormente, a composição do tampão de corrida, o tempo de injeção da amostra e as voltagens de separação foram estrategicamente alterados, de modo a obter uma boa separação em um tempo curto de análise.

Em seguida, curvas analíticas de cada analito foram construídas e, por fim, os mesmos parâmetros analíticos avaliados na EC convencional foram determinados e avaliados. Neste caso, utilizou-se a mesma faixa de concentração do método anterior.

As amostras de microdiálises foram devidamente investigadas de acordo com a condição ótima de operação do método proposto. O procedimento experimental associado às amostras de microdiálise se deu de maneira similar ao procedimento adotado com o sistema de eletroforese capilar convencional, utilizando as mesmas condições experimentais, incluindo o mesmo processo para a reação de derivatização e o mesmo procedimento para a obtenção das amostras.

3.6 Sistema portátil de detecção por fluorescência

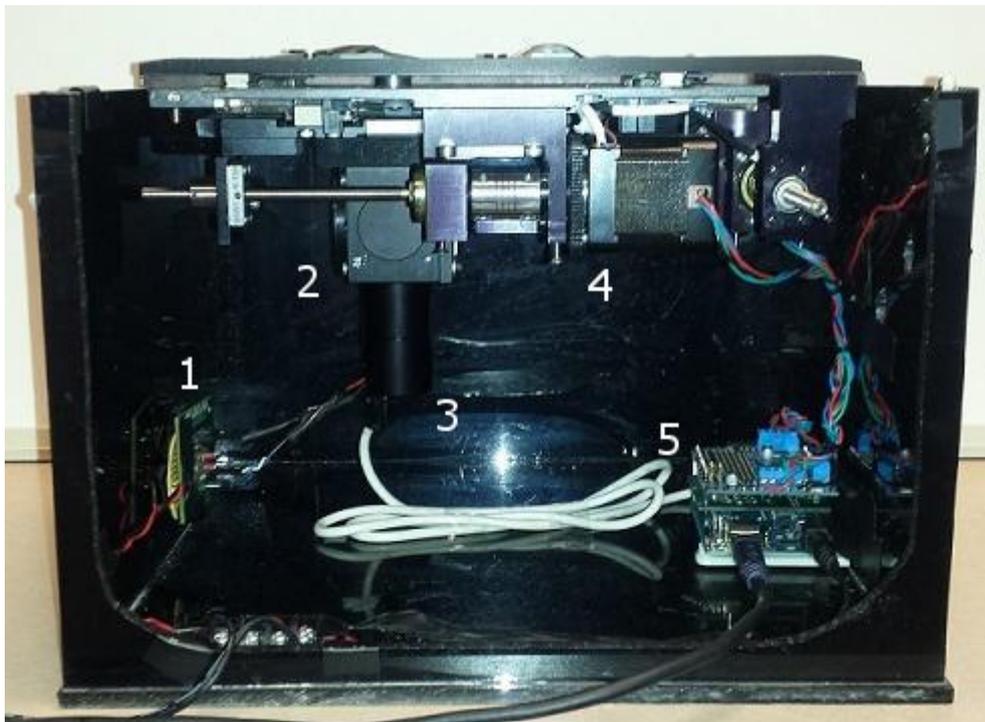
O sistema portátil tem muitas semelhanças com o sistema de detecção por fluorescência convencional, mas também tem várias diferenças. Como no sistema LIF, a detecção por fluorescência foi realizada por filtragem e focalização da luz de excitação sobre o canal de separação, seguido por filtragem e focalização da luz subsequentemente emitida em um detector. No entanto, no caso de o sistema portátil, um LED 420 nm (LED Engin, San José, CA) foi usado em vez de um laser. O LED foi alimentado usando um circuito de corrente personalizado e controlado por frequência. Verificou-se que um sinal de entrada de 1,6 kHz resultou numa saída de corrente estável de 250 mA.

O LED foi montado em paralelo com o chip e, em seguida, colimado utilizando uma lente plano-convexa através de um orifício de 1 mm. A luz do LED foi dirigida para cima através de uma lente objetiva e de um espelho dicróico longo com um ponto de corte de 470 nm (Thorlabs, Newton NJ) e montado em um ângulo de 90°. A luz de emissão foi focalizada através da lente objetiva e do espelho dicróico seguido por um filtro de emissão, e finalmente, esta luz foi focalizada sobre um ponto de detecção usando uma segunda lente plano-convexa, modelo LA1951-A-N-BK7 (Thorlabs, Newton NJ). O filtro de emissão final também tinha um corte de 470 nm (Thorlabs, Newton NJ), permitindo passagem de luz de qualquer comprimento de onda para o detector.

Enquanto as versões futuras do sistema portátil irá integrar a fonte de alta tensão para a separação, o sistema utilizado para este estudo contou com uma fonte

de alta tensão externa UltraVolt HV. O sistema portátil de detecção por fluorescência foi compactado em uma caixa de 40 cm de largura e 15 cm de altura, pesando 4,54 kg (Figura 19).

Figura 19 – Ilustração do sistema portátil de detecção por fluorescência. (1) placa do circuito de corrente personalizada, (2) espelho dicroico, LED, lente objetiva e filtro óptico, (3) fotodiodo e quadro do pré-amplificador, (4) motores de posicionamento e (5) amplificador e conversor digital conectado ao pré-amplificador via cabo USB branco.



Fonte: Autor, 2016.

4 RESULTADOS

4.1 Estudo de otimização do método de separação dos aminoácidos investigados usando EC-LIF

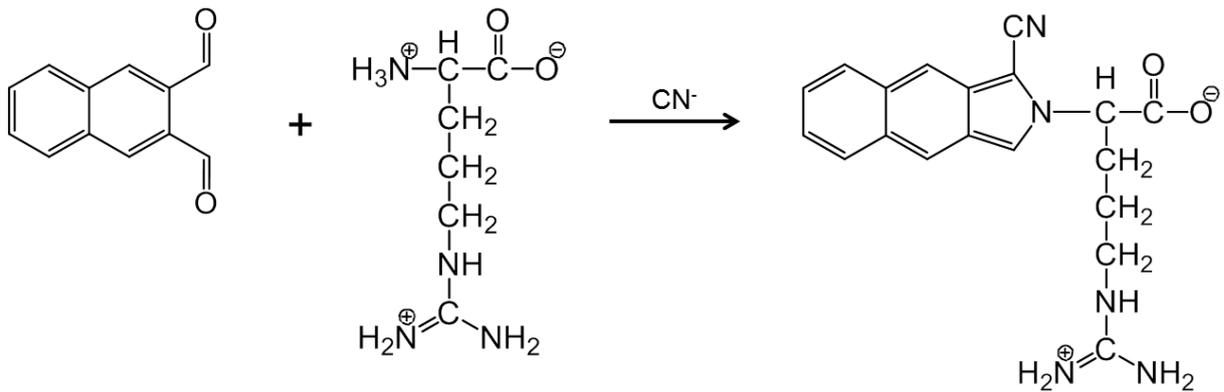
4.1.1 Estudo de otimização do processo de derivatização com NDA/CN

O processo de derivatização é uma etapa extremamente importante para a análise envolvendo aminoácidos neuroativos, visto que, tais espécies, em sua grande maioria, não são eletroativas e não fornecem respostas utilizando detectores ópticos. Existe a possibilidade de analisar os aminoácidos neuroativos diretamente sem a necessidade da etapa de derivatização, utilizando espectrometria de massa (MS) como sistema de detecção. Entretanto, EC-MS é um sistema pouco utilizado devido ao seu alto custo. Além disso, o detector espectrométrico de massa é incompatível com muitos aditivos aplicados para melhorar a resolução de separação dos analitos, limitando a capacidade de separação desta técnica.

A escolha do agente derivatizante adequado para o tipo de detector que se deseja trabalhar e do tipo das espécies químicas de interesse é fundamental para o êxito no desenvolvimento de um método de análise. A escolha do agente derivatizante que demonstre interação apenas com a classe de compostos de interesse irá fornecer separações com baixo grau de complexidade, favorecendo a identificação e quantificação dos picos dos analitos (ALBIN; WEINBERGER; SAPP, 1991). Deste modo, o NDA é uma opção interessante para a análise de aminoácidos em amostras biológicas em comparação aos demais agentes derivatizantes usualmente utilizados.

Seguindo o protocolo experimental, o primeiro analito avaliado com o NDA foi a arginina (Figura 20). Tipicamente, o NDA reage com espécies relativamente pequenas, minimizando a sua contribuição para o tamanho do complexo derivatizado.

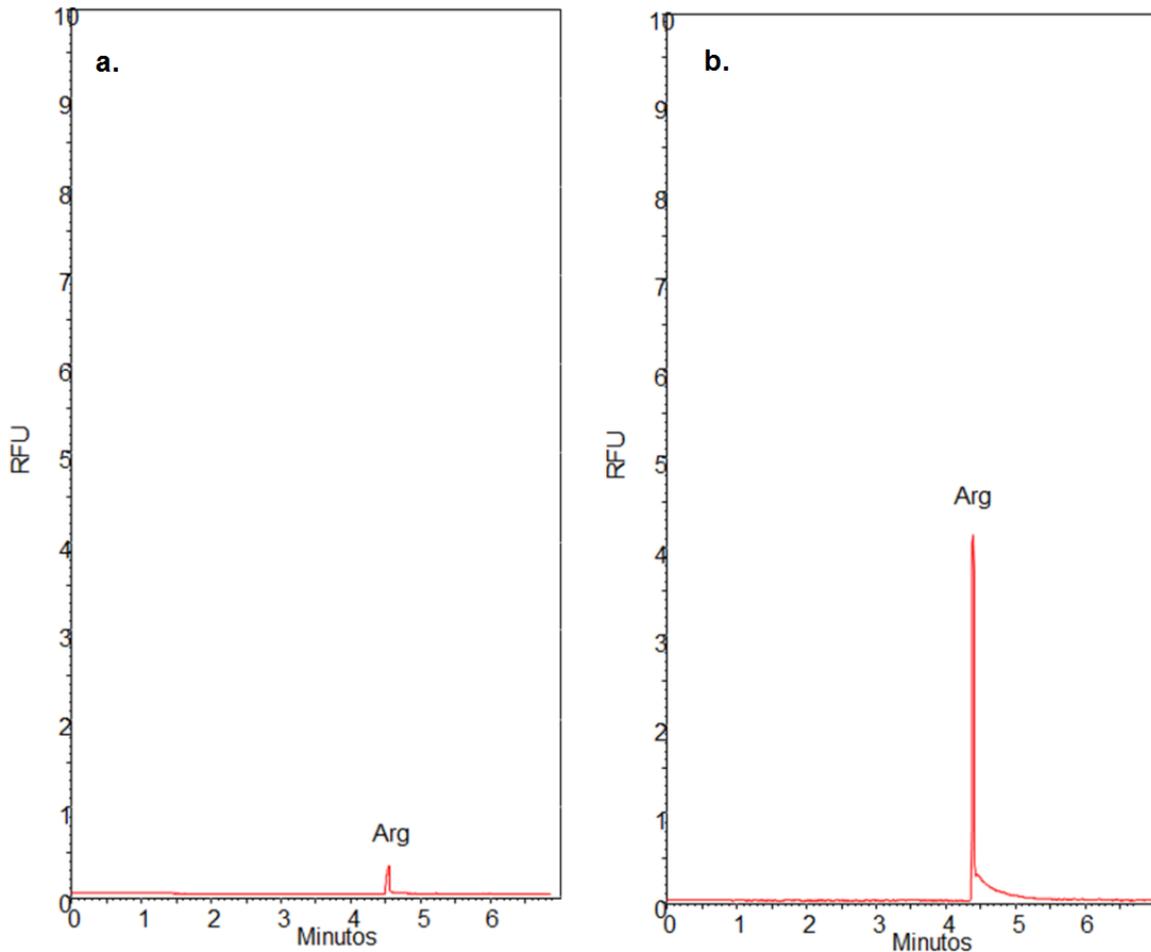
Figura 20 – Reação de derivatização da arginina com o NDA/CN.



FONTE: Extraído de MONTIGNY et al. (1987).

Após a adição do agente derivatizante na solução contendo arginina em tampão borato, realizou-se a análise após 10 min de reação e, em outro momento, deixou-se o sistema reagindo por 15 min. Conforme pode ser visto nos eletroferogramas (Figura 21), após 10 min de reação foi possível constatar um pequeno pico em 4,55 min. Contudo, ao se deixar o analito reagindo por um maior período de tempo (15 min) constatou-se um pico pronunciado na mesma região, indicando que 10 min de reação, não foi o suficiente para a formação do derivado fluorescente. Com isso, ficou evidente a necessidade de otimizar o tempo de derivatização.

Figura 21 - Eletroferogramas de uma solução de arginina $0,02 \text{ mmolL}^{-1}$ após diferentes tempos de derivatização (a. 10 e b. 15 min, respectivamente) com NDA/CN em tampão borato pH 9,2.



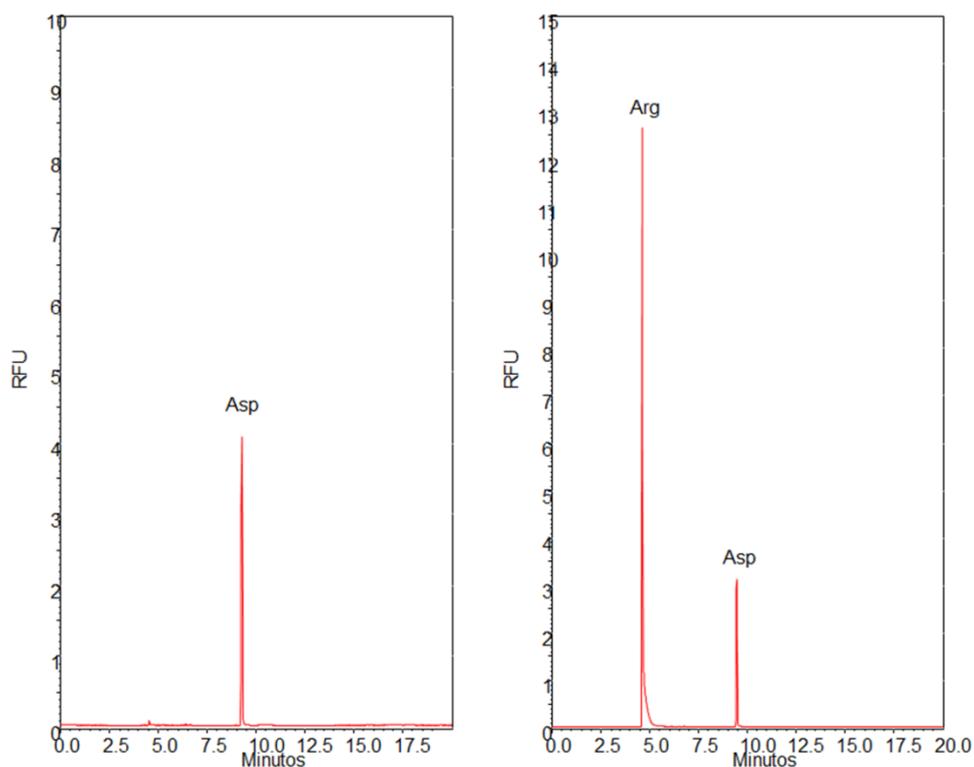
Fonte: Autor, 2016.

Em seguida, utilizou-se um tempo de derivatização de 30 min, no qual a solução foi mantida em temperatura ambiente. Neste caso, após a constatação da resposta preliminar da arginina frente ao procedimento de derivatização adotado, a continuidade da otimização do tempo de reação foi conduzido em uma mistura contendo arginina e ácido aspártico, onde previamente analisou-se uma solução de ácido aspártico $0,02 \text{ mmolL}^{-1}$. O tempo de derivatização de 30 min foi considerado o tempo de reação ótimo, pois, em tempos superiores não houve alteração da resposta nos picos da arginina e do ácido aspártico.

A partir dos eletroferogramas obtidos (Figura 22), temos inicialmente a obtenção de um pico característico do ácido aspártico em 9,28 min e, em relação à mistura, observou-se que os picos da arginina e ácido aspártico foram

satisfatoriamente separados e não houve problemas de interferência. Apesar da boa separação obtida, tem-se que o pico da arginina foi bastante elevado, indicando que a concentração utilizada poderia ser ajustada no sentido de utilizar uma quantidade menor do reagente para a condução dos testes. É importante notar que a diferença do tamanho dos picos de cada aminoácido se dá pela diferença do pK_a dos mesmos, onde considerando o pH do meio, tem-se que a arginina está mais desprotonada, reagindo em maior quantidade com o NDA.

Figura 22 - Eletroferogramas do ácido aspártico e da mistura arginina e ácido aspártico, respectivamente, após derivatização com NDA/CN.

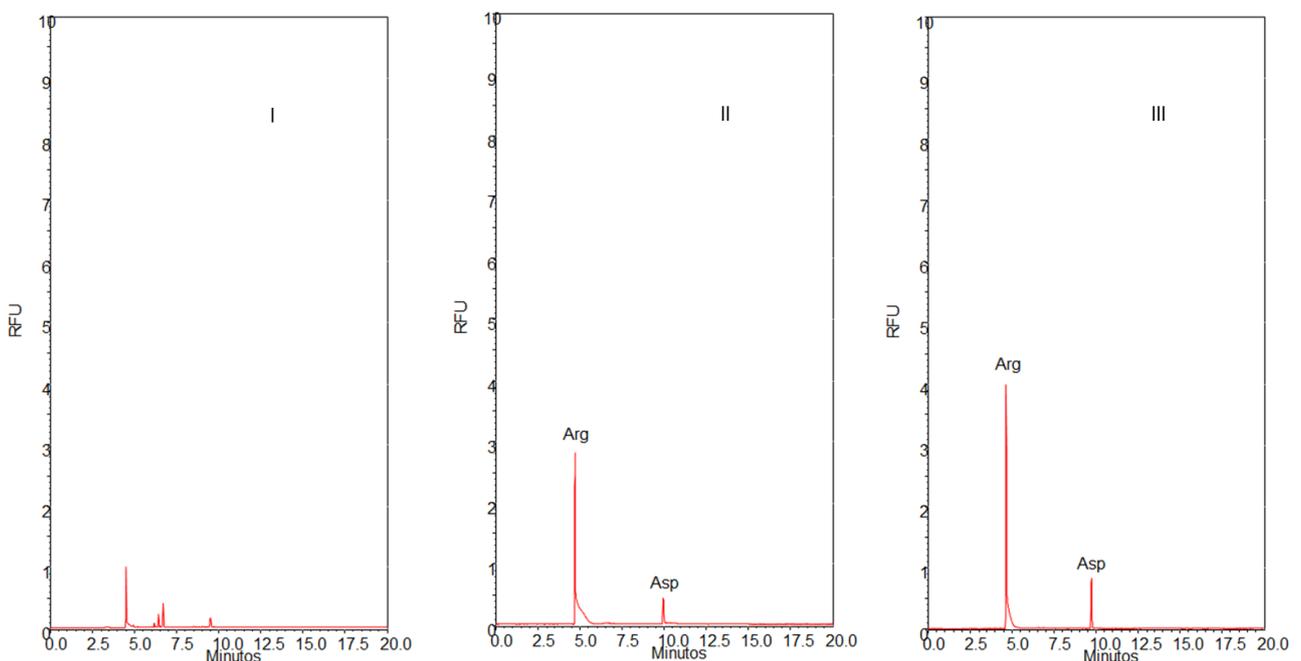


Fonte: Autor, 2016.

Em cada análise efetuada, é de extrema importância trabalhar com um excesso de NDA/CN, pois, o excesso do agente derivatizante garante que todo o analito irá reagir e formar o produto fluorescente. No entanto, para evitar o consumo exacerbado dos reagentes em questão, buscamos encontrar a quantidade ótima de NDA/CN, tal como, a melhor concentração dos analitos para efetuar os experimentos.

Em seguida, a concentração final dos analitos foi diminuída para $6,6 \mu\text{molL}^{-1}$ e diferentes proporções de NDA/CN foram utilizadas. De acordo com os dados adquiridos (Figura 23), concluímos, parcialmente, que esta nova concentração estabelecida juntamente com a utilização de $30 \mu\text{L}$ de NDA e $30 \mu\text{L}$ de CN, proporcionaram a melhor resposta para os analitos até aqui investigados.

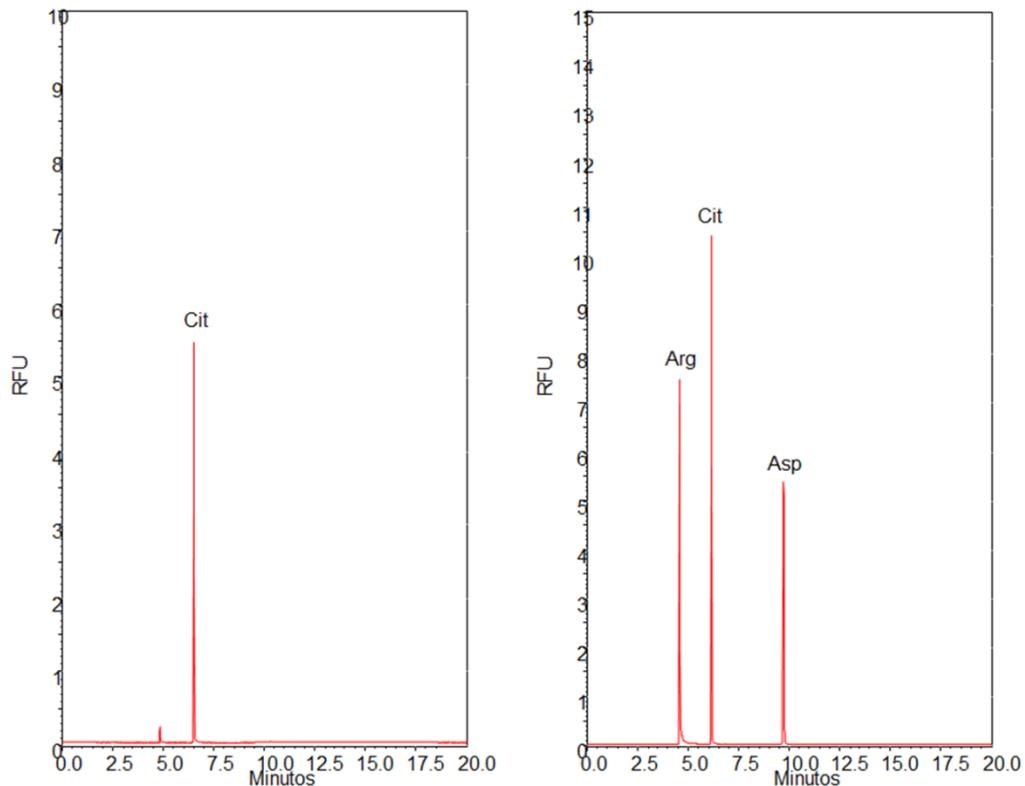
Figura 23 - Diferentes proporções do agente derivatizante reagindo com uma solução de arginina e ácido aspártico com concentração de $6,6 \mu\text{molL}^{-1}$. I. $10 \mu\text{L}$ de NDA e $10 \mu\text{L}$ de CN II. $20 \mu\text{L}$ de NDA e $20 \mu\text{L}$ de CN III. $30 \mu\text{L}$ de NDA e $30 \mu\text{L}$ de CN.



Fonte: Autor, 2016.

Após a definição dos parâmetros acima citados, outro aminoácido foi investigado, a citrulina. Inicialmente realizou-se uma corrida apenas com a citrulina para identificar o seu respectivo pico e, posteriormente, realizou-se a análise de uma mistura contendo arginina, citrulina e ácido aspártico. Os eletroferogramas (Figura 24) mostram um pico característico da citrulina em 6,52 min e uma boa separação dos analitos em um tempo de análise inferior a 11 min. Como pode ser facilmente observado considerando os tempos de migração, o primeiro pico corresponde a arginina, o segundo é a citrulina e o terceiro corresponde ao ácido aspártico.

Figura 24 - Eletroferogramas da citrulina e da mistura arginina, citrulina e ácido aspártico, após derivatização com NDA/CN.



Fonte: Autor, 2016.

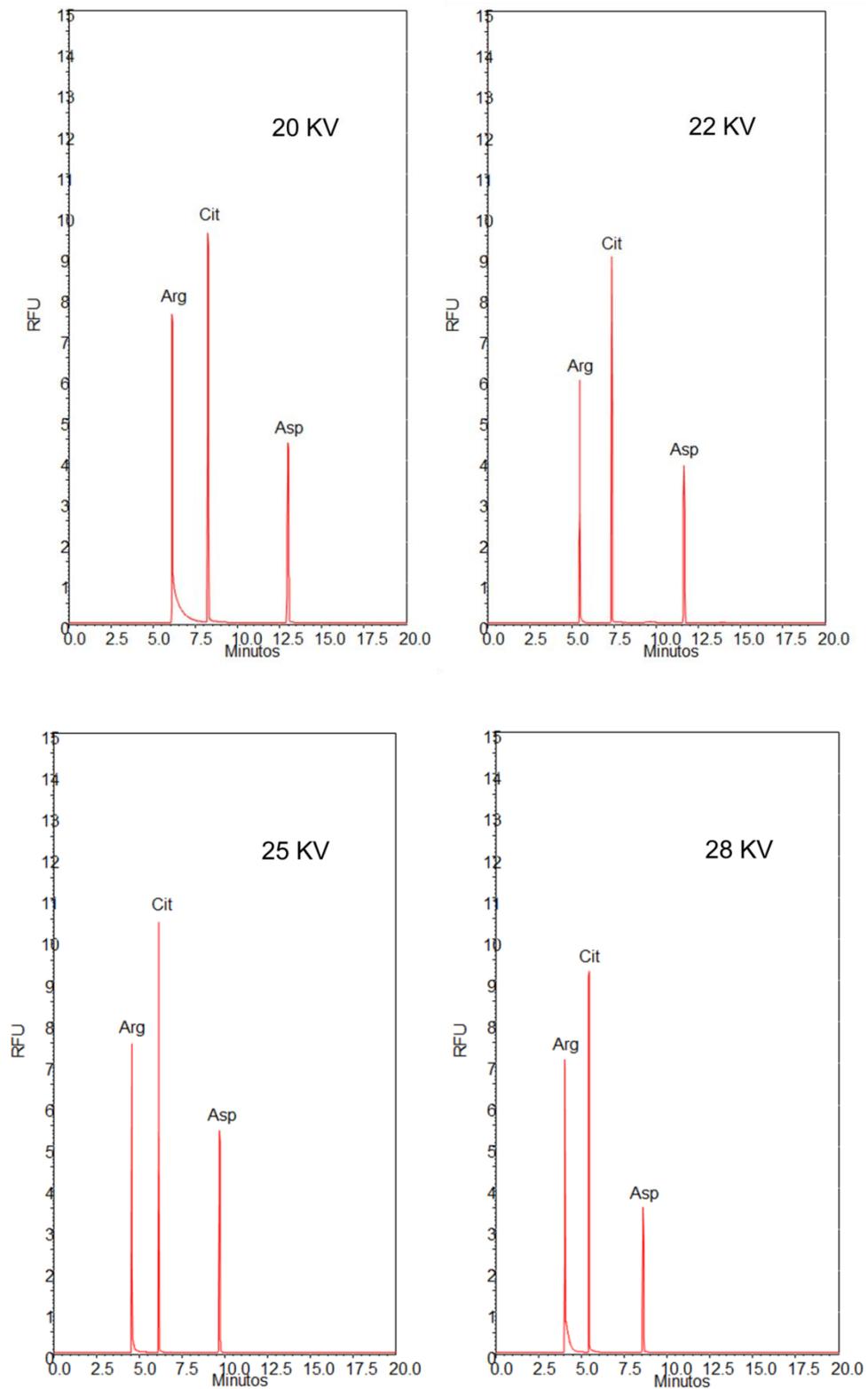
Vale ressaltar que o pH do tampão borato (pH = 9,2) foi escolhido por ser o valor de pH compatível para o processo de complexação dos analitos com o NDA. Na faixa de pH de 9,2 à 10,0 não há alteração na condição de ionização dos aminoácidos investigados, porém, sabe-se que valores altos de pH aumenta os tempos de migração dos analitos. Este aumento no tempo de migração é atribuído ao aumento na força iônica do tampão, que provoca uma diminuição do EOF.

4.1.2 Diferentes voltagens de separação

Neste estudo, foi avaliada a influência da voltagem de separação na resolução e no tempo de análise de uma mistura contendo os analitos investigados anteriormente. Como esperado, os eletroferogramas (Figura 25) mostraram que quanto maior a voltagem de separação, mais rápida é a migração dos analitos e, conseqüentemente, menor o tempo de análise. Isto é, utilizando a voltagem de separação de 25,0 kV foi possível separar adequadamente os analitos em um curto

tempo de análise em relação as outras voltagens avaliadas, sem perda de resolução. Um dos principais objetivos almejados para o desenvolvimento deste método é resolver todos os picos dos analitos envolvidos em um menor intervalo de tempo possível.

Figura 25 - Influência das diferentes voltagens de separação no tempo de análise de uma mistura de arginina, citrulina e ácido aspártico.

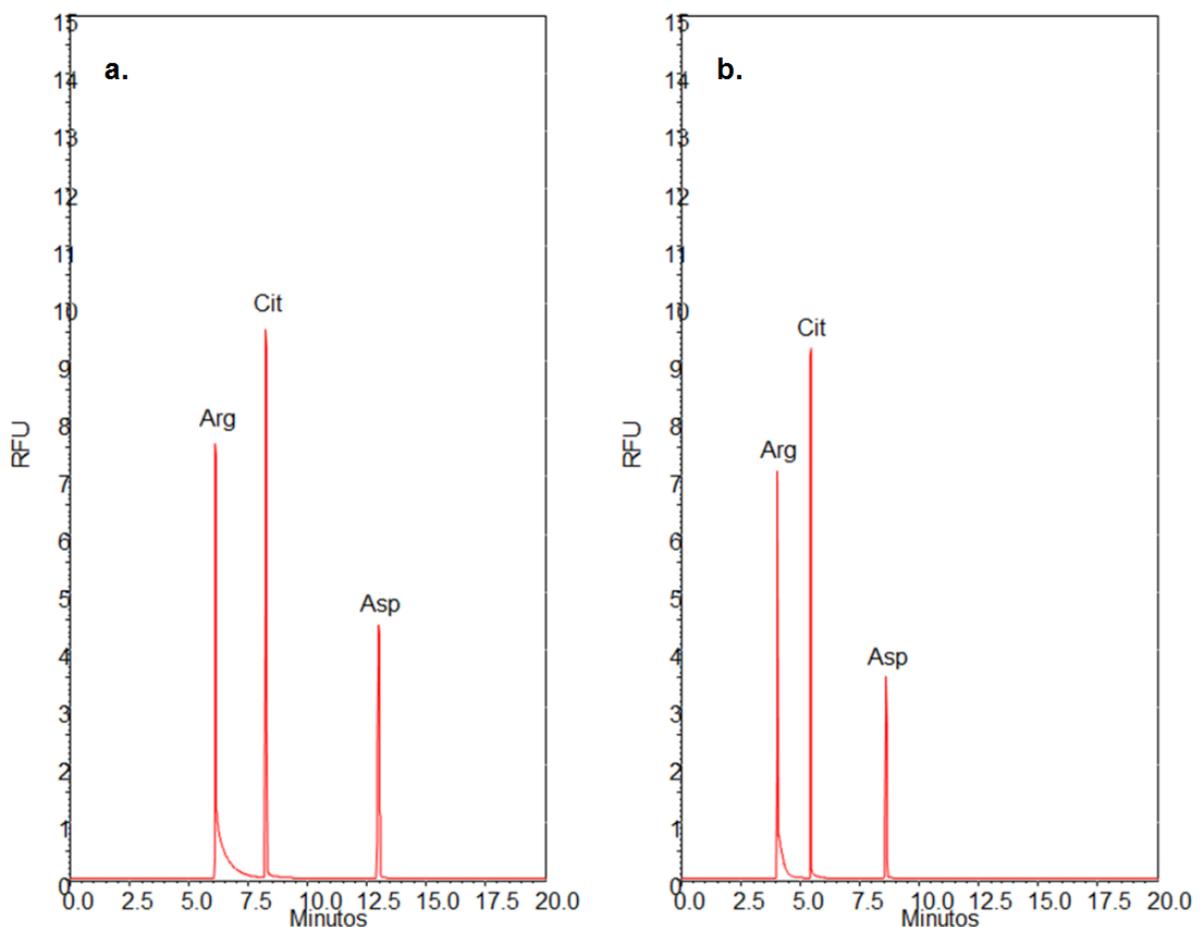


Fonte: Autor, 2016.

4.1.3 Estabilidade dos produtos da derivatização

Uma das grandes limitações ao se utilizar OPA no processo de derivatização, corresponde a grande instabilidade dos derivados fluorescentes formados. Neste caso, avaliou-se a estabilidade dos derivados fluorescentes produzidos com os analitos em presença de NDA/CN. Seguindo o protocolo experimental previamente descrito, constatou-se que após o preparo e a análise de uma amostra contendo os analitos arginina, citrulina e ácido aspártico seja após 30 min ou 2 horas depois da reação de derivatização, obtemos respostas similares, demonstrando que os produtos formados são estáveis por um longo período de tempo (Figura 26).

Figura 26 - Avaliação da estabilidade dos produtos fluorescentes em uma amostra contendo arginina, citrulina e ácido aspártico. Análise realizada após a. 30 min e b. 2 horas após a reação de derivatização.

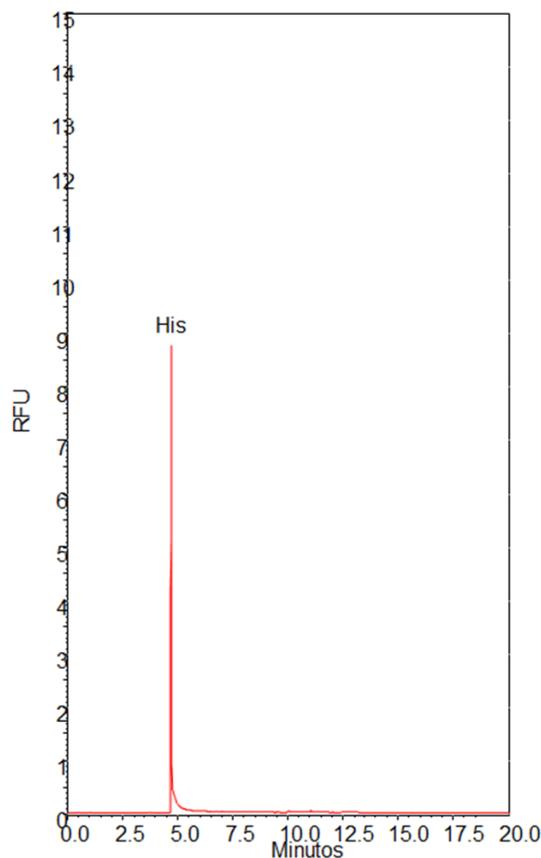


Fonte: Autor, 2016.

4.1.4 Adição da histamina

Após estabelecer um protocolo experimental para realizar a separação dos aminoácidos anteriormente citados, adicionou-se ao sistema a histamina (Figura 27). Deste modo, inicialmente testou-se o método apenas utilizando a histamina, separadamente, no intuito de estabelecer o tempo de migração referente a este aminoácido.

Figura 27 - Eletroferograma da histamina após derivatização com NDA/CN em tampão borato pH 9,2.

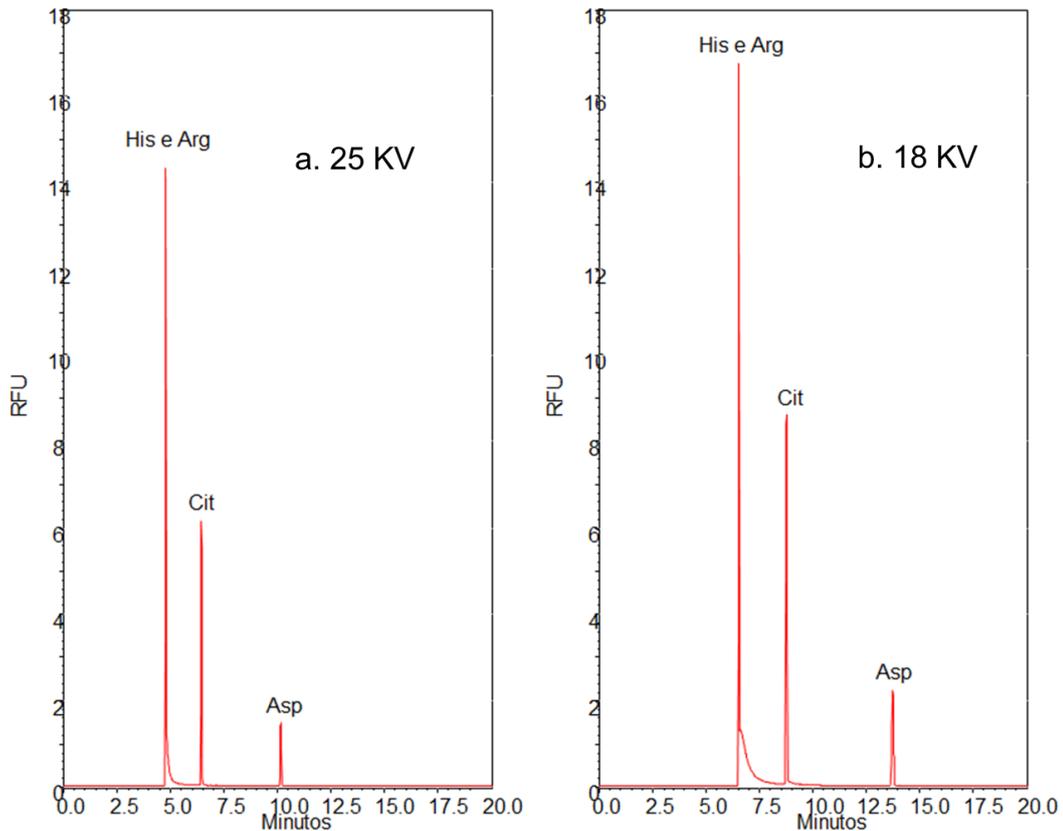


Fonte: Autor, 2016.

É possível constatar no eletroferograma que o pico da histamina apareceu em 4,70 min. Considerando a semelhança entre o pK_a e o tamanho das moléculas da histamina e arginina, além da mesma condição elétrica no pH adotado no processo de derivatização, era esperado que a histamina apresentasse um tempo de migração semelhante a arginina, como foi observado no resultado obtido.

Ao realizar a análise com uma amostra contendo os quatro analitos, observou-se apenas três picos (Figura 28a). Após a realização de análises individuais de cada aminoácido, constatou-se que a histamina e arginina saíram juntas (problema de co-migração). Isso ocorreu devido à elevada similaridade química entre a histamina e arginina, pois mesmo considerando as semelhanças entre estas duas moléculas, como já foi citado no parágrafo anterior, após o processo de derivatização o tamanho relativo dos respectivos produtos fluorescentes são ainda mais semelhantes e ambos adquirem neutralidade elétrica após a ligação com o nitrogênio terminal. Tal resultado evidencia que o método proposto não seria adequado para realizar a separação de todos os analitos. Deste modo, para tentar resolver o problema de co-migração envolvendo a histamina e a arginina, inicialmente, diminuiu-se a voltagem de separação. Ao repetir a análise utilizando uma voltagem de separação de 18 kV, temos que nada mudou em relação ao problema considerado. Respostas semelhantes foram obtidas ao aplicar uma voltagem de 25 kV (Figura 28b). Independente da voltagem aplicada neste método, não houve melhoria significativa na resolução de separação, apenas foram alterados os tempos de migração dos picos obtidos, considerando que quanto menor a voltagem, maior será o tempo de saída dos picos.

Figura 28 - Análise de uma amostra contendo arginina, histamina, citrulina e ácido aspártico em diferentes voltagens de separação: a. 25 kV e b. 18 kV.



Fonte: Autor, 2016.

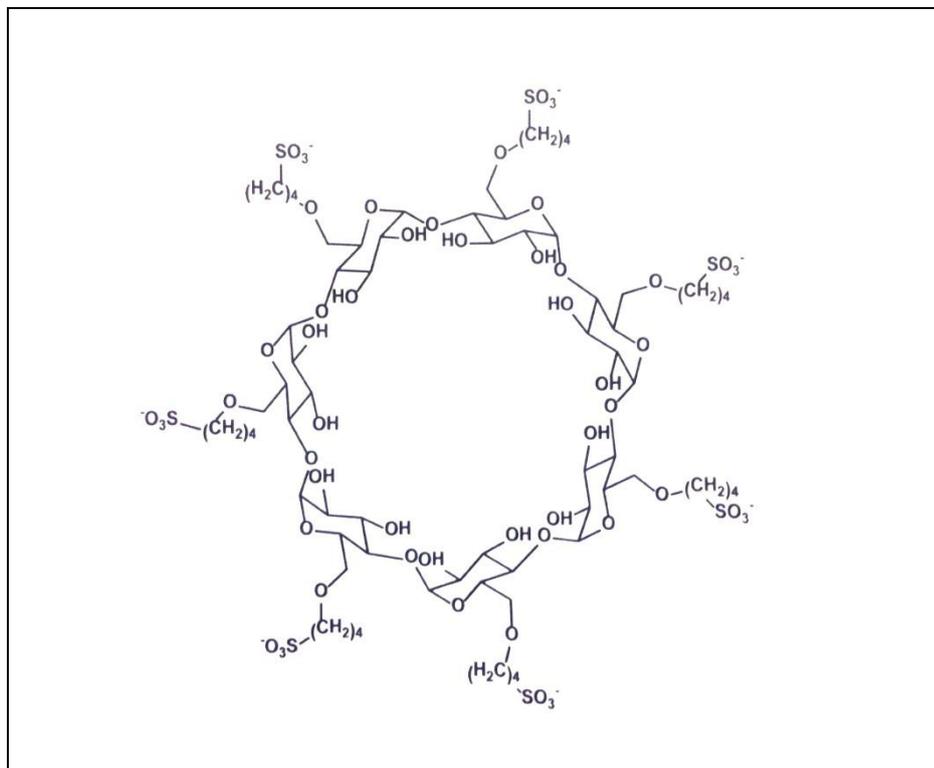
4.1.5 Adição de sulfobutileter β -ciclodextrina (SBE- β -CD) e solvente orgânico (DMSO) no tampão de corrida

Devido a grande semelhança estrutural entre os diferentes aminoácidos avaliados, a obtenção de uma boa resolução na separação destes analitos representa um desafio. Como já foi dito anteriormente, a semelhança entre os analitos torna-se ainda mais acentuada após o processo de derivatização. Neste contexto, foi adicionado ao tampão de corrida o SBE- β -CD, pois acredita-se que este aditivo facilita a separação dos produtos fluorescentes.

Sulfobutileter β -ciclodextrina é uma ciclodextrina modificada contendo grupos sulfonato butil éter ligados (Figura 29). Esta ciclodextrina modificada apresenta interações eletrostáticas e hidrofóbicas, tal como regiões de ligação de hidrogênio e de afinidade baseada no tamanho para a cavidade da ciclodextrina. Esta ciclodextrina modificada pode melhorar a resolução de separação mediante dois

mecanismos. Primeiro, o anel dos produtos CBI é parcialmente acomodado dentro da cavidade hidrofóbica da ciclodextrina. Segundo, desde que SBE- β -CD é aniônica e tem uma mobilidade eletroforética negativa, a migração das espécies derivatizadas é retardada devido a interação eletrostática dos analitos com o anel da ciclodextrina (STOBAUGH et al., 1994).

Figura 29 - Estrutura da sulfobutileter β -ciclodextrina.



Fonte: Autor, 2016.

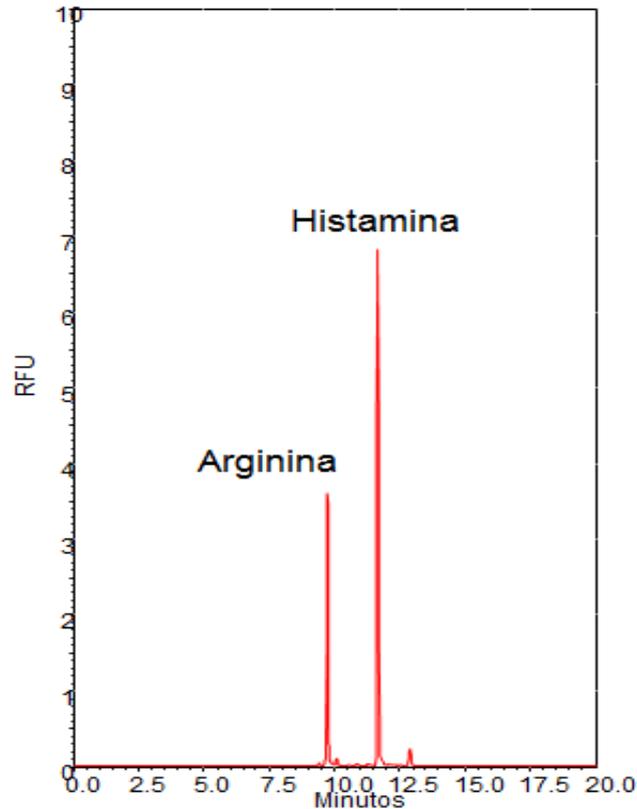
A adição de um solvente orgânico é bastante comum em EC, destacando-se a utilização frequente do metanol e da acetonitrila. Trabalhos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa na Universidade de Kansas (LINZ; LUNTE, 2014), mostraram que a adição de DMSO no tampão de corrida produziu significativa melhoria na resolução de separação das espécies químicas de interesse em uma amostra biológica. Isso foi observado, devido à elevada viscosidade do DMSO quando comparado com a água. Acredita-se que uma maior viscosidade do sistema provoca uma maior resistência para os analitos passarem pelo capilar, melhorando a

eficiência da separação. Além disso, a presença do DMSO provoca uma mudança na solvatação dos íons, acarretando variação nos valores de pK_a das espécies envolvidas.

Ao realizar análises de amostras contendo apenas histamina e arginina (aminoácidos envolvidos com o problema de co-eluição) usando SBE- β -CD nas concentrações de 10 e 5 mmolL⁻¹ e 25% v/v de DMSO, não foi obtido nenhum pico em um tempo total de análise de 20 min. Tal resultado foi obtido, provavelmente, devido a elevada resistência do eletrólito e a elevada concentração da ciclodextrina modificada, fazendo com que os analitos ficassem “presos” no capilar. Deste modo, avaliou-se a mesma amostra utilizando SBE- β -CD em uma concentração de 1,4 mmolL⁻¹ e DMSO 4% (v/v).

Como pôde ser observada no eletroferograma a seguir (Figura 30), a adição de SBE- β -CD e DMSO nas condições anteriormente mencionadas, resolveu o problema de co-migração, sendo observada uma boa separação entre os picos da arginina e histamina.

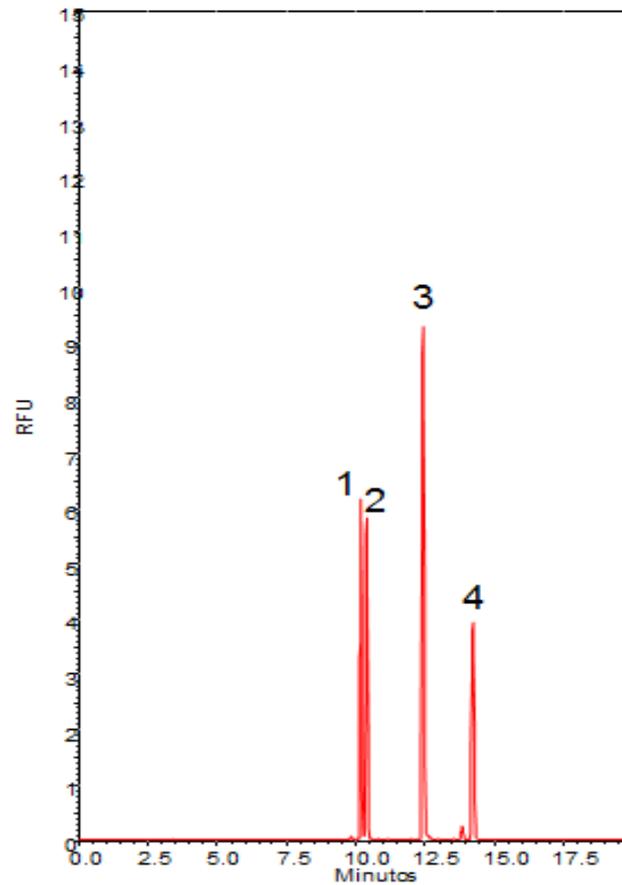
Figura 30 - Eletroferograma de uma solução contendo arginina e histamina utilizando SBE- β -CD 1,4 mmolL⁻¹ e DMSO 4% (v/v) em tampão borato 20 mmolL⁻¹.



Fonte: Autor, 2016.

Após resolver o problema de co-eluição, uma amostra contendo arginina, histamina, citrulina e ácido aspártico foi avaliada utilizando a mesma condição experimental citada anteriormente. A partir da Figura 31 é possível constatar a separação dos aminoácidos em menos de 15 minutos. A ordem de saída dos picos foi arginina (10,2 min), citrulina (10,4 min), histamina (12,4 min) e ácido aspártico (14,2 min). Este resultado está condizente com o fundamento teórico da técnica, visto que as espécies pequenas carregadas positivamente saem do capilar com mais facilidade.

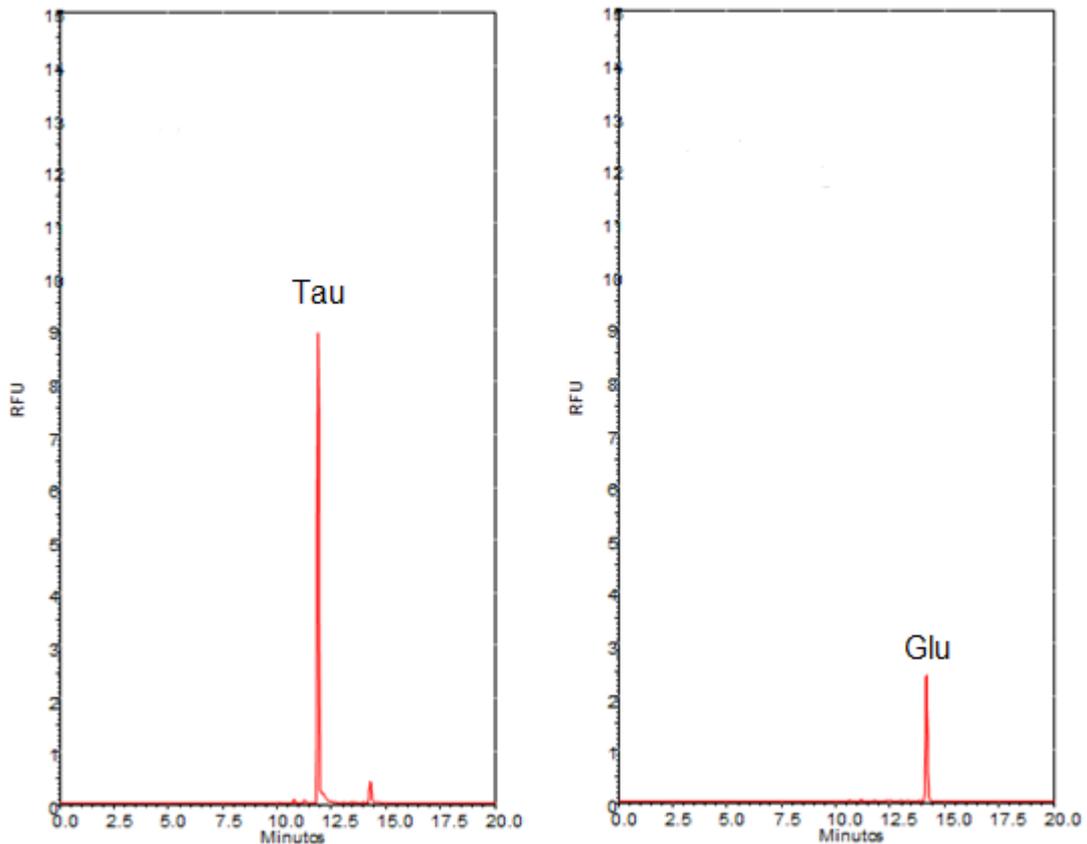
Figura 31 - Eletroferograma de uma solução contendo arginina (1), citrulina (2), histamina (3) e ácido aspártico (4) utilizando SBE- β -CD $1,4 \text{ mmolL}^{-1}$ e DMSO 4% (v/v) em tampão borato 20 mmolL^{-1} .



Fonte: Autor, 2016.

Com o método otimizado, adicionou-se mais dois analitos: taurina e ácido glutâmico. Inicialmente, análises foram conduzidas com cada aminoácido separadamente com o intuito de determinar o tempo de migração destes analitos. A Figura 32 mostra que os picos da taurina e do ácido glutâmico apareceram em 11,9 e 14,2 min, respectivamente.

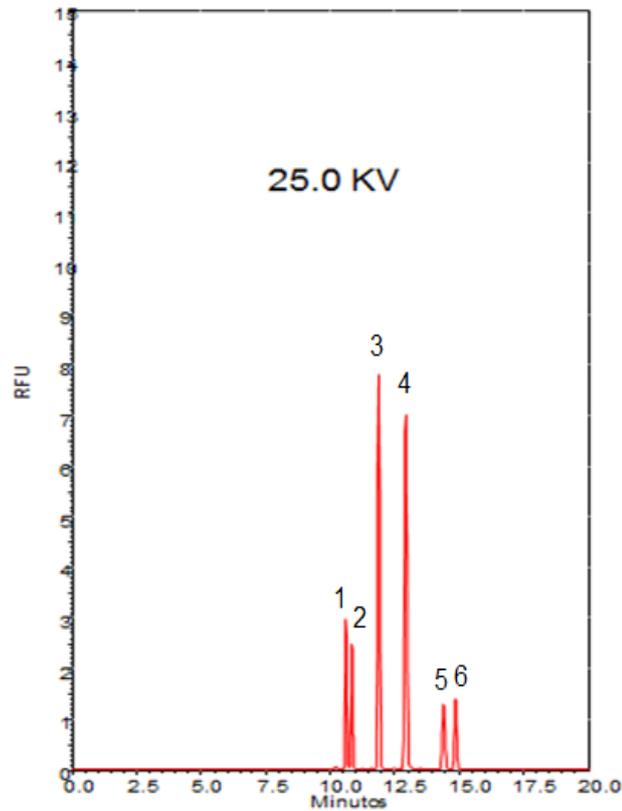
Figura 32 - Eletroferogramas da taurina e ácido glutâmico, respectivamente.



Fonte: Autor, 2016.

Ao definir o tempo de migração do pico da taurina e do pico do ácido glutâmico, uma amostra contendo todos os analitos foi analisada seguindo o procedimento descrito na parte experimental. O eletroferograma (Figura 33) mostrou uma boa separação dos aminoácidos. Para realizar a identificação dos picos, cada aminoácido foi avaliado isoladamente, mostrando que a ordem de saída dos analitos foi: arginina (10,6 min), citrulina (10,8 min), taurina (11,8 min), histamina (12,9 min), ácido glutâmico (14,4 min) e ácido aspártico (14,8 min). A ordem de saída dos analitos foi baseada no tamanho e nas cargas presentes nas estruturas dos produtos fluorescentes. Deste modo, espécies menores chegam ao detector mais rapidamente e, conseqüentemente, as espécies mais volumosas apresentaram os maiores tempos de migração.

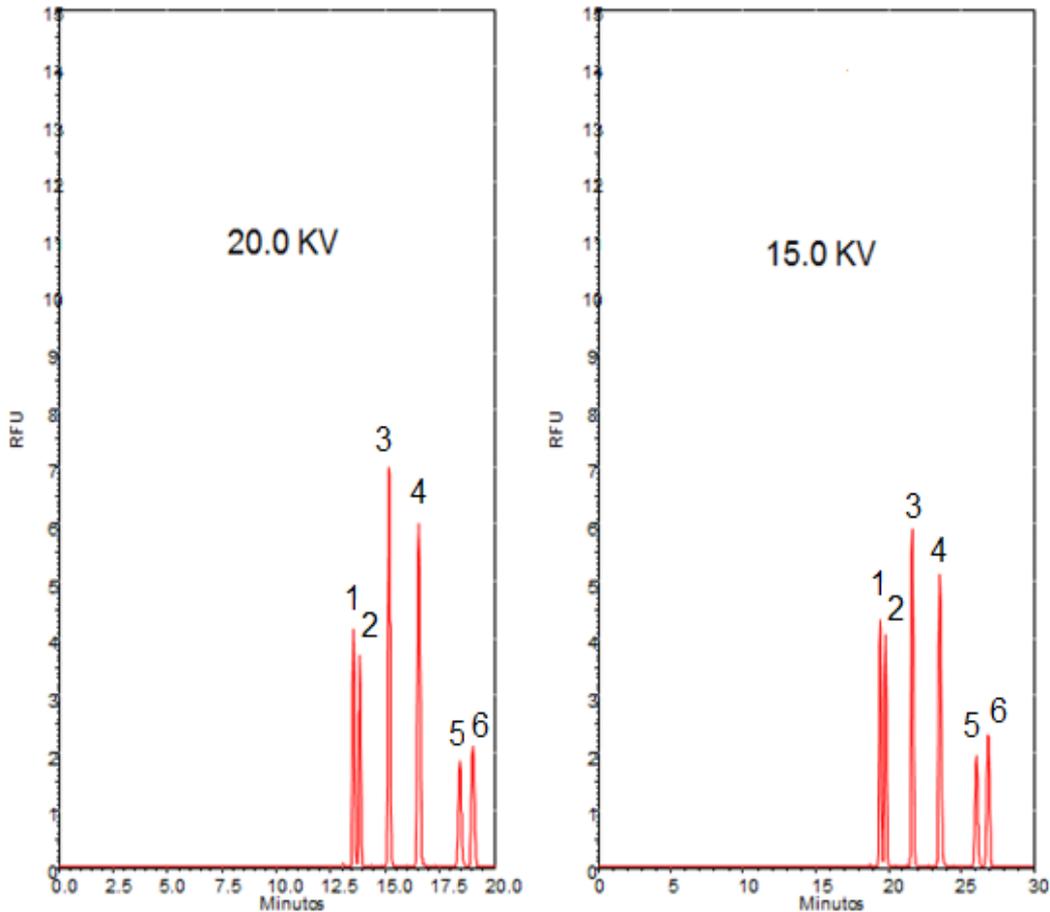
Figura 33 - Eletroferograma dos aminoácidos após derivatização com NDA/CN em presença de SBE- β -CD e DMSO. A voltagem de separação aplicada foi de 25,0 kV. Picos: arginina (1), citrulina (2), taurina (3), histamina (4), ácido glutâmico (5) e ácido aspártico (6).



Fonte: Autor, 2016.

Entretanto, pôde ser observado no eletroferograma que os dois primeiros picos saíram quase ao mesmo tempo. No intuito de melhorar a resolução do sistema, diminuiu-se a voltagem de separação. Neste caso, a mesma amostra foi analisada em diferentes voltagens de separação, 20 e 15 kV, respectivamente (Figura 34). Como pode ser notado, o decréscimo da voltagem não melhorou a resolução de separação do sistema.

Figura 34 - Eletroferogramas da mistura dos aminoácidos após derivatização com NDA/CN em presença de SBE- β -CD e DMSO. As voltagens de separação aplicadas foram de 20 e 15 kV.



Fonte: Autor, 2016.

Tal comportamento pode ser mais bem visualizado na Tabela 1. Neste caso, ao se calcular o número de pratos teóricos e a resolução entre os picos dos analitos, temos que os números de pratos teóricos tal como a resolução (com a exceção do pico da citrulina) foram maiores ao se aplicar a voltagem de separação de 25 kV. Considerando os tempos de migração, a aplicação da voltagem de 25 kV promoveu uma diminuição significativa do tempo de análise dos aminoácidos em comparação com as demais voltagens trabalhadas.

Tabela 1 – Comparação do efeito da voltagem na separação dos analitos investigados.

	Números de pratos (N)			Resolução (Rs)			tm (min)		
	15 kV	20 kV	25 kV	15 kV	20 kV	25 kV	15 kV	20 kV	25 kV
Arg	69278	97161	106266	-	-	-	18,74	13,53	10,60
Cit	95678	92301	101945	3,94	1,61	1,67	19,81	13,81	10,82
Tau	92597	88612	101344	6,87	6,97	7,28	21,66	15,15	11,85
His	86201	80253	91308	6,30	6,25	6,60	23,56	16,52	12,91
Glu	80429	78471	85826	7,29	7,63	8,04	26,07	18,40	14,38
Asp	88691	83935	100426	2,27	2,33	2,40	26,89	19,01	14,84

Fonte: Autor, 2016.

Visando a obtenção de melhores parâmetros analíticos, aumentou-se a quantidade de solvente orgânico para melhorar a resolução de separação. No entanto, observou-se a quantidade mínima necessária de DMSO para promover uma separação satisfatória entre os dois primeiros picos, visto que, o aumento da concentração de DMSO acarreta em análises mais longas.

Ao adicionar 7 e 10% (v/v) de DMSO no tampão de corrida e mantendo-se a concentração de SBE- β -CD constante ($1,4 \text{ mmolL}^{-1}$), foi possível constatar uma melhoria significativa no número de pratos teóricos e resolução do sistema (Tabela 2). Como já foi mencionado, ao aumentar o teor de DMSO no tampão de corrida, aumenta-se a viscosidade dentro do capilar, fazendo com que a passagem dos analitos pelo capilar seja mais dificultada, provocando um aumento na eficiência de separação e, conseqüentemente, um aumento no tempo de migração dos componentes da amostra. Como esperado, o tempo total de análise aumentou à medida que foi adicionado uma quantidade superior do solvente orgânico, no entanto, o aumento nos tempos de migração dos analitos não foi drástico. Deste modo, podemos concluir que a quantidade de solvente orgânico possui grande influência na separação dos aminoácidos.

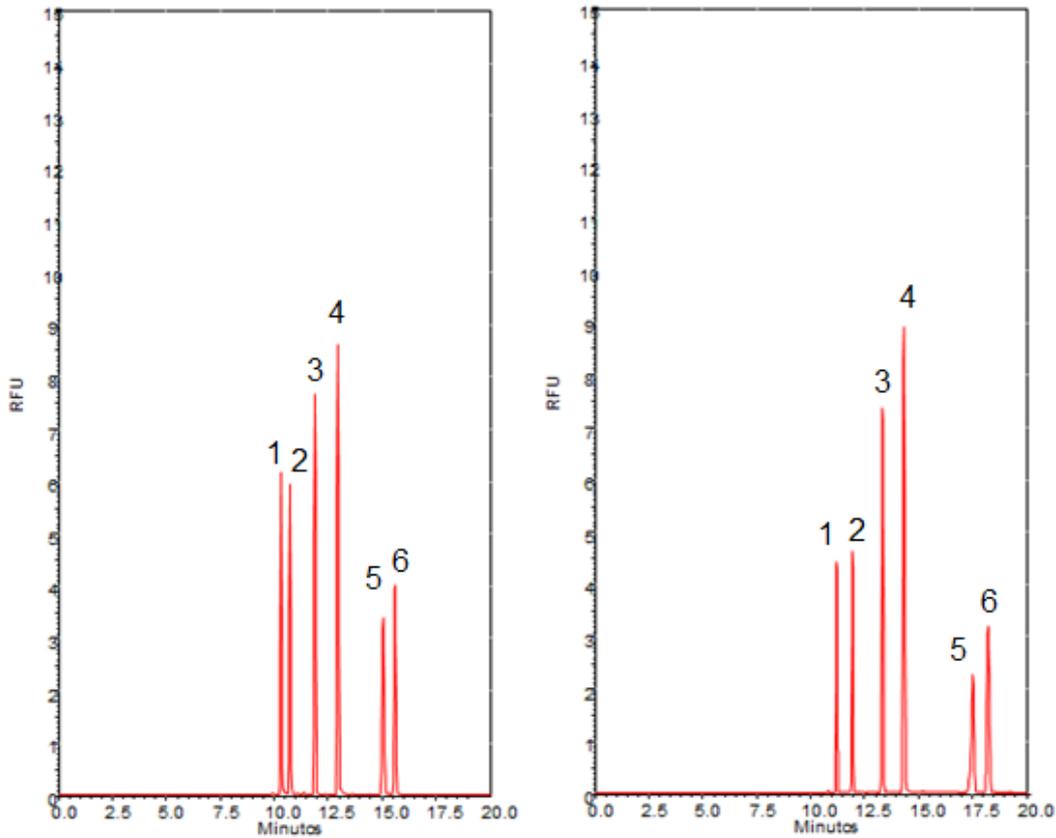
Tabela 2 - Comparação do efeito da quantidade de solvente orgânico (DMSO) no tampão de corrida para a separação dos aminoácidos. A voltagem aplicada foi de 25 kV.

	Número de pratos (N)			Resolução (Rs)			tm (min)		
	4%	7%	10%	4%	7%	10%	4%	7%	10%
Arg	106266	146197	132899	-	-	-	10,60	10,95	11,20
Cit	101945	131768	134469	1,67	3,33	5,76	10,82	11,35	11,92
Tau	101344	110089	132840	7,28	8,78	10,13	11,85	12,56	13,32
His	91308	130631	126032	6,60	7,65	6,39	12,91	13,72	14,30
Glu	85826	82405	118236	8,04	11,37	17,64	14,38	15,83	16,22
Asp	100426	123995	119744	2,40	2,78	3,46	14,84	16,39	17,50

Fonte: Autor, 2016.

Como pôde ser constatado no eletroferograma (Figura 35), em geral, a adição de DMSO 10% (v/v) promoveu uma melhor separação dos aminoácidos. Com isso, a otimização do método foi realizada considerando que a melhor voltagem de separação foi de 25 kV e a quantidade ótima de DMSO no tampão de corrida foi de 10% (v/v). Assim, o tampão de corrida foi composto por tampão borato (20 mmolL^{-1} e $\text{pH} = 9,2$), SBE- β -CD ($1,4 \text{ mmolL}^{-1}$) e DMSO 10% (v/v). A ordem de saída dos analitos (1. arginina; 2. citrulina; 3. taurina; 4. histamina; 5. ácido glutâmico e 6. ácido aspártico) não foi alterada mediante as alterações realizadas no processo de otimização do método.

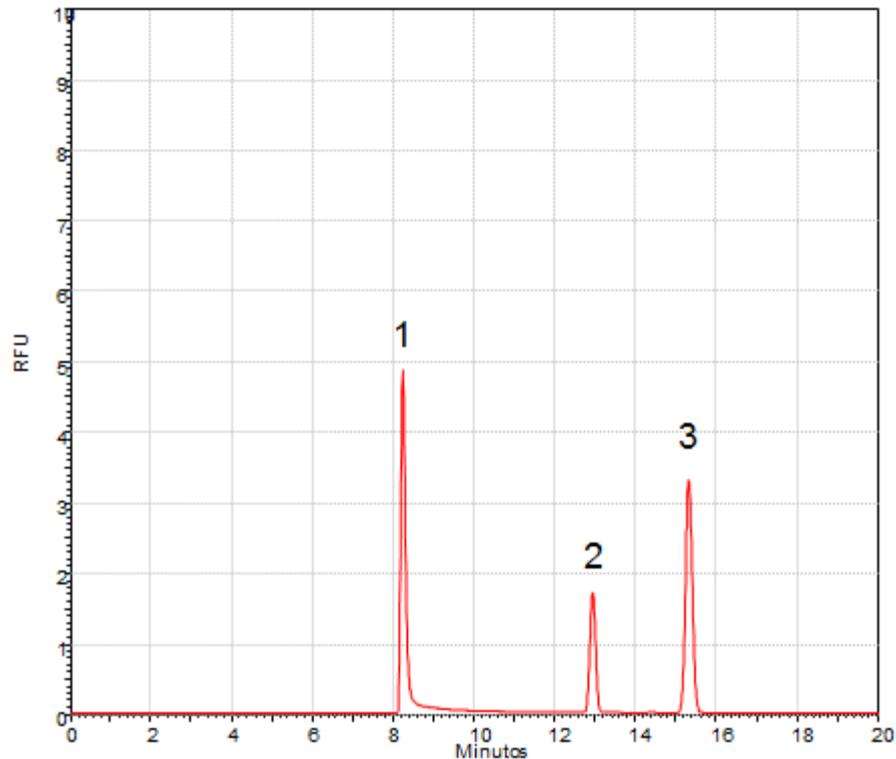
Figura 35 - Eletroferogramas dos aminoácidos após derivatização com NDA/CN em presença de SBE- β -CD 1,4 mmolL⁻¹ e DMSO 7 e 10% (v/v), respectivamente.



Fonte: Autor, 2016.

Para avaliar a influência do SBE- β -CD na separação dos aminoácidos, investigou-se uma amostra contendo todos os seis analitos, no qual, o tampão de corrida foi composto apenas pelo tampão borato e DMSO (condições otimizadas). O eletroferograma mostrou apenas três picos (Figura 36), evidenciando que apenas o aumento da viscosidade do sistema, devido a adição do DMSO não foi o suficiente para promover a completa separação dos aminoácidos. Isto é, a melhoria da resolução de separação obtida, sobretudo, foi decorrente da adição da ciclodextrina modificada.

Figura 36 - Eletroferograma dos aminoácidos após derivatização com NDA/CN em presença de DMSO 7% (v/v).



Fonte: Autor, 2016.

4.2 Validação do método EC-LIF

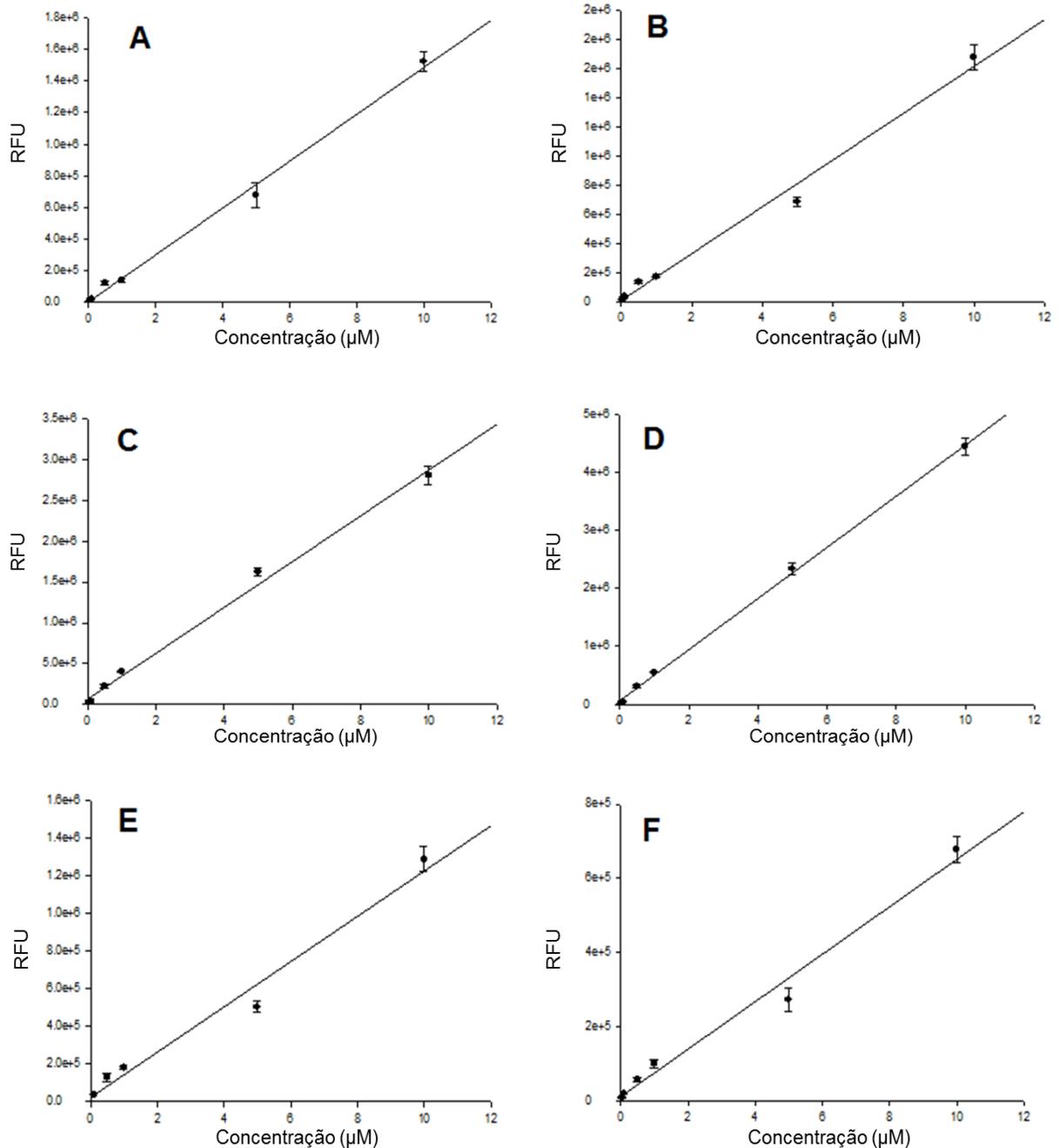
A validação do método foi realizada conforme as condições ótimas de separação dos analitos. Curvas analíticas foram construídas para cada aminoácido utilizando seus respectivos padrões em meio aquoso (Figura 37).

Os resultados finais dos parâmetros analíticos estão resumidos na Tabela 3. De acordo com os dados obtidos, temos que o método apresentou boa linearidade e baixo desvio padrão relativo para os aminoácidos investigados. Além disso, os limites de detecção e quantificação foram significativamente menores do que as concentrações medidas em amostras de microdiálise, pois em amostras de microdiálise as concentrações dos aminoácidos investigados variam em torno de 0,6 à 22 μmolL^{-1} (BENVENISTE, 1989; BOCKELMANN, REISER, HORN, WOLF, 2000). Os limites de detecção foram determinados experimentalmente para cada analito e o valor obtido foi 0,05 μmolL^{-1} para a maioria deles, com exceção do ácido glutâmico

que apresentou um limite de detecção superior de $0,25 \mu\text{molL}^{-1}$, isto é, 5 vezes maior em relação aos outros aminoácidos.

Um dos maiores problemas ao realizar a curva analítica a partir deste método foi à variação do tempo de migração dos analitos em determinadas ocasiões. O desvio nos tempos de migração pode ocorrer de acordo com as condições dinâmicas nas quais o equipamento de EC é operado. Se ocorre adsorção dos analitos na parede do capilar ou se a força iônica do tampão de corrida varia, isso pode afetar a migração dos analitos através do capilar. No entanto, apesar da variabilidade nos tempos de migração que ocorreram durante a execução das análises, a precisão das áreas dos picos foi elevada, e tal fator permitiu a quantificação confiável dos analitos.

Figura 37 - Curvas analíticas (n= 5) dos aminoácidos avaliados. A) Arginina, B) Citrulina, C) Taurina, D) Histamina, E) Ácido glutâmico e F) Ácido Aspártico.



Fonte: Autor, 2016.

As equações da reta foram $y = 148418x + 5818,9$; $y = 160694x + 6799,1$; $y = 280364x + 73214$; $y = 441968x + 54707$; $y = 119981x + 28384$ e $y = 64020x + 11158$,

para a arginina, citrulina, taurina, histamina, ácido glutâmico e ácido aspártico, respectivamente.

Tabela 3 - Parâmetros de validação para os padrões dos aminoácidos investigados.

	Arg	Cit	Tau	His	Glu	Asp
Faixa de trabalho (μmolL^{-1})	10-0,05	10-0,05	10-0,05	10-0,05	10-0,1	10-0,05
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9956	0,9897	0,9940	0,9990	0,9792	0,9854
Precisão intra-dia (%RSD, n = 3, 1 μmolL^{-1})	5,11	2,99	1,18	6,91	6,25	5,57
Precisão inter-dias (%RSD, n = 3, 10 μmolL^{-1})	3,99	5,07	3,99	3,16	5,16	5,16
Limites de detecção (S/N = 3, μmolL^{-1})	0,025	0,025	0,025	0,025	0,05	0,025
Limites de quantificação (S/N = 10, μmolL^{-1})	0,05	0,05	0,05	0,05	0,1	0,05

Fonte: Autor, 2016.

4.3 Análise de amostras de microdiálise

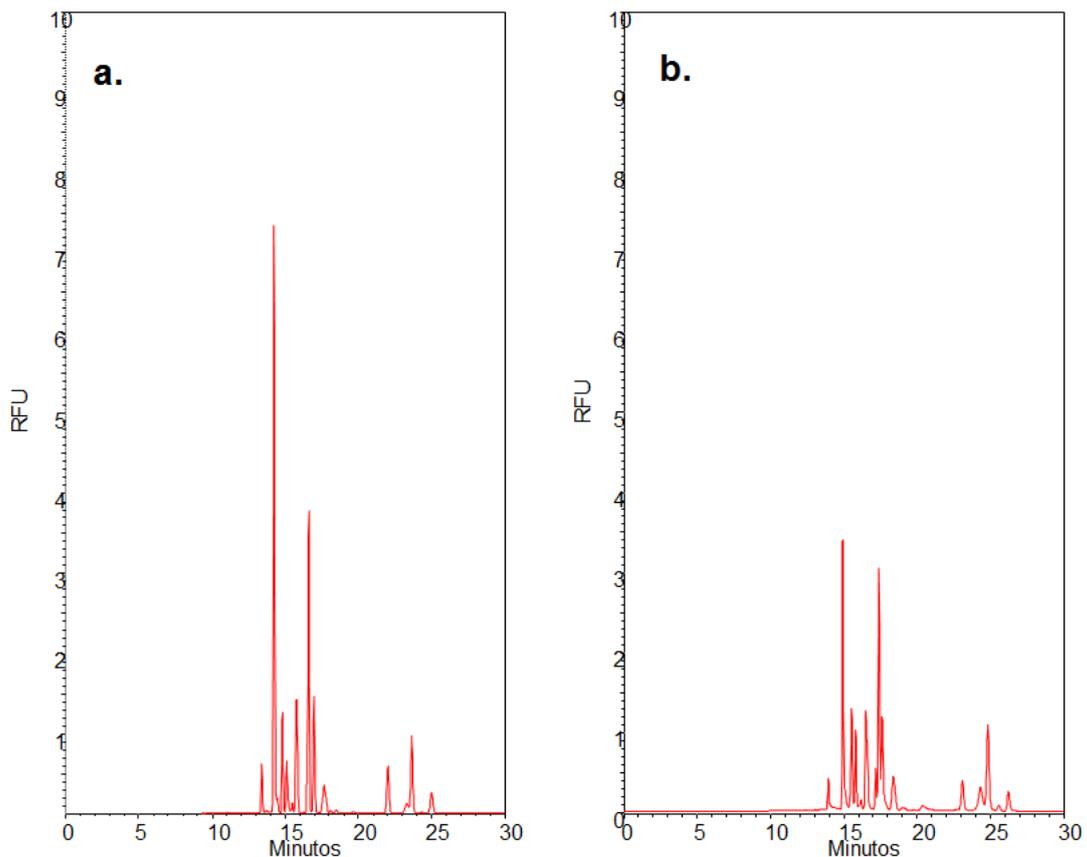
Microdiálise é uma técnica de amostragem que permite o monitoramento contínuo de espécies de importância biológica com alto poder de resolução, seja o monitoramento realizado *in vivo* ou *in vitro*. Este processo de amostragem funciona utilizando uma sonda, no qual tal sonda apresenta uma membrana de diálise com poros com tamanhos específicos para um determinado grupo de substâncias com massas moleculares similares. Em seguida, esta sonda é implantada na região de interesse, em nosso caso, no cérebro, onde ocorre a coleta da amostra por meio da sonda. Estas sondas agem de um modo semelhante aos vasos sanguíneos, permitindo que as substâncias de interesse sejam removidas ou entregues a um local específico através de difusão, sem perda de fluido líquido.

A obtenção dos aminoácidos de interesse para este estudo, ocorreu através da perfusão utilizando uma solução de LCA, pois esta solução apresenta uma composição e força iônica similar ao fluido extracelular a ser amostrado. Sendo assim, pequenas moléculas que não estavam presente na solução de LCA foram transportadas para o coletor a partir de um gradiente de concentração.

Conforme descrito no procedimento experimental, foram analisadas amostras de microdiálise com diferentes períodos de armazenamento com o intuito de avaliar a estabilidade das mesmas. Ao realizar a análise com a amostra real após 1 mês e 3

meses de armazenamento (Figura 38), podemos observar que o eletroferograma apresenta a mesma quantidade de picos, entretanto, a amostra mais velha apresentou picos menores, indicando que ao decorrer do tempo os componentes da amostra se encontram em um estado de progressiva degradação.

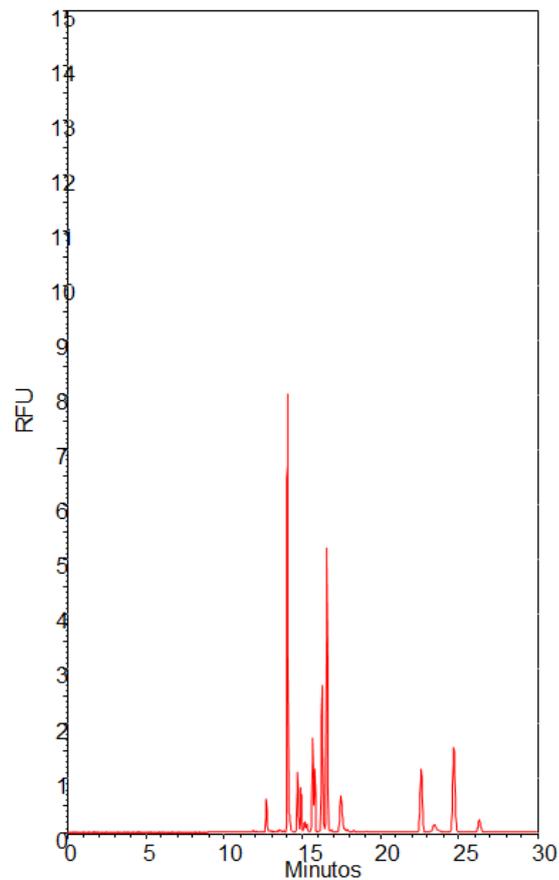
Figura 38 - Estudo comparativo envolvendo amostras de microdiálise variando entre a. 1 a b. 3 meses de armazenamento, respectivamente.



Fonte: Autor, 2016.

Entretanto, ao comparar o eletroferograma de uma amostra de microdiálise armazenada por um mês com o eletroferograma de uma amostra de microdiálise armazenada por apenas 2 dias (Figura 39), é possível notar que ambas apresentaram eletroferogramas bastante similares, considerando a área e o número de picos. Deste modo, pode-se concluir que a amostra de microdiálise é estável dentro de um intervalo de um mês após o procedimento cirúrgico.

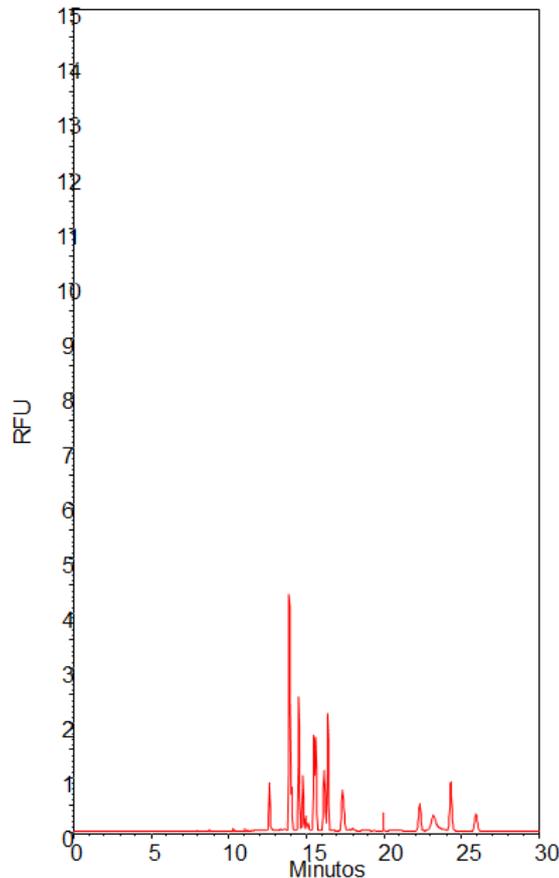
Figura 39 - Eletroferograma da amostra de microdiálise 2 dias após a cirurgia.



Fonte: Autor, 2016.

Em seguida, uma amostra armazenada por uma semana foi investigada utilizando o mesmo procedimento experimental empregado para analisar as amostras reais anteriores. Entretanto, testou-se a aplicação de um volume menor da amostra de microdiálise (metade do volume anteriormente utilizado), visando uma aplicação mais consciente da amostra real, visto que durante a cirurgia, para a obtenção da amostra de microdiálise, coleta-se apenas 60 μL da amostra em um intervalo de tempo de 1 h. Ao empregar 20 μL da amostra real, nota-se que ainda é possível obter um eletroferograma com picos bem definidos (Figura 40), sendo assim, pode-se afirmar que a aplicação de uma quantidade menor da amostra real pode ser utilizada sem afetar o estudo em questão.

Figura 40 - Eletroferograma da amostra de microdiálise 7 dias após a cirurgia. Neste caso, foi utilizado a metade do volume da amostra real em relação as amostras anteriormente investigadas.



Fonte: Autor, 2016.

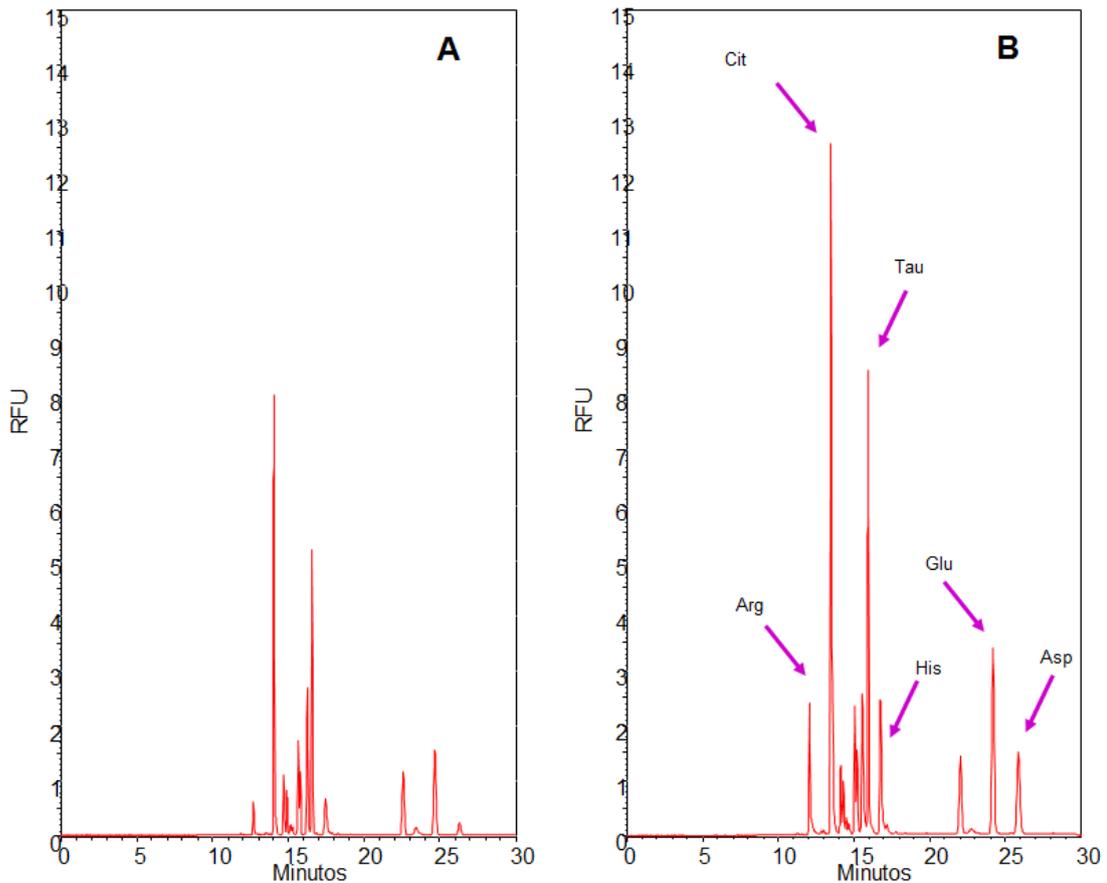
4.4 Quantificação dos analitos na amostra de microdiálise e estudo de recuperação

De acordo com os tempos de migração e a variação da altura do pico, todos os analitos foram identificados na amostra real (Figura 41). Neste procedimento, os aminoácidos foram adicionados um por um, repetindo-se três vezes a análise após cada adição, até a completa adição dos seis analitos.

Após a identificação dos picos, determinou-se a concentração dos analitos em todas as amostras de microdiálise mediante a aplicação das curvas analíticas (Tabela 4). Como pode ser constatada, a variação em termos de concentração entre as amostras mais recente e a mais antiga não foi muito grande, sendo que, quatro analitos apresentaram uma concentração inferior após um longo período de

armazenamento (após um mês). No caso da histamina, não possível realizar a sua quantificação na amostra antiga.

Figura 41 - Estudo de identificação dos analitos na amostra real. A) Eletroferograma da amostra de microdiálise (2 dias armazenada) e B) Eletroferograma referente a adição de $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ dos padrões dos aminoácidos investigados na amostra real.



Fonte: Autor, 2016.

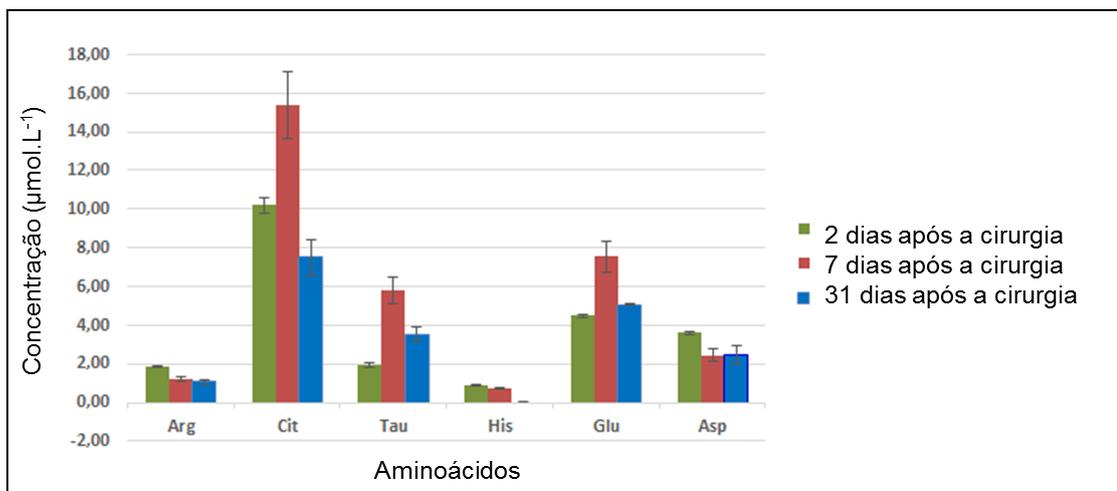
Tabela 4 - Concentrações dos aminoácidos investigados nas amostras de microdiálise.

Amostras de microdiálise – Concentrações dos analitos ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) em diferentes períodos de armazenamento			
	2 dias	7 dias	31 dias
Arg	1,84	1,20	1,07
Cit	10,20	15,39	7,49
Tau	1,95	5,77	3,53
His	0,87	0,73	-
Glu	4,50	7,54	5,07
Asp	3,59	2,45	2,47

Fonte: Autor, 2015.

O comportamento da concentração dos analitos nas amostras de microdiálise pode ser mais bem visualizado na Figura 42. Temos que a citrulina e o ácido glutâmico apresentam as maiores variações de concentração considerando as diferentes amostras, possivelmente, devido ao maior teor destes analitos. A arginina e a histamina apresentaram uma diminuição progressiva das suas respectivas concentrações em função do tempo. Em contrapartida, a concentração do ácido aspártico se manteve praticamente constante ao decorrer do tempo.

Figura 42 – Concentrações dos aminoácidos nas amostras de microdiálise. Uma relação entre a concentração e o período de armazenamento da amostra.



Fonte: Autor, 2016.

Por fim, as informações dos resultados obtidos para a identificação dos analitos na amostra de microdiálise foram utilizadas para realizar o estudo de recuperação. Houve certa dificuldade para a realização deste estudo, devido a própria limitação da técnica relacionada a uma baixa reprodutibilidade do sinal dos picos dos analitos. Deste modo, o ácido glutâmico e o ácido aspártico apresentaram elevados valores de desvio padrão relativo (sd) e coeficiente de variação (RSD) neste procedimento experimental (Tabela 5), ao comparar tais valores com os dados obtidos para os demais analitos. De acordo com os resultados, pode-se afirmar que tal método apresentou uma recuperação satisfatória (valores maiores que 95%) para a citrulina e o ácido glutâmico.

Tabela 5 - Estudo de recuperação dos analitos.

Analitos	Recuperação (%)	sd	RSD
Arg	70,2	0,70	0,98
Cit	97,6	2,46	2,01
Tau	77,7	1,21	1,02
His	89,1	0,85	0,77
Glu	96,3	6,97	4,85
Asp	83,1	6,49	4,61

Fonte: Autor, 2016.

4.5 Microchip eletroforético com detecção por fluorescência (ME-LIF)

4.5.1 Processo de microfabricação e operação do microchip de vidro

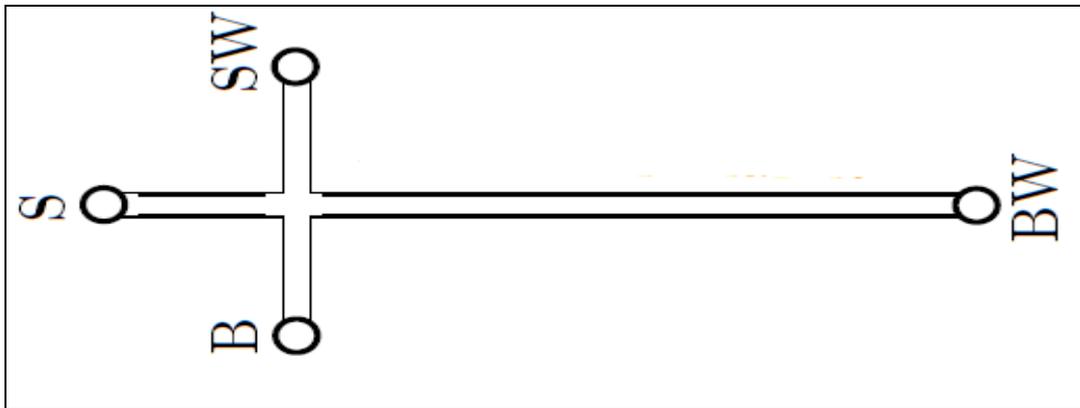
Em geral, para realizar separações utilizando microchips, o vidro é um material ideal para o processo de fabricação destes, pois o vidro apresenta propriedades superficiais bastante similares à sílica fundida, no qual é o material utilizado para separações utilizando o sistema convencional de eletroforese capilar. Os microchips de vidro oferecem uma estável e renovável superfície no qual torna possível a obtenção de dados com bons parâmetros de precisão e um longo tempo de vida útil destes dispositivos. Entretanto, os microchips de vidro apresenta um processo de microfabricação complexo ao ser comparado com o processo de microfabricação de microchips utilizando determinados polímeros como o polidimetilsiloxano (PDMS) e o polimetil-metacrilato (PMMA). Além disso, o custo para a microfabricação destes microchips de vidro é considerado elevado e não é

possível realizar a produção de vários dispositivos em uma única vez, como acontece com os microchips de PMDS, por exemplo.

Cada chip de vidro deve ser produzido individualmente, o que acarreta em um longo período de microfabricação, sendo este o principal motivo pelo qual os microchips de PDMS são ainda os mais utilizados na maioria das aplicações envolvendo microchips. Entretanto, se uma determinada separação precisa ser efetuada com elevada precisão e elevado nível de confiabilidade analítica, o vidro ainda representa a melhor opção para ser o material aplicado para a confecção de tais dispositivos. Além disso, uma vez que o microchip de vidro está pronto, o procedimento experimental para a sua utilização é relativamente mais simples do que os microchips de PDMS que não podem ser utilizado continuamente por vários dias. Deste modo, levando em consideração as vantagens e desvantagens associadas aos microchips de vidro, o vidro foi escolhido como o melhor material a ser utilizado neste estudo.

Usualmente, o design dos microchips eletroforéticos é produzido no formato de “T” (Figura 43). Entretanto, para o estudo proposto, adotou-se um design alternativo, conforme já apresentado na Figura anterior, onde o canal de separação apresentou uma serpentina de 15 cm, fazendo-se necessário que cada analito percorra um caminho mais longo para alcançar o detector. Isso se fez necessário, devido a semelhança estrutural dos analitos envolvidos na análise, como já foi discutido. Com um canal de separação mais longo do que o usual foi possível separar adequadamente todos os analitos, o que não seria possível com o design T devido ao curto período de interação dos analitos com a parede carregada do microcanal.

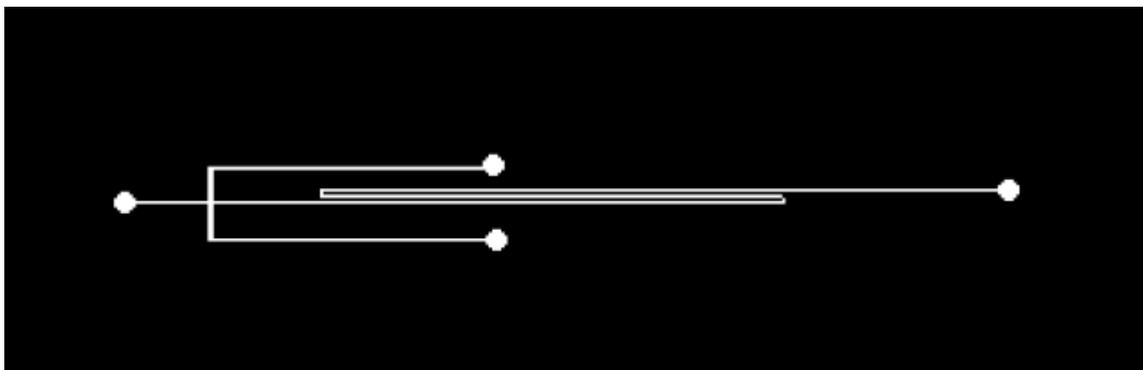
Figura 43 – Design característico de um microchip eletroforético (formato de “T”). S refere-se à amostra (*sample*), B o tampão (*buffer*), SW o resíduo da amostra (*sample waste*) e BW refere-se ao resíduo do tampão (*buffer waste*).



Fonte: Autor, 2016.

Outro fator relevante na elaboração do design do microchip utilizado neste estudo é a posição dos reservatórios laterais (B e SW). Geralmente, os reservatórios laterais são dispostos alinhados, ficando relativamente próximos um do outro (Figura 44). No entanto, testes iniciais indicaram que ao se aplicar elevadas voltagens para realizar a separação dos analitos, observou-se uma descontínua descarga elétrica entre o eletrodo do tampão e o eletrodo do resíduo da amostra, aumentando o ruído da análise. Deste modo, como demonstrado anteriormente, os reservatórios laterais foram dispostos distantes um do outro, evitando qualquer problema de descarga elétrica ao aplicar elevadas voltagens de separação.

Figura 44 – Design do microchip com os reservatórios laterais alinhados.



Fonte: Autor, 2016.

Antes de cada análise, o microchip passou por um processo de condicionamento. O condicionamento é uma etapa fundamental para o bom funcionamento do microchip, pois, nesta etapa verifica-se a existência de qualquer partícula sólida no interior dos microcanais que pode causar entupimentos e efetua-se a remoção de eventuais resíduos de qualquer substância que foi utilizada em análises anteriores e, que porventura não foi removida durante o processo de limpeza ao final do procedimento experimental anterior. Além disso, a adição da base promove a formação de cargas negativas nas paredes do canal de separação, fator este necessário para gerar o fluxo eletrosmótico além da aplicação do potencial elétrico (SEGATO; SILVA; JARDIM, 2009).

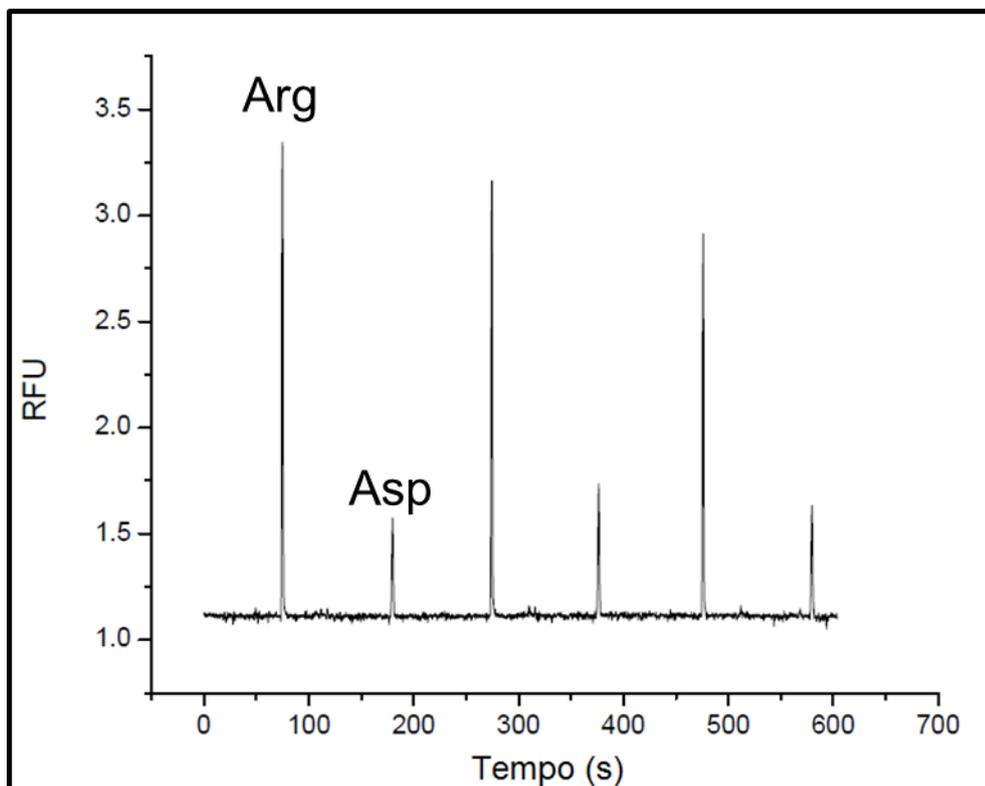
Ao iniciar as análises, um dos principais problemas encontrados foi a variação constante do tempo de migração dos analitos durante a operação do microchip. Após a realização de alguns testes, notou-se que o fator influente responsável pela constante variação do tempo de migração foi a diminuição progressiva da quantidade de tampão durante as corridas, como consequência da reação no eletrodo no reservatório do tampão. Para superar tal problema, antes de cada injeção das amostras o tampão foi substituído, mantendo-se o volume constante a cada início de corrida. Tal procedimento provocou uma melhoria no sistema, proporcionando a obtenção de dados reprodutíveis e com baixo desvio padrão dos tempos de migração.

4.5.2 Otimização do método de separação

Para o desenvolvimento do método de separação usando microchip, foram investigados as condições otimizadas referente a composição do tampão de corrida, o tempo de injeção da amostra e a voltagem de separação. Inicialmente, uma solução contendo arginina ($5 \mu\text{molL}^{-1}$) e ácido aspártico ($5 \mu\text{molL}^{-1}$) foi introduzida no microchip com um tempo de injeção de 1,0 s. Para isso, aplicou-se uma voltagem de 9 kV no reservatório do tampão de corrida, composto apenas por borato 20 mmolL^{-1} (pH = 9,2), e uma voltagem de 6 kV no reservatório da amostra. Como pode ser visto no eletroferograma a seguir (Figura 45), pode-se notar a presença de dois picos bem definidos, onde o primeiro pico refere-se a arginina e o segundo pertence ao ácido aspártico. A análise foi realizada em triplicata e, como pode ser visto, os resultados

foram condizentes entre si, considerando a variação da altura do pico e os tempos de migração.

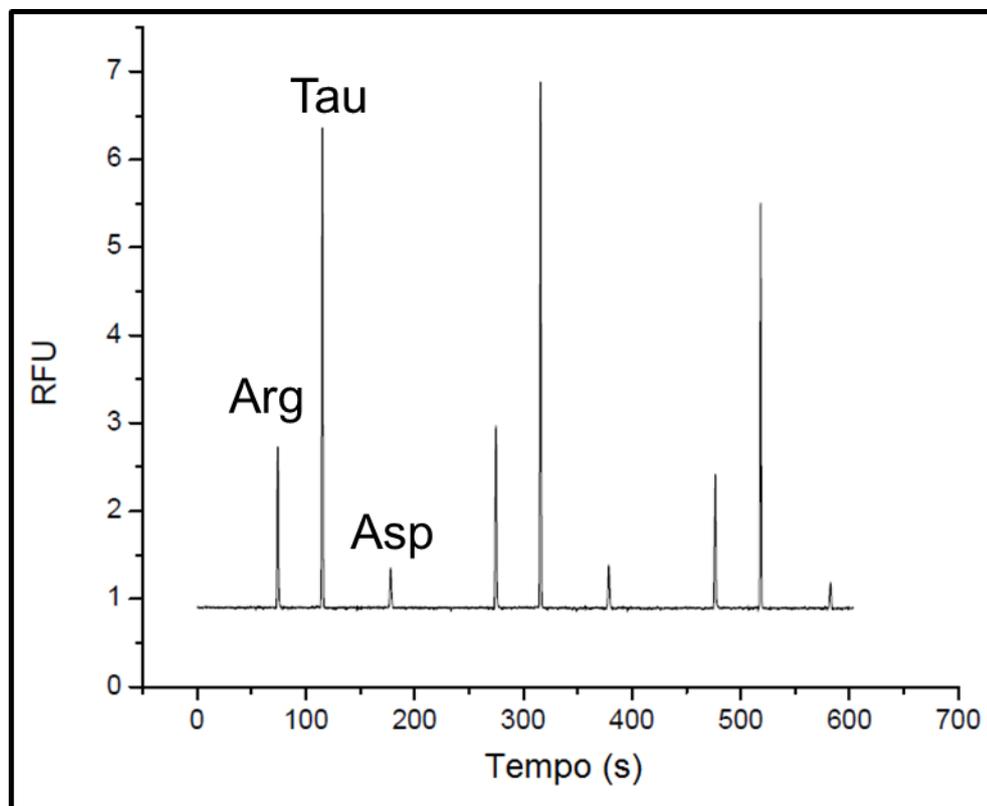
Figura 45 – Eletroferograma de uma solução de arginina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL⁻¹ (pH = 9,2).



Fonte: Autor, 2016.

Utilizando o mesmo sistema e as condições da análise anterior, adicionou-se taurina (5 μmolL^{-1}) em uma solução contendo arginina e ácido aspártico. Neste caso, obteve-se um pico característico da taurina entre os picos da arginina e do ácido aspártico (Figura 46). O eletroferograma apresentou uma boa separação entre os analitos investigados.

Figura 46 – Eletroferograma de uma solução de arginina, taurina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL⁻¹ (pH = 9,2).



Fonte: Autor, 2016.

Durante as primeiras análises envolvendo o microchip, alguns testes foram realizados com o intuito de definir as melhores condições de funcionamento deste sistema. Deste modo, verificou-se se seria possível realizar mais do que três corridas por vez e quantas corridas poderiam ser realizadas com boa precisão após a etapa de condicionamento. Foi constatado que a análise dos aminoácidos com um número superior a três corridas provocou uma variação brusca nos tempos de migração devido a variação da quantidade de tampão ao decorrer do experimento. Sendo assim, estabelecemos que a quantidade ótima para a condução das análises seria três corridas por vez, quantidade esta suficiente para a determinação dos parâmetros de validação.

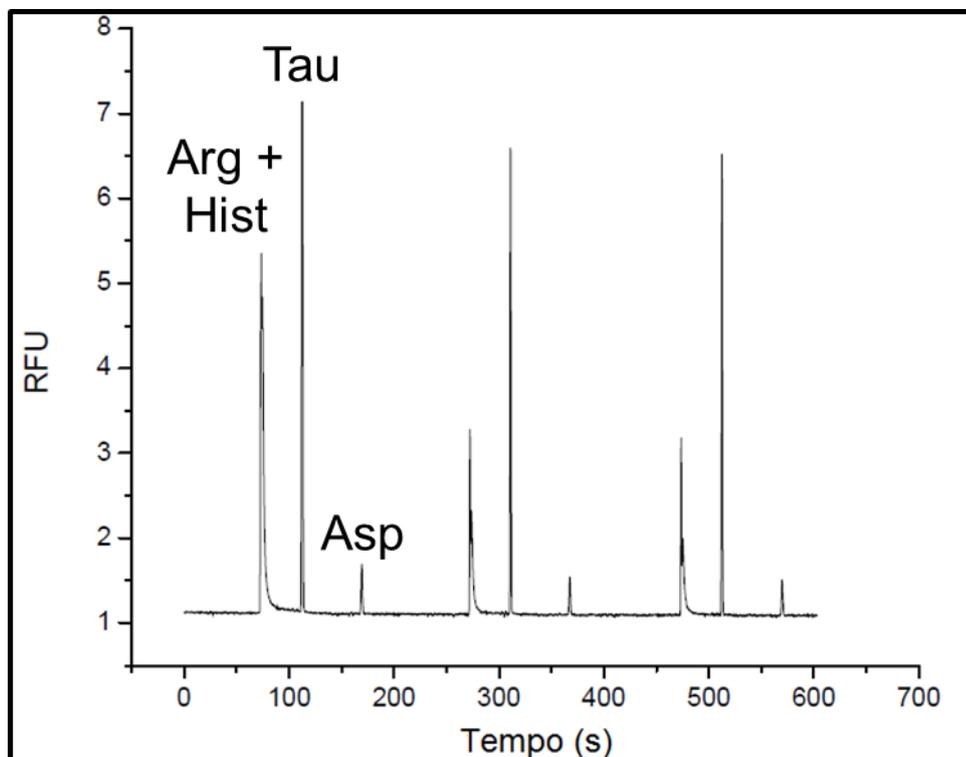
Em seguida, determinou-se, experimentalmente, que o microchip pode realizar até dez corridas após a etapa de condicionamento, sendo necessária a realização de um novo processo de condicionamento após esta sequência de análises. Após dez corridas, os resultados obtidos não foram reprodutíveis devido às mudanças nas cargas negativas da parede do microcanal decorrente das sucessivas

separações, ocasionando uma mudança no EOF e, conseqüentemente, alterando o tempo de saída de cada analito, além de gerar picos mais largos. Vale ressaltar que o tempo de condicionamento entre as análises foi um pouco mais curto, pois, ao invés de 10 minutos, cada solução utilizada no processo de condicionamento foi injetada e mantida por 5 minutos.

Em seguida, a histamina foi adicionada ao sistema e as investigações foram conduzidas utilizando os mesmos parâmetros dos experimentos anteriores. Assim como ocorreu nas análises utilizando o sistema de eletroforese capilar convencional, a arginina e a histamina coeluíram devido à similaridade estrutural dos respectivos produtos fluorescentes após o processo de derivatização com o NDA (Figura 47). Com o objetivo de superar este problema, a voltagem de separação foi decrescida, aplicando-se uma voltagem de 7 e 4 kV no reservatório do tampão e na amostra, respectivamente. Além disso, o tempo de injeção foi reduzido a metade, ou seja, aplicou-se um tempo de injeção de 0,5 s. Houve uma melhoria na resolução de separação entre a arginina e a histamina, no entanto, tal melhoria não foi suficiente para resolver o problema de co-migração entre estas espécies (Figura 48).

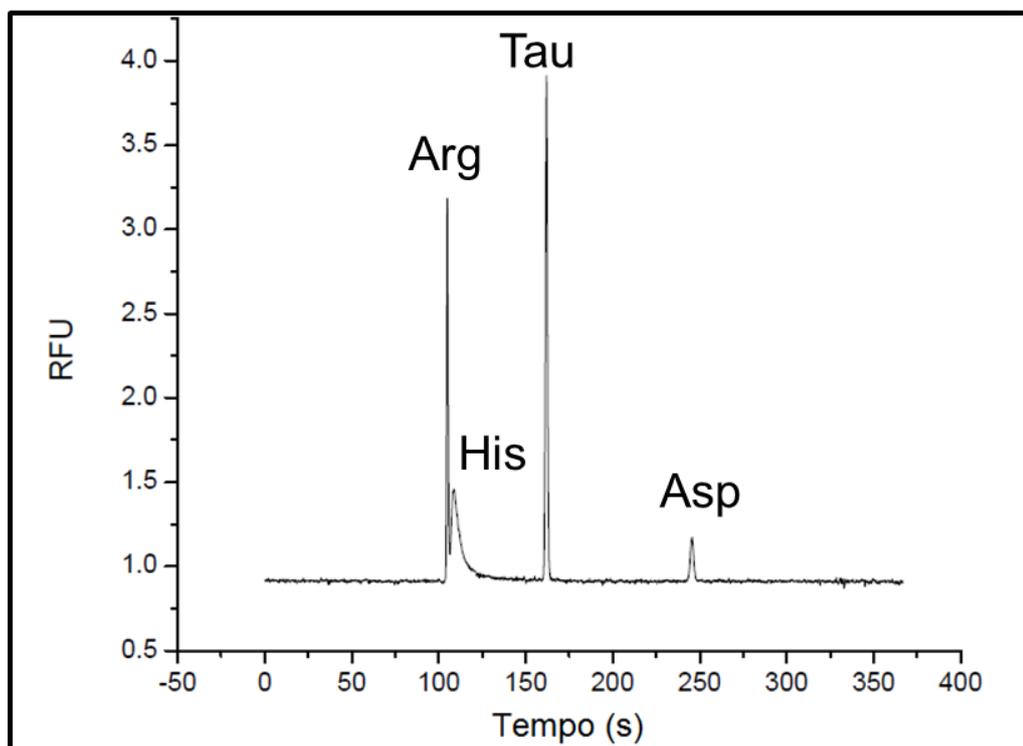
Como esperado, ao diminuir a voltagem de separação, aumentou-se o tempo de migração dos analitos, pois, ao se aplicar uma voltagem menor tem-se que as espécies irão migrar mais lentamente pelo canal de separação, resultando em análises mais longas. No entanto, em determinadas situações, ao migrar mais lentamente pelo canal de separação é possível obter melhorias significativas na resolução da análise.

Figura 47 – Eletroferograma de uma solução de arginina, histamina, taurina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL^{-1} (pH = 9,2).



Fonte: Autor, 2016.

Figura 48 – Eletroferograma de uma solução contendo arginina, histamina, taurina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL^{-1} (pH = 9,2), com um tempo de injeção da amostra de 0,5 s e com voltagem de separação de 7 e 4 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.

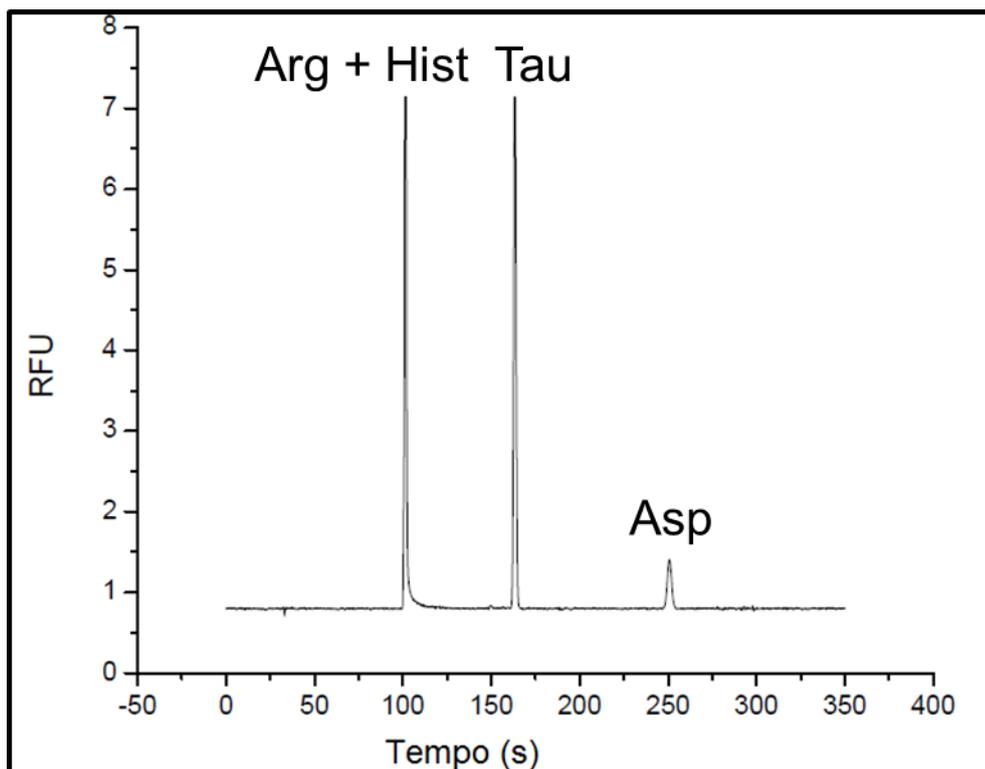


Fonte: Autor, 2016.

Após o fracasso de resolver o problema de co-migração entre a arginina e a histamina alterando a voltagem de separação e o tempo de injeção da amostra, as atenções foram voltadas para a composição do tampão de corrida, no qual apresenta uma influência muito grande na resolução de separação. Inicialmente, adicionou-se ao borato 20 mmolL^{-1} (pH = 9,2), DMSO 10% (v/v). Como já foi dito, a adição de um solvente orgânico pode melhorar a eficiência de separação por proporcionar um aumento da viscosidade do sistema, fazendo com que a passagem dos analitos pelo microcanal de separação seja dificultada, melhorando assim a resolução dos picos. No entanto, a adição de DMSO 10% (v/v) não resolveu o problema em questão, pelo contrário, a adição desta quantidade de solvente orgânico fez com que a arginina e a histamina saíssem completamente juntas (Figura 49). Obtemos apenas três picos em um tempo total de análise de 270 s. Neste caso, não houve ganho de resolução e os tempos de migração dos analitos

foram maiores, visto que ao se trabalhar apenas com tampão borato, todos os analitos saíram antes de 200 s.

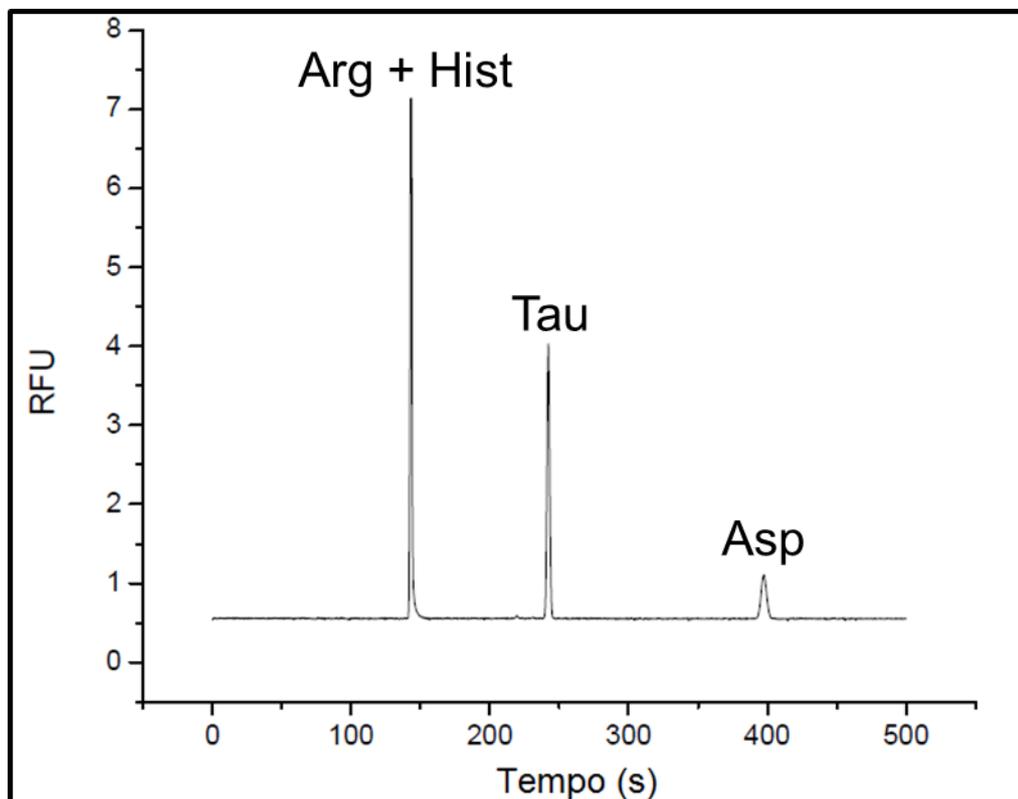
Figura 49 – Eletroferograma de uma solução contendo arginina, histamina, taurina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL⁻¹ (pH = 9,2) e DMSO 10% (v/v), com um tempo de injeção da amostra de 0,5 s e com voltagem de separação de 9 e 6 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.



Fonte: Autor, 2016.

Posteriormente, dobramos a quantidade de solvente orgânico no sistema e, mesmo assim, nenhuma melhoria foi obtida (Figura 50). Como era de se esperar, com o aumento da quantidade de DMSO, aumentou-se a viscosidade do sistema, proporcionando análises ainda mais longas, onde o último pico (pico do ácido aspártico) saiu em aproximadamente 400 s.

Figura 50 – Eletroferograma de uma solução contendo arginina, histamina, taurina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL^{-1} (pH = 9,2) e DMSO 20% (v/v), com um tempo de injeção da amostra de 0,5 s e com voltagem de separação de 9 e 6 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.



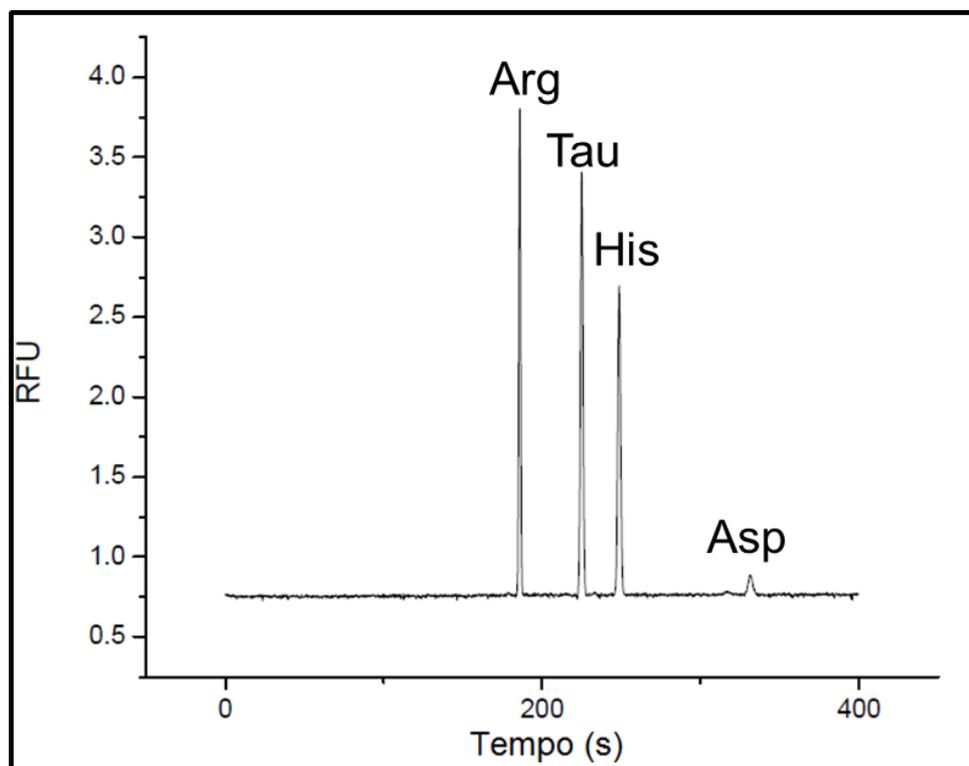
Fonte: Autor, 2016.

Visto que a adição do DMSO não resolveu o problema de co-migração envolvendo a arginina e a histamina, avaliou-se a adição da SBE- β -CD. Como já foi destacada, a adição desta ciclodextrina modificada no tampão de corrida pode melhorar a resolução de separação entre aminoácidos, pois tal componente pode proporcionar diferentes tipos de interações com os analitos baseando-se na diferença de carga e tamanho dos respectivos componentes presentes na amostra.

Inicialmente, avaliamos a mesma solução utilizada nos experimentos anteriores sob as mesmas condições e parâmetros de análise, alterando apenas a composição do tampão de corrida, sendo este composto por borato 20 mmolL^{-1} (pH = 9,2), DMSO 10% (v/v) e $1,4 \text{ mmolL}^{-1}$. Vale ressaltar que tais concentrações utilizadas no tampão de corrida foram estabelecidas de acordo com o estudo de otimização realizado para análises aplicando o sistema de eletroforese capilar convencional. Com a adição da SBE- β -CD, assim como aconteceu no sistema de

EC convencional, foi possível separar a arginina e histamina, resolvendo o problema de co-migração (Figura 51).

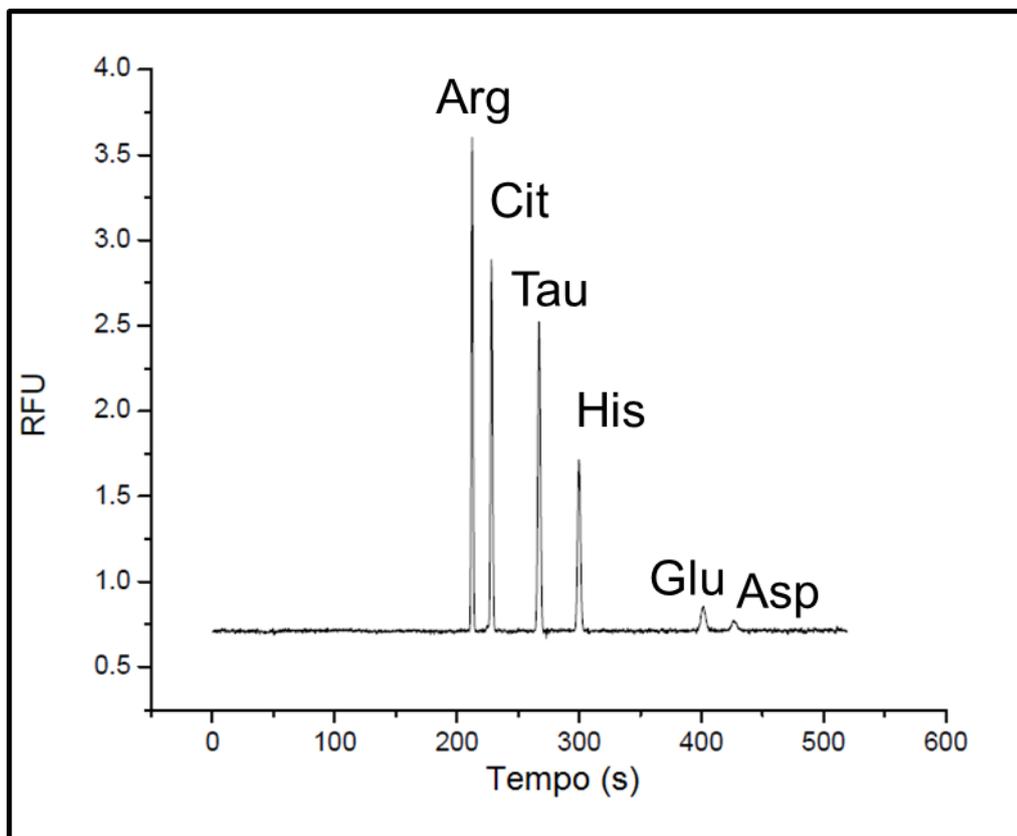
Figura 51 – Eletroferograma de uma solução contendo arginina, histamina, taurina e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL^{-1} (pH = 9,2) e DMSO 10% (v/v) e SBE- β -CD $1,4 \text{ mmolL}^{-1}$. Para tal estudo, aplicou-se um tempo de injeção da amostra de 0,5 s e voltagem de separação de 9 e 6 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.



Fonte: Autor, 2016.

Em seguida, após resolver o problema de co-migração, foram adicionadas ao sistema a citrulina e o ácido glutâmico. Como pode ser visto (Figura 52), obtemos uma boa separação de todos os analitos investigados em um tempo total de análise inferior a 450 s (7,5 min). A ordem de saída dos analitos foi a mesma daquela observada nos resultados de EC convencional, sendo a arginina o primeiro pico, sendo seguida pela citrulina, taurina, histamina, ácido glutâmico e ácido aspártico, respectivamente. Para confirmar a ordem de saída dos analitos, cada aminoácido foi investigado separadamente.

Figura 52 – Eletroferograma de uma solução contendo arginina, citrulina, taurina, histamina, ácido glutâmico e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 20 mmolL⁻¹ (pH = 9,2), DMSO 10% (v/v) e SBE- β -CD 1,4 mmolL⁻¹. Para tal estudo, aplicou-se um tempo de injeção da amostra de 0,5 s e voltagem de separação de 9 e 6 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.



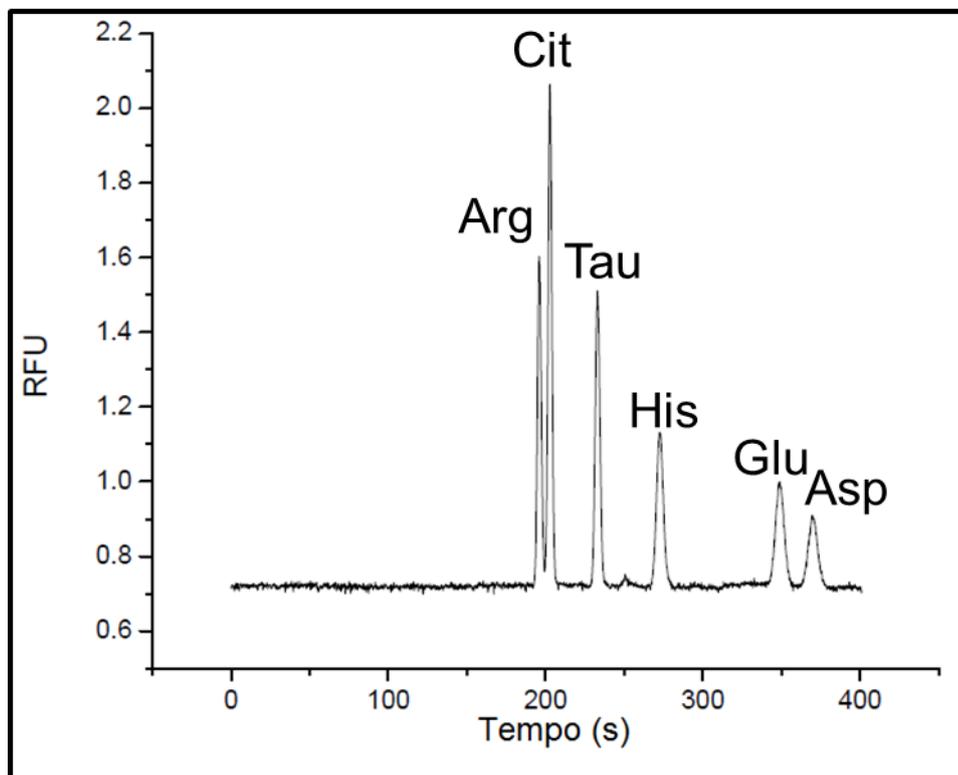
Fonte: Autor, 2016.

Após obter a separação de todos os analitos, avaliou-se a influência da concentração do tampão borato na resolução e no tempo total da análise. O tetraborato de sódio é comumente utilizado em separações eletroforéticas e, neste estudo, tal eletrólito foi escolhido devido a sua compatibilidade com a reação de derivatização utilizando NDA. Para determinar as condições ótimas de separação dos aminoácidos de interesse, além da concentração de 20 mmolL⁻¹, foram testadas concentrações inferiores de borato, tais como 10 e 15 mmolL⁻¹. Elevadas concentrações de borato resulta em uma melhor resolução entre picos adjacentes, entretanto, quanto maior a concentração do borato, maior será o tempo de análise. Além disso, quanto maior a concentração do borato, maior será a força iônica do tampão de corrida e uma elevada força iônica do tampão produz elevadas correntes,

podendo gerar a formação de bolhas no interior dos microcanais. Deste modo, reduzimos a concentração do borato com o objetivo de estabelecer uma relação ótima entre estes dois aspectos cruciais para a validação do método proposto, isto é, tentamos estabelecer uma condição adequada para fornecer resultados com boa resolução em um menor intervalo de tempo possível.

Ao utilizar o borato em uma concentração de 10 mmolL^{-1} no tampão de corrida contendo DMSO 10% (v/v) e SBE- β -CD $1,4 \text{ mmolL}^{-1}$, notamos que o tempo de análise foi menor do que o resultado obtido ao aplicar 20 mmolL^{-1} , no entanto, os picos obtidos foram mais largos e os picos da arginina e citrulina saíram muito próximos (Figura 53). Logo, foi possível concluir que a solução de borato em uma concentração de 10 mmolL^{-1} não foi apropriada para o estudo em questão, pois tal concentração não apresentou boa resolução de separação.

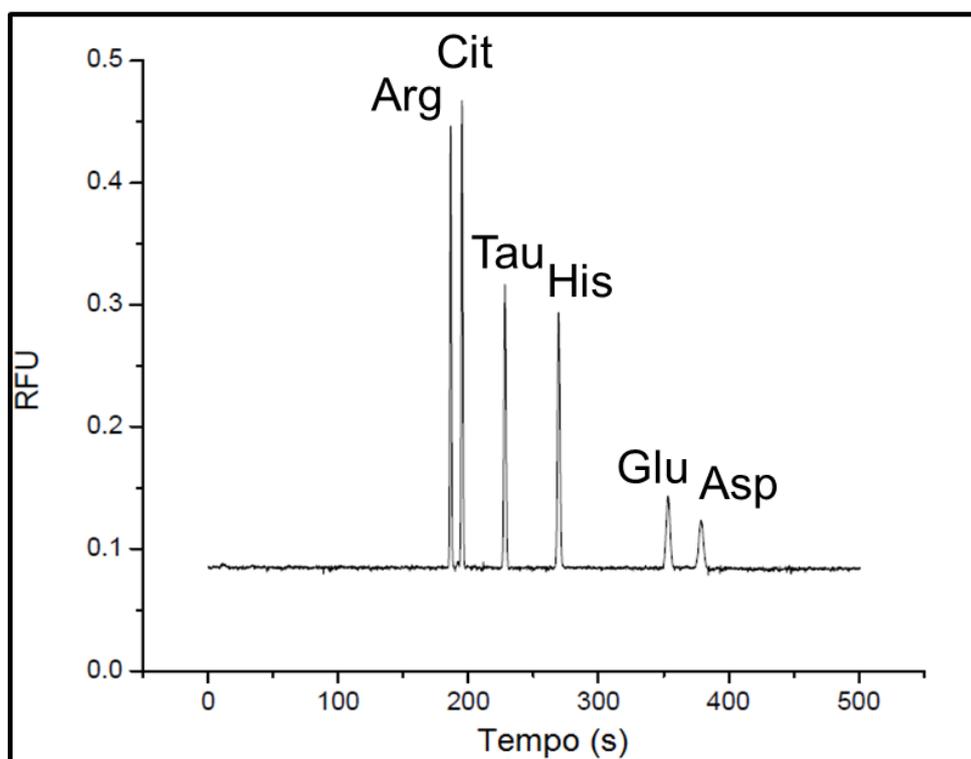
Figura 53 – Eletroferograma de uma solução contendo arginina, citrulina, taurina, histamina, ácido glutâmico e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 10 mmolL^{-1} (pH = 9,2), DMSO 10% (v/v) e SBE- β -CD $1,4 \text{ mmolL}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2016.

Em seguida, aumentou-se a concentração do borato no tampão de corrida para 15 mmolL^{-1} e constatamos uma boa resolução de separação dos analitos e os tempos de migração não sofreram grandes alterações em relação ao estudo realizado com a concentração de 10 mmolL^{-1} (Figura 54).

Figura 54 – Eletroferograma de uma solução contendo arginina, citrulina, taurina, histamina, ácido glutâmico e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 15 mmolL^{-1} (pH = 9,2), DMSO 10% (v/v) e SBE- β -CD $1,4 \text{ mmolL}^{-1}$.



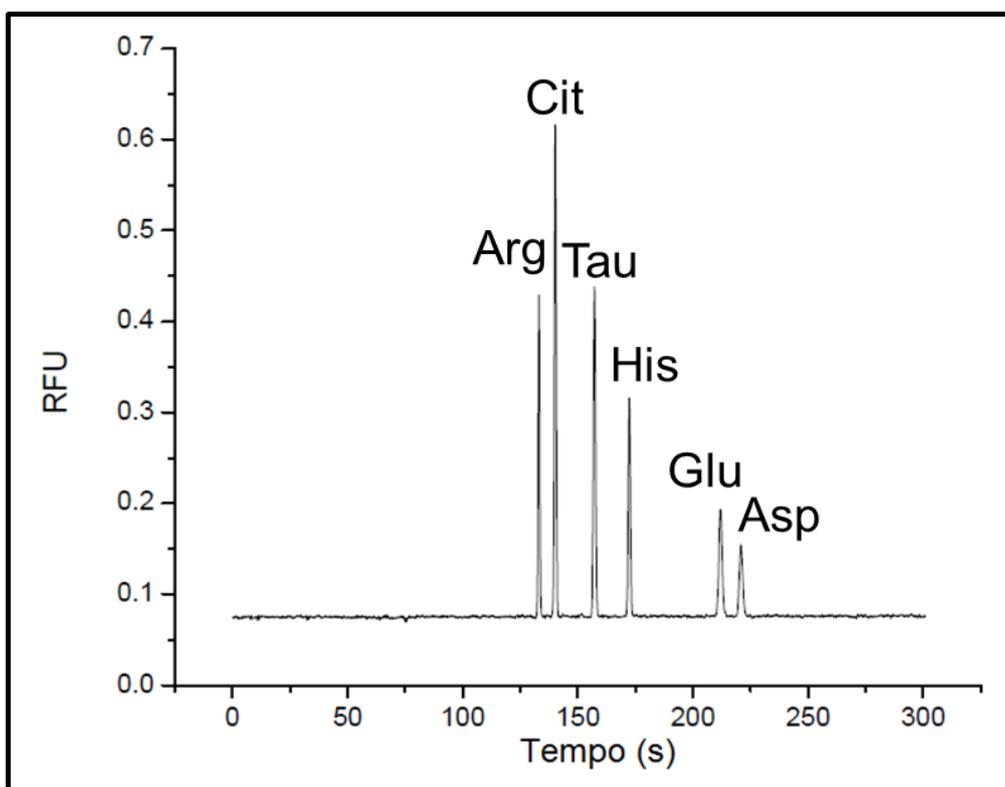
Fonte: Autor, 2016.

Diante dos resultados obtidos até então, decidimos avaliar a influência da voltagem na eficiência de separação e no tempo de análise. Como já foi abordado no estudo envolvendo o sistema de EC convencional, o aumento da voltagem de separação conduz a análises mais rápidas, no entanto, tal condição precisa ser observada com cuidado, pois o processo de separação mais rápido pode diminuir a resolução do sistema, podendo tornar o método inadequado para a investigação de amostras reais, considerando a grande quantidade de componentes existente em tais matrizes. Sendo assim, aplicou-se uma voltagem de 10 e 7 kV nos reservatórios do tampão e da amostra, respectivamente. Ao aplicar a voltagem de 9 e 6 kV, as correntes geradas variaram em torno de 23 e 18 μA , respectivamente. Constatamos

que o aumento aplicado na voltagem elevou sensivelmente os valores de corrente, obtendo correntes em torno de 24 e 21 μA , evitando problemas de formação de bolhas decorrente do aquecimento do sistema.

O aumento nas voltagens de separação de 9 e 6 kV para 10 e 7 kV melhorou de maneira significativa o tempo de análise, onde todos os analitos saíram antes de 230 s (3,8 min) e a resolução obtida foi satisfatória (Figura 55).

Figura 55 – Eletroferograma de uma solução contendo arginina, citrulina, taurina, histamina, ácido glutâmico e ácido aspártico em um tampão de corrida composto por borato 15 mmolL^{-1} (pH = 9,2), DMSO 10% (v/v) e SBE- β -CD 1,4 mmolL^{-1} . Para tal estudo, aplicou-se uma voltagem de separação de 10 e 7 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.



Fonte: Autor, 2016.

Ao obter uma boa separação em um curto tempo de análise, repetimos por quatro dias (em triplicata) a mesma análise nas condições ótimas, utilizando os padrões e constatamos que o método desenvolvido forneceu respostas reproduzíveis em relação aos tempos de migração e as áreas dos picos dos analitos. Em resumo, a condição ótima de análise foi definida como: tampão de corrida composto por

borato 15 mmolL^{-1} , DMSO 10% (v/v) e SBE- β -CD $1,4 \text{ mmolL}^{-1}$, tempo de injeção da amostra de 0,5 s e voltagens de separação de 10 e 7 kV para o reservatório do tampão e da amostra, respectivamente.

4.5.3 Validação do método ME-LIF

Assim como aconteceu com o método desenvolvido utilizando a EC convencional, a partir das condições ótimas estabelecidas, curvas de calibração para cada analito foram construídas a partir de seus padrões e alguns parâmetros analíticos como linearidade, precisão, limites de detecção e quantificação foram determinados (Tabela 6).

Tabela 6 - Parâmetros de validação para os padrões dos aminoácidos investigados usando o método CHIP-LIF.

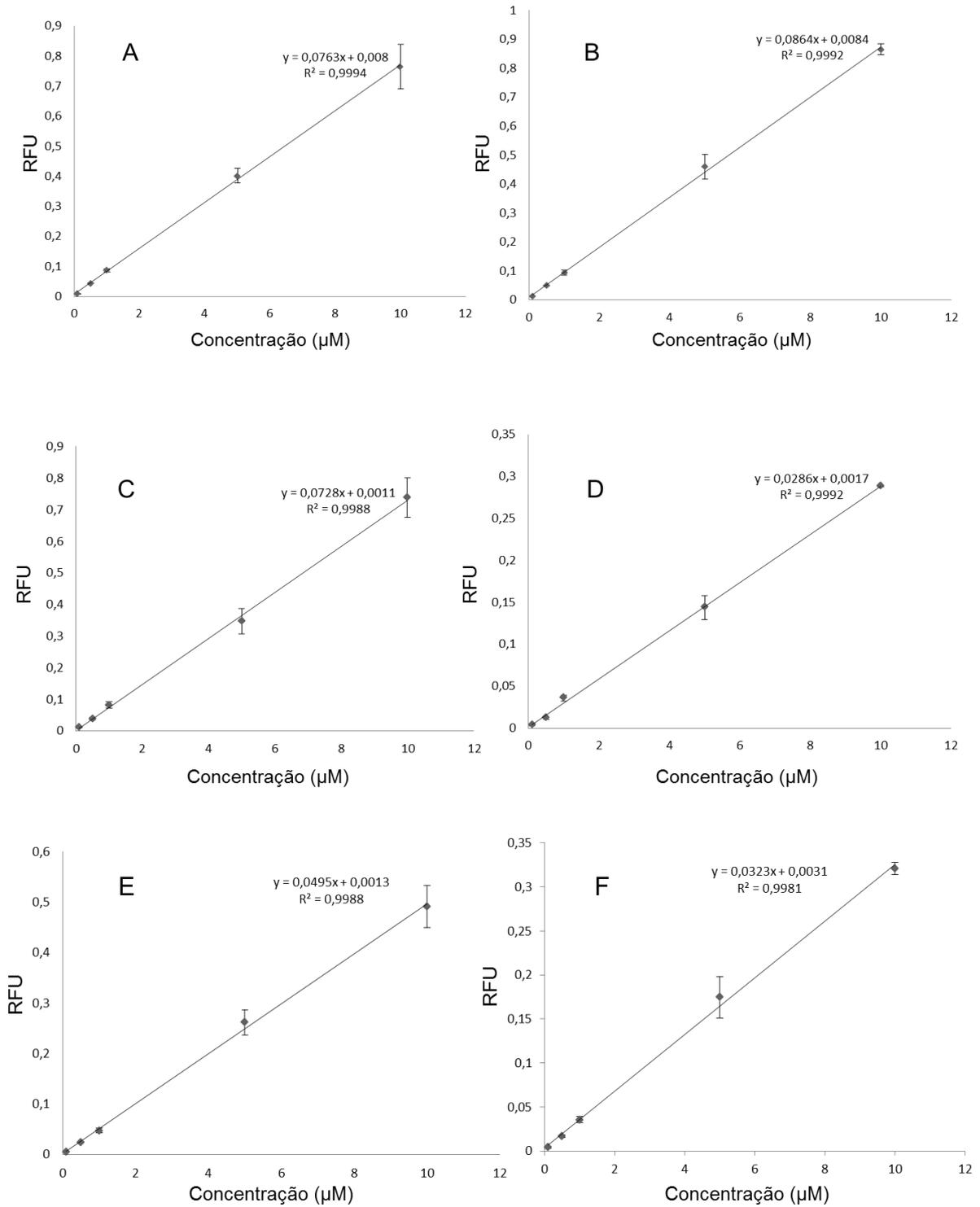
	Arg	Cit	Tau	His	Glu	Asp
Faixa de trabalho (μmolL^{-1})	10-0,1	10-0,1	10-0,1	10-0,1	10-0,1	10-0,1
Coefficiente de determinação (r^2)	0,9994	0,9992	0,9988	0,9992	0,9988	0,9981
Precisão intra-dia (%RSD, n = 4, 5 μmolL^{-1})	1,97	4,73	2,46	6,95	5,23	20,96
Precisão inter-dias (%RSD, n = 5, 5 μmolL^{-1})	9,61	9,57	8,88	13,23	17,09	13,36
Estudo de recuperação (%)	79,9	89,3	95,2	80,7	87,4	84,8
Limites de detecção (S/N = 3, μmolL^{-1})	0,04	0,04	0,06	0,06	0,06	0,06
Limites de quantificação (S/N = 10, μmolL^{-1})	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Fonte: Autor, 2016.

Os coeficientes de regressão das curvas analíticas de cada aminoácido (Figura 56) mostraram uma boa linearidade. Foram obtidos valores satisfatórios de precisão e os limites de detecção e quantificação, que foram determinados experimentalmente, se mostraram adequados para o estudo em questão, visto que as concentrações dos analitos nas amostras de microdiálise são superiores ao limite de quantificação do método desenvolvido.

Este método destaca-se pela facilidade operacional dos experimentos, pelos parâmetros analíticos que foram similares aos encontrados pela técnica de EC convencional e pelo curto tempo de análise, fazendo com que tal método seja bastante atrativo para análises de rotina dos aminoácidos investigados nas amostras de microdiálise cerebral.

Figura 56 – Curvas analíticas (n = 5) dos padrões dos aminoácidos investigados utilizando o método ME-LIF. A) Arginina, B) Citrulina, C) Taurina, D) Histamina, E) Ácido glutâmico e F) Ácido Aspártico.



Fonte: Autor, 2016.

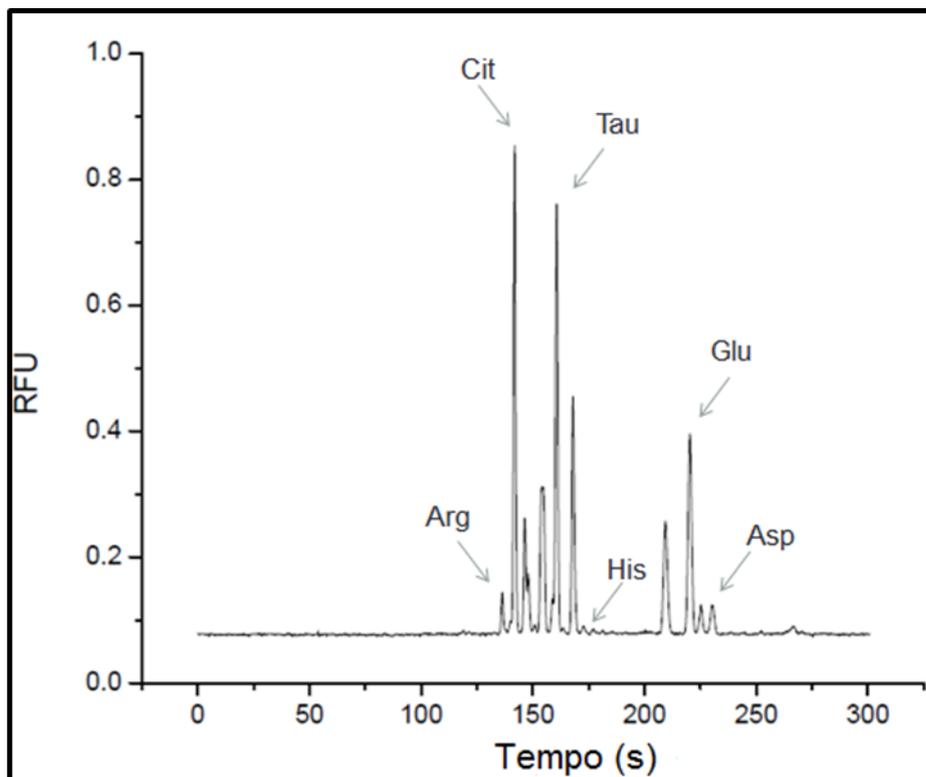
4.5.4 Análises de amostras de microdiálise cerebral

Como já foi dito no procedimento experimental, as análises com as amostras de microdiálise usando o microchip foram realizadas da mesma forma que já foi descrita anteriormente no estudo envolvendo o sistema de EC convencional. Neste caso, adotou-se o mesmo procedimento cirúrgico para a obtenção da amostra real e as mesmas condições para a reação de derivatização. As mudanças realizadas foram pontuais de acordo com a característica do método e da disponibilidade das amostras, pois, neste caso, a quantidade de amostra utilizada foi de 35 μL e as amostras foram armazenadas por apenas 30 min após o procedimento cirúrgico envolvendo a obtenção da amostra, ou seja, todos os resultados foram obtidos no mesmo dia que as amostras de microdiálise foram coletadas.

Os experimentos foram conduzidos considerando as condições ótimas obtidas no estudo de otimização com os padrões, sendo todas as análises realizadas em triplicata. O método ME-LIF permitiu a análise dos aminoácidos investigados na amostra de microdiálise em um tempo total de análise de 3,76 min (Figura 57). Inicialmente, os picos dos analitos foram identificados de acordo com os tempos de migração característicos de cada aminoácido avaliado. Para isso, antes da análise da amostra de microdiálise, foram realizadas análises com os padrões dos analitos, em triplicata, certificando-se o tempo de migração de cada pico de interesse. Em seguida, os tempos de migração dos padrões dos aminoácidos foram comparados com os dados das amostras de microdiálise e todos os analitos foram devidamente identificados (Tabela 7).

Ao contrário do ácido aspártico que mostrou uma variação de 5,2 s entre os tempos de migração na amostra com os padrões e na amostra de microdiálise, os picos dos outros analitos foram facilmente identificados pela similaridade dos tempos de saída dos picos em ambas as análises. Deste modo, o pico do ácido aspártico foi especulado considerando o intervalo de tempo entre a saída do pico deste aminoácido e o pico do aminoácido adjacente (pico do ácido glutâmico).

Figura 57 – Eletroferograma da amostra de microdiálise utilizando o método ME-LIF.



Fonte: Autor, 2016.

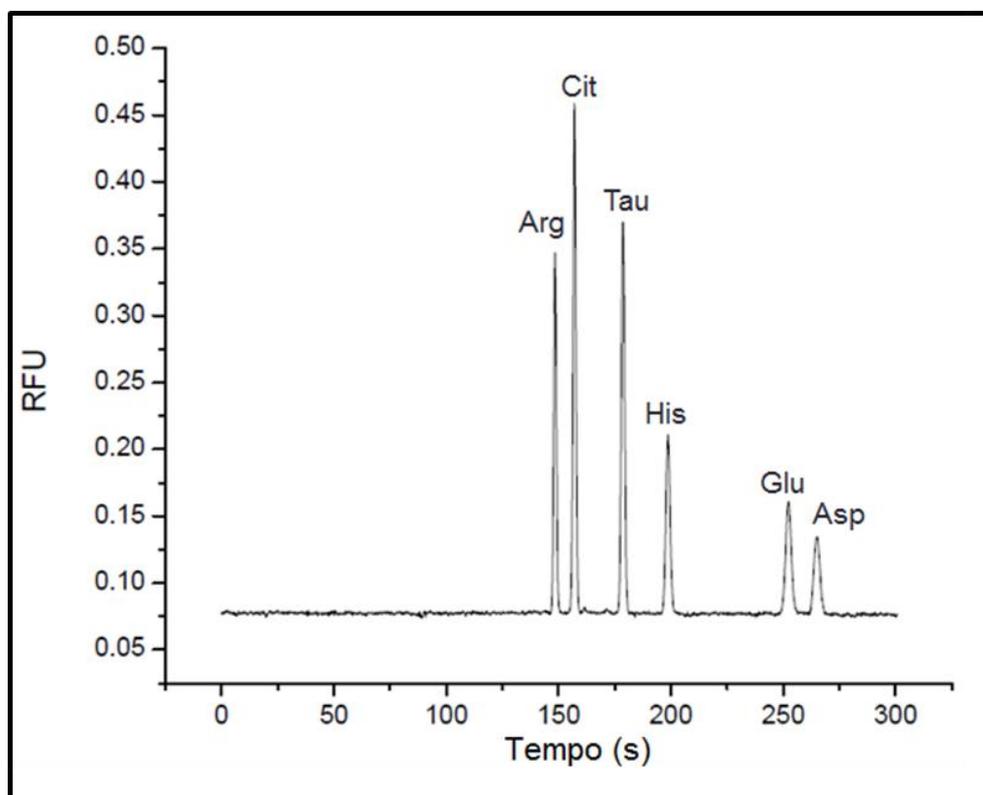
Tabela 7 – Estudo comparativo dos tempos de migração dos analitos em uma amostra contendo os padrões e na amostra de microdiálise.

	Tempos de migração na amostra contendo os padrões (s)	Tempos de migração na amostra de microdiálise (s)	Varição
Arg	135	136,2	+ 1,2
Cit	141	141,8	+ 0,8
Tau	154	154	0
His	172	172,6	+ 0,6
Glu	210	209,2	- 0,8
Asp	220	225,2	+ 5,2

Fonte: Autor, 2016.

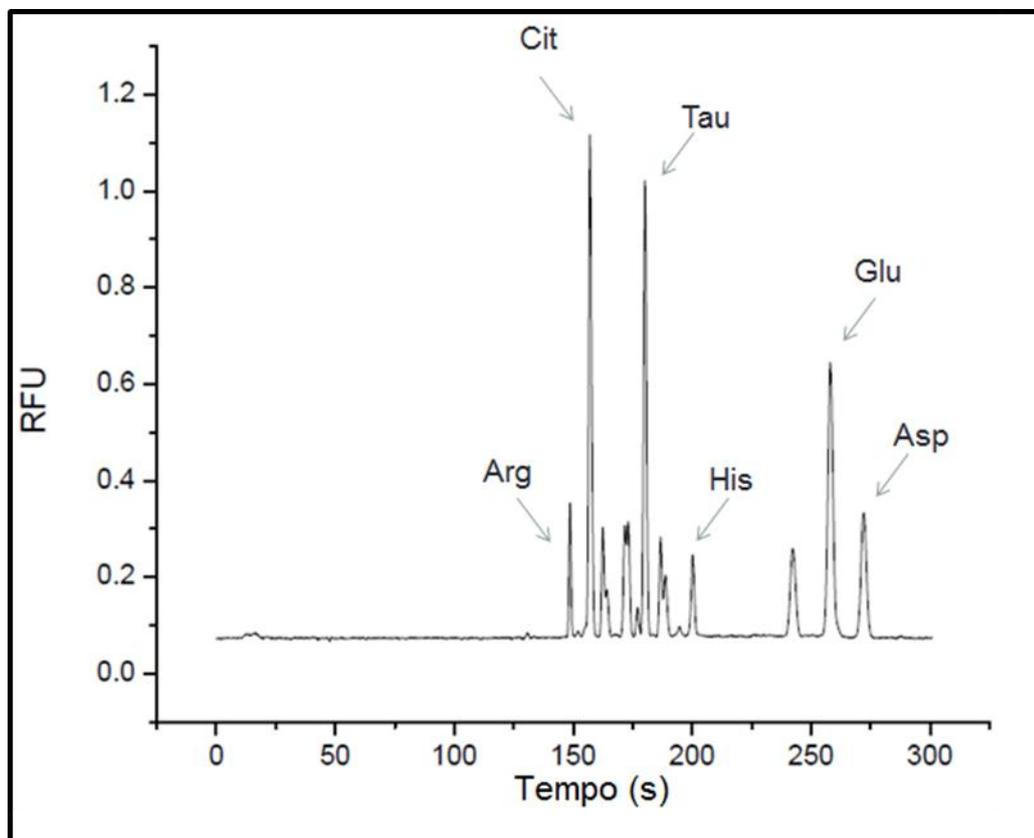
Mediante a indefinição em relação a identificação do pico do ácido aspártico ao comparar o tempo de migração deste aminoácido na amostra contendo os padrões e na amostra real, utilizou-se outro artifício para a confirmação dos picos dos analitos na amostra de microdiálise. Neste caso, após a análise dos padrões (Figura 58), adicionou-se na amostra real uma concentração conhecida dos padrões dos aminoácidos investigados ($5 \mu\text{molL}^{-1}$) e, de acordo com os tempos de migração e o aumento na altura dos picos, todos os analitos foram devidamente identificados (Figura 59).

Figura 58 – Eletroferograma dos padrões dos analitos em uma concentração de $5 \mu\text{molL}^{-1}$ utilizando o método ME-LIF.



Fonte: Autor, 2016.

Figura 59 – Eletroferograma de uma amostra de microdiálise *spiked* com os padrões dos analitos em uma concentração de $5 \mu\text{molL}^{-1}$.



Fonte: Autor, 2016.

Após a identificação dos picos, todos os analitos foram quantificados a partir das informações obtidas nas curvas analíticas de cada aminoácido. As concentrações dos analitos foram $0,96$; $11,28$; $13,05$; $0,94$; $17,03$ e $3,03 \mu\text{molL}^{-1}$ para a Arg, Cit, Tau, His, Glu e Asp, respectivamente. Considerando as concentrações obtidas utilizando o método de EC convencional com amostras de microdiálise armazenada até por 30 dias, tem-se que os analitos apresentaram concentrações similares as determinadas utilizando o método ME-LIF, com a exceção da taurina e ácido glutâmico, nos quais apresentaram concentrações maiores.

Com isso, podemos concluir que o método desenvolvido utilizando o microchip de vidro com detecção por fluorescência é apropriado para a determinação dos aminoácidos investigados na amostra de microdiálise.

4.6 Estudo comparativo entre os métodos investigados (EC-LIF vs ME-LIF)

Ambos os métodos de separação forneceram excelentes parâmetros analíticos para a separação dos aminoácidos avaliados neste estudo (Tabela 8). Para a EC, o número de pratos (N) foram maiores do que 150 000 N / m, valores de resolução foram superiores a 3,4 e o tempo de migração foi entre 11,2 - 18,2 min. O método ME-LIF proporcionou uma maior eficiência de separação (N > 300 000 / m) e uma melhor resolução ($R_s > 3.9$) do que o método utilizando o sistema de eletroforese convencional.

O tempo de análise utilizando o microchip foi significativamente mais curto do que o método EC-LIF. A melhoria expressiva no tempo de análise se deve a intensidade do campo eletromagnético que foi de 667 V / cm para o método ME-LIF, o que foi aproximadamente o dobro do que a intensidade do campo utilizado no método EC-LIF CE (325 V / cm). Além disso, diminuindo a concentração do borato no tampão de corrida para 15 mmolL⁻¹ (em comparação com 20 mmolL⁻¹ em EC) tem-se um aumento no EOF, facilitando a saída dos analitos.

Em geral, de acordo com o que foi demonstrado e discutido, podemos concluir que o método ME-LIF é mais adequado para a análise dos aminoácidos na amostra de microdiálise do que o método EC-LIF, pois além de apresentar os melhores parâmetros analíticos, tal método apresenta um menor consumo da amostra e dos solventes, além de apresentar um menor tempo de análise.

Tabela 8 – Comparação dos parâmetros analíticos entre os métodos desenvolvidos.

	N / m x 10 ³		R _s		t _m (min)	
	EC	ME	EC	ME	EC	ME
Arg	173	810	-	-	11,20	2,25
Cit	175	730	5,76	3,92	11,92	2,35
Tau	173	599	10,13	12,25	13,32	2,56
His	164	612	6,39	12,53	14,30	2,86
Glu	154	415	17,64	18,23	17,50	3,50
Asp	156	338	3,46	4,13	18,22	3,66

Fonte: Autor, 2016.

4.7 Investigação dos aminoácidos neuroativos selecionados utilizando microchip eletroforético com um sistema portátil de detecção por fluorescência

O objetivo da miniaturização da instrumentação de detecção por fluorescência consiste além de reduzir o tamanho do sistema como um todo, busca reduzir o tempo entre a amostragem e a análise. Isto é, propomos criar um sistema portátil de análise contendo o microchip e o detector integrado, no qual tal sistema possa ser colocado próximo do animal ou do paciente para a monitorização das espécies químicas de interesse em tempo real.

Para miniaturizar o sistema o máximo possível, várias decisões foram feitas pensando no design do protótipo. A primeira delas foi a escolha de uma fonte de luz de excitação LED, em vez de um laser. Há três razões para isso. Primeiro, lasers são consideravelmente mais caros do que os LEDs. Em segundo lugar, a robustez mecânica do sistema foi uma consideração importante para portabilidade e, normalmente, os lasers são mais frágeis do que os LEDs. Finalmente, enquanto nós nos concentramos em derivatização com o NDA/CN neste estudo, a fácil disponibilidade de uma ampla gama de comprimentos de onda oferecida pela fonte de luz LED para uso em estudos futuros com outros compostos fluorogênicos, também influenciou na decisão de usar esta fonte de luz.

Os requisitos de portabilidade e robustez também afetaram a condição física e mecânica do sistema. Como o tamanho e o design dos microchips variam de aplicação para aplicação, além de muitas vezes ser necessário mover o microdispositivo para fins de limpeza, o sistema ótico responsável pelo alinhamento da luz com o canal de separação foi elaborado apresentando certa mobilidade, ao contrário dos outros sistemas miniaturizados (MAYER; OSORIO; LUNTE, 2013). Como a voltagem foi aplicada de forma tradicional utilizando uma fonte de alta tensão com os eletrodos submersos nos reservatórios do microchip, mover o sistema ótico em vez do microdispositivo foi a melhor opção, a fim de evitar a retirada de todos os fios de alta tensão durante o alinhamento.

Para avaliar o sistema portátil de detecção para a determinação dos analitos em amostras de microdiálise, inicialmente, foram determinados alguns parâmetros analíticos utilizando os padrões dos aminoácidos investigados. Para este estudo, as mesmas condições experimentais foram adotadas em relação ao sistema ME-LIF,

incluindo a utilização do mesmo microchip de vidro e o mesmo procedimento de derivatização pré-coluna. Para cada aminoácido, o método com o sistema portátil de detecção ofereceu uma resposta linear ao longo das concentrações avaliadas e os limites de detecção e quantificação obtidos foram adequados para análises (maioria dos analitos investigados) envolvendo amostras de microdiálise (Tabela 9). De acordo com os resultados obtidos, não foi possível quantificar a histamina e o ácido aspártico.

Tabela 9 – Parâmetros analíticos do método utilizando ME com o sistema portátil de detecção por fluorescência.

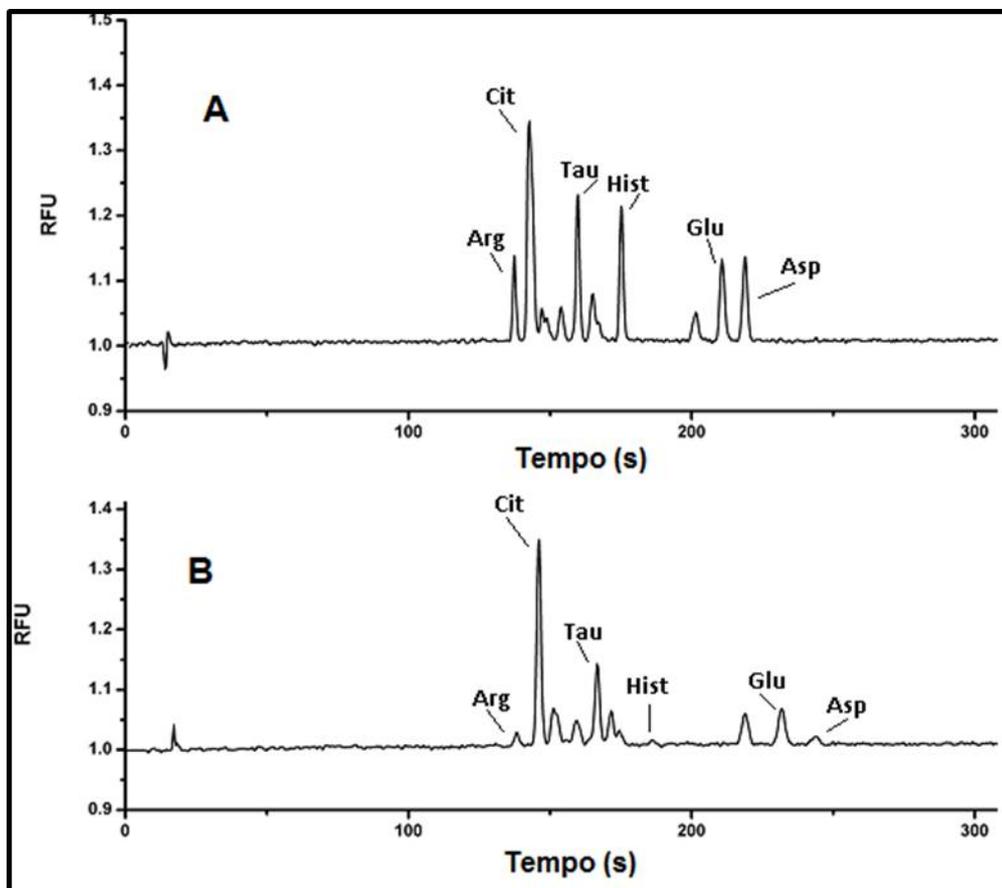
	Arg	Cit	Tau	His	Glu	Asp
Faixa linear (μmolL^{-1})	2,0–50	2,0–50	2,0–25	2,0–15	2,0–50	2,0–50
Coeficiente de determinação (r^2)	0,9956	0,9834	0,9870	0,9977	0,9931	0,9904
Limites de detecção (S/N = 3, μmolL^{-1})	0,25	0,36	0,42	0,37	1,31	1,21
Limites de quantificação (S/N = 10, μmolL^{-1})	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
Tempos de migração %RSD	1,71	1,8	2,52	3,22	4,75	5,23
Pratos teóricos / m	275165	270431	331367	406943	325993	277798
Resolução de pico	-	0,96	1,01	6,09	2,00	3,08

Fonte: Autor, 2016.

Apesar deste método contendo o sistema portátil de detecção não apresentar melhores parâmetros analíticos do que o método utilizando o ME com o sistema de detecção por fluorescência convencional, a redução do volume da instrumentação necessária para a análise pode resolver o grande problema associado a este tipo de detecção, o baixo poder de integração do detector por fluorescência com os microchips, oferecendo condições de portabilidade adequadas para análises *on-line*.

Em seguida, uma amostra de microdiálise foi analisada onde, posteriormente, foram adicionadas adição dos padrões dos aminoácidos em uma concentração conhecida ($5 \mu\text{molL}^{-1}$) na mesma amostra anteriormente investigada. Os picos dos analitos foram identificados baseando-se nos tempos de migração e na variação da altura dos picos após a adição dos padrões (Figura 60).

Figura 60 – A. Amostra de microdiálise após adição padrão dos aminoácidos investigados. B. Eletroferograma da amostra de microdiálise derivatizada com NDA/CN usando o sistema portátil de detecção por fluorescência.



Fonte: Autor, 2016.

5 CONCLUSÕES

Considerando que os aminoácidos neuroativos investigados não são naturalmente fluorescentes, uma etapa de derivatização química foi realizada. Inicialmente, definimos a melhor estratégia de derivatização, sendo o NDA o agente derivatizante escolhido para este estudo. O NDA reage com os analitos em presença de CN para formar produtos fluorescentes. Tais produtos formados demonstraram ser bastante estáveis por várias horas e o procedimento experimental envolvendo o processo de derivatização foi bastante simples.

Durante o estudo de otimização de separação do método EC-LIF, vimos que o tampão de corrida composto apenas por tampão borato não foi suficiente para a separação de todos os analitos. A arginina e a histamina saíram juntas devido à similaridade estruturais dos seus respectivos produtos fluorescentes após o processo de derivatização com NDA/CN. Para superar este problema, promovemos a adição de uma ciclodextrina modificada (SBE- β -CD) e de um solvente orgânico (DMSO) no sistema. A adição destes componentes proporcionou diferentes tipos de interações adicionais entre o tampão de corrida e os analitos, resultando em uma melhoria significativa na resolução de separação do sistema.

A partir do método EC-LIF foi possível obter uma boa separação de todos os aminoácidos neuroativos investigados (Arg, Cit, Tau, His, Glu, Asp). As condições ótimas para este método foi estabelecida, onde o tampão de corrida foi composto por tampão borato 20 mmolL^{-1} (pH = 9,2), SBE- β -CD $1,4 \text{ mmolL}^{-1}$ e DMSO 10% (v/v) e a voltagem de separação foi de 25 kV (325 Vcm^{-1}).

Curvas de calibrações foram construídas para cada aminoácido investigado usando o método EC-LIF. Tal método apresentou boa linearidade e baixo desvio padrão relativo para os padrões dos analitos. Além disso, o método apresentou limites de detecção e quantificação adequados para a análise de amostras de microdiálise cerebral.

Amostras reais foram investigadas considerando diferentes períodos de armazenamento da amostra e todos os analitos foram devidamente monitorados e quantificados utilizando o método EC-LIF.

Em relação ao segundo método proposto (ME-LIF), inicialmente foi estabelecido o melhor procedimento de microfabricação do dispositivo eletroforético, incluindo o melhor substrato e o design mais apropriado para a análise dos analitos.

O vidro foi substrato escolhido para este estudo e o design do microchip foi uma adaptação do típico design em forma de T, onde utilizamos um canal de separação maior (uma serpentina de 15 cm) e os reservatórios laterais foram dispostos um distante do outro, para evitar problemas com a aplicação de altas voltagens de separação.

Após o processo de otimização de separação do método ME-LIF, vimos que foi possível obter uma boa separação de todos os analitos em um tempo de análise inferior a 4 min.

Curvas analíticas dos analitos foram construídas utilizando o método ME-LIF e bons parâmetros analíticos foram alcançados, permitindo a realização da validação deste método. Em seguida, os aminoácidos investigados foram devidamente identificados e quantificados nas amostras de microdiálise cerebral.

O método ME-LIF apresentou melhores respostas analíticas em relação ao método EC-LIF. O procedimento experimental envolvendo o método aplicando o microchip foi muito mais simples e rápido do que o método usando o sistema de eletroforese capilar convencional. Além disso, no método ME-LIF os tempos de migração dos aminoácidos não mudaram constantemente, como aconteceu no método EC-LIF, facilitando a identificação dos picos das espécies químicas de interesse.

PERSPECTIVAS

- Avaliar a resposta eletroquímica dos aminoácidos investigados;
- Preparar microchips com substratos alternativos, incluindo o PDMS e PMMA, para separar os analitos aplicando diferentes estratégias de detecção por fluorescência e eletroquímica;
- Aprimorar o sistema portátil de detecção por fluorescência, reduzindo ainda mais as suas dimensões e melhorar os limites de detecção e quantificação;
- Integrar todas as etapas analíticas de análise em um único dispositivo eletroforético, incluindo o processo de derivatização química. Com isso, se faz necessário investigar diferentes designs e dimensões dos microcanais e do microchip como um todo;
- Desenvolver um sistema de análise *in vivo* utilizando o método ME-LIF.

REFERÊNCIAS

- AKAIKE, N. et al. Modifications of excitatory and inhibitory transmission in rat hippocampal pyramidal neurons by acute lithium treatment. **Brain Research Bulletin**, v. 117, p. 39–44, 2015.
- ALBIN, M., WEINBERGER, R., SAPP, E. Fluorescence detection in capillary electrophoresis: evaluation of derivatization reagents and techniques. **Analytical Chemistry**, v. 63, p. 417-422, 1991.
- ARMANI, A. M. et al. “Label-free, single-molecule detection with optical microcavities.” **Science**, v. 317, p. 783–787, 2007.
- ARMENTA, J. M., DAWOUD, A. A., LAZAR, L. M. “Microfluidic chips for protein differential expression profiling.” **Electrophoresis**, v. 30, p. 1145–1156, 2009.
- AULT, J. M. et al. Dermal microdialysis sampling in vivo. **Pharmaceutical Research**, v. 11, p. 1631–1639, 1994.
- BAK, L., SCHOUSBOE, A., WAAGEPETERSEN, H. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **Journal of Neurochemistry**, v. 98, p. 641-653, 2006.
- BARD, A. J., FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. 2^a ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, 2002.
- BENVENISTE, H. Brain Microdialysis. **Journal of Neurochemistry**, v. 52, p. 1667-1669, 1989.
- BENVENISTE, H. et al. Regional cerebral glucose phosphorylation and blood flow after insertion of a microdialysis fiber through the dorsal hippocampus in the rat. **Journal of Neurochemistry**, v. 49, p. 729–734, 1987.
- BI, X. D. et al. Spatio-temporally resolved detection on a microfluidic chip for monitoring the dynamic processes of molecular events. **Analyst**, v. 137, p. 4016–4022, 2012.
- BOCKELMANN, R., REISER, M., HORN, T. F., WOLF, G. Influence of nitric oxide synthase activity on amino acid concentration in the quinolinate lesioned rat striatum: a microdialysis and histochemical study. **Amino Acids**, v. 19, p. 423-427, 2000.
- BORNHOP, D. J., SWINNEY, K. “Detection in capillary electrophoresis: a review,” **Electrophoresis**, v. 21, p. 1239–1250, 2000.
- BROSNAN, J., BROSNAN, M. The Sulfur-containing Amino Acids: An Overview. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1636–1640, 2006).

CARLSSON, M., CARLSSON, A. Interactions between glutamatergic and monoaminergic systems within the basal ganglia-implications for schizophrenia and Parkinson's disease. **Trends in Neurosciences**, v. 13, p. 272–274, 1990.

CARRILHO, E. et al. Microssistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1986-2000, 2007.

CASADO, M. et al. Analysis of cerebrospinal fluid γ -aminobutyric acid by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. **Electrophoresis**, v. 35, p. 1181-1187, 2014.

CASTRO, E. R., MANZ, A. Present state of microchip electrophoresis: State of the art and routine applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 66–85, 2015.

CHAMOUN, R. et al. Role of extracellular glutamate measured by cerebral microdialysis in severe traumatic brain injury. **Journal of neurosurgery**, v. 113, p. 564-569, 2010.

CHEN, J. et al. Imbalance between excitatory and inhibitory amino acids at spinal level is associated with maintenance of persistent pain-related behaviors. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 290–299, 2009.

CHEN, C. P., TENG, W., HAHN, J. H. Nanoband electrode for high-performance in-channel amperometric detection in dual-channel microchip capillary electrophoresis, **Electrophoresis**, v. 32, p. 838–843, 2011.

CHEN, G., WANG, J. Fast and simple sample introduction for capillary electrophoresis microsystems. **Analyst**, v. 129, p. 507-1, 2004.

COLTRO, W. K. T. et al. Monitoring of nitrite, nitrate, chloride and sulfate in environmental samples using electrophoresis microchips coupled with contactless conductivity detection. **Talanta**, v. 133, p. 521-527, 2015.

COLTRO, W. K. T., LUNTE, S. M., CARRILHO, E. Comparison of the analytical performance of electrophoresis microchannels fabricated in PDMS, glass, and polyester-toner. **Electrophoresis**, v. 29, p. 4928–4937, 2008.

COOPER, J., BLOOM, F., ROTH, R. **The Biochemical Basis of Neuropharmacology**, Oxford University Press, New York, 2003.

COURDEC, F. et al. Recent advances in amino acid analysis by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 33, p. 14–35, 2012.

CULBERTSON, C. T. et al. Micro total analysis systems: Fundamental advances and biological applications. **Analytical Chemistry**, v. 86, p. 95–118, 2014.

DAWOD, M., CHUNG, D. S. High-sensitivity capillary and ME using electrokinetic supercharging. **Journal of Separation Science**, v. 34, p. 2790–2799, 2011.

DOLNÍK, V. Wall coating for capillary electrophoresis on microchips. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3589–3601, 2004.

DU, M. et al. Simultaneous determination of 3-nitro tyrosine, o-, m-, and p-tyrosine in urine samples by liquid chromatography–ultraviolet absorbance detection with pre-column cloud point extraction. **Journal of Chromatography B**, v. 803, p. 321–329, 2004.

EIDE, P.K., STANISIC, M. Cerebral microdialysis and intracranial pressure monitoring in patients with idiopathic normal-pressure hydrocephalus: association with clinical response to extended lumbar drainage and shunt surgery. **Journal of Neurosurgery**, v. 112, p. 414–424, 2010.

EWING, A. G., GAVIN, P. F. Continuous Separations with Microfabricated Electrophoresis–Electrochemical Array Detection. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, p. 8932–8936, 1996.

FANGUY, J. C., HENRY, C. S. “The analysis of uric acid in urine using microchip capillary electrophoresis with electrochemical detection.” **Electrophoresis**, v. 23, p. 767–773, 2002.

FARBER, N. B., NEWCOMER, J. W., OLNEY, J. W., The glutamate synapse in neuropsychiatric disorders: Focus on schizophrenia and Alzheimer's disease. **Progress in Brain Research**, v. 116, p. 421–437, 1998.

FARO, L. R. et al. Role of glutamate receptors and nitric oxide on the effects of glufosinate ammonium, an organophosphate pesticide, on in vivo dopamine release in rat striatum. **Toxicology**, v. 311, p. 154–161, 2013.

FLORA, R., ZILBERSTEIN, B. O óxido nítrico como neurotransmissor no sistema nervoso entérico: Fisiopatologia e implicações no íleo adinâmico. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgias**, v. 25, p. 343, 1998.

FUNG, Y. et al. Native fluorescence detection of flavin derivatives by microchip capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence intensified charge-coupled device detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, p. 223–229, 2004.

GAS, B. High **Performance Capillary Electrophoresis – A primer**. Agilent Technologies, p. 182, 2009.

GHANIM, M. H., ABDULLAH, M. Z. Integrating amperometric detection with electrophoresis microchip devices for biochemical assays: recent developments. **Talanta**, v. 85, p. 28–34, 2011.

GINSBERG, M. D. et al. Differing Neurochemical and Morphological Sequelae of Global Ischemia: Comparison of Single- and Multiple-Insult Paradigms. **Journal of Neurochemistry**, v. 59, p. 2213–2223, 2006.

GOLAN, D. E. **Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2ª ed., cap. 2, 2009.

GONDA, S. R. et al. Microchip separations in reduced-gravity and hypergravity environments. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 7933–7940, 2005.

GONIL, P. et al. Synthesis and fluorescence properties of N-substituted 1-cyanobenz[*f*]isoindole chitosan polymers and nanoparticles for live cell imaging. **Biomacromolecules**, v.11, p. 2879-88, 2014.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, M. et al. Stimulation of the Po-shen and Shen-hun scalp-acupuncture bands modifies levels of inhibitory and excitatory amino acids in the immature rat brain. **Neurochemistry International**, v. 63, p. 275–282, 2013.

GRECO, S. et al. Microdialysate analysis of monoamine neurotransmitters: a versatile and sensitive LC-MS/MS method. **Analytica Chimica Acta**, v. 771, p. 65-72, 2013).

GREENAMYRE, J. T., YOUNG, A. B. Excitatory amino acids and Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, v. 5, p. 593-602, 1989.

GUIHEN, E., O'CONNOR, W. T. Current separation and detection methods in microdialysis the drive towards sensitivity and speed. **Electrophoresis**, v. 30, p. 2062–2075, 2009.

HAMMARLUND-UDENAES, M. The use of microdialysis in CNS drug delivery studies. Pharmacokinetic perspectives and results with analgesics and antiepileptics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.45, p. 283–294, 2000.

HARRISON, D. J. et al. Capillary electrophoresis and sample injection systems integrated on a planar glass chip. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 1926-1932, 1992.

HASSEL, B., IVANOVIC, J., DAHLBERG, D. High extracellular concentration of excitatory amino acids glutamate and aspartate in human brain abscess. **Neurochemistry International**, v. 69, p. 41–47, 2014.

HENRY, C. S. **Microchip Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols**. Humana Press, Totowa, New Jersey, 2006.

HIGUCHI, T. et al. Naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde/Cyanide ion: A rationally designed fluorogenic reagent for primary amines. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 1096-1101, 1987.

HIMMELREICH, U. et al. Identification of *Staphylococcus aureus* brain abscesses: rat and human studies with ¹H MR spectroscopy. *Radiology*, v. 236, p. 261–270, 2005.

HOFFMANN, E., STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Application**, 3ª ed., Wiley, New York, 2007.

HUANG, S. Y. et al. Suppressive effects of intrathecal granulocyte colony-stimulating factor on excessive release of excitatory amino acids in the spinal cerebrospinal fluid of rats with cord ischemia: role of glutamate transporters. **Neuroscience**, v. 165, p. 1217–1232, 2010.

ICHIKAWA, A., TANAKA, S. **Histamine Biosynthesis and Function**. eLS. 2012 (Publicado online: 16 APR 2012 DOI: 10.1002/9780470015902.a0001404.pub2 eLS).

JACOBSON, S. C., RAMSEY, J. M. Microchip electrophoresis with sample stacking. **Electrophoresis**, v. 16, p. 481–486, 1995.

JACOBSON, S. C., RAMSEY, J. M., MOORE, A. W. Fused quartz substrates for microchip electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 67, p. 2059–2063, 1995.

JARDIM, I. C. S., SILVA, C. R., SEGATO, M. P. Eletrocromatografia capilar: Contextualização, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 431-440, 2009.

JOHNSON, M. E., LANDERS, J. P. Fundamentals and practice for ultrasensitive laser-induced fluorescence detection in microanalytical systems. **Electrophoresis**, v. 25, p. 3513–3527, 2004.

JOKERST, J. C. et al. Advances in microfluidics for environmental analysis. **Analist**, v. 137, p. 24-32, 2012.

KAUL, S., FAIMAN, M. D., LUNTE, C. E. Determination of GABA, glutamate and carbamathione in brain microdialysis samples by capillary electrophoresis with fluorescence detection. **Electrophoresis**, v. 32, p. 284–29, 2011.

KIM, E., XIA, Y. N., WHITESIDES, G. M. Polymer microstructures formed by molding in capillaries. **Nature**, v. 376, p. 581–584, 1995.

KOWALSKI, P. et al. Improvement of derivatized amino acid detection sensitivity in micellar electrokinetic capillary chromatography by means of acid-induced pH-mediated stacking technique. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 406, p. 6713-6721, 2014.

KREBS-KRAFT, D. L., FRANTZ, K. J., PARENT, M. B. **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Practical Neurochemistry Methods**, Springer, New York, p. 219-256, 2007.

KUBAN, P., HAUSER, P. C. Fundamentals of electrochemical detection techniques for CE and MCE. **Electrophoresis**, v. 30, p. 3305–3314, 2009.

KUMAR, C. S. **Microfluidic Devices in Nanotechnology Applications**. John Wiley & Sons, Inc, New Jersey, USA, 2010.

KUSCHEL, M., BUHLMANN, C., PRECKEL, T. High-Throughput Protein and DNA Analysis Based on Microfluidic On-Chip Electrophoresis. **Journal of Laboratory Automation**, v.10, p. 319-326, 2005.

LACHER, N. A. et al. Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry. **Electrophoresis**, v. 22, p. 2526–2536, 2001.

LANDERS, J. P. **Handbook of capillary and microchip electrophoresis and associated microtechniques**. Ed. Boca Raton: CRC Press, 3^a ed., v. 21, p. 1567, 2008.

LEON, R. et al. Protective function of taurine in glutamate-induced apoptosis in cultured neurons. **Journal of Neuroscience Research**, v. 5, p. 1185-1194, 2009.

LI, H. et al. A novel microfluidic chip electrophoresis strategy for simultaneous, label-free, multi-protein detection based on a graphene energy transfer biosensor. **Analyst**, v. 139, p. 2890–2895, 2014.

LIANG, Z. H. et al. Microfabrication of a planar absorbance and fluorescence cell for integrated capillary electrophoresis devices. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 1040–1046, 1996.

LIN, X. et al. Assay of multiplex proteins from cell metabolism based on tunable aptamer and microchip electrophoresis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 63, p. 105-111, 2015.

LINZ, T. H., LUNTE, S. M. Determination of methylarginines in infant plasma by CE-LIF. **Analytical Methods**, v. 6, p. 3990–3994, 2014.

LONNROTH, P., JANSSON, P.A., SMITH, U. A microdialysis method allowing characterization of intercellular water space in humans. **The Journal of Physiology**, v. 253, p. 228–231, 1987.

LUNTE, S. M. et al. A microchip electrophoresis device with on-line microdialysis sampling and on-chip sample derivatization by naphthalene 2,3-dicarboxaldehyde/2-mercaptoethanol for amino acid and peptide analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 42, p. 529–534, 2006.

LUNTE, S. M. et al. Development and optimization of an integrated PDMS based-microdialysis microchip electrophoresis device with on-chip derivatization for continuous monitoring of primary amines. **Electrophoresis**, v. 34, p. 895-902, 2013.

MA, M. et al. Determination of monoamine neurotransmitters in human urine by carrier-mediated liquid-phase microextraction based on solidification of stripping phase. **Talanta**, v. 144, p. 356-362, 2015.

MADOU, M. J. **Fundamentals of Microfabrication**, 2^a ed., CRC Press: New York, 2002.

MANZ, A. et al. Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems. **Journal of Chromatography A**, v. 593, p. 253-258, 1992.

MANZ, A. et al. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 1, p. 244–248, 1990.

MANZ, A. et al. Micro Total Analysis Systems. Latest Advancements and Trends. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 3887, 2006.

MARINS, R.V. et al. Alternativa analítica para especificação físico-química de mercúrio em águas costeiras tropicais. **Química Nova**, v. 25, p. 372-378, 2002.

MAYER, A. P., OSORIO, I., LUNTE, C. E. Microperfusion of 3-MPA into the brain augments GABA. **Epilepsy & Behavior**, v. 29, p. 478-484, 2013.

MCDONALD, J. C., WHITESIDES, G. M. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, p. 491-499, 2002.

MELDRUM, B. S. **Antiepileptic Drugs (Handbook of Experimental Pharmacology)**, Springer, Berlin, p. 153, 1985.

MICKE, G. A., DOLZAN, M. D., SPUDEIT, D. A. Conceitos básicos em Eletroforese Capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, p. 287-297, 2012.

MIRANDA, G. A., ARIAS, J. A. Neuromodulación e histamina: regulación de la liberación de neurotransmisores por receptores H3. **Salud Mental**, v. 35, p. 345-352, 2012.

MONNIG, C. A., KENNEDY, R. T. Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 280-R314, 1994.

MONTIGNY, P. et al. Naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde/cyanide ion: a rationally designed fluoregenic reagent for primary amines. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 1096-1101, 1987.

MORA, M. F., STOCKTON, A. M., WILLIS, P. A. Microchip capillary electrophoresis instrumentation for in situ analysis in the search for extraterrestrial life. **Electrophoresis**, v. 33, p. 2624–2638, 2012.

MORITA, M. et al. Oral Supplementation with a Combination of L-Citrulline and L-Arginine Rapidly Increases Plasma L-Arginine Concentration and Enhances NO Bioavailability. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 454, p. 53–57, 2014.

NANDI, P., LUNTE, S. M. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 651, p. 1-14, 2009.

NESTLER, E., HYMAN, S., MALENKA, R. **Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience**, New York, 2001.

NESTLER, E., KRISHNAN, V. The molecular neurobiology of depression. **Nature**, v. 455, p. 894-902, 2008.

NGE, P. N., ROGERS, C. I., WOOLLEY, A. T. Advances in microfluidic materials, functions, integration and applications. **Chemical Reviews**, v. 113, p. 2550–2583, 2013.

NGUYEN, A., NAM-TRUNG, M. S., WERELEY, S. T. **Fundamentals and Applications of Microfluidics**. Artech House, 2^a ed., Boston, USA, 2006.

NISHIZAWA, Y. Glutamate release and neuronal damage in ischemia. **Life Science**, v. 69, p. 369–381, 2001.

OATES, M. D., JORGENSON, J. W. Determination of naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde-labeled amino acids by open tubular liquid chromatography with electrochemical detection. **Analytical Chemistry**, v. 61, p. 432-435, 1989.

OCVIRK, G., TANG, T., HARRISON, D. Optimization of confocal epifluorescence microscopy for microchip-based miniaturized total analysis systems. **Analyst**, v.123, p. 1429–1434, 1998.

PASQUARELLI, A. Biochips: technologies and applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, p. 495–508, 2008.

PERRY, M., LI, Q., KENNEDY, R. T. Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters. **Analytica Chimica Acta**, v. 653, p. 1-22, 2010.

PLOCK, N., KLOFT, C. Microdialysis—theoretical background and recent implementation in applied life-sciences. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 25, p. 1–24.

PRESTES, O. D. et al. Desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação de histamina em vinhos utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. **Química Nova**, v. 30, p. 18-21, 2007.

PRICE, K. E., VANDAVEER, S. S., LUNTE, C. E. Tissue-targeted metabonomics: metabolic profiling by microdialysis sampling and microcoil NMR. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 904–909, 2005.

QIN, B. et al. Electrophoretic separations on microfluidic chips. **Journal of Chromatography: A**, v. 1184, p. 542–559, 2008.

RAFFA, R. B. et al. Measurement of glutamate and aspartate in *Planaria*. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 53, p. 291-295, 2006.

REINHOUD, N. J. et al. Analysis of Glutamate, GABA, Noradrenaline, Dopamine, Serotonin, and Metabolites Using Microbore UHPLC with Electrochemical Detection. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 4, p. 888-894, 2013.

REYES, D. R. et al. Micro Total Analysis Systems. 1. Introduction, Theory, and Technology. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 2623-2636, 2002.

RICHARDS, D. A. et al. Extracellular amino acid levels in the human liver during transplantation: a microdialysis study from donor to recipient, **Amino Acids**, v. 33, p. 429–437, 2007.

RIEKKOLA, M. L. et al. Terminology for analytical capillary electromigration techniques. **Pure and Applied Chemistry**, v. 76, p. 443-451, 2004.

RILEY, C. M. et al. Electrochemical characteristics of amino acids and derivatized with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde: pH effects and differences in oxidation potentials. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 1259-1263, 1992.

ROBERTS, R.C., ROCHE, J. K., MCCULLUMSMITH, R. E. Localization of excitatory amino acid transporters EAAT1 and EAAT2 in human postmortem cortex: a light and electron microscopic study. **Neuroscience**, v. 277, p. 522–540, 2014.

ROMAN, G. T., MCDANIEL, K., CULBERTSON, C. T. High efficiency micellar electrokinetic chromatography of hydrophobic analytes on poly(dimethylsiloxane)microchips. **Analyst**, v. 13, p. 194–201, 2006.

SALVADORE, G. et al. An investigation of amino-acid neurotransmitters as potential predictors of clinical improvement to ketamine in depression. **International Journal of Neuropsychopharmacology**, v. 15, p. 1063–1072, 2012.

SANLI, N., TAGUE, S. E., LUNTE, C. Analysis of amino acid neurotransmitters from rat and mouse spinal cords by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 107, p.217–222, 2015.

SARIEGO-JAMARDO, A. et al. Efficacy of the Ketogenic Diet for the Treatment of Refractory Childhood Epilepsy: Cerebrospinal Fluid Neurotransmitters and Amino Acid Levels. **Pediatric Neurology**, v. 53, p. 422-426, 2015.

SAYLOR, R. A., LUNTE, S. M. A review of microdialysis coupled to microchip electrophoresis for monitoring biological events. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 48–64, 2015.

SEGATO, M., SILVA, C., JARDIM, I. Eletrocromatografia capilar: contextualização, estado da arte e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 431-440, 2009.

SHADPOUR, H., MUSYIMI, H., CHEN, J. Physicochemical properties of various polymer substrates and their effects on ME performance. **Journal of Chromatography A**, v. 1111, p. 238–251, 2006.

SHARP, T., ZETTERSTROM, T. **Handbook of Microdialysis: Methods, Applications and Clinical Aspects**, Elsevier, New York, p. 5–16, 2007.

STENKEN, J. A., SIDES, C. R. Microdialysis sampling techniques applied to studies of the foreign body reaction. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 57, p. 74–86, 2014.

STOBAUGH, J. F. et al. Sulfobutyl Ether β -Cyclodextrin as a Chiral Discriminator for Use with Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 4013-4018, 1994.

SUNTORNUSUK, L. et al. Recent applications of microchip electrophoresis to biomedical analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 113, p. 72-96, 2015.

TAGLIARO, F., MANETTO, G., CRIVELLENTI, F. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, p. 75-88, 1998.

TAKAYAMA, S. et al. "Patterned electrode-based amperometric gas sensor for direct nitric oxide detection within microfluidic devices." **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 3300–3305, 2010.

TANG, X. et al. Determination of baicalin in rat cerebrospinal fluid and blood using microdialysis coupled with ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 874, p. 77–83, 2008.

TAVARES, M. F. M. Mecanismo de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, p. 493-511, 1997.

TEMIZ, Y. et al. Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? **Microelectronic Engineering**, v. 132, p. 156–175, 2015.

TERRY, S. C. et al. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. **IEEE Transactions on Electron Devices**, v. 26, p. 1880-1884, 1979.

TSAI, T. **Applications of microdialysis in pharmaceutical science**, Wiley, New Jersey, cap. 3, 2011.

UNGERRSTEDT, U. Microdialysis – principles and applications for studies in animals and man. **Journal of Internal Medicine**, v. 230, p. 365–373, 1991.

VAJDA, F. J. E. Neuroprotection and neurodegenerative disease. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 9, p. 4-8, 2002.

VILKNER, T., JANASEK, D., MANZ, A. Micro total analysis systems. Recent developments. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 3373–3386, 2004.

WANG, H. Y. et al. Low temperature bonding for microfabrication of chemical analysis devices. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 45, p. 199-207, 1997.

WARD, K. W., POLLACK, G. M. Use of intrauterine microdialysis to investigate methanol-induced alterations in uteroplacental blood flow. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 140, p. 203–210, 1996.

WEINBERGER, R. **Practical capillary electrophoresis**, Academic Press: San Diego, CA, 1993.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, p. 368–373, 2006.

WILEY, J. **Elements of Molecular Neurobiology**, C.U.M Smith, London, cap. 11, 1996.

WILSON, G. S., GIFFORD, R. Biosensors for real-time in vivo measurements. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 2388–2403, 2005.

WISNIEWSKI, N., MOUSSY, F., REICHERT, W. M. Characterization of implantable biosensor membrane biofouling. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 366, p. 611-621, 2000.

WOO, K. L., LUNTE, C. E. The development of multiple probe microdialysis sampling in the stomach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, p. 20–26, 2008.

WOTJAK, C.T. et al. Listening to neuropeptides by microdialysis: echoes and new sounds? **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, p. 125–134, 2008.

WU, M. et al. Sensitive analysis of amino acids and vitamin B3 in functional drinks via field-amplified stacking with reversed-field stacking in microchip electrophoresis. **Talanta**, v. 131, p. 624-631, 2015.

WU, J., GU, M. Microfluidic sensing: state of the art fabrication and detection techniques. **Journal of Biomedical Optics**, v. 16, p. 1-13, 2011.

YANG, L. et al. Small-angle optical deflection from collinear configuration for sensitive detection in microfluidic systems. **Electrophoresis**, v. 33, p.1996–2004, 2012.

ZAPATA, A., CHEFER, V. I., SHIPPENBERG, T. S., DENOROY, L. Curr. Protoc. **Neuroscience**, Cap. 7, p. 1–37, 2009.

ZHU, T. et al. Simultaneous intravenous and intra middle ear dosing to determine cefditoren influx and efflux clearances in middle ear fluid in freely moving chinchillas. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, p. 1947–1956, 2003.