

UFAL

**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
E BIOTECNOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS BASEADAS EM SISTEMAS
MINIATURIZADOS COM APLICAÇÕES EM QUÍMICA ANALÍTICA**

JOSÉ GUIMARÃES FERREIRA DE LIMA JÚNIOR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970 - Maceió - AL

JOSÉ GUIMARÃES FERREIRA DE LIMA JÚNIOR

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS BASEADAS EM
SISTEMAS MINIATURIZADOS COM APLICAÇÕES EM QUÍMICA
ANALÍTICA**

Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos

Maceió – AL
2023

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

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

- L732d Lima Júnior, José Guimarães Ferreira de.
Desenvolvimento de metodologias baseadas em sistemas miniaturizados com aplicações em química analítica / José Guimarães Ferreira de Lima Júnior. – 2023.
118 f. : il., graf., tabs. color.
- Orientador: Diógenes Meneses dos Santos.
Tese (doutorado em ciências) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2023.
- Bibliografia: f. 114-117.
1. Equipamento eletrônico em miniatura. 2. Dispositivos baseados em papel. 3. Ranitidina. 4. Eletroforese em microchip. 5. Eletroquímica - Detecção. I. Título.

CDU: 543.545.2



FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese do Doutorando JOSÉ GUIMARÃES FERREIRA DE LIMA JÚNIOR intitulada: “*DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIAS BASEADAS EM SISTEMAS MINIATURIZADOS COM APLICAÇÕES EM QUÍMICA ANALÍTICA*”, apresentada, em sessão aberta, ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 28 de setembro de 2023, às 14h, por meio de *videoconferência*.

Maceió, 28 de setembro de 2023.

Comissão Examinadora:

Dr. BRUNO GABRIEL LUCCA, UFMS
Examinador Externo à Instituição

Documento assinado digitalmente
gov.br BRUNO GABRIEL LUCCA
Data: 29/09/2023 09:06:46-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. PHABYANNO RODRIGUES DE LIMA, IFAL
Examinador Externo à Instituição

Documento assinado digitalmente
gov.br PHABYANNO RODRIGUES LIMA
Data: 29/09/2023 10:20:57-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. WANDER GUSTAVO BOTERO, UFAL
Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
gov.br WANDER GUSTAVO BOTERO
Data: 29/09/2023 09:20:28-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dra. FABIANE CAXICO DE ABREU GALDINO, UFAL
Examinadora Interna

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIANE CAXICO DE ABREU GALDINO
Data: 29/10/2023 00:11:49-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr. DIÓGENES MENESES DOS SANTOS, UFAL
Presidente

Documento assinado digitalmente
gov.br DIÓGENES MENESES DOS SANTOS
Data: 29/09/2023 08:51:45-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dedico este trabalho à minha mãe, Maria Lucinalva, minha mentora e maior referência que tenho em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho só foi possível de ser realizado devido a influência, empenho, companheirismo e ajuda de diversas pessoas. Minha trajetória durante o doutorado possibilitou que um jovem do interior de Alagoas pudesse desenvolver ciência em dentro e fora do Brasil. A oportunidade de realizar parte do doutorado com uma pesquisadora de referência internacional numa das melhores universidades dos Estados Unidos fez com que novos horizontes se abrissem para mim, levando ao aumento da minha bagagem acadêmica, mas principalmente pessoal. Esse trabalho é o resultado de anos de dedicação para que esse momento se tornasse realidade. A todas as pessoas aqui elencadas, minha gratidão eterna por fazerem parte desse momento ímpar.

Assim, gostaria de agradecer as pessoas abaixo, que se mostraram essenciais durante todo esse processo:

À minha família, base fundamental para as minhas conquistas e formação humana;

Aos meus pais, José Guimarães e Maria Lucinalva por me apoiarem irrestritamente durante toda a minha vida;

Aos meus irmãos, Pedro e Lara, pelo companheirismo vivenciado dia após dia;

À minha amada Kelly Monique, um ser especial que tenho a honra de compartilhar meus dias e sorte por ter conhecido. Sou grato por todo carinho, amor e apoio durante essa caminhada;

Aos meus grandes amigos de UFAL/LINQA Wood, Elysson, Alysson, Fátima, Raphael, Jorge e Pato, por todos os momentos e ensinamento vividos e compartilhados;

Aos meus grande amigos de LEMAN, Ângladis, Elvis, Sara, João Victor, Ivis, Samaysa e Leyllane, por todas as discussões científicas e principalmente não científicas;

Aos meus grandes amigos do GEM/Unicamp, em especial Ana Clara Fernandes, uma amiga sem igual que me acompanhou em toda trajetória do doutorado.

Aos meus amigos do Susan Lunte Group, em especial Indika Warnakula, Galina Bulgakova e Dhanuskha Weerasekara, seres de luz que foram essenciais durante o período sanduíche na University of Kansas;

Ao meu orientador, Professor Doutor Diógenes Meneses, por ter acreditado na minha capacidade e ter confiança no meu trabalho;

À Professora Doutora Fabiane Caxico, pelo apoio e discussões relevantes;

Ao Professor Doutor José Alberto Fracassi pela receptividade durante o estágio na Unicamp;

À Professora Doutora Susan Marie Lunte, por toda prestatividade, amizade e orientações mesmo durante um período tão adverso. Serei sempre grato e levarei todos os ensinamentos por toda minha carreira.

Aos órgãos de fomentos CAPES, CNPq, FAPEAL e as instituições UFAL, IFAL e Unicamp, pelo auxílio financeiro e o espaço físico que viabilizaram a realização deste projeto.

“Eu sou a continuação de um sonho
Da minha mãe, do meu pai
De todos que vieram antes de mim
Eu sou a continuação de um sonho
Da minha vó, do meu vô
Quem sangrou pra gente poder sorrir”.

(Continuação de um sonho – BK)

RESUMO

Sistemas miniaturizados possuem características únicas que possibilitam suas aplicações nos mais diversos campos do conhecimento. O baixo custo por análise, a portabilidade e as possibilidades de hifenação das mais diversas técnicas analíticas são atributos que vem chamando a atenção da comunidade científica desde os anos 1990. Neste trabalho, duas metodologias distintas utilizando sistemas miniaturizados são apresentadas. A primeira metodologia utiliza dispositivos analíticos baseados em papel (PADs) para determininação colorimétrica de ranitidina através da reação do analito com a sonda 4-Cloro-7-nitrobenzofurazano (NBD-Cl). A ranitidina é um antagonista do receptor H2 da histamina empregado no tratamento de úlcera gastroduodenal e doenças relacionadas, como refluxo gastroesofágico e síndrome de Zollinger-Ellison. Vários métodos analíticos foram relatados para a determinação de ranitidina, incluindo eletroquímicos, espectofotométricos, fluorescência e quimioluminescência. Embora esses métodos sejam adequados para a determinação de ranitidina em diferentes amostras, eles apresentam grandes desvantagens, incluindo alto custo e consumo de reagente, operação trabalhosa, equipamentos complexos e pessoal treinado. Parâmetros analíticos como pH, tipo de tampão, concentração dos reagentes e temperatura foram otimizados para a metodologia proposta. Em condições ótimas, o sistema de análise utilizou tampão fosfato (pH 8,0; 30mM), com adição de NBD-Cl (0,8 μ L, 20mM). o método apresentou uma faixa linear de 0,2 – 1,5 mmol L⁻¹, correspondendo à equação $[(M_b - M_r)/M_b] = 43,04(\pm 1,28)C_{\text{ranitidina}} - 9,48 \times 10^{-13} (\pm 5,52 \times 10^{-8})$ e coeficiente de correlação linear $r = 0,9982$. Os testes de recuperação com amostras reais apresentaram valores entre 90,90% e 109,27%. Além disso, essa metodologia mostrou-se adequada para aplicação em amostras farmacêuticas e é uma alternativa simples, barata e rápida para a determinação de ranitidina. A segunda metodologia desenvolvida nesse trabalho utilizou um sistema de microchip eletroforese com detecção eletroquímica (ME-EC) para a separação e determinação de tióis biológicos (glutathiona e cisteína) e ácido ascórbico. Essas espécies possuem papel fundamental dentro da fisiologia humana e protegem as células das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sendo fundamentais para a homeostase celular. As concentrações dessas espécies nos seres humanos indicam os níveis de estresse oxidativo e podem sugerir a necessidade de tratamento para doenças como diabetes e câncer. Utilizando um microchip híbrido PDMS/vidro, a metodologia foi baseada na reação dos tióis com a menadiona, sendo o produto desta reação analisado via ME-EC. Parâmetros como composição do tampão, uso de surfactantes e ciclodextrinas foram otimizados. Assim, o sistema foi otimizado tendo potencial de detecção de +0,4 V, tampão HEPES (pH 8,5; 30mM) com adição de SDS 8mM SBE- β -CD a 2mM. A metodologia possibilitou a construção de curvas analíticas para cada um dos analitos com coeficientes de correlação linear acima de 0,995. Além disso, as faixas lineares foram de 2,5 – 100 μ M para glutathiona e 5 – 50 μ M para cisteína e ácido ascórbico. As principais vantagens da metodologia proposta estão no baixo potencial de detecção, facilidade na execução das etapas experimentais e viabilidade para análise de amostras complexas como plasma e eritrócitos humanos.

Palavras-chave: Sistemas miniaturizados; Dispositivos baseados em papel; Ranitidina; Microchip eletroforese; Detecção eletroquímica;

ABSTRACT

Miniaturized systems have unique characteristics that enable their applications in several fields of knowledge. The low cost per analysis, portability and the possibilities of hyphenating the most diverse analytical techniques are attributes that have been attracting the attention of the scientific community since the 1990s. In this work, two different methodologies using miniaturized systems are presented. The first methodology uses paper-based analytical devices (PADs) for colorimetric determination of ranitidine through the reaction of the analyte with the probe 4-Chloro-7-nitrobenzofurazan (NBD-Cl). Ranitidine is a histamine H₂ receptor antagonist used in the treatment of gastroduodenal ulcers and related diseases, such as gastroesophageal reflux and Zollinger-Ellison syndrome. Many analytical methods have been reported for the determination of ranitidine, including electrochemical, spectrophotometric, fluorescence, and chemiluminescence. Although these methods are suitable for the determination of ranitidine in different samples, they have major disadvantages, including high cost and reagent consumption, laborious operation, complex equipment, and trained personnel. Analytical parameters such as pH, type of buffer, concentration of reagents and temperature were optimized for the proposed methodology. Under optimal conditions, the analysis system used phosphate buffer (pH 8.0; 30mM), with the addition of NBD-Cl (0.8 μ L, 20mM). the method presented a linear range of 0.2 – 1.5 mmol L⁻¹, corresponding to the equation $[(M_b - M_r)/M_b] = 43,04(\pm 1,28)C_{\text{ranitidine}} - 9,48 \times 10^{-13} (\pm 5,52 \times 10^{-8})$ and linear correlation coefficient $r = 0.9982$. Recovery tests with real samples showed values between 90.90% and 109.27%. Furthermore, this methodology proved to be suitable for application in pharmaceutical samples and is a simple, cheap and quick alternative for the determination of ranitidine. The second methodology developed in this work used an electrophoresis microchip system with electrochemical detection (ME-EC) for the separation and determination of biological thiols (glutathione and cysteine) and ascorbic acid. These species play a fundamental role in human physiology and protect cells from reactive oxygen and nitrogen species, being fundamental for cellular homeostasis. The concentrations of these species in humans indicate levels of oxidative stress and may suggest the need for treatment for diseases such as diabetes and cancer. Using a PDMS/glass hybrid microchip, the methodology was based on the reaction of thiols with menadione, the product being of this reaction analyzed via ME-EC. Parameters such as buffer composition, use of surfactants and cyclodextrins were optimized. Thus, the system was optimized with a detection potential of +0.4 V, HEPES buffer (pH 8.5; 30mM) with the addition of 8mM SDS SBE- β -CD at 2mM. The methodology made it possible to construct analytical curves for each of the analytes with linear correlation coefficients above 0.995. Furthermore, the linear ranges were 2.5 – 100 μ M for glutathione and 5 – 50 μ M for both cysteine and ascorbic acid. The main advantages of the proposed methodology are the low detection potential, ease in carrying out the experimental steps and feasibility for analyzing complex samples such as human plasma and erythrocytes.

Keywords: Miniaturized systems; Paper-based devices; Ranitidine; Microchip electrophoresis; Electrochemical detection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama para a fabricação de dispositivo de análise baseado em papel desenvolvido por Martinez e colaboradores.	23
Figura 2- Resumo gráfico do trabalho de Silva e colaboradores para a determinação colorimétrica de fenacetina.	26
Figura 3- Reação para a formação do produto colorimétrico entre (NA-DDTC) e Cu^{2+} utilizado por Fernandes e colaboradores.	27
Figura 4 – Resumo das formas de geração de cor em dispositivos baseados em papel.	29
Figura 5 - Resumo gráfico do trabalho de Huy e colaboradores para a determinação de tetraciclina utilizando dispositivos baseados em papel.	30
Figura 6 - Estrutura da ranitidina.	30
Figura 7 - Resumo gráfico do procedimento para a determinação de ranitidina em amostras farmacêuticas de acordo com o método proposto.	37
Figura 8- Resultados obtidos para a avaliação da concentração e volume de NBD-Cl para o método proposto. $n=3$	40
Figura 9- Avaliação da influência da presença de água na solução de NBD-Cl. $n=3$	41
Figura 10 - Avaliação da influência da temperatura para a geração do produto colorimétrico entre ranitidina e NBD-Cl. $n=3$	42
Figura 11 - Imagens dos dispositivos utilizados na avaliação da temperatura. Temperaturas superiores a 80°C levam a uma diminuição do tamanho dos <i>spot tests</i> , inviabilizando o uso.	43
Figura 12 - Gráfico com os resultados obtidos para o teste de variação da cor ao longo do tempo. O <i>inset</i> mostra a variação da cor do dispositivo no intervalo de 1h. $n=3$	43
Figura 13- Gráfico com os resultados referentes à avaliação da influência de CTAB na determinação de ranitidina utilizando NBD-Cl como sonda colorimétrica. $n=3$	45
Figura 14- Gráfico das distribuições das espécies de ranitidina em função do pH. H_2A representa a espécie totalmente associada, HA representa a espécie parcialmente dissociada e A representa a espécie totalmente dissociada.	46
Figura 15- Gráfico com os resultados obtidos para a avaliação do pH do meio reacional para o método proposto.	47
Figura 16 - Sensibilidade analítica em função dos sistemas tamponantes avaliados para o método proposto. $n=3$	49
Figura 17 - Gráfico com os resultados obtidos para a avaliação da concentração do tampão fosfato utilizado na metodologia proposta. $n=3$	50
Figura 18 - Resultados obtidos para a avaliação de possíveis interferentes ao método proposto na ausência e na presença de ranitidina. $n=3$	51
Figura 19 - Curva analítica otimizada para a determinação de ranitidina, de acordo com o método proposto. <i>Inset</i> : Foto do dispositivo utilizado para a construção da curva analítica. $n=3$	52
Figura 20 - Cromatograma obtido a partir da metodologia de referência para a determinação de ranitidina.	54
Figura 21 - Gráfico de Job para ranitidina e NBD-Cl.	56
Figura 22- A) Mecanismo genérico para a reação de substituição nucleofílica aromática ao NBD-Cl. B) Reação proposta para a ranitidina e NBD-Cl.	56
Figura 23- MEV com diferentes ampliações para dispositivo contendo apenas papel. A) Ampliação de 78x. B) Ampliação de 168x.	58

Figura 24 - MEV com diferentes ampliações para dispositivo contendo NBD-Cl e ranitidina (0,5mM). A) Ampliação de 78x. B) Ampliação de 168x.....	58
Figura 25- Figura 24 - MEV com diferentes ampliações para dispositivo contendo NBD-Cl e ranitidina e CTAB. A) Ampliação de 78x. B) Ampliação de 168x.....	59
Figura 26 - Esquema básico de uma eletroforese capilar. A separação das espécies ocorre com base nas diferenças na razão carga/massa.	65
Figura 27 - Organograma com os diversos tipos de eletroforese capilar.	66
Figura 28 - Representação do fluxo electrosmótico que ocorre dentro dos capilares.	67
Figura 29 - Estrutura do PDMS.....	69
Figura 30 - Diferentes abordagens para injeção de amostra em eletroforese capilar e microchip eletroforese.	71
Figura 31 - Esquema do sistema de injeção de amostra hidrodinâmica acoplado com o dispositivo PDMS/vidro.	72
Figura 32 – Organograma com as principais técnicas de detecção para microchip eletroforese	75
Figura 33 - Resumo gráfico do trabalho de Wang e colaboradores (2022).....	76
Figura 34 - Esquema do microchip baseado em vidro com tubo guia utilizado por Wu e colaboradores (2004).	78
Figura 35 – A) Eletroferograma para a detecção de catecol utilizando configuração <i>in-channel</i> . B) Eletroferograma para a detecção de catecol utilizando configuração <i>end-channel</i>	79
Figura 36 – Principais espécies oxidantes e antioxidantes e suas classificações quanto à origem.....	81
Figura 37 – Esquema da derivatização dos tióis com o reagente NPM presente no trabalho de Forgacsova e colaboradores.....	83
Figura 38 – Resumo gráfico do dispositivo PDMS/vidro utilizado no trabalho.	88
Figura 39 – Reação da menadiona com tióis e procedimento de derivatização.....	89
Figura 40 – Sistema ME-EC utilizado no trabalho e posicionamento do eletrodo.	90
Figura 41 – Esquema da reação entre os tióis (RSH) e a orto-quinona presente no trabalho de Lee e colaboradores (2014).	91
Figura 42 – Eletroferograma para p-benzoquinona. Condições experimentais: Microchip PDMS/Vidro. Canal de separação: 5cm. Eletrólito de suporte: Tampão fosfato (10mM, pH 2.5), SDS 8mM, EDTA 1mM E_{det} : +0.6V / E_{inj} : +1600V , E_{sep} : +1900V.....	92
Figura 43 – A) eletroferograma referente à mistura entre cisteína (10 μ M) com p-BQN (25 μ M) e B) eletroferograma referente à mistura entre glutationa (15 μ M) com p-BQN (25 μ M). Condições experimentais: Microchip PDMS/Vidro. Canal de separação: 5cm. Eletrólito de suporte: Tampão fosfato (10mM, pH 2.5), SDS 8mM, EDTA 1mM E_{det} : +0.6V / E_{inj} : +1600V , E_{sep} : +1900V	93
Figura 44 – Perfil dos eletroferogramas obtidos durante os experimentos com mistura de cisteína, glutationa e p-BQN. Condições experimentais: Microchip PDMS/Vidro. Canal de separação: 5cm. Eletrólito de suporte: Tampão fosfato (10mM, pH 2.5), SDS 8mM, EDTA 1mM E_{det} : +0.6V / E_{inj} : +1600V , E_{sep} : +1900V.....	94
Figura 45 – Gráficos referentes às análises de área de pico para determinação de cada analito presente na mistura entre p-BQN, glutationa e cisteína.	95
Figura 46 – Experimento de adição de ácido ascórbico durante eletroferograma para identificação dos picos. Condições experimentais: Microchip PDMS/Vidro. Canal de	

separação: 5cm. Eletrólito de suporte: Tampão fosfato (10mM, pH 2.5), SDS 8mM, EDTA 1mM e 1mM β ciclodextrina sulfatada. E_{det} : +1.0V / E_{inj} : +1600V , E_{sep} : +1900V.....	96
Figura 47 – Avaliação da reação de ranitidina com p-BQN utilizando a metodologia proposta por Elgawish e colaboradores. Condições experimentais: Microchip PDMS/Vidro. Canal de separação: 5cm. Eletrólito de suporte: Tampão HEPES (30mM, pH 8.5), SDS 8mM, EDTA 1mM e 1mM β ciclodextrina sulfatada. E_{det} : +0.6V / E_{inj} : +1600V , E_{sep} : +1900V.....	97
Figura 48 – Eletroferogramas para GSH, cys e AA (10 – 100 μ M) com base na reação de derivatização com menadiona. Condições experimentais: Microchip PDMS/Vidro. Canal de separação: 5cm. Eletrólito de suporte: Tampão HEPES (30mM, pH 8.5), SDS 8mM, EDTA 1mM e 1mM β ciclodextrina sulfatada. E_{det} : +0.6V / E_{inj} : +1600V E_{sep} : +1900V.....	98
Figura 49 – Estudo das áreas dos picos para GSH, cys e AA com o aumento da concentração.	99
Figura 50 – Eletroferogramas obtidos a partir dos experimentos de eletroforese capilar. A) Menadiona (400 μ M); B) Menadiona e glutatona (400 μ M e 100 μ M, respectivamente); C) Menadiona e cisteína(400 μ M e 100 μ M, respectivamente) e D) Ácido ascórbico (100 μ M). 101	101
Figura 51 – Resultados obtidos para o eletroferograma com mix de glutatona, cisteína e ácido ascórbico (100 μ M cada) com menadiona (400 μ M).	102
Figura 52 – Estudo do potencial aplicado no eletrodo de trabalho	103
Figura 53 – Eletroferogramas da separação de glutatona, cisteína e ácido ascórbico. Condições experimentais: PDMS/Glass microchip – 5cm separation channel BGE: HEPES (pH 8.5), SDS 4mM, SBE- β -CD 2mM ; E_{det} : +0.4V / E_{inj} : +1600V , E_{sep} : +1900V.....	105
Figura 54 – Estruturas do SDS e STS e LMT. A diferença estrutural da cadeia carbônica hidrofóbica exerce pouca diferença na seletividade de analitos polares. Por outro lado, as diferenças estruturais na região hidrofílica apresentam grande efeito na seletividade.....	106
Figura 55 – Efeito da concentração de SDS na separação das espécies.....	107
Figura 56 – Avaliação das ciclodextrinas SBE- b -CD e b -CD – sulfatada	109
Figura 57 – Tempo de migração dos analitos em função do tipo e concentração das ciclodextrinas.....	110
Figura 58 – Curvas analíticas para glutatona, cisteína e ácido ascórbico sob condições otimizadas.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Técnicas de fabricação de dispositivos baseados em papel.....	24
Tabela 2- Principais características físico-químicas do cloreto de ranitidina.	31
Tabela 3 - Principais estratégias utilizadas para a determinação de ranitidina em diferentes matrizes.....	33
Tabela 4- Custo dos principais agentes derivatizantes para a determinação de aminas alifáticas primárias ou secundárias	34
Tabela 5- Faixa tamponante dos sistemas avaliados para o método proposto.	48
Tabela 6 - Resultados obtidos para a avaliação do sistema tampão para o método proposto. .	48
Tabela 7 - Espécies avaliadas como possíveis interferentes ao método proposto.....	50
Tabela 8 - Resultados obtidos no teste recuperação utilizando a metodologia proposta para a determinação de ranitidina em amostras farmacêuticas.	53
Tabela 9- Dados estatísticos obtidos pela metodologia de referência e a metodologia proposta para a amostra de Ranivet.....	54
Tabela 10 - Teste t para médias independentes utilizado para comparar estatisticamente os resultados obtidos pela metodologia proposta e a metodologia de referência para a amostra de Ranivet.....	55
Tabela 11 – Principais estratégias utilizadas para a determinação de ranitidina em diferentes matrizes.....	85
Tabela 12 – Concentrações utilizadas para o experimento preliminar de verificação da sequência dos analitos cisteína e glutatona na presença de p-BQN.	93
Tabela 13 – Resumo dos principais parâmetros analíticos referentes às curvas analíticas para a metodologia proposta.	111

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
ANVISA	Agência Brasileira de Vigilância Sanitária
β -ciclodextrinasulfatada	Ciclodextrina beta sulfatada
BGE	Eletrólito de suporte
CE	Eletroforese Capilar
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
cys	Cisteína
cys-MD	Produto da glutatona com a menadiona
CZE	Eletroforese Capilar em zona
DARPA	Agência de projetos de pesquisa avançada
EOF	Fluxo eletrosmótico
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FAAS	Espectroscopia de Absorção Atômica de Chama
FDA	Food and Drug Administration
GC-FID	Cromatografia a gás com detector de ionização
GPC	Cromatografia de fase gasosa
GSH	Glutatona
GSH-MD	Produto da glutatona com a menadiona
Hcys	Homocisteína
HEPES	4-(2-hidroxietyl)-1-ácido piperazineetanesulfônico
HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência
IPA	2-propanol
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem
LIF	Fluorescência Induzida por laser
LMT	sodium lauroyl methyl taurate
MD	Menadiona
ME-EC	Microchip eletroforese com detecção eletroquímica
MEMS	Microssistemas eletromecânicos
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

N,S - CODs	Quantum dots de carbono dopados com nitrogênio e enxofre
Na-DDTC	Edietiltiocarbamato de sódio
NACE	eletroforese capilar não aquosa
NBD-Cl	4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NBD-F	4-fluor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol
NO	Óxido Nítrico
NPM	N-fenilmaleimida
NQS1.2	Naftoquinona-4-sulfônico
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO-	Peroxinitrito
p-BQN	p-benzoquinona
PADs	Paper-based Analytical Device
PC	Policarbonato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMMA	Polimetil-metacrilato
PS	Poliestireno
RSD	Desvio Padrão Relativo
SAL	Salmترول
SBE-β-CD	Sulfobutil eter beta ciclodextrina
SDME	Microextração em gota única
SDS	Dodecil sulfato de sódio
STS	tetradecil sulfato de sódio
TCEP	cloridrato de tris(2-carboxietil) fosfina
UHPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de interação hidrofílica de ultra eficiência acoplada com detector de espectrometria de massas

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	19
2.	DISPOSITIVO BASEADO EM PAPEL (PAD) PARA A DETERMINAÇÃO DE RANITIDINA EM AMOSTRAS FARMACÊUTICAS	21
2.1	Introdução	21
2.1.1	Perspectiva histórica dos dispositivos baseados em papel	21
2.1.2	Técnicas de fabricação de dispositivos em papel	24
2.1.2.1	Impressão à cera (wax printing)	25
2.1.3	Dispositivos de baixo custo baseados em papel	26
2.1.4	Detecção colorimétrica em dispositivos baseados em papel	28
2.1.5	Ranitidina.....	30
2.1.5.1	Mecanismo de ação e posologia	31
2.1.5.2	Estratégias para determinação da ranitidina	31
2.1.6	NBD-Cl.....	34
2.2	Objetivos.....	35
2.2.1	Objetivo Geral	35
2.2.2	Objetivos Específicos	35
2.3	Procedimento experimental	36
2.3.1	Equipamentos utilizados.....	36
2.3.2	Reagentes e soluções	36
2.3.3	Fabricação dos dispositivos baseados em papel	36
2.3.4	Procedimento para determinação de ranitidina	37
2.3.5	Ensaio de interferentes.....	38
2.3.6	Figuras de mérito	38
2.3.7	Ensaio de recuperação com amostras farmacêuticas de ranitidina.....	39
2.3.8	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	39
2.4	Resultados e discussões	40
2.4.1	Concentração e volume de NBD-Cl	40
2.4.2	Avaliação da razão EtOH/H ₂ O na solução de NBD-Cl.....	41
2.4.3	Efeito da temperatura.....	41
2.4.4	Teste de estabilidade da cor	43
2.4.5	Avaliação da influência do CTAB.....	44
2.4.6	Otimização do pH e do sistema tampão	45
2.4.6.1	Avaliação do pH	45
2.4.6.2	Avaliação do tipo de tampão	47
2.4.6.3	Avaliação da concentração do tampão	49
2.4.7	Ensaio de interferentes.....	50

2.4.8	Figuras de mérito e curva analítica.....	51
2.4.9	Análise de amostras reais	52
2.4.9.1	Ensaio de recuperação	52
2.4.9.2	Comparação com a metodologia de referência.....	53
2.4.10	Caracterização dos dispositivos baseados em papel.....	55
2.4.10.1	Método de Job e mecanismo proposto	55
2.4.10.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	57
2.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
2.6	PERSPECTIVAS.....	60
	REFERÊNCIAS	61
3	MICROCHIP ELETROFORESE COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO, GLUTATIONA E CISTEÍNA.....	64
3.1	Introdução.....	64
3.1.1	Eletroforese Capilar	64
3.1.2	Fluxo eletrosmótico (EOF).....	66
3.1.3	Técnicas de fabricação de dispositivos microfluídicos	67
3.1.3.1	Substratos poliméricos.....	68
3.1.4	Técnicas de injeção em microchip eletroforese.....	69
3.1.4.1	Injeção eletrocínética	72
3.1.5	Técnicas de detecção em microchip eletroforese	74
3.1.5.1	Detecção eletroquímica em microchip eletroforese	76
3.1.5.2	Posicionamento do eletrodo de trabalho em microchip eletroforese.....	77
3.1.6	Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....	80
3.6.1.1	Estratégias para separação e detecção de tióis biológicos e ácido ascórbico	83
3.2	Objetivos.....	86
3.2.1	Objetivo Geral	86
3.2.2	Objetivos específicos.....	86
3.3	Experimental.....	87
3.3.1	Reagentes, soluções e amostras	87
3.3.2	Fabricação do microchip de PDMS.....	87
3.3.3	Reação de derivatização dos tióis.....	88
3.3.4	Procedimento de eletroforese capilar (CE).....	89
3.3.5	Microchip eletroforese com detecção eletroquímica (ME-EC).....	89
3.4	Resultado e discussão	91
3.4.1	Estudos preliminares.....	91
3.4.2	Metodologia baseada na reação da menadiona com tióis.....	96
3.4.2.1	Avaliação da reação entre menadiona e glutatona	97

3.4.2.2	Avaliação do sistema de separação com glutatona, cisteína e ácido ascórbico...	98
3.4.4	Estudo da performance do sistema microfluídico	102
3.4.4.1	Otimização do potencial de eletrodo	103
3.4.4.2	Avaliação da concentração do tampão	104
4.4.4.3	Avaliação da concentração do surfactante.....	106
4.4.4.4	Avaliação da concentração e do efeito de ciclodextrinas	108
3.4.5	Curva analítica para a metodologia proposta	110
3.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	112
3.6	PERSPECTIVAS.....	113
	REFERÊNCIAS	114
4	CONCLUSÃO GERAL	118

1 INTRODUÇÃO GERAL

Em 29 de dezembro de 1959, o físico Richard Feynman proferiu durante um encontro da Sociedade Americana de Física a palestra “*There is a plenty of room down there – An invitation for a new field of Physics*” (Há muito espaço lá embaixo – Um convite para um novo campo da física, em tradução livre para o português). Durante a palestra, o pesquisador postulou sobre a possibilidade de arquivar informações em escalas muito pequenas, miniaturização de computadores e microscópios eletrônicos mais eficientes. Essa palestra foi considerada como um marco inicial da tecnologia e a engenharia na escala atômica (FEYNMAN, 1959).

A perspectiva visionária de Feynman é o ponta pé inicial do que hoje chamamos de nanotecnologia e microeletrônica. Esses dois campos foram essenciais para o desenvolvimento de tecnologias que promovem facilidades para o ser humano moderno, incluindo computadores pessoais, aparelhos celulares e dispositivos médicos de alta precisão.

A química analítica moderna é um exemplo claro de como o desenvolvimento tecnológico leva ao surgimento de tendências científicas. Podemos dizer que a química analítica moderna é baseada em três tendências fundamentais: A simplificação, a automação e a miniaturização. Todas essas três tendências levam ao desenvolvimento tecnológico e podem ser trabalhadas em conjunto para o desenvolvimento de procedimentos analíticos capazes de prover as informações analíticas necessárias para uma dada análise (RIOS; ESCARPA; SIMONET, 2009; RÍOS, Á.; ZOUGAGH, 2015). Assim, os microssistemas de análise total (μ TAS – do inglês *Micro Total Analysis Systems*) e a microfluídica compreendem dois termos chave para a o desenvolvimento tecnológico dentro da química analítica moderna, uma vez que englobam as três tendências fundamentais citadas anteriormente (JÚNIOR, 2019).

O químico estadunidense George Whitesides é uma das principais referências dentro do campo da microfluídica e a define como a ciência e tecnologia dos sistemas que processam ou manipulam pequenas quantidades de fluidos (10^{-9} – 10^{-18} L), usando canais com dimensões de dezenas a centenas de micrômetros (WHITESIDES, 2006). Ainda de acordo com Whitesides, a microfluídica teve sua base estabelecida em quatro pilares principais. O primeiro pilar envolveu o avanço das técnicas de análise molecular, como a cromatografia de fase gasosa (GPC), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a eletroforese

capilar (CE). Essas técnicas, quando combinadas com os princípios capilares, revolucionaram a análise química, proporcionando alta sensibilidade e resolução com volumes reduzidos de amostra. A evolução dessas técnicas para plataformas ainda menores possibilitou o surgimento de aplicações em microescala tanto na química quanto na bioquímica.

O segundo pilar da microfluídica foi impulsionado pela necessidade de combater o desenvolvimento de armas químicas e biológicas durante a Guerra Fria. Na década de 1990, a Agência de Projetos de Pesquisa Avançada de Defesa (DARPA) financiou diversos projetos voltados para o desenvolvimento de plataformas microfluídicas com o objetivo de detectar ameaças químicas e biológicas, uma vez que esses dispositivos possibilitariam a detecção rápida dessas armas. Esse estímulo teve um impacto fundamental no avanço acadêmico das tecnologias relacionadas à microfluídica.

O terceiro pilar da microfluídica concentrou-se no progresso da biologia molecular e da genômica, especialmente com o advento do sequenciamento de DNA (WHITESIDES, 2006). Essas áreas demandaram o desenvolvimento de metodologias analíticas com alta sensibilidade, resolução e capacidade de processamento, características essenciais dos sistemas microfluídicos de análise. Por fim, o quarto e último pilar da microfluídica foi impulsionado pelo progresso da microeletrônica, que possibilitou o desenvolvimento de sistemas microeletromecânicos. A utilização de plataformas de vidro ou sílica, inicialmente adotadas, foi posteriormente substituída por plataformas de elastômeros.

Além disso, mais recentemente, o desenvolvimento dessa área de pesquisa possibilitou que novas tecnologias pudessem ser desenvolvidas, utilizando materiais de baixo custo aplicados a técnicas de análise simples, porém necessárias para a determinação de espécies de interesse ambiental, biológico, forense e farmacêutico. Entre esses materiais de baixo custo destaca-se o papel, um material que tem elevada relevância na história da humanidade.

2. DISPOSITIVO BASEADO EM PAPEL (PAD) PARA A DETERMINAÇÃO DE RANITIDINA EM AMOSTRAS FARMACÊUTICAS

2.1 Introdução

A miniaturização em química analítica é uma tendência que vem obtendo grande relevância nos últimos anos, levando ao desenvolvimento de novas tecnologias que possibilitam operações laboratoriais em microescala. Com o objetivo inicial de aumentar o desempenho analítico, a miniaturização proporcionou uma revolução que gerou o desenvolvimento de novas tecnologias científicas (COLTRO, Wendell Karlos Tomazelli *et al.*, 2007; JÚNIOR, 2019).

Nesse sentido, a utilização de dispositivos baseados em papel para a determinação de espécies como a ranitidina oferece a possibilidade de metodologias alternativas e inovadoras que possam ser utilizadas de forma sustentável e eficaz.

2.1.1 Perspectiva histórica dos dispositivos baseados em papel

Criado na China no ano 105 d.C. pelo oficial da corte T'sai Lun, após pilar cascas de amoreira, bambu e restos de rede de pesca até a obtenção de uma pasta úmida e prosseguindo para um processo secagem, o papel se tornou um material indispensável para o desenvolvimento tanto das civilizações orientais quanto ocidentais. Ao longo de quase 2000 anos, diversos avanços científicos permitiram o desenvolvimento de novas técnicas de fabricação que visavam retardar o processo de degradação, o estabelecimento agentes de branqueamento e uma maior durabilidade do papel (FRITOLI; KRÜGER; CARVALHO, 2017).

As aplicações do papel na ciência não são recentes. No começo do século XIX, o físico e químico francês Louis Joseph Gay-Lussac (1778 – 1850) desenvolveu o papel de tornassol, até hoje amplamente utilizado em testes qualitativos de pH. Durante a segunda metade do século XIX e a primeira metade do século XX o papel foi utilizado, entre outras aplicações, como plataforma para testes de urina e detecção de corantes e pigmentos.

Em 1944, A. Martin, R. Consden e A. H. Gordon desenvolveram a cromatografia em papel. O uso desse substrato foi baseado no conhecimento de Martin acerca das análises de corantes em papel. Inicialmente eles impregnaram um papel filtro com água (fase

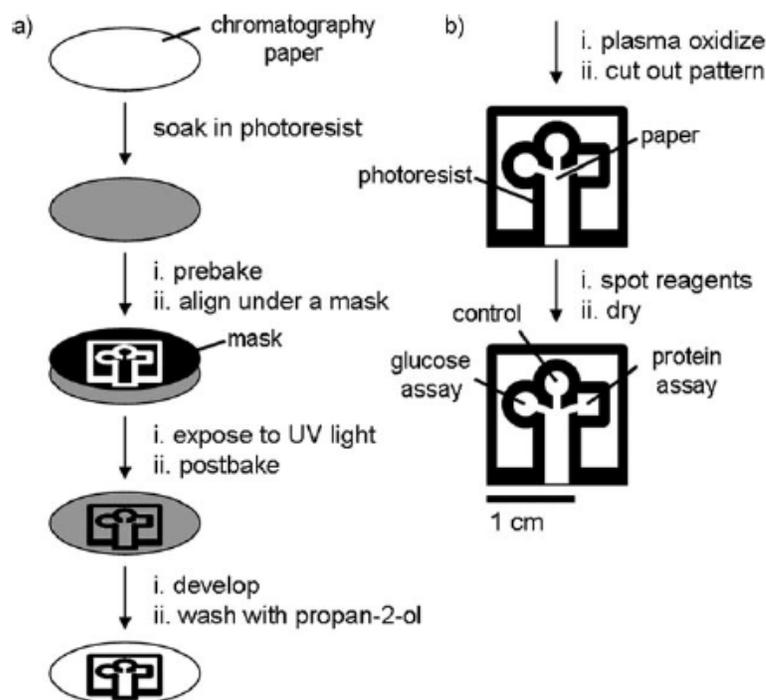
estacionária) e logo após adicionaram uma solução contendo aminoácidos numa das bordas do papel e deixaram com que a fase móvel (*n*-butanol) subisse por atração capilar e carregasse os aminoácidos em velocidades diferentes baseados na retardação pela fase estacionária no papel. Quando a fase móvel atingiu a outra borda do papel, os autores secaram o papel e adicionaram uma solução de ninidrina para revelar onde os aminoácidos estavam localizados no substrato. As principais vantagens apresentadas no desenvolvimento da cromatografia em papel foram a simplificação das metodologias de análise, a utilização de equipamentos simples e a possibilidade de alta frequência analítica. Devido ao desenvolvimento da cromatografia de partição, Archer Martin foi agraciado com o prêmio Nobel de Química em 1952, juntamente com Richard Synge (ETTRE, 1991).

Os anos seguintes marcaram o desenvolvimento bastante acelerado de dispositivos baseados em papel do tipo *point of care*. Dentre eles, destacam-se o sensor para glicose no sangue (Ames Company, 1964), o teste para gravidez (Unipath, 1988) e os testes para diabetes, colesterol, infecções e outros desenvolvidos durante a década de 90 e a primeira década do século XXI (BHATTACHARYA; KUMAR, S.; AGARWAL, A. K., 2019). Conquanto, muitos dos avanços desenvolvidos na década de 90 foram direcionados para o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos com aplicações médicas, ambientais, diagnósticas e outras. Apesar da portabilidade e possibilidade de realizar diversos procedimentos analíticos, esses necessitavam de equipamentos externos tais como bombas de pressão, válvulas e outros aparelhamentos que notavelmente diminuía a portabilidade desses dispositivos. Sendo assim, vários grupos de pesquisa trabalharam no desenvolvimento de alternativas para contornar esses problemas, onde a ausência de bombas e válvulas possibilitasse a utilização desses dispositivos para além dos laboratórios (NOVIANA *et al.*, 2021).

O ano de 2007 marca o início de uma nova era no desenvolvimento dos dispositivos baseados em papel. Martinez e colaboradores desenvolveram uma metodologia relativamente simples para a época com o objetivo de criar em papel canais na dimensão de milímetros com barreiras hidrofóbicas (baseadas no fotorresiste SU-8 2010) para análises biológicas como por exemplo a determinação de glicose e proteínas em amostras de urina (MARTINEZ *et al.*, 2007). É importante salientar que a metodologia de fabricação do dispositivo desenvolvida pelos autores utilizava estratégias que comumente eram utilizadas para o desenvolvimento

de dispositivos microfluídicos baseados em polímeros. A fabricação do dispositivo em papel envolvia duas etapas, conforme a Figura 1 abaixo:

Figura 1 – Diagrama para a fabricação de dispositivo de análise baseado em papel desenvolvido por Martinez e colaboradores.



Fonte: Martinez e colaboradores, 2007

A primeira etapa do processo de fabricação do dispositivo envolvia a imersão de um papel cromatográfico (7,5 cm de diâmetro) em 2 mL do fotorresiste por 30 segundos, girado por 30 segundos a 2000 rpm e então levado ao aquecimento (95 °C por 5 minutos) para a remoção da ciclopentanona presente na estrutura do fotorresiste. O papel contendo o fotorresiste foi então exposto a luz UV (405 nm) por 10s através de uma máscara que continha o *design* do dispositivo. Depois dessa exposição o dispositivo foi levado novamente ao aquecimento e na sequência porções não polimerizadas do fotorresiste foram removidas com a utilização de éter metílico de propileno glicol e álcool isopropílico. A hidroflicidade do papel foi aumentada pela exposição da superfície ao plasma de oxigênio a 600 millorr por 10 segundos. Na segunda etapa, o dispositivo foi modificado para a determinação dos analitos através da adição de reagentes cromogênicos como por exemplo a mudança na coloração do azul de tetrabromofenol para determinação de proteínas.

Entre as principais vantagens reportadas pelos autores estão o baixo custo do dispositivo desenvolvido e a alta frequência analítica que permitiu a análise de 20 amostras diferentes em um intervalo de tempo de apenas 7,5 minutos.

2.1.2 Técnicas de fabricação de dispositivos em papel

Uma das etapas mais importantes no desenvolvimento de dispositivos analíticos baseados em papel é, sem dúvida alguma, o procedimento de fabricação desses dispositivos. As diferentes técnicas de fabricação possibilitaram o avanço dos dispositivos e a possibilidade de utilização em diversos campos. De uma forma geral, esses dispositivos podem ser subdivididos em duas categorias: Nos dispositivos 2D o transporte de fluidos ocorre apenas horizontalmente. Já nos dispositivos 3D esse transporte ocorre tanto horizontalmente quanto verticalmente. Tendo como foco os dispositivos 2D, os dispositivos podem ser fabricados pela padronização de barreiras hidrofóbicas no substrato de papel ou a modelagem ou corte do papel para definir as regiões hidrofílicas (AGARWAL, C.; CSÓKA, 2019; BHATTACHARYA; KUMAR, S.; AGARWAL, A. K., 2019; NOVIANA *et al.*, 2021). Dentre as técnicas de fabricação por meio de formação de barreiras hidrofóbicas destacam-se a fotolitografia, a qual foi utilizada por Martinez e colaboradores, e a impressão à cera. A Tabela 1 apresenta as principais técnicas de fabricação dos dispositivos baseados em papel, apresentando as suas principais características (NOVIANA *et al.*, 2021):

Tabela 1 – Técnicas de fabricação de dispositivos baseados em papel.

Princípio	Técnica	Material utilizado	Vantagens	Desvantagens
Formação de barreira hidrofóbica	Fotolitografia	Fotorresistes	Dispositivos bem definidos, alta resolução	Equipamentos e reagentes caros, etapas complexas de fabricação
Formação de barreira hidrofóbica	Impressão à cera	Cera	Baixo custo, fabricação simples e rápida	Baixa resolução
Formação de barreira hidrofóbica	Impressão à jato de tinta	Tintas comerciais e customizáveis	Possibilidade de customização e fabricação rápida	Necessidade de modificações na impressora, o que acarreta na diminuição da sua vida útil

Formação de barreira hidrofóbica	Desenho	Cera, tinta permanente, tintas customizáveis	Baixo custo, processo de fabricação simples e sem necessidade de aquecimento	Baixa resolução e reprodutibilidade, não sendo indicado para a produção em massa
----------------------------------	---------	--	--	--

Fonte: Adaptado de Noviana, 2021.

Independente da metodologia de fabricação, existe uma necessidade perene do desenvolvimento de dispositivos que sejam de baixo custo agregado e possibilitem a determinação de analitos em amostras biológicas, forenses, ambientais, farmacêuticas entre outras. O desenvolvimento desses dispositivos se torna imprescindível em países em desenvolvimento onde técnicas e metodologias de análise mais complexas não estão facilmente acessíveis.

2.1.2.1 *Impressão à cera (wax printing)*

A técnica de impressão à cera foi inicialmente proposta por Lu e colaboradores (2009), onde dispositivos foram modelados em papel filtro com cera de três formas diferentes: pintando-os com uma caneta de cera, imprimindo-os com uma impressora jato de tinta convencional e depois utilizando uma caneta de cera e imprimindo diretamente com uma impressora à base de cera. Na terceira forma de fabricação abordada pelos autores, após a impressão os dispositivos foram levados a aquecimento e, devido à estrutura porosa do papel, a cera pode penetrar no mesmo e formar microcanais com estrutura bem-definidas.

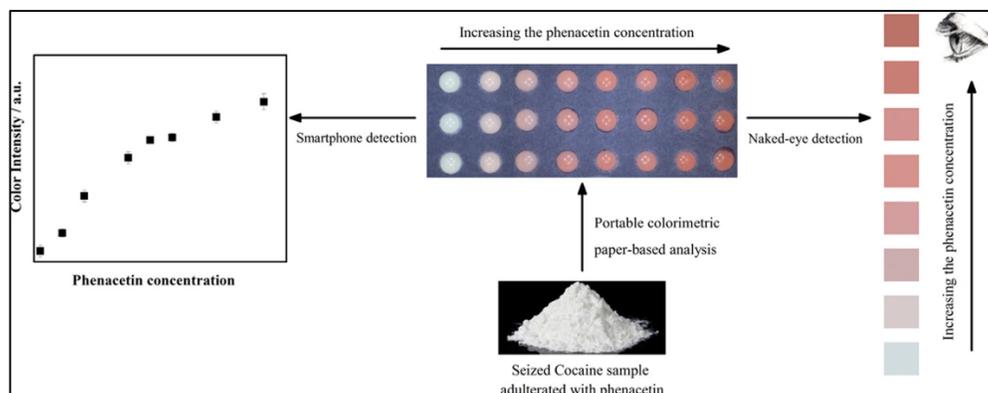
Essa estratégia simples, direta e de baixo custo proporcionou um aumento no uso desses dispositivos na comunidade científica, popularizando e promovendo novas aplicações (LU, R. *et al.*, 2009; NOVIANA *et al.*, 2021). Todavia, um dos principais problemas relacionados a essa técnica de fabricação de dispositivos em papel é o fato de que a empresa fabricante desse tipo de impressora descontinuou a sua fabricação em 2017 e, portanto, menos trabalhos apresentando essa técnica de fabricação serão publicados na literatura.

2.1.3 Dispositivos de baixo custo baseados em papel

Um apropriado exemplo da aplicação de dispositivos de papel de baixo custo está no trabalho de (SILVA, G. O. DA; ARAUJO, DE; PAIXÃO, 2018). Nesse trabalho, um papel ofício convencional foi utilizado como substrato para a fabricação de dispositivos analíticos do tipo *spot test* para a determinação de fenacetina, um fármaco com ação antipirética e analgésica, em amostras de cocaína apreendidas pela polícia. A fenacetina é comumente utilizada por traficantes no preparo de cocaína para aumentar o lucro, visto que suas propriedades apresentam efeitos farmacológicos similares às da cocaína. Desta forma, a determinação dos adulterantes utilizados na droga é uma ferramenta forense importante, já que pode indicar a origem geográfica dos materiais apreendidos.

A determinação de fenacetina foi baseada na reação colorimétrica entre o analito e o cromóforo 1,2-naftoquinona-4-sulfônico (NQS). Nesta metodologia, à medida que a concentração de fenacetina aumentava, a proporção de magenta medida também aumentava, de forma que o dispositivo poderia ser utilizado como um sensor qualitativo e semi-quantitativo. Em condições otimizadas, a metodologia proposta possibilitou um limite de detecção de $3,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e foi utilizada para a determinação do analito em amostras reais. A metodologia proposta mostrou-se satisfatória para a determinação de fenacetina, sendo os resultados obtidos comparados com a metodologia padrão de análise (cromatografia a gás com detector de ionização de chama, GC-FID). Um resumo gráfico do trabalho de Silva e colaboradores pode ser encontrado na Figura 2 abaixo:

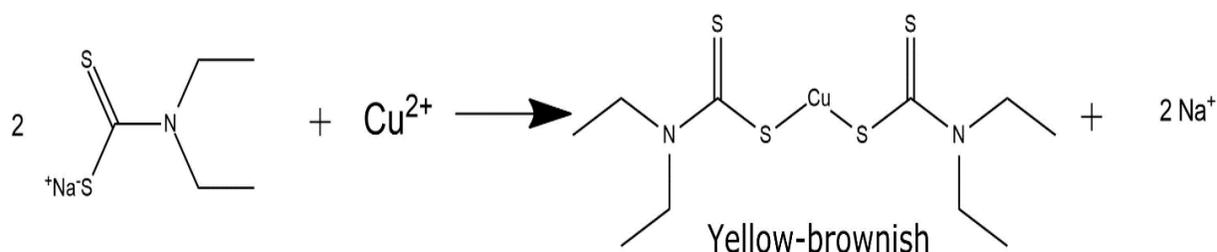
Figura 2- Resumo gráfico do trabalho de Silva e colaboradores para a determinação colorimétrica de fenacetina.



Fonte: Silva e colaboradores, 2018.

De forma similar, o trabalho de Fernandes e colaboradores (2020) propôs a fabricação e aplicação de um dispositivo baseado em papel, também do tipo *spot test*, para a determinação de Cu^{2+} em amostras de cachaça. A concentração máxima de Cu^{2+} em cachaças permitida pela Agência Brasileira de Vigilância Sanitária (ANVISA) é de 5 mg L^{-1} visto que a presença desse íon metálico pode ser danosa aos seres humanos devido a sua alta toxicidade. Desta forma, o trabalho desenvolvido foi baseado na reação de coordenação entre o analito e dietiltiocarbamato de sódio (Na-DDTC), formando um produto amarelo-castanho, conforme a Figura 3 abaixo:

Figura 3- Reação para a formação do produto colorimétrico entre (NA-DDTC) e Cu^{2+} utilizado por Fernandes e colaboradores.



Fonte: Fernandes e colaboradores, 2020.

O sinal analítico foi obtido através de parâmetros derivados do RGB, de forma que a determinação do analito em amostras reais mostrou-se satisfatória quando comparada com a metodologia de referência apresentada, baseada em Espectroscopia de Absorção Atômica de Chama (FAAS). O método apresenta-se, portanto, como uma alternativa rápida, simples, portátil e de baixo custo para a determinação de Cu^{2+} em amostras de cachaça, possibilitando uma avaliação quanto ao atendimento da legislação dessas amostras.

Esses dois trabalhos demonstram que uma das principais formas de aplicação de dispositivos analíticos de baixo custo baseados em papel presentes na literatura consiste na utilização da detecção colorimétrica para gerar um sinal analítico mensurável. A possibilidade de diversas estratégias para a obtenção de cor nesses dispositivos faz com que a utilização da detecção colorimétrica seja bastante utilizada e versátil (MORBIOLI *et al.*, 2017).

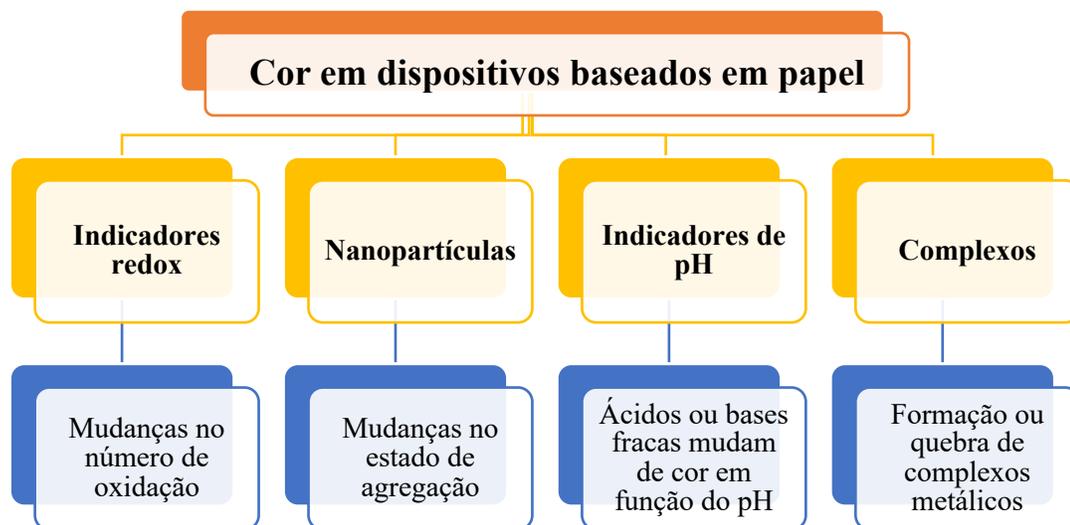
2.1.4 Detecção colorimétrica em dispositivos baseados em papel

Colorimetria pode ser definida como uma técnica que detecta o analito através de mudanças na coloração através de uma reação com um reagente específico (YU, Jingjing *et al.*, 2019). A utilização da cor e a sua intensidade como parâmetro relacionado à ocorrência de uma reação química tem sido abordada desde o século XIX. De fato, em 1838 o pesquisador W. A. Lampadius estimou a quantidade de níquel e ferro em minérios de cobalto utilizando uma comparação entre as amostras com cilindros cúbicos que apresentavam diferentes porcentagens desses metais. O desenvolvimento da Lei de Beer em 1852, do colorímetro em 1853 e do fotômetro em 1911 possibilitaram mais avanços no uso da cor para aplicações voltadas à química (FERNANDES, Gabriel Martins *et al.*, 2020).

Desde então, novas técnicas e abordagens para a utilização da cor têm sido desenvolvidas para que métodos de análise possam ser elaborados, sobretudo na utilização dessa técnica no desenvolvimento de dispositivos baseados em papel (FERNANDES, Gabriel Martins *et al.*, 2020; MORBIOLI *et al.*, 2017).

Existem várias possibilidades para a geração de cor em dispositivos baseados em papel. De acordo com (MORBIOLI *et al.*, 2017), as principais formas de gerar cor nesses dispositivos envolvem o uso de cromóforos ou sistemas capazes de apresentar mudanças na coloração através de uma determinada variação química. Assim, indicadores redox, nanopartículas, complexos, indicadores de pH e reagentes colorimétricos são comumente utilizados para este fim. A Figura 4 mostra, em resumo, quais os princípios na geração de cor em dispositivos baseados em papel. Tendo em vista que cada abordagem permite a detecção de diferentes analitos nas mais variadas matrizes, evidencia-se o potencial da detecção colorimétrica como uma ferramenta importante no desenvolvimento de novas metodologias de análise.

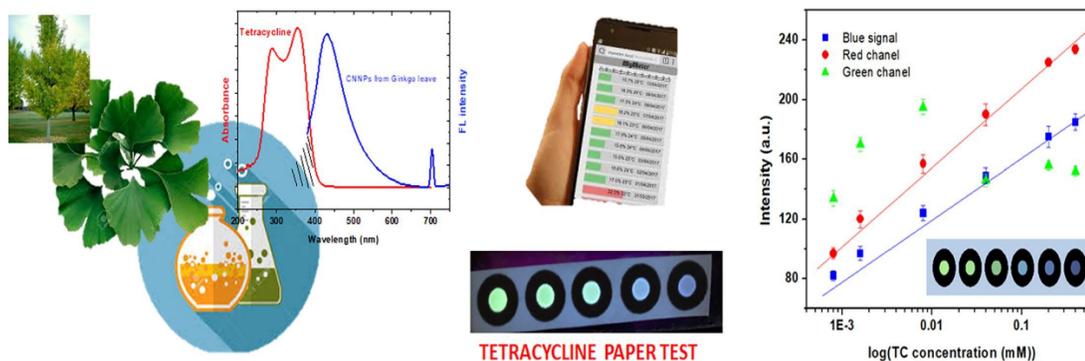
Figura 4 – Resumo das formas de geração de cor em dispositivos baseados em papel.



Fonte: Adaptado de Morbioli e colaboradores, 2017.

Um exemplo da utilização de nanopartículas em dispositivos baseados em papel está no trabalho de Huy e colaboradores (2020), presente na Figura 5. Neste trabalho os autores desenvolveram uma metodologia colorimétrica para a determinação de tetraciclina a partir de nanopartículas de nitreto de carbono utilizando uma *síntese top-down* usando folhas de uma espécie de árvore nativa da China como material de partida e síntese hidrotermal. A variação de cor observada no dispositivo foi utilizada como sinal analítico e imagens foram capturadas utilizando um *smartphone*. Após a otimização dos parâmetros analíticos avaliados, a metodologia apresentou faixa linear de 0,8 – 400 μM , limite de detecção de 120 nM e foi utilizada em amostras reais de camarão e água de rio.

Figura 5 - Resumo gráfico do trabalho de Huy e colaboradores para a determinação de tetraciclina utilizando dispositivos baseados em papel.

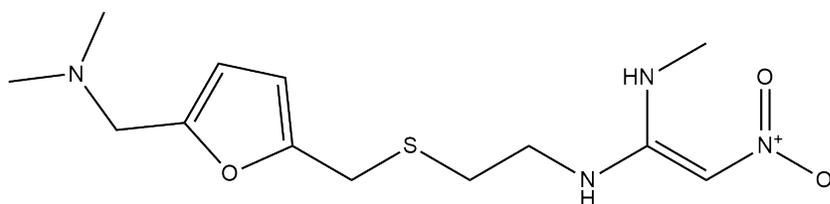


. Fonte: Huy e colaboradores, 2020.

2.1.5 Ranitidina

A ranitidina (Figura 6) é um antagonista do receptor H_2 da histamina utilizado no tratamento de úlcera gastroduodenal e doenças relacionadas, como refluxo gastroesofágico, esofagite erosiva, gastrite e síndrome de Zollinger-Ellison (NOROUZI; GANJALI; DANESHGAR, 2007; PAHWA *et al.*, 2016).

Figura 6 - Estrutura da ranitidina



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Sua principal função é inibir a superprodução de ácido gástrico devido ao seu efeito na secreção de ácido gástrico e, assim, reduzir a dor daqueles que fazem uso desse medicamento. Introduzida no mercado farmacêutico em 1981 e listada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um dos medicamentos essenciais para uso no sistema básico de saúde, a ranitidina tem mercado global e está disponível comercialmente como a marca Zantac e outras.

A Tabela 2 abaixo mostra algumas das principais características físico-químicas do cloreto de ranitidina, principal forma comercial disponível para a ranitidina:

Tabela 2 – Principais características físico-químicas do cloreto de ranitidina.

Cloreto de ranitidina	
Fórmula molecular	$C_{13}H_{22}N_4O_3S \cdot HCl$
Massa molar	$350,86g \text{ mol}^{-1}$
Ponto de fusão	$69 - 70 \text{ }^\circ\text{C}$
pKa	2,7 e 8,2
Solubilidade	Solúvel em H_2O

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

2.1.5.1 *Mecanismo de ação e posologia*

Em pacientes com doenças gástricas, depois da alimentação o hormônio gastrina estimula a liberação de histamina, que então se liga a receptores H_2 e ativam a liberação de excesso de secreção gástrica. Quando a ranitidina é utilizada, a secreção gástrica é diminuída pois a ela liga-se reversivelmente aos receptores de histamina (receptores H_2). Este procedimento leva à redução da secreção de ácido gástrico e promove um alívio nas dores sentidas pelos pacientes (JOSEPH *et al.*, 2019).

Para tanto, há uma recomendação médica para o uso de duas doses de administração oral de 150mg ou uma dose única de 300mg por dia. Além disso, cerca de 70% da ranitidina é excretada na urina sem ser metabolizada e diversas metodologias analíticas foram desenvolvidas para a determinação deste medicamento em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos tais como sangue e urina (GORE *et al.*, 2011).

2.1.5.2 *Estratégias para determinação da ranitidina*

Sendo a ranitidina um dos medicamentos essenciais para o sistema básico de saúde, a literatura apresenta diversos trabalhos que propõem a determinação da ranitidina nas mais diversas amostras. De fato, distintas estratégias podem ser observadas na Tabela 3 abaixo. Apesar das diferenças inerentes às técnicas utilizadas, alguns pontos são comuns nessas metodologias.

Uma das semelhanças está na utilização de técnicas de alto custo por análise. Tomando como exemplo o trabalho de Kiszkiel-Taudul e Starczweska (2019), as autoras utilizaram um tratamento de amostra com microextração em gota única (SDME) e uma metodologia baseada em cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em Tandem (LC-MS/MS). O uso de solventes e gases de alto custo juntamente com equipamentos que demandam operadores com formação específica e custos elevados de operação e manutenção fazem com que essa metodologia seja inviável em regiões com poucos recursos ou operadores sem formação específica para os equipamentos utilizados.

Outro problema apresentado nessas metodologias é o tempo de análise e/ou preparo dos sistemas. Como exemplo, o trabalho de Chen e colaboradores (2017) propõe a determinação de ranitidina via quimiluminescência utilizando *quantum dots* de carbono dopado com nitrogênio e enxofre (N,S-CQDs). Apesar dessa metodologia apresentar um material com rendimento quântico excelente (79%), o processo de síntese hidrotermal demanda 13h, o que torna a metodologia inviável para análises rápidas. Além disso, apesar dos baixos valores obtidos para os limites de detecção e quantificação, os autores apenas utilizaram o método proposto para determinação de ranitidina em amostras farmacêuticas.

Desta forma, evidencia-se que na literatura há um vácuo de trabalhos que demonstrem metodologias simples, rápidas e de baixo custo para a determinação de ranitidina. O desenvolvimento dessas metodologias torna-se ainda mais necessário visto que em várias regiões do mundo há uma escassez de recursos e material humano treinado para a determinação de fármacos de interesse da sociedade.

Tabela 3 – Principais estratégias utilizadas para a determinação de ranitidina em diferentes matrizes.

ARTIGO	TÉCNICA	LOD	FAIXA LINEAR	TIPO DE AMOSTRA	REFERÊNCIA
Single drop microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SDME-LC-MS/MS) for determination of ranitidine in water samples	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem	9,4 nM	28 nM – 15 µM	Água	(KISZKIEL-TAUDUL; STARCZEWSKA, 2019)
Highly luminescent S,N co-doped carbon quantum dots sensitized chemiluminescence on luminol–H ₂ O ₂ system for the determination of ranitidine	Quimiluminescência	0,12 µg ml ⁻¹	0,5 – 50 µg ml ⁻¹	Cápsulas	(CHEN, Jianqiu <i>et al.</i> , 2017)
Ionic liquid-based ultrasound-assisted emulsification microextraction for the determination of ranitidine in water samples and pharmaceutical preparations	UV	1,9 µM	3 – 50 µM	Amostras farmacêuticas e de água	(KISZKIEL-TAUDUL; STARCZEWSKA; JABŁOŃSKA, 2020)
A novel method for ranitidine hydrochloride determination in aqueous solution based on fluorescence quenching of functionalised CdS QDs through photoinduced charge transfer process: Spectroscopic approach	Fluorescência	1,08 µmol L ⁻¹	1,42– 42,75 µmol L ⁻¹	Amostras farmacêuticas	(GORE <i>et al.</i> , 2011)
Electrochemical oxidation of ranitidine at poly(dopamine) modified carbon paste electrode: Its voltammetric determination in pharmaceutical and biological samples based on the enhancement effect of anionic surfactant	Eletroquímica (Voltametria)	1,9 × 10 ⁻⁸ M	0,1 – 7,5 µmol L ⁻¹	Amostras farmacêuticas e urina humana	(TALAY PINAR; YARDIM; ŞENTÜRK, 2018)
Modified Au nanoparticles-imprinted sol-gel, multiwall carbon nanotubes pencil graphite electrode used as a sensor for ranitidine determination	Eletroquímica (Voltametria)	0,02 µmol L ⁻¹	0,05 – 2,0 µmol L ⁻¹	Urina humana	(REZAEI; LOTFI-FORUSHANI; ENSAFI, 2014)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021

2.1.6 NBD-Cl

NBD-Cl (4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol) é um agente derivatizante comumente utilizado para a determinação de aminas alifáticas primárias ou secundárias de baixo peso molecular. Por ser considerado um agente derivatizante de baixo custo (Tabela 4), quando comparado com outros agentes derivatizantes para aminas tais como ninhidrina, ortoftaldeído e NBD-F, diversos trabalhos presentes na literatura utilizam esta sonda para a determinação de aminas (ZACHARIS *et al.*, 2011). Entretanto, um ponto negativo na utilização do NBD-Cl é a sua baixa reatividade quando comparado com outros agentes derivatizantes, em especial o NBD-F (ELBASHIR; SULIMAN; ABOUL-ENEIN, 2011).

Tabela 4 – Custo dos principais agentes derivatizantes para a determinação de aminas alifáticas primárias ou secundárias

Agente derivatizante	Custo (€/mg) *
Ortoftaldeído	0,15
Naftaleno-2,3-dicarboxaldeído (NDA)	0,84
1,2-naftoquinona-sulfônico (NQS)	0,02
4-fluor-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol	7,9
4-cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol	0,01

*= custo em 2011.

Fonte: Adaptado de Zacharis e colaboradores, 2011

Um exemplo da aplicação do NBD-Cl na determinação de aminas secundárias está no trabalho de (OMAR; HAMMAD; AWAD, 2017). Neste trabalho, o NBD-Cl foi utilizado no desenvolvimento de uma metodologia espectrofluorimétrica para a determinação de xinafoato de salmeterol (SAL), um broncodilatador utilizado no tratamento de doenças como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica. Desta forma, baseado na reação de substituição nucleofílica entre o NBD-Cl e o SAL, o método proposto foi utilizado para a determinação do fármaco em amostras de plasma humano. Como principais vantagens referentes ao método, os autores reportaram a simplicidade e rapidez das análises, além da possibilidade de determinação do SAL mesmo na presença de produtos de degradação.

Assim, o presente trabalho visa o desenvolvimento de uma metodologia que possa aliar a praticidade, facilidade de operação e portabilidade dos dispositivos baseados em papel com as características apresentadas para o NBD-Cl para a determinação colorimétrica de ranitidina em amostras farmacêuticas.

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver metodologia analítica de baixo custo utilizando PADs (*Paper-Based Analytical Devices*) na reação colorimétrica entre ranitidina e NBD-Cl para a determinação desse fármaco em amostras farmacêuticas.

2.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência da concentração e do volume de NBD-Cl utilizado na metodologia proposta;
- Avaliar a influência da temperatura na reação entre ranitidina e NDB-Cl e avaliar a cinética da reação;
- Determinar a razão EtOH/H₂O ideal na solução de NBD-Cl;
- Avaliar a influência de CTAB na geração do produto colorimétrico na metodologia proposta;
- Realizar método de Job para determinação da estequiometria da reação;
- Avaliar parâmetros analíticos relacionados ao pH, tais como pH ideal para a reação, tipo de sistema tampão e concentração do sistema tampão;
- Avaliar possíveis interferentes ao método proposto com base nas amostras utilizadas;
- Obter as principais figuras de mérito referentes ao método, tais como faixa linear, limite de quantificação e detecção, RSD, entre outros;
- Aplicar a metodologia proposta na determinação de ranitidina em fármacos para aplicação humana e animal;
- Comparar os dados obtidos com a metodologia de referência para determinação de ranitidina;
- Avaliar possíveis mudanças morfológicas na estrutura do papel através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

2.3 Procedimento experimental

2.3.1 Equipamentos utilizados

Para as medições das massas dos reagentes utilizou-se balança analítica eletrônica Shimadzu modelo ATY224 com precisão de 0,1 mg. Para as medidas e ajustes de pH, utilizou-se um eletrodo combinado de vidro associado ao potenciômetro QUIMIS, (Q400mt, Brasil). Eventualmente, a solubilização completa de alguns reagentes foi efetuada utilizando banho ultrassom da Cristófoli Equipamentos de Biossegurança LTDA (USC070236). Medidas espectrofotométricas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro de varredura com feixe duplo (Agilent, modelo HP 8453) equipado com cubetas de quartzo de 10mm de caminho óptico. A análise de dados foi realizada a partir dos gráficos obtidos utilizando o *software* Origin 8.0.

2.3.2 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico de pureza, não sendo necessária qualquer purificação adicional, sendo provenientes da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), Vetec Química (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, BR) Merck (São Paulo, SP, BR) e Dinâmica Química (Indaiatuba, SP, BR). As soluções foram preparadas com água ultrapura (condutividade elétrica $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) e resistividade específica de 18,2 M Ω cm obtida a partir do purificador Milli-Q[®] (Millipore, Bedford, MA, USA). Diluições subsequentes das soluções foram efetuadas quando necessárias.

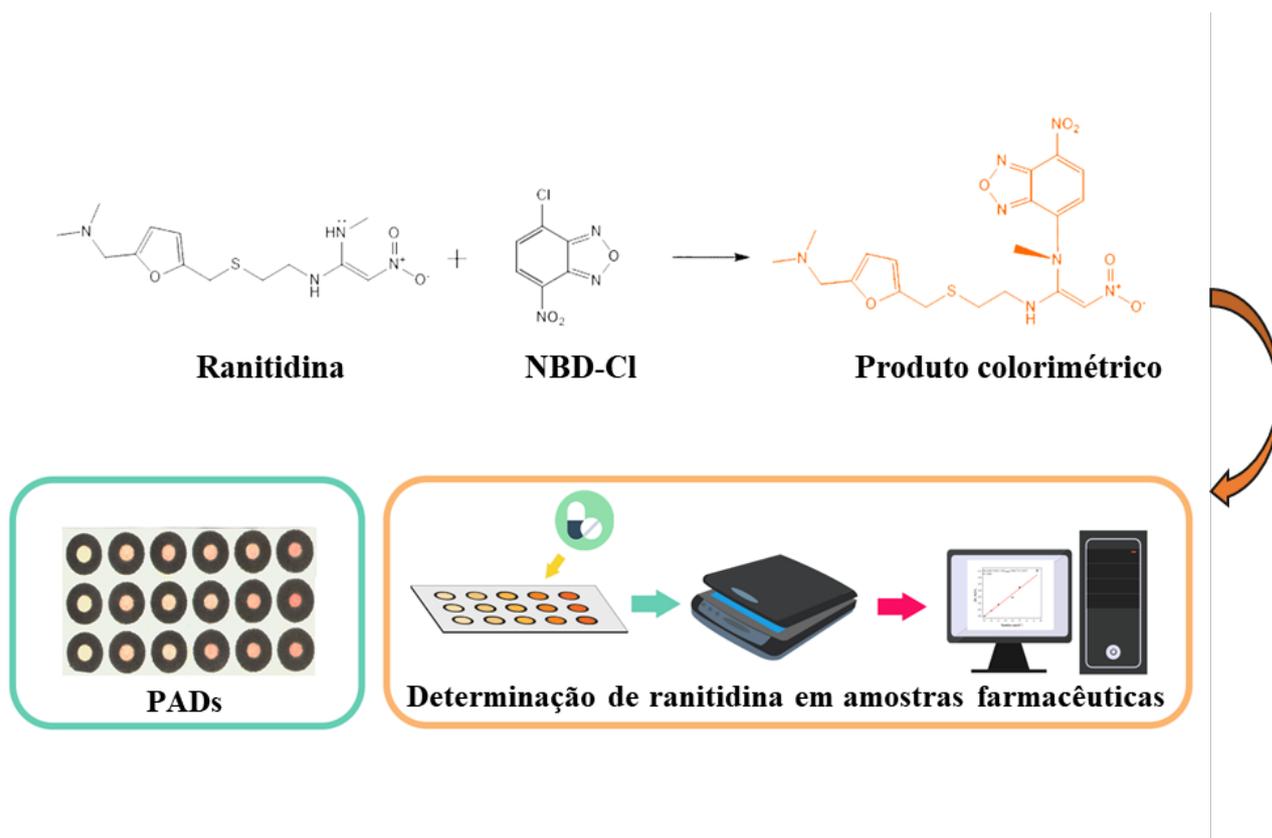
2.3.3 Fabricação dos dispositivos baseados em papel

Os dispositivos analíticos baseados em papel foram desenhados usando o *software* Adobe Illustrator[®] para gerar um layout de *spot test* de 5 mm de diâmetro e impressos em uma impressora de cera Xerox ColorQube[®] (Xerox, Norwalk, CT) usando papel de filtro como substrato. O papel filtro foi previamente cortado para obter-se uma folha com o tamanho A4 (297 x 210 mm). Um procedimento de aquecimento foi utilizado nos dispositivos em uma chapa térmica a 120 °C por 2 minutos, para permitir que a cera derretesse e criasse barreiras hidrofóbicas. Para evitar vazamento e contaminação da solução, uma fita adesiva foi colocada na parte inferior dos *spots test*.

2.3.4 Procedimento para determinação de ranitidina

Sob condições otimizadas, o procedimento de determinação de ranitidina foi realizado da seguinte forma: 0,8 μL da solução de NBD-Cl (20 mM, solução de etanol) foi aplicada no *spot test* e deixado secar por 5 min. Em seguida, 1,0 μL de solução de ranitidina (concentrações entre 0,2-1,5 mmol L^{-1}) foi pipetado no *spot test* e o dispositivo baseado em papel foi colocado em uma estufa a 70 ° C por 5min. A detecção colorimétrica foi realizada utilizando uma scanner Samsung Xpress M2070W para a aquisição de imagens e resolução de 600 dpi. A intensidade do sistema RGB (*Red, Green, Blue*) foi analisada com o software Corel Draw x7 e aplicada para quantificar os parâmetros analíticos de intensidade de cor. Um resumo gráfico para o procedimento de determinação da ranitidina pode ser observado na Figura 7 abaixo:

Figura 7 - Resumo gráfico do procedimento para a determinação de ranitidina em amostras farmacêuticas de acordo com o método proposto.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A otimização da metodologia proposta foi realizada utilizando a inclinação da curva de calibração (sensibilidade analítica) como principal parâmetro de comparação das condições avaliadas. Eventualmente, outros parâmetros analíticos como sinal do branco, faixa linear e

limites de detecção e quantificação foram utilizados como ferramentas avaliação das condições experimentais no desenvolvimento da metodologia proposta. Uma vez que a intensidade de cor no sistema RGB é inversamente proporcional à concentração (ou seja, um dispositivo com coloração mais intensa apresenta valor de RGB menor), uma normalização da intensidade de cor foi realizada a fim de obter-se uma relação diretamente proporcional entre o sinal analítico e a concentração de ranitidina. Assim, a Equação 1 apresenta a equação utilizada para a avaliação dos parâmetros analíticos:

$$\left[\frac{M_b - M_r}{M_b} \right] = aC_{\text{ranitidina}} + b \quad \text{Equação 1}$$

Onde M_b e M_r são, respectivamente, o valor de RGB (média de pixels) na ausência e presença de ranitidina, $C_{\text{ranitidina}}$ é a concentração de ranitidina e a e b são a sensibilidade analítica e o coeficiente linear, respectivamente.

2.3.5 Ensaio de interferentes

A avaliação dos possíveis interferentes ao método proposto foi realizada utilizando como base espécies comumente utilizadas como excipientes para fármacos. O ensaio foi realizado na ausência e na presença de ranitidina (0,8, mol L⁻¹). Os interferentes, por sua vez, foram avaliados numa concentração mínima 10 vezes superior à concentração de ranitidina.

2.3.6 Figuras de mérito

Para o cálculo dos parâmetros das figuras de mérito, uma curva analítica utilizando o método proposto foi realizada tendo concentração de NBD-Cl de 20mM e diferentes concentrações de ranitidina em tampão fosfato 30mM. Nesta etapa, os parâmetros avaliados foram LOD (limite de detecção), LOQ (limite de quantificação) e RSD (desvio padrão relativo). Os cálculos relativos aos limites de detecção (3σ) e de quantificação (10σ) foram realizados de acordo com as Equações 2 e 3:

$$LOD = C_{\text{branco}} - 3sb/ac \quad \text{Equação 2}$$

$$LOQ = C_{\text{branco}} - 10sb/ac \quad \text{Equação 3}$$

Onde C_{branco} = concentração relativa ao sinal do branco, sb equivale ao desvio padrão do branco analítico ($n = 10$), enquanto a_c corresponde ao coeficiente angular da curva analítica empregada. O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado de acordo com a Equação 4:

$$RSD = (sp/xp) \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde sp equivale ao desvio padrão referente a um determinado padrão analítico de ranitidina dentro da faixa linear e xp corresponde ao valor médio encontrado para este padrão ($n = 10$).

2.3.7 Ensaio de recuperação com amostras farmacêuticas de ranitidina

O método proposto foi utilizado para a determinação de ranitidina em amostras farmacêuticas. Foram usadas duas amostras diferentes de ranitidina: A primeira amostra foi obtida em farmácia de manipulação localizado na cidade de Maceió e com 150mg de ranitidina por cápsula, além de excipientes. A segunda amostra utilizada foi obtida em *pet shop* também localizado na cidade de Maceió e está comercialmente disponível com o nome Coveli Ranivet. Este medicamento, utilizado no combate à secreção gástrica de cães, apresenta 80mg de ranitidina por comprimido, além de excipientes.

As amostras foram solubilizadas em tampão e submetidas à filtração, sem a necessidade de procedimentos adicionais de preparo de amostra. Seguidamente, padrões de ranitidina foram adicionados às amostras e medições colorimétricas foram realizadas de acordo com o método proposto.

2.3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura

A estrutura e morfologia dos dispositivos baseados em papel foi avaliada. Para tanto, um Microscópio Eletrônico de Varredura foi utilizado. Assim, a morfologia do dispositivo na presença do surfactante brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e ausência e na presença de ranitidina foi investigada, com base em metodologia previamente descrita na literatura (OLIVEIRA, Y. M., 2018). Neste procedimento, as micrografias foram obtidas utilizando um microscópio eletrônico de varredura Shimadzu VEGA3, com detectores de elétrons secundários (SE) a fim de se avaliar mudanças estruturais e morfológicas presentes nos dispositivos na presença das substâncias utilizadas para a determinação de ranitidina no método proposto. Assim, as amostras foram metalizadas com ouro utilizando um sistema de revestimento

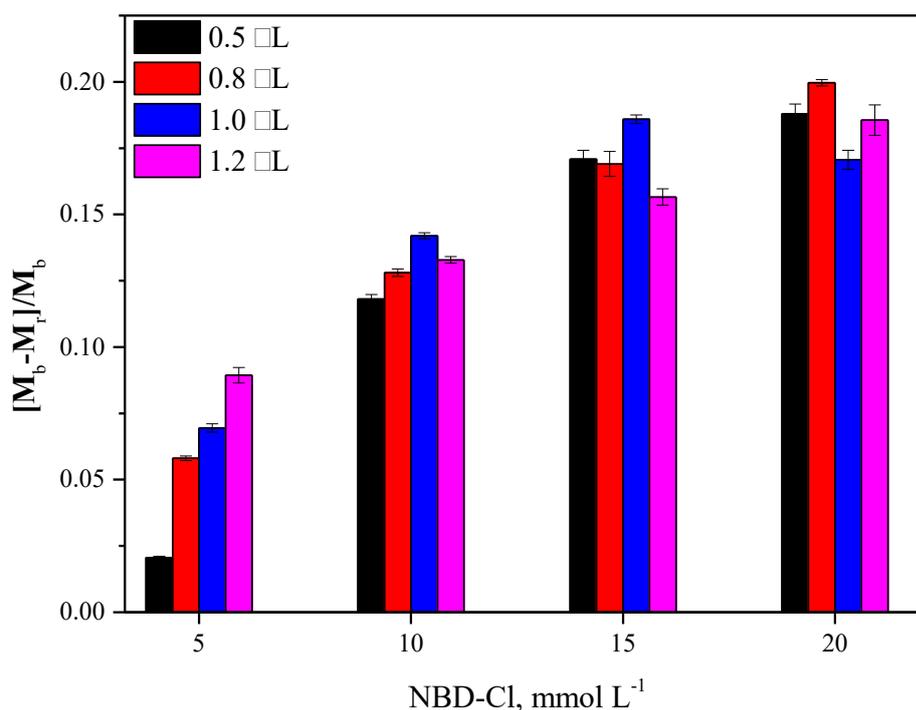
(Quorum Technologies LTD, modelo Q150R), sob corrente de 10 mA por 8 minutos. Na sequência, as amostras foram micrografadas e analisadas.

2.4 Resultados e discussões

2.4.1 Concentração e volume de NBD-Cl

A avaliação da concentração e o volume de NBD-Cl é um parâmetro importante a ser otimizado visto que norteia as avaliações subsequentes para a metodologia proposta. Para tanto, uma concentração de ranitidina foi mantida fixa (2mM, 0,5 μ L) e foram definidas quatro concentrações de NBD-Cl (5,0, 10,0 15,0 e 20,0 mM) e quatro volumes (0,5, 0,8, 1,0 e 1,2 μ L), conforme a Figura 8 abaixo.

Figura 8- Resultados obtidos para a avaliação da concentração e volume de NBD-Cl para o método proposto. $n=3$.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

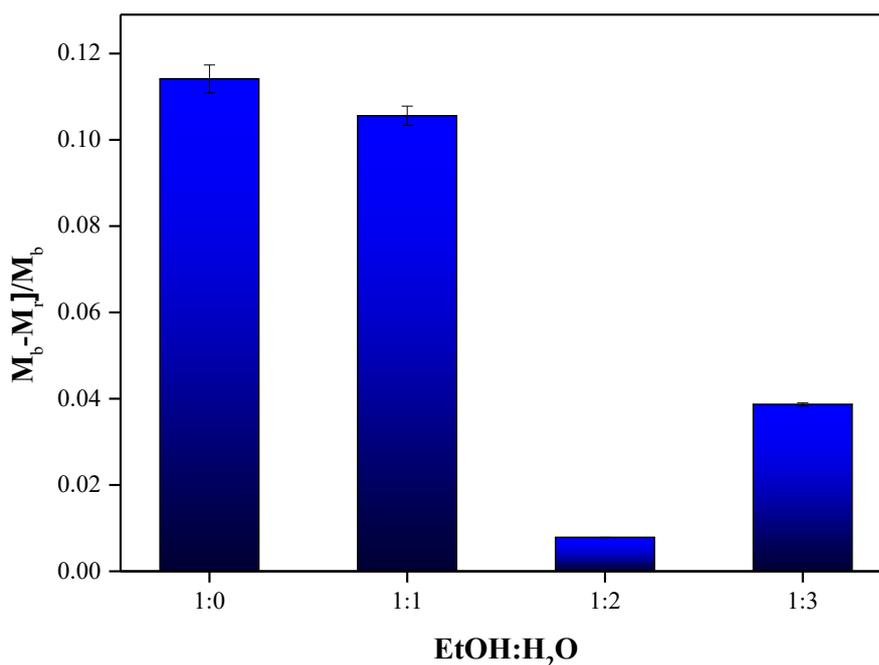
As concentrações foram definidas levando em consideração que um excesso de NBD-Cl em relação à ranitidina seria necessário para garantir que toda ranitidina pudesse reagir para a formação do produto colorimétrico. Em relação aos volumes de NBD-Cl avaliados, foi

observado que volumes superiores a 1,2 μL levavam ao vazamento da solução no reservatório, o que impede a análise de forma efetiva. Por outro lado, concentrações maiores levaram a uma maior cor nos dispositivos, o que é um fator positivo. Desta forma, a concentração de 20mM com um volume de 0,8 μL foi definida como a ideal para os experimentos subsequentes.

2.4.2 Avaliação da razão EtOH/H₂O na solução de NBD-Cl

Também foi avaliada a presença ou não de água na solução de NBD-Cl. Para tanto, diversas proporções de água na solução com etanol foram avaliadas. Os resultados obtidos indicam que a presença de água dificulta a geração de cor no sistema, o que pode estar relacionado com o fato do NBD-Cl apresentar baixa solubilidade em água (Figura 9). Desta forma, a solução de NBD-Cl foi preparada utilizando apenas etanol para a solubilização.

Figura 9- Avaliação da influência da presença de água na solução de NBD-Cl. $n=3$.



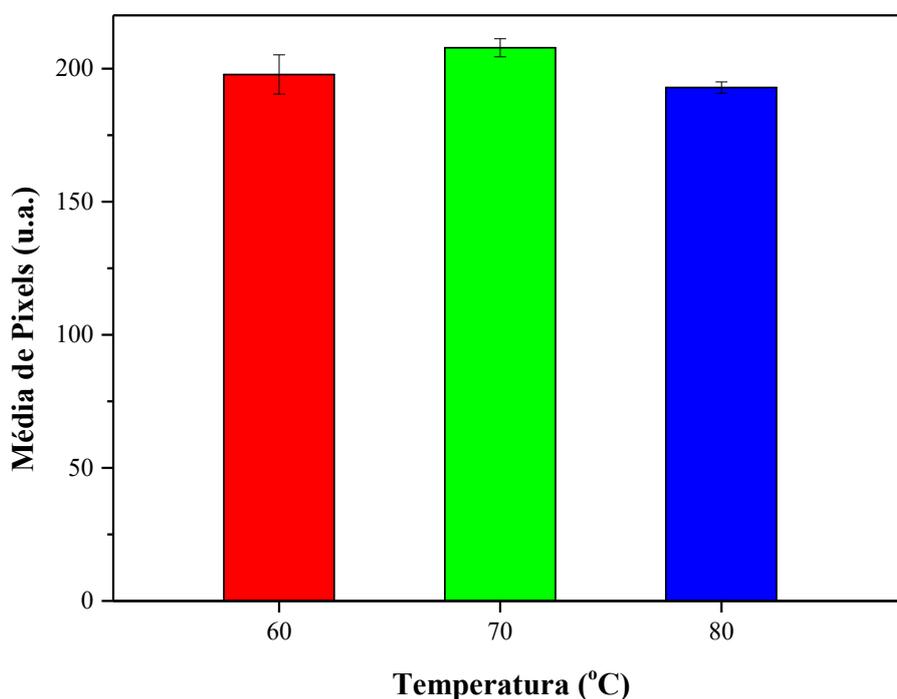
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

2.4.3 Efeito da temperatura

Tendo a concentração e o volume de NBD-Cl sidos otimizados anteriormente, o efeito da temperatura foi investigado. Essa avaliação é importante pois como a metodologia proposta baseia-se na reação entre ranitidina e NBD-Cl em aquecimento, a temperatura em que essa

reação ocorre é determinante para a geração de cor no dispositivo. Assim, o experimento foi realizado utilizando soluções de ranitidina em tampão Britton-Robison (pH 8,0) em dispositivo com *spots* individuais, e a média de pixels foi utilizada como parâmetro de comparação entre os dados obtidos (Figura 10).

Figura 10 - Avaliação da influência da temperatura para a geração do produto colorimétrico entre ranitidina e NBD-Cl. $n=3$.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Com base no perfil apresentado no gráfico acima, observa-se que com a temperatura de 70°C apresentou a maior média de pixels enquanto a temperatura de 80°C apresentou a menor média de pixels. Como uma menor intensidade de pixels indica uma coloração mais forte, tem-se que a temperatura de 80°C proporcionou uma maior intensidade de cor, o que possibilita a detecção de concentrações menores (menor limite de detecção e quantificação). Entretanto, verificou-se também que os *spots* para esta temperatura tiveram os seus tamanhos diminuídos drasticamente, um efeito direto da temperatura na cera (Figura 11) Desta forma, apesar de apresentar maior coloração, esta temperatura não pode ser utilizada. Quando comparadas as duas outras temperaturas, verifica-se que a diferença entre ambas é relativamente pequena.

Desta forma, a temperatura de 70°C foi escolhida como a ideal para a realização dos experimentos subsequentes.

Figura 11 - Imagens dos dispositivos utilizados na avaliação da temperatura. Temperaturas superiores a 80°C levam a uma diminuição do tamanho dos *spot tests*, inviabilizando o uso.

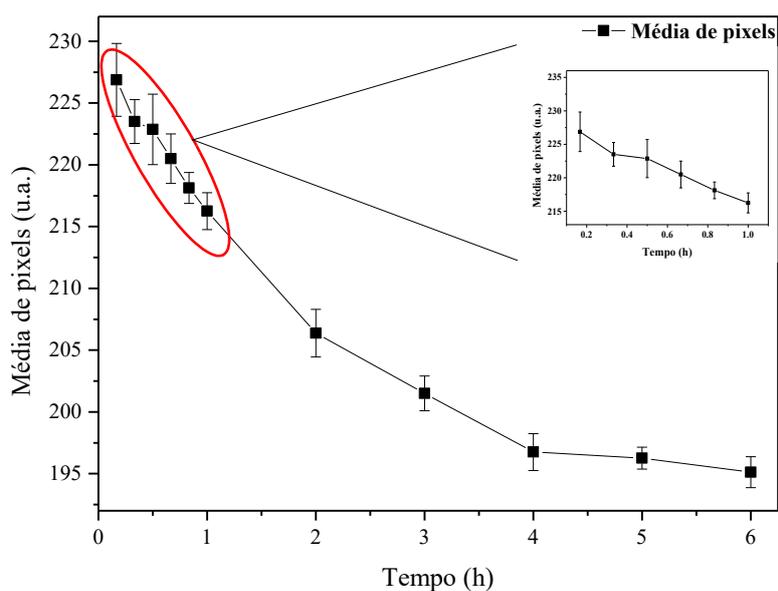


Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

2.4.4 Teste de estabilidade da cor

A estabilidade da cor gerada nos dispositivos foi avaliada. Assim, mantendo fixa uma concentração de ranitidina (1mM) e utilizando os parâmetros otimizados nas etapas anteriores, a intensidade de pixels foi utilizada como parâmetro analítico para comparar os dados obtidos (Figura 12).

Figura 12 - Gráfico com os resultados obtidos para o teste de variação da cor ao longo do tempo. O *inset* mostra a variação da cor do dispositivo no intervalo de 1h. $n=3$.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Medições foram efetuadas inicialmente de 10 em 10 minutos e após a primeira hora, as medições foram efetuadas em intervalos de 60min, com uma duração total do experimento de 6 horas. Evidencia-se pelo gráfico que nos primeiros 60 minutos a cor obtida nos dispositivos não apresenta alteração expressiva, com variação de apenas 5% nesse intervalo de tempo. Todavia, quando o intervalo de tempo é superior a 1 hora, a variação da intensidade de cor torna-se maior, com aproximadamente 15% de diferença em relação à medição inicial e o dispositivo apresenta uma coloração mais alaranjada. Sendo assim, para padronizar a medição de cor e evitar possíveis erros definiu-se o tempo para medição da cor dos dispositivos em 15min. Este tempo possibilita a análise e avaliação dos dispositivos sem comprometer a frequência analítica, o que é um parâmetro importante para dispositivos baseados em papel. Não obstante, a utilização de estratégias para melhorar a estabilidade e homogeneidade da cor dos PADs foram realizadas na etapa subsequente da otimização do método proposto.

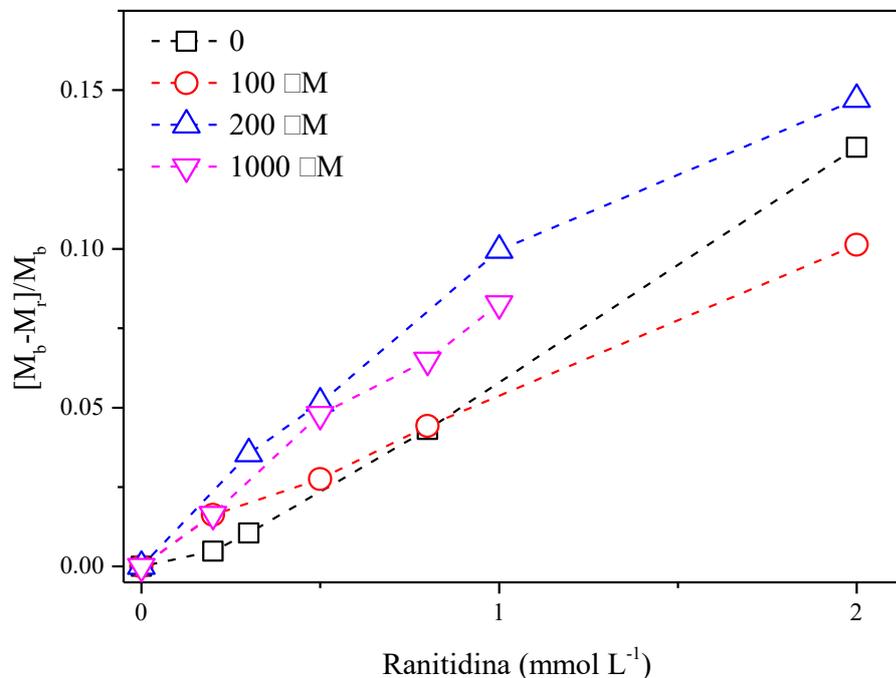
2.4.5 Avaliação da influência do CTAB

Tensoativos são bastante utilizados em química analítica devido à possibilidade de modificar o meio reacional e melhorar tanto a sensibilidade quanto a seletividade analítica (JÚNIOR, 2019). Entre esses tensoativos, destaca-se o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), um tensoativo catiônico que é constantemente utilizado em aplicações em eletroforese capilar e sistemas microfluídicos, por facilitar a separação de analitos (MANIASSO, 2001; TAVARES, 1996).

No desenvolvimento de metodologias colorimétricas baseadas em dispositivos de papel o CTAB também apresenta papel importante na estabilidade e homogeneidade da cor. (SILVA, G. O. DA; ARAUJO, DE; PAIXÃO, 2018) utilizaram CTAB para aprimorar a resposta analítica do sistema desenvolvido para a determinação de fenacetina. Os autores reportaram que a formação de micelas no meio reacional proporcionou uma melhor intensidade na cor.

Baseado nessa estratégia, CTAB foi avaliado neste trabalho para verificar se uma melhoria significativa na intensidade de cor pudesse ser observada na presença desse tensoativo catiônico. Para tanto, três diferentes concentrações de CTAB (100 μM , 200 μM e 1000 μM) foram adicionadas ao meio reacional e curvas analíticas foram construídas para avaliar a influência desse composto. (Figura 13).

Figura 13- Gráfico com os resultados referentes à avaliação da influência de CTAB na determinação de ranitidina utilizando NBD-Cl como sonda colorimétrica. $n=3$.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Como pode ser observado no gráfico acima, a presença de CTAB no meio reacional não proporcionou um ganho significativo na inclinação das curvas analíticas quando comparado com a curva de referência e, por conseguinte, na sensibilidade analítica. Desta forma, optou-se por não utilizar CTAB no meio reacional já que pouco ganho na sensibilidade seria alcançado com a inclusão do tensoativo catiônico no sistema.

2.4.6 Otimização do pH e do sistema tampão

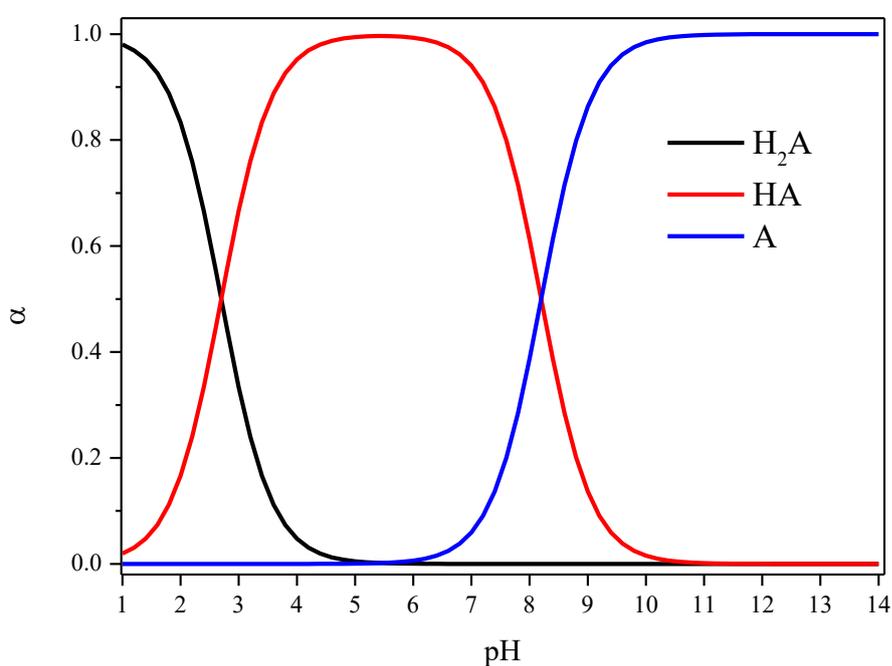
No desenvolvimento de metodologias analíticas um dos pontos principais de otimização é o pH e o sistema tampão. Esses parâmetros definem pontos importantes como a seletividade de sistemas e permitem a adequação e aplicação dessas metodologias em sistemas reais.

2.4.6.1 Avaliação do pH

O efeito do pH é um parâmetro crucial e foi avaliada para este trabalho. Para tanto, tampão Britton-Robinson (solução equimolar de HAc, H₃PO₄, HBO₃; 0,1M); foi utilizado na

faixa de pH entre 2-8. Os resultados sugerem que a resposta analítica é dependente do pH. Em baixos valores de pH (2,0 e 4,0), a resposta obtida é negligenciável para todas as concentrações (Figura 15), tendo em vista que o analito apresenta-se com a amina secundária majoritariamente protonada, o que pode ser observado no gráfico presente na Figura 15 (DUMANOVIĆ *et al.*, 1997).

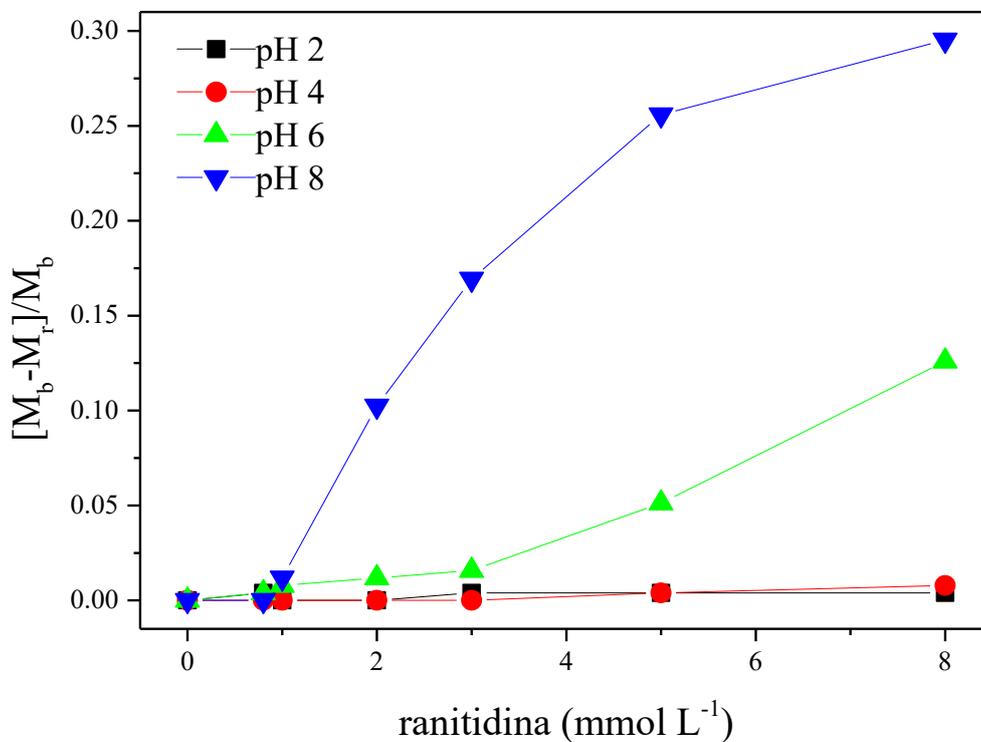
Figura 14- Gráfico das distribuições das espécies de ranitidina em função do pH. H₂A representa a espécie totalmente associada, HA representa a espécie parcialmente dissociada e A representa a espécie totalmente dissociada.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Com o aumento do pH, a espécie com a amina secundária desprotonada torna-se majoritária e a reação com o NBD-Cl é facilitada. Por outro lado, o aumento do pH para valores maiores que 8 pode levar à hidrólise do NBD-Cl com a formação de NBD-OH, o que diminui o sinal analítico (EL-EMAM *et al.*, 2004; OMAR; HAMMAD; AWAD, 2017). Desta forma, pH 8 foi escolhido como pH ótimo para análise.

Figura 15- Gráfico com os resultados obtidos para a avaliação do pH do meio reacional para o método proposto.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

2.4.6.2 Avaliação do tipo de tampão

Sendo o valor ótimo de pH previamente definido utilizando sistema tampão Britton-Robinson na etapa anterior, a avaliação do sistema tampão foi realizada. Esta avaliação foi realizada tomando como base dois fatores principais: A faixa tamponante do sistema avaliado e ausência de grupamentos amino na estrutura da molécula. Assim, curvas analíticas foram construídas e os principais parâmetros obtidos a partir delas foram analisados. Com base nas características necessárias, os seguintes sistemas tamponantes presentes na Tabela 5 foram avaliados:

Tabela 5- Faixa tamponante dos sistemas avaliados para o método proposto.

Sistema	Faixa tamponante
HEPES	6,8 – 8,2
Tampão Borato	8,0 – 10,0
Tampão fosfato	6,2 – 8,2

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tendo como base os sistemas tampão com faixa tamponante coincidente com o valor de pH selecionado na etapa anterior, o estudo do tampão foi realizado. Para tanto, alguns parâmetros analíticos foram utilizados para a comparação dos sistemas, conforme a Tabela 6 abaixo:

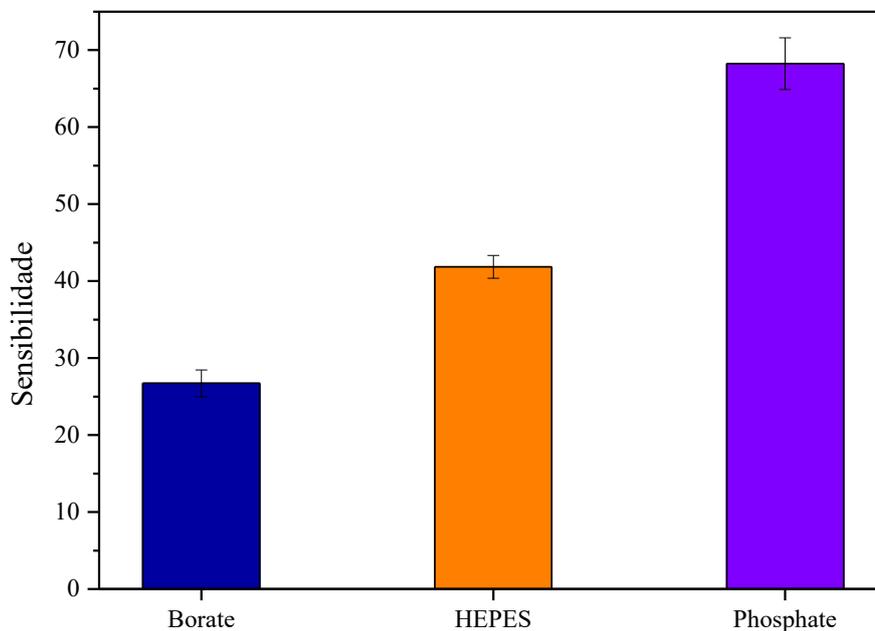
Tabela 6 - Resultados obtidos para a avaliação do sistema tampão para o método proposto.

	Faixa linear (mmol L ⁻¹)	Sinal do branco	$[M_b - M_p]/M_b = aC_{\text{ranitidina}} + b$		
			a	b (x100)	r
HEPES	0,2 – 3,0	246,22	41,85 ± 1,48	-0,079 ± 2,29	0,9975
Borato	0,8 – 5,0	248,87	26,72 ± 1,72	-0,184 ± 0,461	0,9938
Fosfato	0,2 – 2,0	235,26	68,25 ± 3,35	-0,069 ± 0,328	0,9964

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tendo em vista os resultados obtidos, o tampão fosfato foi selecionado como sistema a ser utilizado para a metodologia proposta. Em termos de coeficiente de correlação (r), todos os sistemas apresentaram valores satisfatórios, assim como o sinal do branco analítico. O principal parâmetro que difere os três sistemas é, portanto, a sensibilidade analítica (Figura 16). O sistema tampão fosfato possui uma sensibilidade cerca de 38% maior quando comparado ao tampão HEPES e 60% maior do que o sistema tampão borato. Uma possível explicação para a maior sensibilidade do tampão fosfato frente os outros sistemas pode estar ligada a uma maior interação eletrostática entre o produto da reação da ranitidina com o NBD-Cl com o tampão fosfato, garantindo assim uma maior estabilidade e intensidade da cor gerada. Esse parâmetro também reverbera na comparação das faixas lineares dos sistemas avaliados, onde o tampão fosfato apresenta a menor faixa linear. Deste modo, o tampão fosfato foi escolhido como o sistema tamponante ideal para a metodologia proposta.

Figura 16 - Sensibilidade analítica em função dos sistemas tamponantes avaliados para o método proposto. $n=3$.



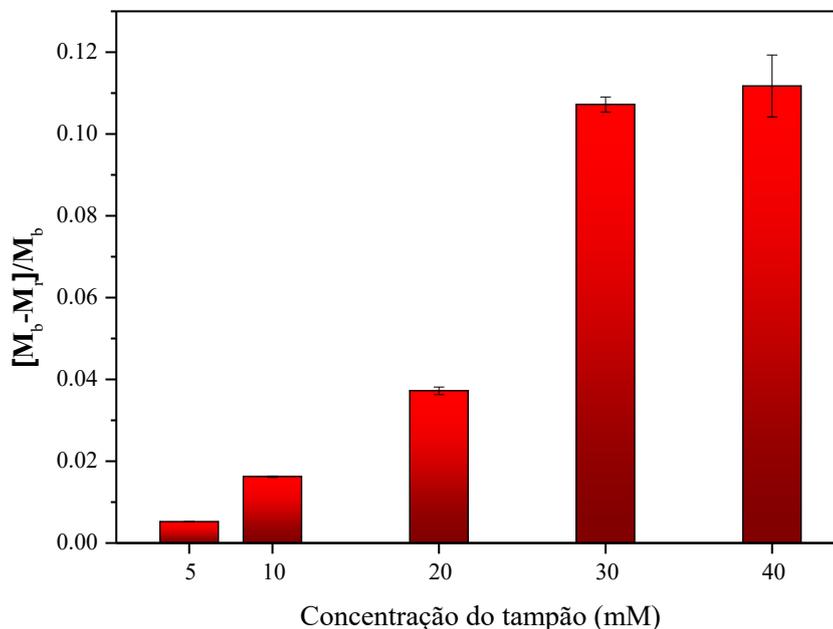
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

2.4.6.3 Avaliação da concentração do tampão

Tendo o tampão fosfato sendo selecionado na etapa anterior de otimização, a concentração dele foi averiguada. Para tanto, 5 diferentes concentrações foram avaliadas. Como a concentração do tampão está diretamente ligada à força iônica do meio, temos que esse experimento possibilita tanto a otimização da concentração quanto a influência da força iônica para a determinação da ranitidina. Assim, os resultados obtidos estão presentes no gráfico abaixo (Figura 17):

Com base no gráfico, pode-se observar que o aumento da concentração do tampão leva a um concomitante aumento da intensidade de cor medida, até a obtenção de um patamar a partir de 30mM. Assim, pode-se inferir que o aumento da força iônica do meio leva a um aumento da sensibilidade da metodologia proposta. Como há uma diferença mínima no que tange a sensibilidade obtida quando a concentração do tampão é 30mM ou 40mM, a concentração de 30mM foi escolhida como ideal devido ao menor desvio-padrão obtido nas medições.

Figura 17 - Gráfico com os resultados obtidos para a avaliação da concentração do tampão fosfato utilizado na metodologia proposta. $n=3$.



Fonte:

Elaborado pelo autor, 2021.

2.4.7 Ensaio de interferentes

Inicialmente, uma série de possíveis interferentes (microcelulose cristalina, estearato de magnésio e dióxido de silício) foram avaliados. Entretanto, esses compostos não são solúveis de forma satisfatória no meio reacional utilizado no método proposto. Assim, outros excipientes foram avaliados (Tabela 7), levando em consideração a sua solubilidade em água. Os interferentes foram avaliados tanto na ausência quanto na presença de ranitidina, sendo utilizada uma concentração $0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ para esta avaliação.

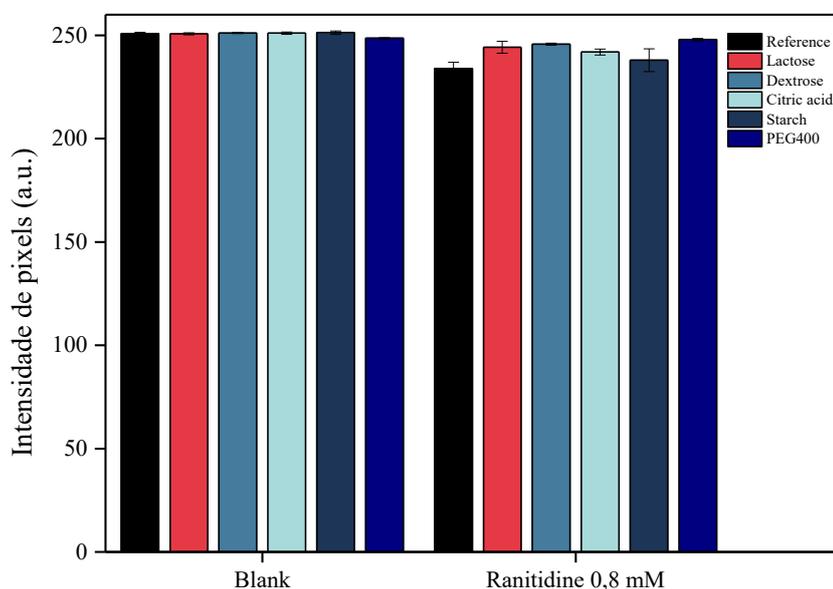
Tabela 7 - Espécies avaliadas como possíveis interferentes ao método proposto.

Interferente	Concentração avaliada
Lactose	8 mM
Dextrose	20 mM
Ácido Cítrico	10 mM
PEG400	8 mM
Amido	2000 mg L^{-1}

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Com base nos resultados (Figura 18), evidencia-se que a interferência das espécies para o método proposto foi relativamente baixa, com valores de RGB (intensidade de pixels) na faixa de 99,09 – 106,00 % com relação aos valores tomados como referência na ausência e presença de ranitidina. Desta forma, tem-se que a metodologia proposta apresenta baixa interferência com relação aos excipientes comumente utilizados em formulações farmacêuticas, fato este que é corroborado pelos resultados obtidos no ensaio com amostras reais.

Figura 18 - Resultados obtidos para a avaliação de possíveis interferentes ao método proposto na ausência e na presença de ranitidina. $n=3$.



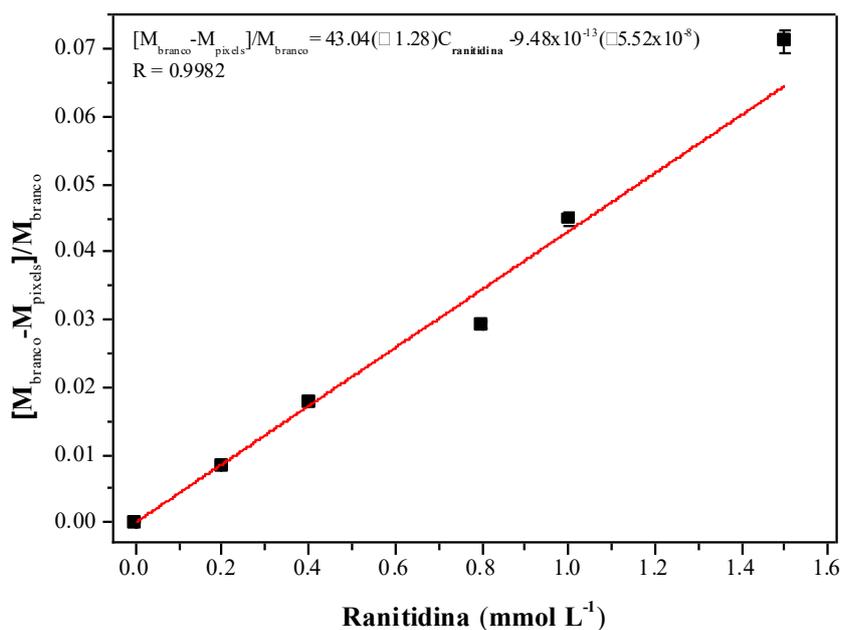
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

2.4.8 Figuras de mérito e curva analítica

Como a concentração de ranitidina está diretamente relacionada à cor gerada pelo método proposto, foram estabelecidas as figuras de mérito (Figura 2A). Em condições ótimas, o método proposto apresenta uma faixa linear de 0,2 - 1,5 mmol L⁻¹, correspondendo à equação $[(M_b - M_r)/M_b] = 43,04(\pm 1,28)C_{\text{ranitidina}} - 9,48 \times 10^{-13} (\pm 5,52 \times 10^{-8})$ e coeficiente de correlação linear $r = 0,9982$. O método proposto é preciso, visto que o limite de detecção encontrado foi de 84,6 μM e o desvio padrão relativo (RSD) foi calculado como 0,91% e 2,49% para

concentrações de ranitidina de 0,2 e 1,0 mM, respectivamente. A curva analítica construída para a metodologia proposta está presente na Figura 19 abaixo:

Figura 19 - Curva analítica otimizada para a determinação de ranitidina, de acordo com o método proposto com $n=3$.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

2.4.9 Análise de amostras reais

A análise de amostras reais é etapa importante no desenvolvimento de metodologias analíticas alternativas, como a metodologia presente nesse trabalho. Desta forma, essa etapa inclui tanto ensaios de recuperação quanto a comparação dos resultados obtidos tanto pela metodologia proposta quanto pela metodologia de referência.

2.4.9.1 Ensaio de recuperação

O ensaio de recuperação é uma ferramenta comumente utilizada para a validação de metodologias analíticas e possibilita o entendimento sobre o efeito da matriz nas amostras. Os dados referentes ao ensaio de interferentes obtidos na etapa anterior evidenciam que as espécies avaliadas têm pouca ou nenhuma interferência no sinal analítico mensurado. Este

comportamento, de fato, foi observado para o sistema proposto. De acordo com os dados presentes na Tabela 8, têm-se que as recuperações medidas foram satisfatórias.

Tabela 8 - Resultados obtidos no teste recuperação utilizando a metodologia proposta para a determinação de ranitidina em amostras farmacêuticas. $n=3$.

Amostra	Ranitidina (mmol L^{-1})		Recuperação (%)
	adicionado	recuperado	
Ranivet	0,0	$0,22 \pm 0,0009$	-
	0,2	$0,40 \pm 0,0033$	94,65
	0,4	$0,57 \pm 0,0058$	90,90
	0,6	$0,82 \pm 0,0101$	99,95
Cápsula	0,0	$0,58 \pm 0,0019$	-
	0,2	$0,74 \pm 0,0019$	94,09
	0,4	$0,92 \pm 0,0045$	93,91
	0,6	$1,29 \pm 0,0049$	109,27

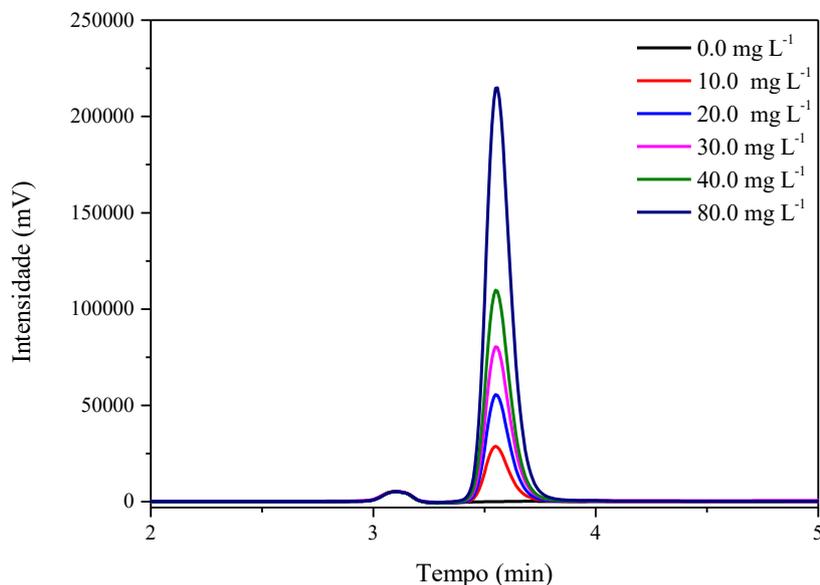
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Para o Ranivet, as porcentagens de recuperação variaram entre 90,90 e 99,95%. Para o medicamento em cápsula obtido em farmácia de manipulação, as recuperações variaram entre 93,91 e 109,27%. Considerando que uma variação de $\pm 10\%$ é tida como razoável (VAZ *et al.*, 2017), os dados obtidos estão de acordo com outros trabalhos presentes na literatura e evidenciam que a metodologia proposta é aplicável para a determinação de ranitidina em amostras farmacêuticas.

2.4.9.2 Comparação com a metodologia de referência

O método proposto foi usado para determinar ranitidina em formulações farmacêuticas e comparado com a metodologia de referência baseada em HPLC-UV, com detecção em 230nm. Assim, amostras com diferentes níveis de ranitidina foram preparadas utilizando a metodologia de (NOROUZI; GANJALI; DANESHGAR, 2007). A metodologia de referência apresentou tempo de retenção de 3,5 minutos (Figura 20), faixa linear de 10 – 80 mg L^{-1} , $r=0,99998$ e limite de detecção de 3 mg L^{-1} .

Figura 20 - Cromatograma obtido a partir da metodologia de referência para a determinação de ranitidina.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos pelo nosso método proposto, o que revela boa consistência com a metodologia de HPLC utilizada para comparar os resultados e demonstra ser uma alternativa atraente à determinação de ranitidina em amostras farmacêuticas. Além disso, os resultados mostram que os PADs obtiveram resultados não estatisticamente diferentes dos obtidos pela metodologia de referência, com base no teste t com nível de confiança de 95% (Tabela 10).

Assim, a comparação dos dados obtidos para o comprimido ranivet pode ser realizada através da aplicação do teste t para médias independentes. Desta forma, obtemos:

Tabela 9- Dados estatísticos obtidos pela metodologia de referência e a metodologia proposta para a amostra de Ranivet.

	<i>n</i>	Média	Desvio-Padrão
Metodologia de referência (HPLC-UV)	3	8,12848	0,03542
Metodologia proposta	3	8,05589	0,03172

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Tabela 10 - Teste t para médias independentes utilizado para comparar estatisticamente os resultados obtidos pela metodologia proposta e a metodologia de referência para a amostra de Ranivet.

T estatístico	Graus de liberdade	Prob> t
2,64416	4	0,1566

Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Como o valor da probabilidade calculada é maior do que p (0,05), temos que a hipótese nula é aceita, ou seja, a um nível de confiança de 95% os dados obtidos pela metodologia de referência e a metodologia proposta não diferem estatisticamente.

Desta maneira, evidencia-se que a metodologia proposta pode ser utilizada para a determinação de ranitidina. Vale lembrar que a metodologia proposta apresenta menor tempo de análise e menor consumo de reagente do que outros métodos analíticos, o que a torna atrativa para a determinação de ranitidina em amostras farmacêuticas.

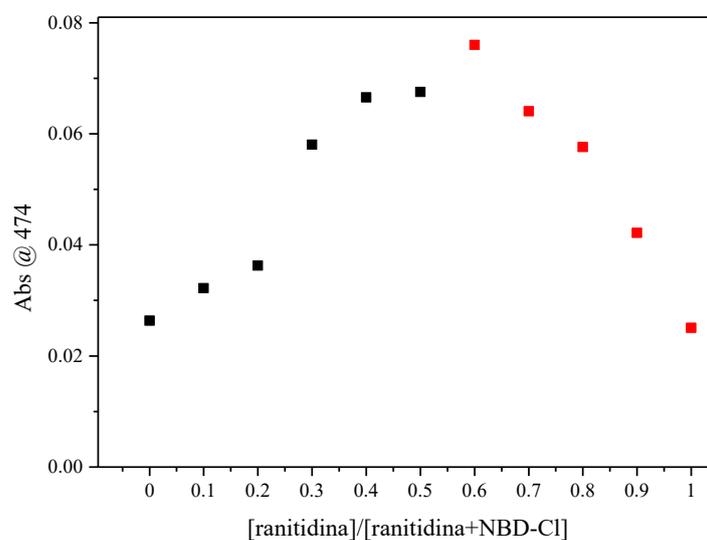
2.4.10 Caracterização dos dispositivos baseados em papel

A caracterização dos dispositivos baseados em papel é uma etapa importante, visto que permite uma maior elucidação dos processos químicos e físicos que ocorrem na reação entre NBD-Cl e a ranitidina. Assim, duas metodologias de caracterização foram utilizadas neste trabalho e são discutidas a seguir.

2.4.10.1 Método de Job e mecanismo proposto

O método de Job (também conhecido como método da variação contínua) é uma ferramenta utilizada na determinação da estequiometria de reagentes dentro de um equilíbrio químico. Comumente utilizado na determinação das proporções estequiométricas na formação de complexos, essa metodologia permite uma compreensão simples acerca da estequiometria de reações (OLSON; BÜHLMANN, 2011). Sendo assim, a Figura 21 abaixo mostra os resultados obtidos para a avaliação entre ranitidina e NBD-Cl a fim de elucidar a estequiometria do composto formado entre os dois reagentes. Esta avaliação foi realizada utilizando a absorção em 474nm como parâmetro de comparação entre as diferentes proporções entre ranitidina e NBD-Cl.

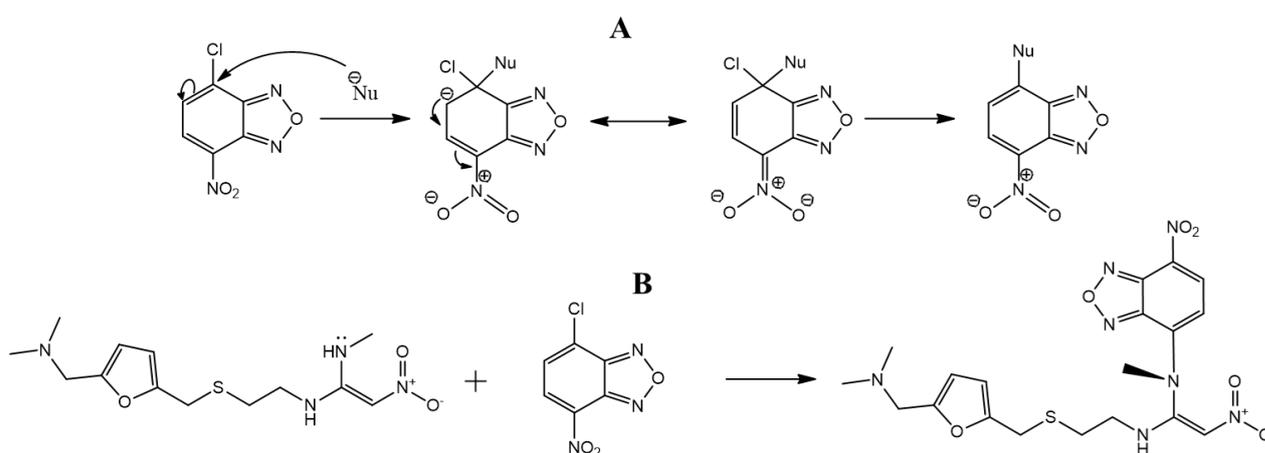
Figura 21 - Gráfico de Job para ranitidina e NBD-Cl.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Assim, com base no perfil apresentado, a estequiometria do composto formado entre ranitidina e NBD-Cl é de 1:1, visto que a intensidade máxima de absorção ocorre quando a razão molar entre os dois compostos é 0,5. Desta forma, o mecanismo proposto para a reação entre a ranitidina e o NBD-Cl é descrito na Figura 22B abaixo:

Figura 22- A) Mecanismo genérico para a reação de substituição nucleofílica aromática ao NBD-Cl. B) Reação proposta para a ranitidina e NBD-Cl.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

O mecanismo proposto entre a ranitidina e o NBD-Cl baseia-se numa reação de substituição nucleofílica aromática (Figura 22A). Nessa reação, o anel aromático apresenta um

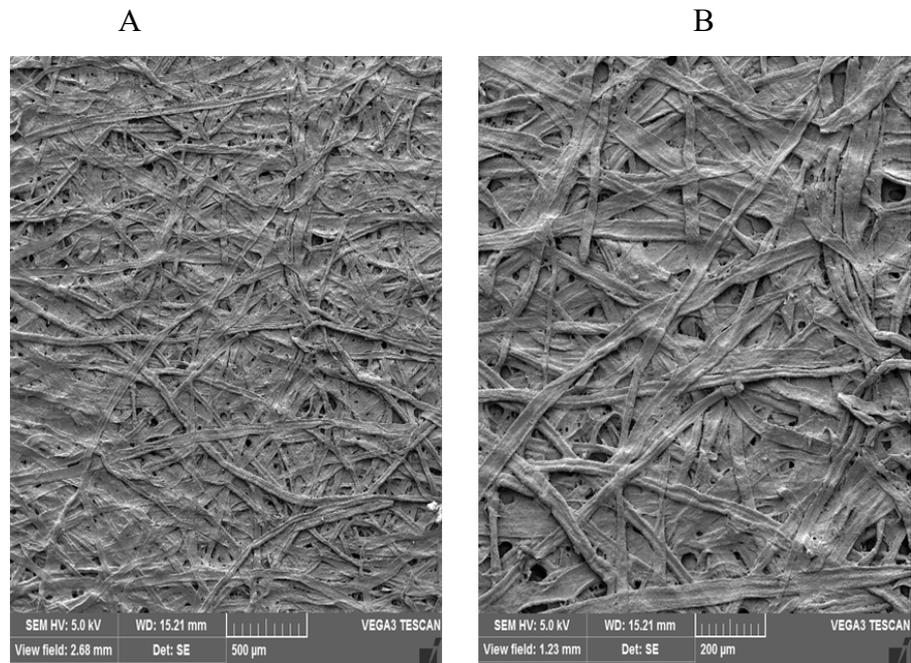
grupo retirador de elétrons, que nesse caso, é o grupo nitro (-NO₂). Adicionalmente, o grupo abandonador (o íon cloreto) está na posição para em relação ao grupo retirador de elétrons. Além disso, o meio deve estar básico para que a reação aconteça, o que explica o comportamento apresentado nos estudos de avaliação do pH, onde pouco produto foi formado em meio ácido ou neutro.

2.4.10.2 *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A caracterização morfológica de dispositivos baseados em papel é um aspecto importante a ser avaliado. De fato, trabalhos recentes presentes na literatura utilizam a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para a caracterização de dispositivos (GHADERINEZHAD *et al.*, 2017; KOMATSU *et al.*, 2020). Deste modo, os resultados obtidos para a caracterização dos dispositivos estão presentes nas Figuras 23-25. As micrografias evidenciam que não houve diferença significativa na estrutura do papel (Figura 23) em relação ao dispositivo com a presença de ranitidina e NBD-Cl (Figura 24) e na presença desses reagentes e CTAB (Figura 25). Este perfil já era esperado para este tipo de dispositivo visto que nenhuma modificação física ou química foi realizada na superfície do papel.

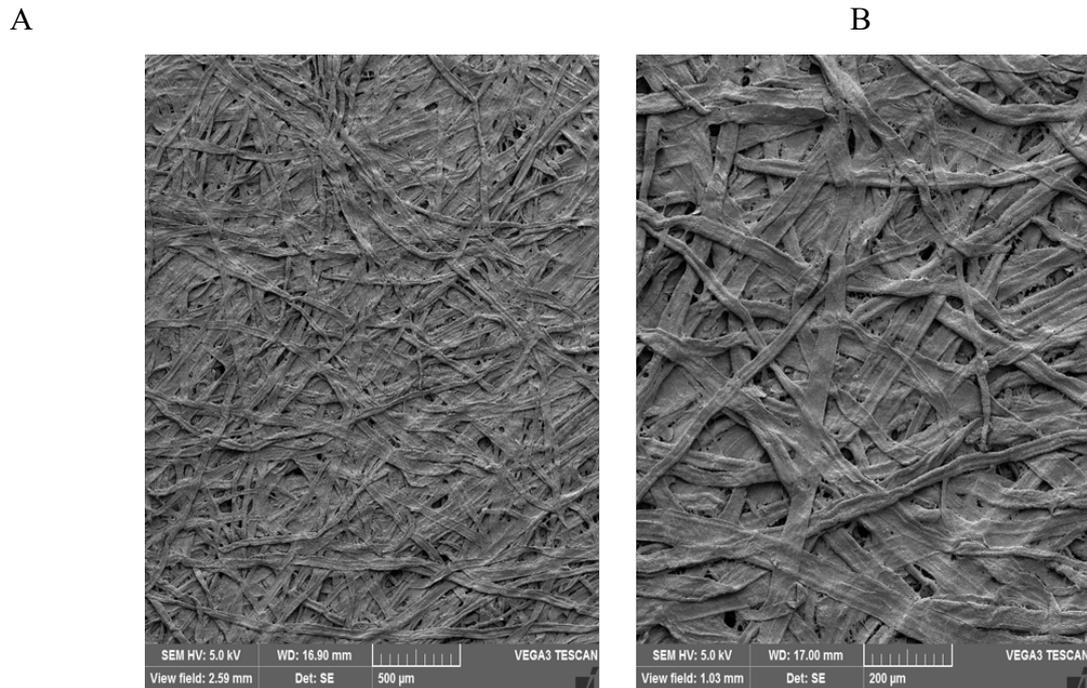
A estrutura presente caracteriza-se pela presença de fibras de celulose que se apresentam distribuídas de forma uniforme em toda a superfície. Quando comparadas as micrografias obtidas com outros trabalhos presentes na literatura, evidencia-se que independentemente da presença dos reagentes a estrutura do papel não se modifica substancialmente (BENNIS *et al.*, 2010; KOMATSU *et al.*, 2020). Assim, pode-se inferir que os reagentes utilizados não alteram a estrutura física dispositivo.

Figura 23- MEV com diferentes ampliações para dispositivo contendo apenas papel. A) Ampliação de 78x. B) Ampliação de 168x.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

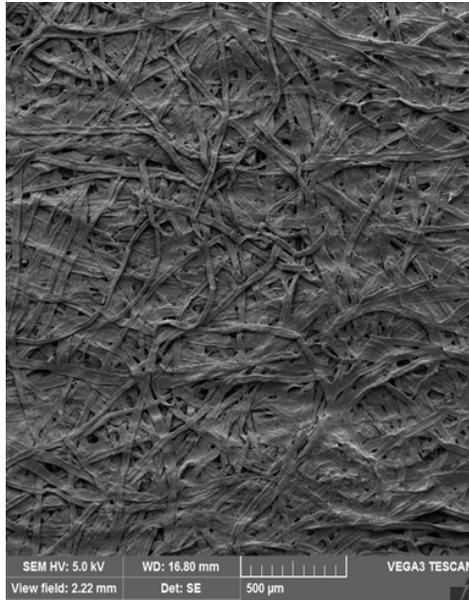
Figura 24 - MEV com diferentes ampliações para dispositivo contendo NBD-Cl e ranitidina (0,5mM). A) Ampliação de 78x. B) Ampliação de 168x.



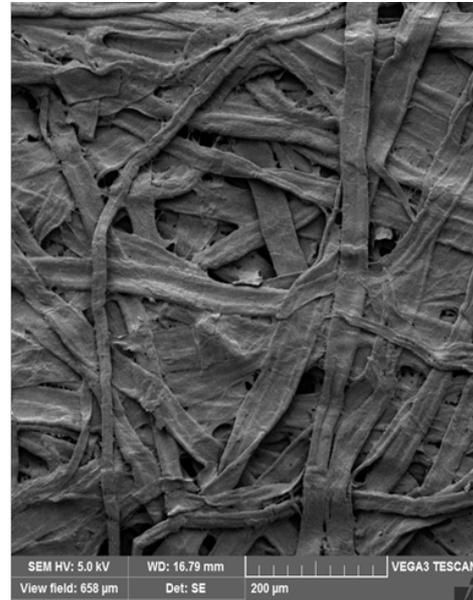
Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

Figura 25- Figura 24 - MEV com diferentes ampliações para dispositivo contendo NBD-Cl e ranitidina e CTAB. A) Ampliação de 78x. B) Ampliação de 168x.

A



B



Fonte: Elaborado pelo autor, 2021.

2.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização da metodologia proposta para a determinação de ranitidina em amostras farmacêuticas foi satisfatória, tendo em vista todos os resultados obtidos no procedimento de avaliação e desenvolvimento dessa metodologia. Os dispositivos baseados em papel para a determinação de ranitidina em amostras farmacêuticas a partir de sua reação com NBD-Cl mostraram-se eficientes para a determinação deste analito. Parâmetros como pH, tampão, temperatura e concentração de NBD-Cl foram otimizados e evidenciaram que a resposta analítica mensurada é dependente desses parâmetros. A metodologia apresentou faixa linear de 0,2 – 1,5 mmol L⁻¹, o que permite seu uso na determinação de ranitidina em formulações farmacêuticas.

Além disso, o desvio padrão relativo foi calculado como 0,91% e 2,49% para concentrações de ranitidina de 0,2 e 1,0 mM, respectivamente. Obteve-se baixa interferência dos excipientes comumente utilizados nas formulações farmacêuticas em relação ao método, o que indica excelente seletividade. Os dados obtidos para as amostras reais não diferem estatisticamente dos obtidos pela metodologia de referência, o que indica que a metodologia proposta pode ser utilizada na determinação de ranitidina. Além disso, o método proposto supera inconvenientes como alto custo, procedimento laborioso, alto consumo de amostra e reagentes e outros problemas comuns para metodologias já estabelecidas na literatura. Portanto, a metodologia proposta é simples, barata, rápida e eficaz para a determinação de ranitidina em amostras farmacêuticas.

2.6 PERSPECTIVAS

- Avaliar a influência de outros agentes que possam melhorar a estabilidade e a cor gerada nos dispositivos analíticos baseados em papel;
- Realizar mais experimentos para a comprovação do mecanismo proposto, tais como RMN e infravermelho;
- Aplicar a metodologia proposta para a determinação de ranitidina em amostras de natureza biológica.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, C.; CSÓKA, L. **Recent Advances in Paper-Based Analytical Devices: A Pivotal Step Forward in Building Next-Generation Sensor Technology**. [S.l.]: [s.n.], 2019.
- BENNIS, H. *et al.* Fibre width measurement and quantification of filler size distribution in paper-based materials by SEM and image analysis. **Journal of Electron Microscopy**, 2010. v. 59, n. 2, p. 91–102.
- BHATTACHARYA, S.; KUMAR, S.; AGARWAL, A. K. **Paper Microfluidics**. [S.l.]: Springer Nature Singapore, 2019.
- CHEN, Jianqiu *et al.* Highly luminescent S,N co-doped carbon quantum dots-sensitized chemiluminescence on luminol–H₂O₂ system for the determination of ranitidine. **Luminescence**, 2017. v. 32, n. 3, p. 277–284.
- COLTRO, W. K. T. *et al.* Microsistemas de Análises Químicas. Introdução, Tecnologias de Fabricação, Instrumentação e Aplicações. **Química Nova**, 2007. v. 30, n. 8, p. 1986–2000.
- DUMANOVIĆ, D. *et al.* Protolytic constants of nizatidine, ranitidine and N,N'-dimethyl-2-nitro-1,1-ethenediamine; spectrophotometric and theoretical investigation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 1997. v. 15, n. 11, p. 1667–1678.
- ELBASHIR, A. A.; SULIMAN, F. E. O.; ABOUL-ENEIN, H. Y. The application of 7-chloro-4-nitrobenzoxadiazole and 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole for the analysis of amines and amino acids using high-performance liquid chromatography. **Gazi University Journal of Science**, 2011. v. 24, n. 4, p. 679–697.
- EL-EMAM, A. A. *et al.* Determination of lisinopril in dosage forms and spiked human plasma through derivatization with 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole (NBD-Cl) followed by spectrophotometry or HPLC with fluorimetric detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2004. v. 34, n. 1, p. 35–44.
- ETTRE, L. S. 1941-1951: The golden decade of chromatography. **The Analyst**, 1991. v. 116, n. 12, p. 1231–1235.
- FERNANDES, Gabriel M. *et al.* Paper-based analytical device for colorimetric detection of Cu²⁺ in Brazilian sugarcane spirits by digital image treatment. **Microchemical Journal**, 2020. v. 159, n. July, p. 105463.
- FERNANDES, Gabriel Martins *et al.* Novel approaches for colorimetric measurements in analytical chemistry – A review. **Analytica Chimica Acta**, 2020. v. 1135, p. 187–203.
- FEYNMAN, R. P. **Plenty of Room at the Bottom**. [S.l.]: [s.n.], 1959.
- FRITOLI, C. L.; KRÜGER, E. L.; CARVALHO, S. K. De P. História do papel: panorama evolutivo das técnicas de produção e implicações para sua preservação. **Revista Ibero-Americana de Ciência da Informação**, 2017. v. 9, n. 2, p. 475–502.
- GHADERINEZHAD, F. *et al.* High-throughput rapid-prototyping of low-cost paper-based microfluidics. **Scientific Reports**, 2017. v. 7, n. 1, p. 1–9.
- GORE, A. H. *et al.* A novel method for ranitidine hydrochloride determination in aqueous solution based on fluorescence quenching of functionalised CdS QDs through photoinduced charge transfer process: Spectroscopic approach. **Analyst**, 2011. v. 136, n. 12, p. 2606–2612.
- HUY, B. T.; NGHIA, N. N.; LEE, Y. I. Highly sensitive colorimetric paper-based analytical device for the determination of tetracycline using green fluorescent carbon nitride nanoparticles. **Microchemical Journal**, 2020. v. 158, n. June, p. 105151.

- JOSEPH, J. *et al.* Ranitidine ban - a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, 2019. v. 59, n. 2, p. 52–55.
- JÚNIOR, J. G. F. **Desenvolvimento de um dispositivo microfluídico híbrido pdms/vidro para a detecção e separação de glifosato e ampa em amostras ambientais**. [S.l.]: Universidade Federal de Alagoas, 2019.
- KISZKIEL-TAUDUL, I.; STARCZEWSKA, B. Single drop microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (SDME-LC-MS/MS) for determination of ranitidine in water samples. **Microchemical Journal**, 2019. v. 145, n. December 2018, p. 936–941.
- _____; _____. JABŁOŃSKA, A. Ionic liquid-based ultrasound-assisted emulsification microextraction for the determination of ranitidine in water samples and pharmaceutical preparations. **New Journal of Chemistry**, 2020. v. 44, n. 27, p. 11490–11497.
- KOMATSU, T. *et al.* Paper-Based Device for the Facile Colorimetric Determination of Lithium Ions in Human Whole Blood. **ACS Sensors**, 2020. v. 5, n. 5, p. 1287–1294.
- LU, R. *et al.* Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. **Electrophoresis**, 2009. v. 30, n. 9, p. 1497–1500.
- MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, 2001. v. 24, n. 1, p. 87–93.
- MARTINEZ, A. W. *et al.* Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low Volume, Portable Bioassays. **Angew Chem Int Ed Engl.**, 2007. v. 46, n. 8, p. 1318–1320.
- MORBIOLI, G. G. *et al.* Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μPADs) - A review. **Analytica Chimica Acta**, 2017. v. 970, p. 1–22.
- NOROUZI, P.; GANJALI, M. R.; DANESHGAR, P. A novel method for fast determination of Ranitidine in its pharmaceutical formulations by fast continuous cyclic voltammetry. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 2007. v. 55, n. 3, p. 289–296.
- NOVIANA, E. *et al.* Microfluidic Paper-Based Analytical Devices: From Design to Applications. **Chemical Reviews**, 2021.
- OLIVEIRA, Y. M. Polímeros híbridos para a obtenção de sistemas de liberação controlada de repelente volátil para o desenvolvimento de protótipo de controle do aedes aegypti. 2018.
- OLSON, E. J.; BÜHLMANN, P. Getting more out of a job plot: Determination of reactant to product stoichiometry in cases of displacement reactions and n: N complex formation. **Journal of Organic Chemistry**, 2011. v. 76, n. 20, p. 8406–8412.
- OMAR, M. A.; HAMMAD, M. A.; AWAD, M. Utility of 4-chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole for development of a highly sensitive stability indicating spectrofluorimetric method for determination of salmeterol xinafoate; Application to human plasma. **RSC Advances**, 2017. v. 7, n. 71, p. 44773–44779.
- PAHWA, R. *et al.* Review Article Ranitidine hydrochloride: An update on analytical, clinical and pharmacological aspects. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, 2016. v. 8, n. 7, p. 70–78.
- REZAEI, B.; LOTFI-FORUSHANI, H.; ENSAFI, A. A. Modified Au nanoparticles-imprinted sol-gel, multiwall carbon nanotubes pencil graphite electrode used as a sensor for ranitidine determination. **Materials Science and Engineering C**, 2014. v. 37, n. 1, p. 113–119.
- RIOS, A.; ESCARPA, A.; SIMONET, B. **Miniaturization in Analytical Chemistry**. [S.l.]: [s.n.], 2009.

- RÍOS, Á.; ZOUGAGH, M. Modern qualitative analysis by miniaturized and microfluidic systems. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, 2015. v. 69, p. 105–113. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.003>>.
- SILVA, G. O. DA; ARAUJO, W. R. DE; PAIXÃO, T. R. L. C. Portable and low-cost colorimetric office paper-based device for phenacetin detection in seized cocaine samples. **Talanta**, 2018. v. 176, n. July 2017, p. 674–678.
- TALAY PINAR, P.; YARDIM, Y.; ŞENTÜRK, Z. Electrochemical oxidation of ranitidine at poly(dopamine) modified carbon paste electrode: Its voltammetric determination in pharmaceutical and biological samples based on the enhancement effect of anionic surfactant. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, 2018. v. 273, n. July, p. 1463–1473.
- TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos.pdf. **Química Nova**, 1996. v. 19, n. 2, p. 173–181.
- VAZ, R. *et al.* High luminescent carbon dots as an eco-friendly fluorescence sensor for Cr(VI) determination in water and soil samples. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 2017. v. 346, p. 502–511.
- WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, 2006. v. 442, n. 7101, p. 368–373.
- YU, J. *et al.* Light-controlled configurable colorimetric sensing array. **Analytical Chemistry**, 2019.
- ZACHARIS, C. K. *et al.* NBD-Cl as a post-column reagent for primary and secondary amines after separation by ion-exchange chromatography. **Analytical Letters**, 2011. v. 44, n. 10, p. 1821–1834.

3 MICROCHIP ELETROFORESE COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO, GLUTATIONA E CISTEÍNA

3.1 Introdução

A microfluídica possibilitou o desenvolvimento de tecnologias em diversas áreas do conhecimento. Dentro da química, a eletroforese capilar foi uma das maiores beneficiadas pela consolidação da microfluídica. A eletroforese pôde ter várias etapas do seu procedimento padrão de análise comprimidas em um único dispositivo com dimensões substancialmente menores do que aquelas comumente verificadas numa eletroforese capilar convencional (COLTRO, Wendell Karlos Tomazelli *et al.*, 2007; JÚNIOR, 2019).

As principais vantagens dos sistemas microfluídicos residem nos pequenos volumes de amostra utilizados, menor voltagens para separação dos analitos e menor consumo de amostra e reagentes. Esse último, notadamente, vai de encontro com os princípios preconizados pela química verde (LENARDÃO *et al.*, 2003).

3.1.1 Eletroforese Capilar

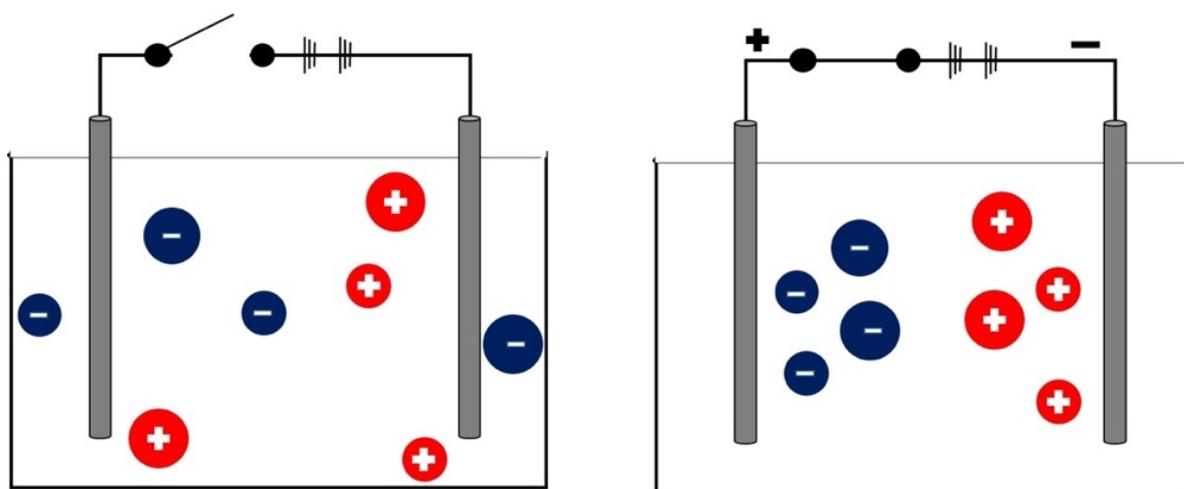
A eletroforese capilar pode ser definida como uma técnica de separação em que a compostos iônicos ou ionizáveis podem ser separados com base em diferenças de migração (TAVARES, 1996). Essa separação ocorre através da ação de um campo elétrico em capilares com diâmetro interno de 15 a 100 μm ou microcanais. A ação do campo elétrico nos capilares induz efeitos eletrocinéticos que estão associados com a relação de mobilidade entre duas fases (geralmente uma líquida e outra sólida e as propriedades elétricas da interface entre elas. Podemos citar, notadamente, dois desses efeitos eletrocinéticos: A eletroosmose, que compreende o movimento de todo o líquido dentro do capilar e a eletroforese, que é o transporte de partículas carregadas ou íons em relação ao fluido (TAVARES, 1996, 1997; WIEDMER; RIEKKOLA, 2022).

O comportamento das moléculas sob a influência de um campo elétrico é fundamental para entender como esse fenômeno ocorre. Em geral, as moléculas podem ter carga positiva ou negativa. Quando as cargas positivas e negativas são iguais em magnitude dentro de uma molécula, elas se anulam, resultando em uma molécula eletricamente neutra. Em solução, moléculas carregadas tendem a se mover em direção a regiões com cargas elétricas opostas.

Na ausência de um campo elétrico aplicado, o movimento das moléculas é aleatório. Porém, na presença de um campo elétrico, elas se movem de maneira organizada. Nesse

cenário, os cátions (espécies com carga positiva) migram em direção ao cátodo (eletrodo com carga negativa), enquanto os ânions (espécies com carga negativa) se movem em direção ao ânodo (eletrodo com carga positiva). Esse fenômeno é conhecido como fluxo eletroosmótico e é fundamental para a separação de espécies por meio da eletroforese capilar (JÚNIOR, 2019; TAVARES, 1997; WHATLEY, 2001). Um esquema de como a eletroforese acontece pode ser visto na Figura 26 abaixo, em que podemos verificar a influência da razão carga/massa (m/z). Partículas menores tendem a ser atraídas de forma mais rápida para os polos de carga oposta e, desta maneira, mesmo que a carga líquida das partículas seja igual, há diferença na migração das espécies. Como consequência, temos que essa característica é fundamental para a eletroforese capilar pois permite não somente a separação de espécies com cargas diferentes, mas também tamanhos diferentes.

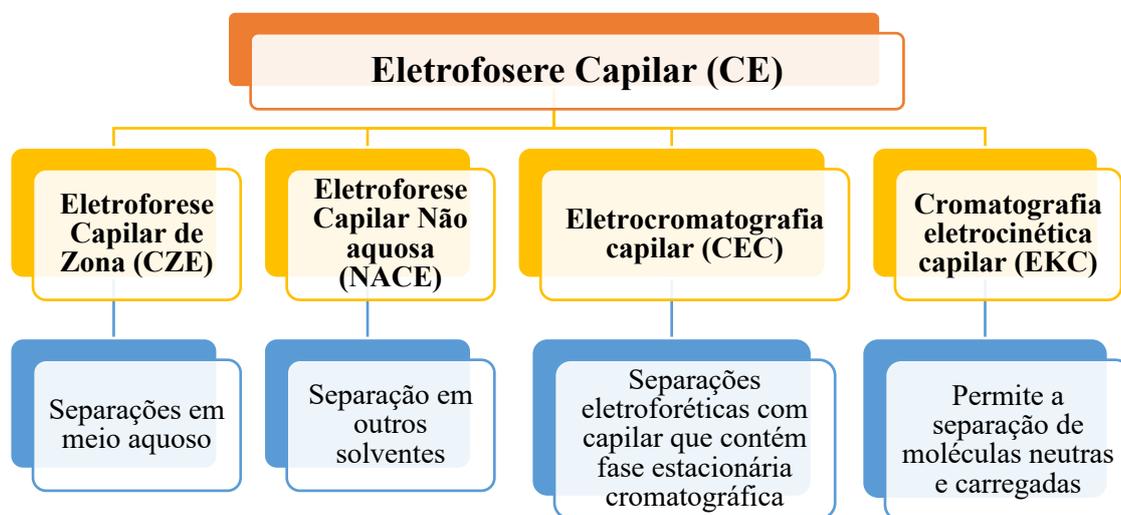
Figura 26 - Esquema básico de uma eletroforese capilar. A separação das espécies ocorre com base nas diferenças na razão carga/massa.



Fonte: Elaborado pelo autor (2019) e adaptado de Whatley (2001).

Separações utilizando eletroforese capilar podem ocorrer tendo como base diversos mecanismos, conforme elencado na Figura 27. Os mecanismos vão definir o tipo de eletroforese capilar. A eletroforese capilar de zona (CZE), por exemplo, recebe esse nome pois os solutos migram dentro de um capilar em zonas com diferentes mobilidades. Outros tipos de eletroforese capilar podem envolver outros solventes, como a eletroforese capilar não aquosa (NACE), ou até mesmo capilares que contenham uma fase estacionária cromatográfica, como a eletrocromatografia capilar (VAZA; OLIVEIRA, C. L. M. DE; OLIVEIRAA, DE, 2015)

Figura 27 - Organograma com os diversos tipos de eletroforese capilar.



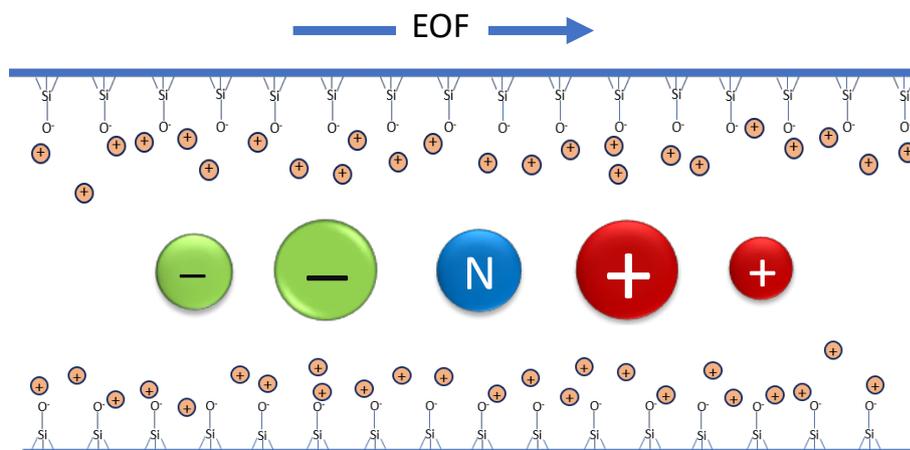
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

3.1.2 Fluxo eletrosmótico (EOF)

O fluxo eletrosmótico, também chamado de EOF (do inglês *electroosmotic flow*) é uma das principais características para entender e descrever a eletroforese capilar. Tavares (1997), define o fluxo eletrosmótico como um fenômeno que ocorre como decorrência do diâmetro pequeno do capilar e que pode ocorrer em qualquer sistema eletroforético. Nos sistemas que empregam capilares de sílica fundida, o fluxo eletrosmótico surge a partir da ionização dos grupos silanóis presentes na parede do capilar. Esses grupos adquirem uma carga negativa devido à passagem de uma solução alcalina pelo meio (ALIZADEH *et al.*, 2021; QUEIROZ; JARDIM, 1993; TAVARES, 1997).

A presença de íons opostos na solução resulta na formação de uma dupla camada elétrica. A dupla camada elétrica apresenta uma camada fixa e outra móvel, gerando uma diferença de potencial conhecida como potencial zeta. Esse potencial é criado em todo o capilar, promovendo um fluxo uniforme sem a necessidade de aplicar pressão. Essa característica é de extrema importância em termos experimentais e configura-se como uma das principais vantagens da eletroforese capilar, uma vez que evita a dispersão dos picos, já que moléculas semelhantes tenderão a se mover com velocidades muito próximas entre si (JÚNIOR, 2019; TAVARES, 1997). Podemos então ter uma ideia clara de como os grupos silanóis atuam através da Figura 28 abaixo, em que podemos também a separação de espécies de carga/massa diferentes:

Figura 28 - Representação do fluxo eletroosmótico que ocorre dentro dos capilares.



Fonte: Elaborado por Weerasekara (2021).

3.1.3 Técnicas de fabricação de dispositivos microfluídicos

A fabricação dos sistemas microfluídicos é uma etapa importantíssima dentro do desenvolvimento de metodologias analíticas que utilizam esses sistemas. Em linhas gerais, a técnica de fabricação e o tipo de material utilizado irá definir a viabilidade e as aplicações de cada tipo de dispositivo. Parâmetros como o tamanho dos canais, o *layout* e as limitações e aplicações de cada dispositivo microfluídico são determinados a partir do tipo de material a ser utilizado, ou seja, o substrato para a fabricação do dispositivo.

. Podemos dividir os substratos dos dispositivos microfluídicos em três grandes grupos: Os substratos rígidos, que incluem o vidro e o silício; os substratos poliméricos, que incluem os elastômeros e os termoplásticos; e o papel, um substrato que vem apresentando diversas aplicações recentemente (GALINDO-ROSALES, 2017; NOVIANA *et al.*, 2021; SCOTT; ALI, 2021).

Para a fabricação de dispositivos que utilizam substratos rígidos, tecnologias foram desenvolvidas com base na engenharia já existente para a fabricação de microssistemas eletromecânicos, os MEMS. A tecnologia por trás desse tipo de fabricação foi baseada primordialmente na indústria de circuitos integrados. Nessa categoria podemos elencar os processos de fotolitografia, deposição de vapor químico, pulverização catódica (*sputtering*) e outros. Pesa contra essas metodologias o fato de serem de alto consumo energético e/ou de longa duração. Adicionalmente, a falta de reprodutibilidade e principalmente a viabilidade de microssistemas baseados em vidro e/ou silício faz com que esses dispositivos não sejam atrativos para o desenvolvimento de metodologias analíticas. Para contornar esse problema,

outras técnicas de microfabricação são mais interessantes, como o uso de substratos poliméricos.

3.1.3.1 *Substratos poliméricos*

Os substratos poliméricos surgiram como uma alternativa os substratos rígidos, visto que esses apresentam uma série de problemáticas na sua fabricação. Além disso, soma-se aos fatores previamente elencados o fato de que em regiões de baixo desenvolvimento humano ou com recursos escassos os substratos poliméricos podem ser mais atrativos para o desenvolvimento de metodologias baseadas em sistemas microfluídicos, uma vez que o custo de produção desses dispositivos é substancialmente menor quando comparado com os dispositivos baseados em substratos rígidos (BECKER; LOCASCIO, 2002; TSAO, 2016)

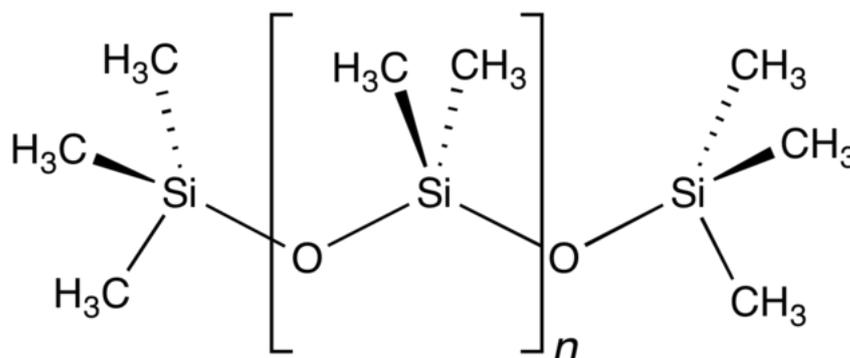
As metodologias de microfabricação para substratos poliméricos são baseadas na fotolitografia suave (do inglês *soft lithography*) e têm como principais características o baixo custo de replicação, a facilidade e a conveniência no processo de fabricação. De maneira ampla, esse método engloba o processo de endurecimento de um material polimérico (elastômeros) sobre a superfície de um molde que incorpora o dispositivo microfluídico (geralmente fabricado a partir de materiais como o silício). Os elastômeros podem ser facilmente retirados da superfície do molde, possibilitando uma replicação dos componentes de forma relativamente simples. Isso resulta em uma relação custo-benefício satisfatória devido à sua operacionalidade direta (JÚNIOR, 2019; TSAO, 2016)

A escolha do polímero a ser utilizado na microfabricação perpassa a identificação da aplicação e das condições experimentais a serem utilizadas. De uma forma geral, existem duas classes principais de polímeros. A primeira classe é formada pelos polímeros termoplásticos, que se destacam por sua rigidez, sólida estabilidade mecânica e resistência a solventes, ácidos e bases. Essas propriedades conferem aos dispositivos criados a partir desses polímeros uma variedade de aplicações em análises biomoleculares. Alguns dos principais termoplásticos incluem o PC (policarbonato), PS (poliestireno) e PMMA (polimetil-metacrilato). A segunda categoria é constituída pelo elastômero conhecido como polidimetilsiloxano, amplamente referido como PDMS (FRIEND; YEO, 2010; JÚNIOR, 2019; SCOTT; ALI, 2021)

O PDMS (Figura 29) é um polisiloxano, ou seja, apresenta na sua unidade monomérica um átomo de silício ligado ao oxigênio e dois grupos orgânicos –R. No caso específico do PDMS, esses grupos orgânicos são grupos metila. A fórmula empírica do PDMS é $(C_2H_6OSi)_n$, onde n denota a quantidade de unidades monoméricas presentes no polímero. A depender da

quantidade dessas unidades monoméricas, o PDMS pode se apresentar como um líquido viscoso (baixo número de n) ou um semi-sólido (alto número de n) (TAGLIARO *et al.*, 1998)

Figura 29 - Estrutura do PDMS



Fonte: Adaptado de O'Brien, 2003.

O PDMS possui significativa biocompatibilidade com diversas biomoléculas e células, além de possuir excelentes características ópticas e estabilidade térmica (até 186°C). Além disso, apresenta notável elasticidade e é suscetível a alterações mediante a aplicação de força ou pressão de ar. Entre as principais desvantagens do PDMS encontram-se a possibilidade de deformação dos canais microfluídicos, a baixa resistência a solventes e as variações de pH em extremos (meios excessivamente ácidos ou alcalinos) (XIA; WHITESIDES, 1998). Devido à presença de grupos ionizáveis, o PDMS pode ser empregado para induzir um fluxo eletrosmótico de maneira análoga ao que ocorre nos capilares de sílica.

3.1.4 Técnicas de injeção em microchip eletroforese

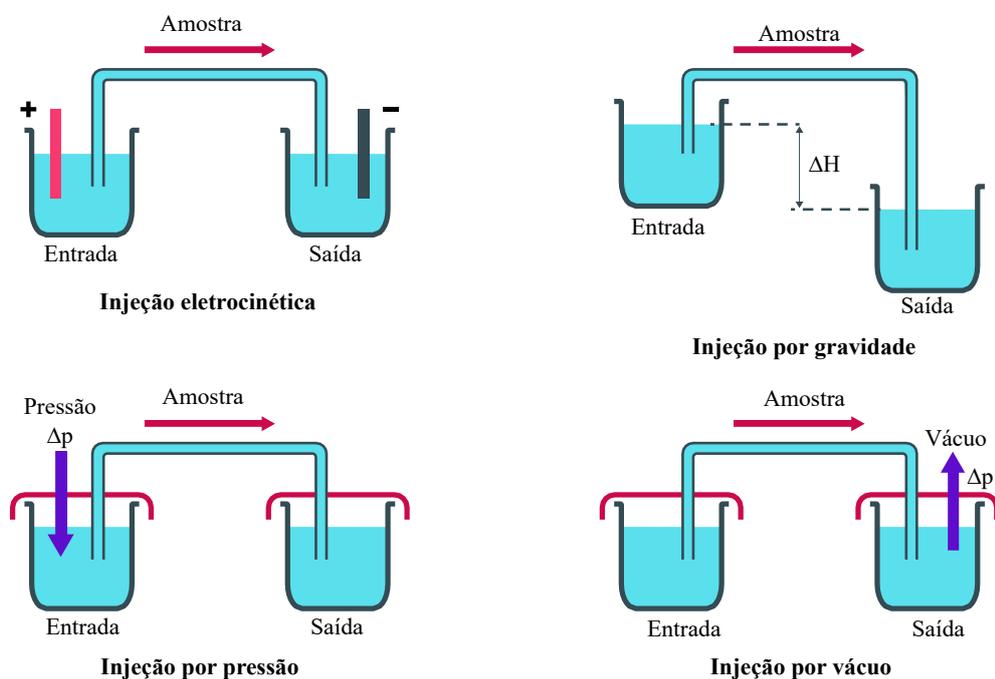
A injeção da amostra configura-se como uma etapa fundamental para as aplicações de microchip eletroforese, uma vez que é uma etapa crucial dentro do processo analítico (GARCÍA; CHUMBIMUNI-TORRES; CARRILHO, 2013; WHATLEY, 2001). Como a quantidade de amostra injetada é da ordem de apenas alguns nanolitros ou até mesmo picolitros (10^{-9} L a 10^{-12} L, respectivamente), a injeção da amostra demanda extrema importância. Podemos subdividir a injeção da amostra em duas categorias: a injeção hidrodinâmica e a injeção eletrocínética.

A injeção hidrodinâmica ocorre quando um volume de amostra é injetado no dispositivo a partir de uma pressão aplicada na extremidade do capilar que está diretamente imersa na solução da amostra (GABRIEL *et al.*, 2017; WHATLEY, 2001). As principais vantagens da injeção hidrodinâmica derivam do volume de amostra praticamente constante, fator esse dependente do uso de amostras com viscosidade semelhante e ausência de mudanças bruscas na temperatura. Por outro lado, as principais desvantagens estão ligadas às já mencionadas possibilidades de alterações na viscosidade, bem como aos desafios associados ao controle preciso de parâmetros como a precisão no momento da injeção, a reprodutibilidade de todos os procedimentos e a altura de elevação do capilar (particularmente na injeção por gravidade), o que ocorre em sistemas de injeção do tipo *homemade* (COLTRO, Wendell Karlos Tomazelli *et al.*, 2007; WHATLEY, 2001).

Podemos ainda subdividir a injeção hidrodinâmica em três subtipos: A injeção por gravidade, injeção por pressão e injeção à vácuo. A diferença entre cada uma delas se dá pela forma como a diferença de pressão é obtida. Na injeção por gravidade, o capilar de separação é preenchido com o eletrólito de suporte (tampão) e funciona como uma coluna de líquido. A partir do momento em que uma extremidade do capilar é elevada a uma determinada altura, o fluxo hidrodinâmico é alcançado. Essa abordagem é a considerada a mais simples por não necessitar de válvulas de injeção ou dispositivos para pressão.

A segunda forma de injeção hidrodinâmica é a injeção por pressão, em que a diferença de pressão é obtida utilizando-se bombas de ar com alta precisão. A principal vantagem desse tipo de injeção é a alta reprodutibilidade. A injeção por vácuo é o terceiro modo de injeção hidrodinâmica, e utiliza um sistema de vácuo para a obtenção da injeção da amostra (RANG, [s.d.]; WHATLEY, 2001). Um esquema geral das diferentes técnicas de injeção de amostra está presente na Figura 30 abaixo:

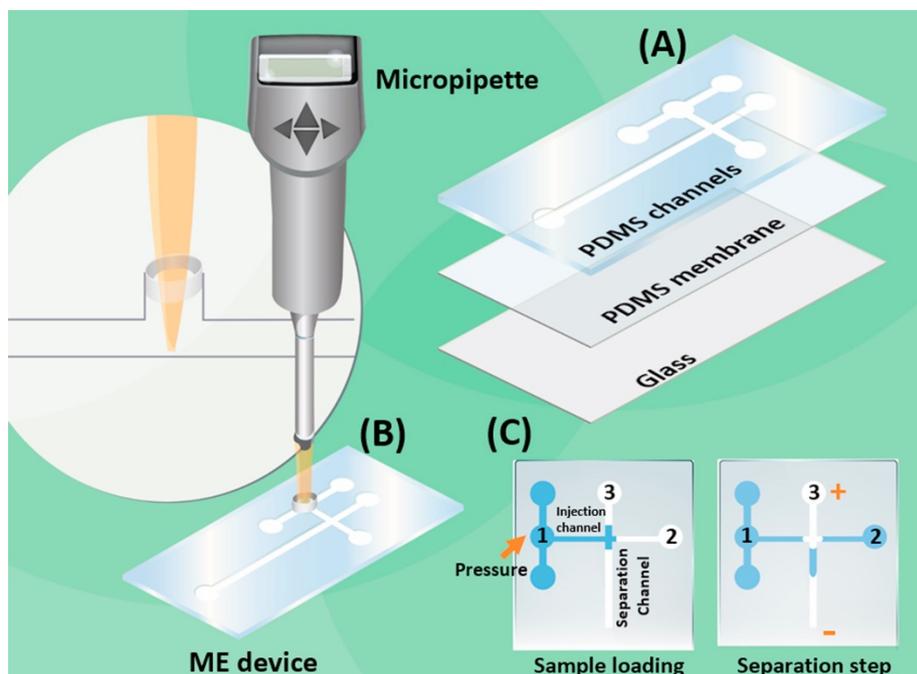
Figura 30 - Diferentes abordagens para injeção de amostra em eletroforese capilar e microchip eletroforese.



Fonte: Adaptado de Rang (s.d.)

Um exemplo de aplicação da injeção hidrodinâmica está no trabalho de Gabriel e colaboradores (2017). Neste trabalho, os autores desenvolveram um sistema injetor hidrodinâmico por pressão para microchip eletroforese baseado no uso de uma micropipeta eletrônica e caracterizaram todo o processo de injeção da amostra. A micropipeta eletrônica foi acoplada no dispositivo híbrido PDMS/vidro e após as otimizações necessárias o sistema foi utilizado para a separação de Na^+ , Li^+ e K^+ utilizando um sistema de detecção baseado em C^4D . O volume de amostra necessário para completar o canal de injeção foi estimado em $0,6 \mu\text{L}$ e, utilizando um microdispositivo do tipo T simples, um dos principais problemas reportados pelos autores foi a presença de bolhas de ar dentro dos canais. Esse problema foi ocasionado pela diferença de pressão ocasionada no acoplamento do chip de PDMS e a micropipeta, o que pode ser visto na Figura 31.

Figura 31 - Esquema do sistema de injeção de amostra hidrodinâmica acoplado com o dispositivo PDMS/vidro.



Fonte: Gabriel e colaboradores (2017).

Após as otimizações necessárias, os autores reportaram um limite de detecção para as espécies analisadas na faixa de 18 – 23 $\mu\text{mol L}^{-1}$, valores que estão de acordo com outros trabalhos presentes na literatura. Além disso, os autores reportaram a simplicidade instrumental e o alto potencial de integração e portabilidade do dispositivo, que pode ser utilizado para análises em campo.

3.1.4.1 Injeção eletrocinética

A injeção eletrocinética é a forma de injeção mais comumente utilizada em microchip eletroforese e não necessita de aparelhagem complexa. Para esse tipo de injeção, um eletrodo é disposto na extremidade do capilar onde a amostra está presente e uma alta voltagem é aplicada através por um curto espaço de tempo. Esse tipo de injeção depende do fluxo eletroforético e do fluxo eletrosmótico e a quantidade de amostra injetada pode ser calculada a partir da equação 5 abaixo:

$$Q_i = \frac{[\mu_i(k_e/k_s) + \mu_{EOF}] \pi r^2 C_i t_{inj} V_{inj}}{L} \quad \text{Equação 5}$$

Onde Q_i é a quantidade da espécie que é injetada, μ_i é a mobilidade eletroforética da espécie, μ_{EOF} é a mobilidade do EOF, k_e/k_s é a razão da condutividade do tampão de corrida e a amostra e V_{inj} é a voltagem aplicada para a injeção da amostra. As principais vantagens da injeção eletrocínética estão relacionadas com a simplicidade da injeção da amostra e a melhor sensibilidade analítica em relação à injeção hidrodinâmica (JÚNIOR, 2019). Apesar dos fatores positivos reportados, a reprodutibilidade da injeção eletrocínética é menor do que a reprodutibilidade da injeção hidrodinâmica, o que pode ser considerado um entrave para o desenvolvimento de metodologias baseadas em microchip eletroforese (GABRIEL *et al.*, 2017; GARCÍA; CHUMBIMUNI-TORRES; CARRILHO, 2013).

Outras desvantagens relacionadas com a injeção eletrocínética estão relacionadas com a mobilidade dos íons e a condutividade. Em geral, íons com maior mobilidade eletroforética tendem a estar presentes em maior quantidade na amostra injetada do que os íons que apresentam menor mobilidade eletroforética. Assim, podemos dizer que a composição da amostra injetada difere da composição original da amostra. Além disso, tem-se que a quantidade de amostra injetada depende da razão da condutividade/resistividade da amostra. Numa situação em que duas amostras com a mesma concentração de um analito possuem condutividades diferentes, a quantidade de amostra que é de fato injetada será diferente para as duas amostras, afetando a reprodutibilidade da metodologia a ser desenvolvida.

Existem três modos de injeção eletrocínética: *Unpinched*, *pinched* e *gated*. Cada uma dessas abordagens possui particularidades e podem ser utilizadas em microchip eletroforese de acordo com parâmetros como o tipo de amostra, a precisão necessária para a análise e o tipo de fonte de alta tensão disponível (FISCHER *et al.*, 2009).

A injeção *unpinched* é considerada a forma mais simples de injeção eletrocínética, já que necessita apenas de uma fonte monocanal (PINHEIRO; REZENDE; COLTRO, Wendell K.T., 2021). Essa injeção ocorre a partir da aplicação de alta voltagem no reservatório da amostra por um período que varia de 1 a 5 segundos, sendo o reservatório de detecção utilizado como *ground*. A amostra é então introduzida no canal de separação através das forças eletrocínéticas atuantes e a separação é iniciada quando a alta voltagem é aplicada no reservatório do tampão. Apesar da praticidade e simplicidade, essa forma de injeção da amostra apresenta sérios problemas de reprodutibilidade, inviabilizando assim a sua aplicação em microchip eletroforese (FISCHER *et al.*, 2009; PENG *et al.*, 2018).

A injeção *pinched*, por sua vez, configura-se como uma alternativa à injeção *unpinched* para a obtenção de injeções com melhor reprodutibilidade. Nessa abordagem, o potencial

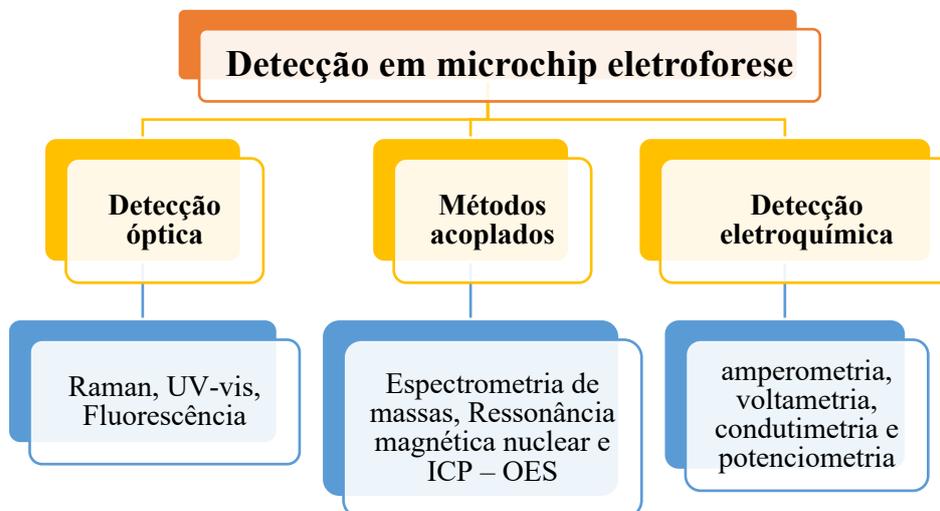
elétrico é aplicado em três reservatórios de maneira simultânea. Inicialmente, a região que corresponde à intersecção do microchip é preenchida com a aplicação potencial negativo no reservatório de descarte da amostra, estando os reservatórios de amostra, tampão e detecção na configuração *ground*. Na segunda etapa, a separação ocorre pela aplicação da alta tensão no reservatório do tampão e uma voltagem menor nos reservatórios de amostra e descarte da amostra (FISCHER et al., 2009; PENG et al., 2018; PINHEIRO; REZENDE; COLTRO, Wendell K.T., 2021).

O terceiro modo de injeção eletrocinética é o *gated*, em que há o controle da voltagem em cada reservatório. Nesse modo de injeção dois fluxos são mantidos de forma contínua, tendo uma alta tensão aplicada no reservatório do tampão e uma parte dessa alta tensão sendo aplicada no reservatório de amostra e os outros dois reservatórios (descarte do tampão e descarte da amostra) mantidos em *ground*. Como consequência, um fluxo de amostra em direção ao reservatório de descarte e um fluxo de separação do reservatório do tampão para o reservatório de detecção são gerados. Nesse modo de injeção, o volume de amostra introduzido no canal de separação depende essencialmente do tempo de injeção e da magnitude do campo elétrico aplicado, sendo esses os dois principais parâmetros a serem otimizados durante o desenvolvimento de metodologias analíticas baseadas em microchip eletroforese. Uma das principais características do modo *gated* é a possibilidade de serem utilizadas diferentes técnicas de detecção, além de permitir o processamento de múltiplas injeções (HENRY, 2006; PINHEIRO; REZENDE; COLTRO, Wendell K.T., 2021).

3.1.5 Técnicas de detecção em microchip eletroforese

A integração das etapas de um procedimento analítico dentro do microchip eletroforese permite que várias técnicas de detecção possam ser utilizadas. Podemos dividir as técnicas de detecção em microchip eletroforese em três grupos principais, conforme a Figura 32 abaixo:

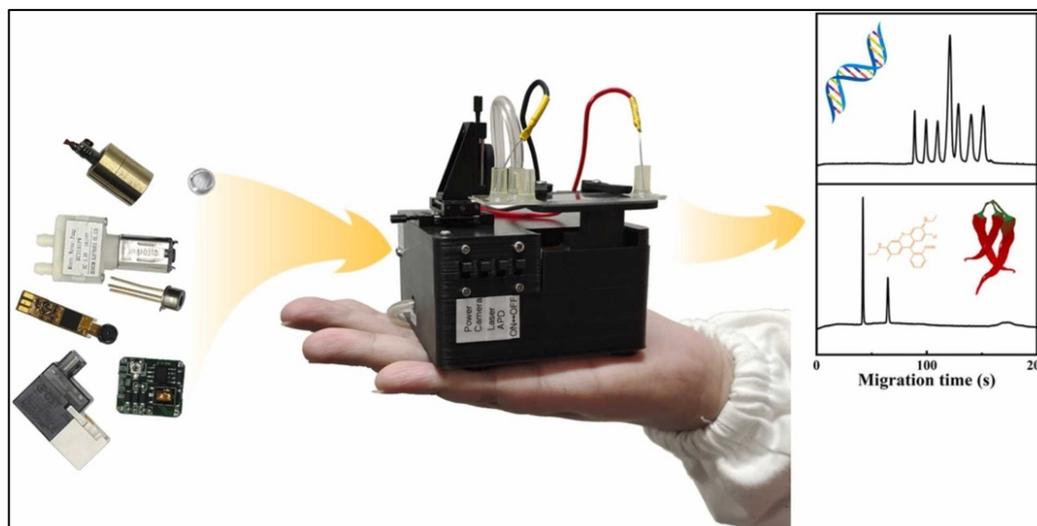
Figura 32 – Organograma com as principais técnicas de detecção para microchip eletroforese



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Cada técnica de detecção possui características singulares que podem ser utilizadas de acordo com o tipo de amostra e analito a ser analisada. Um claro exemplo das potencialidades das técnicas analíticas citadas podem ter está no trabalho de (Wang e colaboradores (2022)). Neste trabalho, os autores desenvolveram um dispositivo portátil que pode ser colocado na palma da mão e tem um custo total de fabricação de 600 dólares e é operável utilizando uma fonte externa simples. Esse dispositivo permite a integração de várias etapas do procedimento analítico. O dispositivo foi construído utilizando uma impressora 3D, e a injeção utilizada foi do tipo hidrodinâmica e obtida a partir por pressão. O sistema de detecção óptica utilizou LIF (Fluorescência induzida por laser, do inglês *laser induced fluorescence*) para determinação de fluoresceína como analito modelo para a validação do dispositivo proposto que pode ser observado na Figura 33:

Figura 33 - Resumo gráfico do trabalho de Wang e colaboradores (2022).



Fonte: Wang e colaboradores, 2022.

Como pode ser visto na Figura 32, várias técnicas podem ser utilizadas no sistema de detecção de um microchip eletroforese. Wang e colaboradores (2023) publicaram uma nota técnica de um dispositivo para eletroforese capilar construído a partir de uma impressora 3D que possui um sistema com 3 diferentes detectores. Dois desses detectores são considerados ópticos, uma vez que realizam detecção via UV e LIF. O terceiro detector é considerado um detector eletroquímico, uma vez que utiliza detecção via C^4D (detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente). As otimizações necessárias para cada tipo de detector foram realizadas e os autores demonstraram o potencial do dispositivo com fluoresceína e obtiveram limites de detecção entre 1nM e 2 μ M. Assim, na etapa subsequente do trabalho, os autores analisaram uma série de compostos orgânicos e inorgânicos presentes em uma amostra complexa, visando a aplicação do dispositivo desenvolvido em missões espaciais em planetas extraterrestres. Deste modo, analitos como aminoácidos (glicina, alanina e fenilalanina, histidina e outros) e espécies inorgânicas como Na^+ , K^+ , Li^+ e SO_4^{2-} e Cl^- foram analisados e mostraram a potencialidade do sistema desenvolvido.

3.1.5.1 Detecção eletroquímica em microchip eletroforese

A utilização de sistemas de detecção eletroquímicos em microchip eletroforese baseia-se numa série de características interessantes do ponto de vista analítico como a alta sensibilidade, facilidade de operação, seletividade elevada e instrumentação miniaturizada. Em geral, podemos imaginar um sistema de detecção eletroquímica composto por um conjunto de

três eletrodos contendo um eletrodo de trabalho, em que o potencial varia linearmente com o tempo; um eletrodo de referência, o qual apresenta potencial constante durante o experimento; E um contraeletrodo, em que a corrente flui do eletrodo de trabalho para o contraeletrodo (SKOOG *et al.*, 2017). Apesar dos sistemas contendo três eletrodos serem comuns, há a possibilidade de obter sistemas de detecção eletroquímica com apenas dois eletrodos, sendo utilizados apenas um eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência.

Idealmente, a utilização de um sistema de detecção eletroquímica em microchip eletroforese envolve uma etapa de incorporação dos eletrodos na própria base do microchip durante a etapa de fabricação, uma vez que a construção desse dispositivo necessita do posicionamento dos eletrodos, melhorando a reprodutibilidade do sistema (JÚNIOR, 2019).

Dentre as abordagens possíveis para a detecção eletroquímica, a detecção amperométrica é a mais utilizada devido a uma série de características/vantagens como os baixos limites de detecção, baixo custo relativo a outras técnicas como o LIF e ampla variedade de analitos passíveis de serem analisados (HULVEY; FRANKENFELD; LUNTE, 2010a; JÚNIOR, 2019; PASAS; MARTIN; LUNTE, 2002). De uma forma geral, a detecção amperométrica é baseada na oxidação ou redução do analito na superfície do eletrodo de trabalho, sendo a variação da corrente elétrica proporcional à concentração do analito, conforme a equação 6 abaixo:

$$i = -AnFD \frac{c}{\delta_N} \quad \text{Equação 6}$$

Em que i representa a corrente medida durante a amperometria, A é a área do eletrodo, n é o número de elétrons envolvidos no processo redox, F é a constante de Faraday, D é o coeficiente de difusão, δ_N é a espessura da camada de difusão e c representa a concentração do analito (GARCÍA; CHUMBIMUNI-TORRES; CARRILHO, 2013). Como citado anteriormente, a amperometria permite que as medições sejam realizadas tanto na oxidação quanto na redução. Apesar disso, a detecção via oxidação é mais comum, uma vez que quando a detecção via redução ocorre há uma problemática relacionada com a interferência do oxigênio dissolvido no sinal analítico obtido.

3.1.5.2 Posicionamento do eletrodo de trabalho em microchip eletroforese

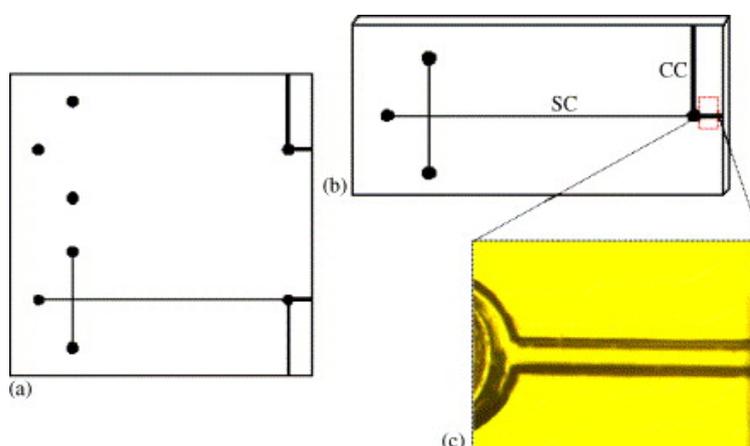
Apesar das vantagens descritas anteriormente para a amperometria, alguns cuidados devem ser tomados para que a detecção ocorra de maneira satisfatória. Uma preocupação recorrente consiste no posicionamento do eletrodo de trabalho, uma vez que esse deve ser posicionado de forma mais próxima da saída do canal para evitar um alargamento de banda

presente no sinal amperométrico. Adicionalmente, a proximidade do sistema de alta voltagem utilizado para a separação das espécies e o sistema de detecção pode causar dano ao potenciostato, equipamento utilizado para as medições dos sinais analíticos. Assim, uma etapa importante consiste no desacoplamento da alta voltagem e do sistema eletroquímico de detecção. Assim, existem três principais possibilidades de posicionamento do eletrodo de trabalho (FISCHER *et al.*, 2009; JÚNIOR, 2019).

A primeira forma de posicionamento do eletrodo é o posicionamento *end-channel*, em que o eletrodo de trabalho fica posicionado no final do canal de separação. Esse tipo de posicionamento é o mais utilizado, e a pequena distância entre o eletrodo de trabalho e o canal de separação possibilita o desacoplamento da alta voltagem (FISCHER *et al.*, 2009; WU, Y. *et al.*, 2004).

Um exemplo de aplicação do posicionamento *end-channel* está no trabalho de Wu e colaboradores (2004). Neste trabalho, os autores reportaram o desenvolvimento de um microchip eletroforese baseado em vidro em que o alinhamento do eletrodo de trabalho no final do canal foi obtido a partir da utilização de um tubo guia. Esse tubo foi fabricado no final do reservatório de detecção e permitiu o alinhamento do eletrodo do eletrodo de fibra de carbono em disco. Durante os processos de separação das espécies, a injeção do tipo *floating* foi utilizada e o dispositivo foi utilizado na investigação de neurotransmissores. A separação de dopamina, catecolamina e epinefrina ocorreu de forma satisfatória em menos de 80 segundos, tendo limites de detecção abaixo de $2,9\mu\text{M}$ para as espécies. Um esquema do dispositivo utilizado pode ser observado na Figura 34 abaixo:

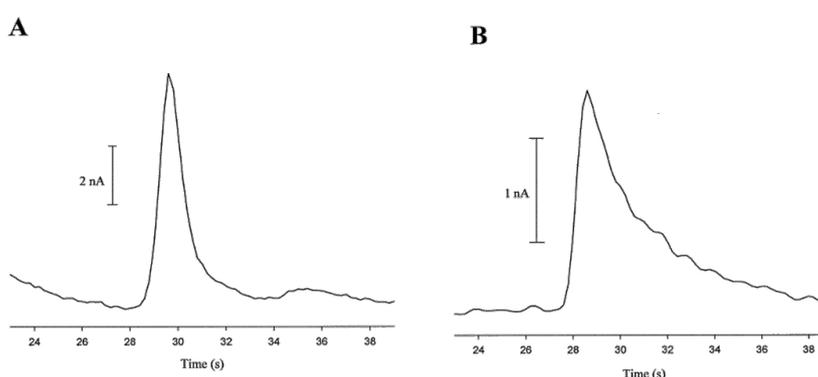
Figura 34 - Esquema do microchip baseado em vidro com tubo guia utilizado por Wu e colaboradores (2004).



Uma outra possibilidade de alinhamento do eletrodo de trabalho está na configuração *in-channel*, em que o eletrodo de trabalho é colocado diretamente no canal de separação. Entretanto, esse tipo de configuração exige a utilização de potenciostatos eletricamente isolados que não utilizam *ground* e, desta forma, o eletrodo de trabalho não sofre a exposição do campo elétrico oriundo da aplicação da alta voltagem (FISCHER *et al.*, 2009; MARTIN *et al.*, 2002; MENESES *et al.*, 2015) .

O trabalho de Martin e colaboradores (2002) é um exemplo de utilização da configuração *in-channel*. Neste trabalho, os autores reportaram a utilização dessa configuração a partir do desenvolvimento de um potenciostato *homemade*. Com o objetivo de comparar o sistema proposto com as metodologias baseadas em alinhamento *end-channel* já existentes na literatura, os autores utilizaram catecol como analito modelo para a realização dos testes. Assim, os autores observaram que houve uma melhora significativa no perfil de alinhamento dos picos obtidos para o analito. Essa melhora no alinhamento dos picos é justificada pelo fato de que na configuração *end-channel* o eletrodo está alinhado algumas dezenas de micrometros do canal de separação e, desta forma, há dispersão do pico, o que pode ser observado nas Figuras 35^a e 35B, em que os eletroferogramas para catecol empregando o alinhamento *in-channel* e *end-channel* foram utilizados, respectivamente.

Figura 35 – A) Eletroferograma para a detecção de catecol utilizando configuração *in-channel*. B) Eletroferograma para a detecção de catecol utilizando configuração *end-channel*.



Fonte: Martin e colaboradores, 2002.

Uma outra possibilidade de alinhamento de eletrodo é a configuração *off-channel*. Nessa configuração o eletrodo de trabalho é posicionado fora do canal de separação e um desacoplador é utilizado dentro do canal de separação. Esse desacoplador é geralmente um eletrodo de platina ou paládio. O desacoplador tem a função de redirecionar a voltagem de separação para um

ground e, desta forma, diminui a influência do campo elétrico. Os desacopladores são necessários quando o posicionamento *off-channel* é utilizado pois a alta voltagem do sistema de separação pode danificar o potenciostato (JÚNIOR, 2019; RÍOS, A. *et al.*, 2006).

3.1.6 Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

A vida na terra é dependente, quase que de forma integral, do oxigênio presente na atmosfera. Historicamente podemos assumir que o Grande Evento de Oxigenação/Oxidação tenha sido um momento crucial para a existência do planeta Terra da forma como conhecemos hoje. Esse evento ocorreu cerca de 2,5 bilhões de anos atrás e trouxe um aumento significativo da concentração de oxigênio atmosférico. Algumas consequências diretas desse evento foram a extinção de muitas espécies anaeróbicas existentes no planeta e um período de esfriamento planetário, uma vez que o oxigênio presente na atmosfera oxidou o metano atmosférico em dióxido de carbono e água, reduzindo o efeito estufa (MANDAL *et al.*, 2022).

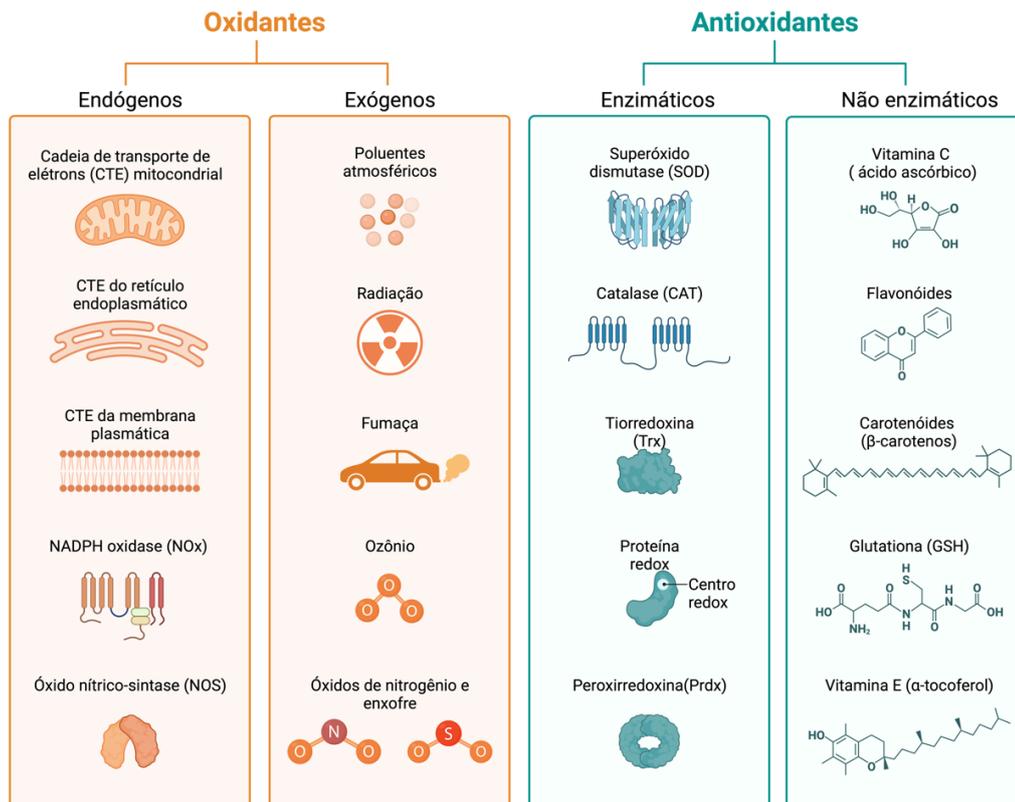
Por outro lado, a presença de O₂ na atmosfera aumentou visto que houve um aumento na quantidade de cianobactérias responsáveis por processos como fotossíntese. Assim, podemos dizer que a alta oferta de oxigênio na atmosfera levou ao desenvolvimento de organismos eucarióticos complexos. Essa era foi marcada pela existência de dois fenômenos. O primeiro deles foi a evolução dos processos fisiológicos utilizando oxigênio molecular para a produção de energia. O segundo evento foi a formação de processos e fatores protetivos contra a toxicidade do O₂, uma vez que as espécies reativas de oxigênio e as espécies reativas de nitrogênio estão envolvidas numa série de processos tóxicos nos seres vivos (MANDAL *et al.*, 2022).

Espécies reativas de nitrogênio e oxigênio (ERNs e EROs, respectivamente) são parte importante e integrante do metabolismo humano e mediadores da neuroinflamação com a função biológica ativa na fagocitose, processo necessário para a eliminação de agentes invasores ao metabolismo dos seres humanos (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO⁻), superóxido e peróxido de hidrogênio (O₂⁻ e H₂O₂) são alguns exemplos dessas espécies reativas. Entretanto, um aumento substancial da concentração dessas espécies está diretamente relacionado com dano celular em quase todos os compostos que exercem funções biológicas, tais como ácidos nucleicos, lipídios, proteínas, carboidratos celulares e outros, numa condição chamada de estresse oxidativo (HU *et al.*, 2020). Uma série de doenças neurodegenerativas, incluindo as doenças de Alzheimer e Parkinson, doenças

cardiovasculares, câncer e diabetes estão relacionadas com o estresse oxidativo (AL-SHEHRI, 2021).

Tióis de baixo peso molecular como a cisteína (cys), homocisteína (hcys) e a glutatona (GSH) são as moléculas pequenas mais abundantes entre os chamados tióis biológicos, uma série de compostos de papel importantíssimo na fisiologia humana (DAI et al., 2020). Antioxidantes de ocorrência natural como a glutatona e o ácido ascórbico, protegem as células de espécies reativas, e a proporção de glutatona oxidada e reduzida demonstrou ser um indicador de estresse oxidativo celular (GIUSTARINI et al., 2017). A homeostase celular, portanto, é um mecanismo do próprio organismo para estabelecer um equilíbrio entre espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e os antioxidantes. A Figura 36 abaixo mostra as principais espécies oxidantes e antioxidantes, focando na origem endógena ou exógena para os oxidantes e enzimática ou não enzimática para os antioxidantes

Figura 36 – Principais espécies oxidantes e antioxidantes e suas classificações quanto à origem.



Fonte: elaborado pelo autor, 2023.

A glutatona é o principal antioxidante intracelular presente em concentrações de 1–10 mM na microglia e outras células do sistema imunológico. GSH pode reagir com peroxinitrito e outras ERNs e EROs para proteger a célula do dano oxidativo. A glutatona peroxidase na

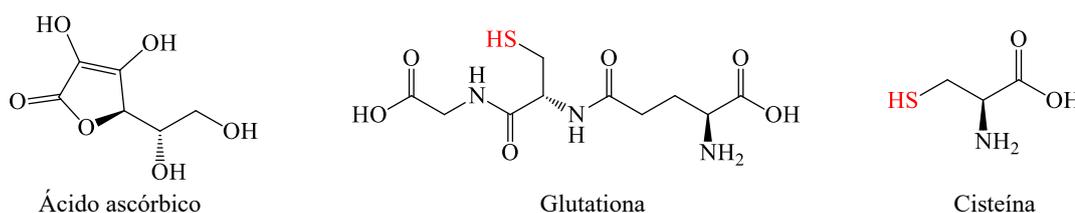
célula reduz o peróxido de hidrogênio com a formação concomitante de glutathiona dissulfeto (GSSG). Por causa de seu papel principal na manutenção do status redox da célula, a proporção intracelular de GSH / GSSG é frequentemente usada como uma medida quantitativa do estresse oxidativo celular (CLAESON et al., 2019; GIUSTARINI et al., 2015, 2017). Níveis anormais de GSH são indicativos de uma série de doenças como AIDS, câncer e mal de Parkinson (LEE, S. et al., 2018).

A cisteína é um alfa aminoácido natural que apresenta funções importantíssimas como síntese de proteínas, detoxificação e outras funções metabólicas. Níveis anormais de cisteína são apontados como indicativos de neurotoxicidade, despigmentação de cabelos, lesões no fígado e na pele (DAI et al., 2020; NGUYEN, Q. K. et al., 2021). A homocisteína, por sua vez, é um aminoácido não-proteinogênico, não participando diretamente da síntese de proteínas. A homocisteína pode ser utilizada como um biomarcador de diversas doenças como mal de Alzheimer, perda de funções cognitivas e doenças relacionadas ao risco cardiovascular. A concentração normal da homocisteína no plasma humano é de 5 – 15 μM , e altos níveis desse biomarcador estão associados com fatores de risco (HOSSEINZADEH et al., 2021). A homocisteína presente nos seres humanos advém da metionina encontrada em alimentos como ovos, peixes, iogurte e sementes.

Ácido ascórbico (AA), popularmente chamado de vitamina C, é uma das mais comuns moléculas pequenas encontradas no sangue humano e um dos principais antioxidantes, tendo funções relevantes para o funcionamento fisiológico correto do corpo humano. Estudos presentes na literatura demonstram que a concentração de AA nos fluidos biológicos pode ser utilizada para determinar os níveis de estresse oxidativo e indicar a necessidade de tratamentos para doenças relacionadas como diabetes, câncer e desordens psiquiátricas (MALIK; NARWAL; PUNDIR, 2022; NJUS et al., 2020).

A Figura 37 abaixo mostra as estruturas químicas das três espécies, dando destaque para o grupo tiol da glutathiona e da cisteína:

Figura 37 – Estruturas do ácido ascórbico, glutathiona e cisteína



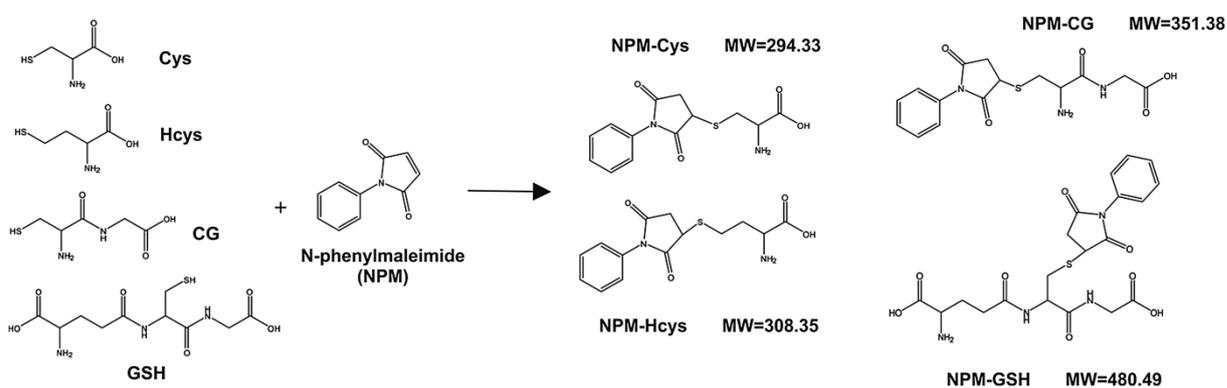
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

3.6.1.1 Estratégias para separação e detecção de tióis biológicos e ácido ascórbico

Devido a sua importância singular, várias metodologias para a determinação da dos biotióis e ácido ascórbico em diferentes tipos de amostra são reportadas na literatura. Forgacsova e colaboradores (2019) desenvolveram uma metodologia baseada em cromatografia líquida de interação hidrofílica de ultra eficiência acoplada com detector de espectrometria de massa (UHPLC–MS/MS) para a determinação de cisteína, homocisteína, glutatona e cisteinil-glicina (um produto da degradação da glutatona) em amostras de plasma de ratos transgênicos modelo para taupatias – um grupo de doenças neurodegenerativas que ocorrem pelo acúmulo exagerado de proteínas tau no cérebro e interferem na função celular e leva a danos progressivos no sistema nervoso, como pode ser observado no mal de Alzheimer (CÁRDENAS-AGUAYO *et al.*, 2014; GERSON; CASTILLO-CARRANZA; KAYED, 2014).

O método foi desenvolvido com base na reação de derivatização dos tióis com o reagente N-fenilmaleimida (NPM), o qual proporcionou alta seletividade e sensibilidade na detecção das espécies. Podemos observar na Figura 38 que o esquema de derivatização com o reagente NPM. É importante salientar que os autores reportaram outros procedimentos de derivatização utilizando reagentes que não foram satisfatórios devido a fatores como falta de linearidade e baixa solubilidade.

Figura 38 – Esquema da derivatização dos tióis com o reagente NPM presente no trabalho de Forgacsova e colaboradores



Fonte: Forgacsova e colaboradores, 2019.

Após as otimizações necessárias para o desenvolvimento do trabalho, a metodologia proposta apresentou limites de detecção na faixa de 0,18 – 2,84 μM e obteve os critérios necessários para análises biomédicas de acordo com o FDA (*Food and Drug Administration*), a agência regulatória americana. As análises com os ratos transgênicos demonstrou que os níveis

de homocisteína e glutatona nesses ratos estavam alterados quando em comparação com o grupo controle (FORGACSOVA *et al.*, 2019).

Assim, o presente trabalho visa o desenvolvimento de uma metodologia baseada em microchip eletroforese com detecção eletroquímica (ME-EC) para a separação e determinação de ácido ascórbico, glutatona e cisteína visando aplicações em amostras biológicas.

A Tabela 11 abaixo elenca algumas estratégias para a determinação de tióis biológicos e ácido ascórbico. De uma forma geral, as estratégias utilizadas obtiveram sucesso uma vez que a determinação e separação dos analitos nas amostras foram obtidas de forma satisfatória. Apesar disso, todas as estratégias utilizadas apresentam uma desvantagem em comum: O alto tempo de análise leva a uma baixa frequência analítica, ou seja, o número de análises que uma determinada metodologia pode fazer num dado intervalo de tempo. Assim, estratégias que possam reduzir o tempo de análise e, por consequência, aumentar a frequência analítica são necessárias.

Assim, o presente trabalho busca o desenvolvimento de uma metodologia de análise para tióis biológicos e ácido ascórbico com base num microchip eletroforese com detecção eletroquímica que permita uma separação das espécies com um menor tempo de análise e possibilite assim uma maior frequência analítica.

Tabela 11 – Principais estratégias utilizadas para a determinação de tióis biológicos e ácido ascórbico em diferentes matrizes.

ARTIGO	TÉCNICA DE SEPARAÇÃO	DETECÇÃO	FAIXA LINEAR	TIPO DE AMOSTRA	TEMPO DE SEPARAÇÃO	REFERÊNCIA
A new HPLC method for the simultaneous determination of ascorbic acid and aminothiols in human plasma and erythrocytes using electrochemical detection	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	Eletroquímica	0,05 – 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (cys); 0,1 – 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (hcys); 0,1 – 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (GSH);	Plasma humano e eritrócitos	19 minutos	(KHAN, Abad <i>et al.</i> , 2011)
Simultaneous determination of aminothiols, ascorbic acid and uric acid in biological samples by capillary electrophoresis with electrochemical detection	Eletroforese capilar (CE)	Eletroquímica	0,5 – 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Sangue humano e tecido de cérebro de rato	10 minutos	(YAO; WANG, Yuting; CHEN, G., 2007)
A simple highly selective probe for discriminative visualization of endogenous cysteine, homocysteine and glutathione in living cells via three separated fluorescence channels	Não aplicável	Fluorescência	0 – 20 μM (cys e hcys) e 0 – 30 μM (GSH)	Células A375 e Tcam-2	Não aplicável	(CAO, C. <i>et al.</i> , 2020)
Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC	Cromatografia Líquida de alta eficiência (HPLC)	UV	10 – 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (cys); 0,7 – 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (hcys); 2 – 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (GSH)	Homogenato de cérebro de rato	10 minutos	(KAMIŃSKA <i>et al.</i> , 2018)
Methodology for a rapid and simultaneous determination of total cysteine, homocysteine, cysteinylglycine and glutathione in plasma by isocratic RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Fase Reversa	Fluorescência	15 – 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (cys); 2 – 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (hcys); 0,5 – 7,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (GSH)	Amostras de plasma sanguíneo humano	6 minutos	(FERIN; PAVÃO; BAPTISTA, 2012)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

3.2 Objetivos

3.2.1 Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia baseada em microchip eletroforese com detecção eletroquímica (ME-EC) para a separação e quantificação de glutatona (GSH), cisteína (cys) e ácido ascórbico (AA).

3.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar as reações de derivatização entre quinonas e tióis e aplicá-las em ME-EC;
- Avaliar o perfil e o tempo de migração dos analitos através de ME – EC;
- Avaliar o perfil e o tempo de migração dos analitos através de eletroforese capilar (CE);
- Avaliar e otimizar o potencial do eletrodo;
- Avaliar e otimizar a concentração do tampão presente no eletrólito de suporte (BGE);
- Avaliar e otimizar a concentração do surfactante SDS (dodecil sulfato de sódio) presente no eletrólito de suporte;
- Avaliar e otimizar a presença e concentração de ciclodextrinas;
- Construir curvas analíticas para os analitos e avaliar a viabilidade de aplicação para a metodologia proposta.

3.3 Experimental

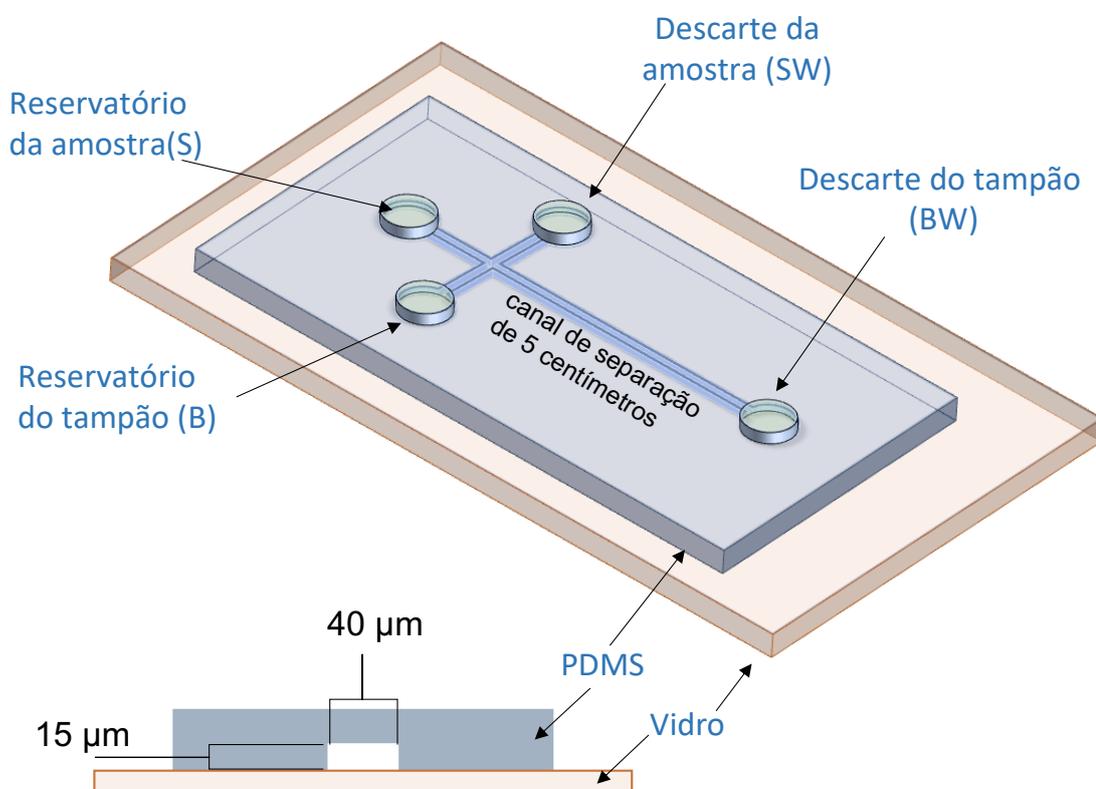
3.3.1 Reagentes, soluções e amostras

Os seguintes produtos químicos utilizados neste trabalho foram de grau analítico, sem necessidade de purificação adicional e adquiridos das fontes designadas: Glutathione, cisteína, ácido ascórbico, HEPES (4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazineetanesulfônico) e menadiona (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA); NaOH, HCl, 2-propanol (IPA) (Fisher Scientific, Fairlawn, NJ, EUA); Revelador SU-8 10 e SU-8 (Micro-Chem, Newton, MA, EUA); e poli(dimetilsiloxano) e agente de cura (base de elastômero de silício Sylgard 184 e agente de cura, Dow Corning Corp. Midland, MI, EUA). As soluções foram preparadas em água 18,2 (MΩcm) (Millipore, Kansas City, MO, EUA), salvo indicação em contrário. Soluções estoque padrão de glutathione, cisteína e ácido ascórbico (10 mmol L⁻¹) foram preparadas em água purificada e a solução de menadiona (10 mmol L⁻¹) foi preparada em etanol. As soluções de trabalho foram preparadas através da diluição de soluções estoque conforme necessário e filtradas usando um filtro de seringa de 0,22 μm.

3.3.2 Fabricação do microchip de PDMS

Um microchip PDMS simples para eletroforese contendo um canal com dimensões de 5 cm × 40 μm × 15 μm foi fabricado de acordo com metodologias previamente otimizadas pelo Susan Lunte Group (HULVEY; FRANKENFELD; LUNTE, 2010b). Resumidamente, o dispositivo foi desenhado utilizando o software AutoCad LT2004 (Autodesk, San Rafael, CA, EUA). e impresso em folha de transparência com resolução de 40.000 dpi. Um *wafer* de silício de 4" foi revestido com fotorresiste negativo SU-8 10 usando um spin-coater para obter uma espessura de filme de 15 μm. O wafer de Si revestido foi então cozido a 65°C por 2 minutos, seguido de cozimento a 95°C por 5 minutos em uma placa de aquecimento programável. Em seguida, as características da fotomáscara foram transferidas para o wafer de silício revestido por rotação usando uma fonte UV. O revelador SU-8 foi usado para revelar o fotorresiste no wafer de Si e foi então enxaguado com álcool isopropílico. O wafer foi transferido para uma placa de aquecimento por 2 horas a 200 °C e depois foi seco com nitrogênio. 10,9 g de polímero PDMS e 1,1 g de agente de cura (10:1) foram bem misturados, as bolhas de ar foram removidas e o PDMS foi moldado no molde de wafer de Si. Um resumo gráfico do dispositivo pode ser encontrado na Figura 39 abaixo:

Figura 39 – Resumo gráfico do dispositivo PDMS/vidro utilizado no trabalho.

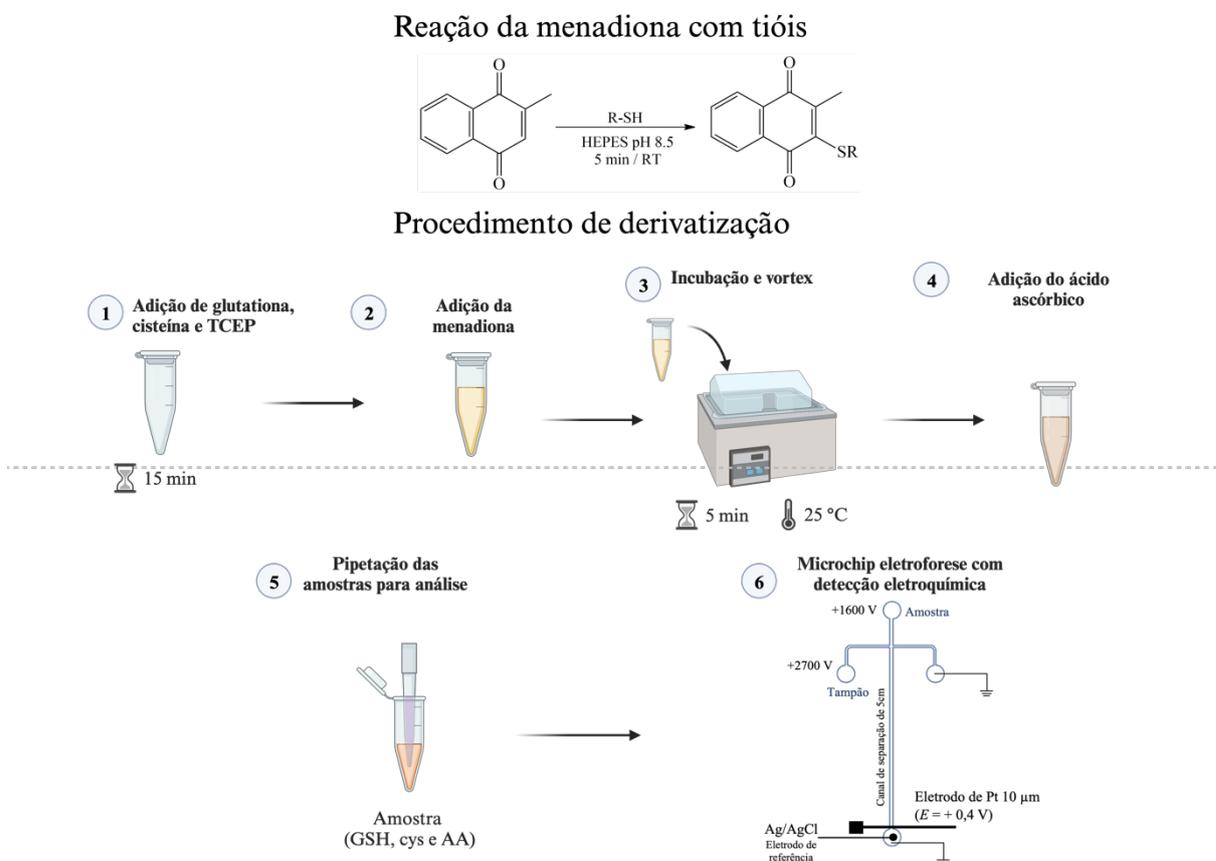


Fonte: Elaborado por Weerasekara (2021).

3.3.3 Reação de derivatização dos tióis

O procedimento para derivatização dos tióis (glutathiona e cisteína) foi baseado no trabalho de Elgawish e colaboradores (2015). De forma resumida, em um tubo Eppendorf 100µL de GSH e cys em concentrações na faixa de micromolar foram misturados com 100µL de cloridrato de tris(2-carboxietil) fosfina (TCEP, 100µM), um agente redutor para tióis. Na sequência, menadiona em excesso foi adicionada à mistura e a amostra foi agitada no vórtex por 5 minutos. Após o procedimento, ácido ascórbico foi adicionado ao tubo e a amostra foi analisada por ME-EC, conforme a Figura 40 abaixo.

Figura 40 – Reação da menadiona com tióis e procedimento de derivatização.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

3.3.4 Procedimento de eletroforese capilar (CE)

Um sistema de eletroforese capilar Agilent 7100 com um detector DAD a 214 e 254 nm foi empregado para experimentos de CE. Capilares de sílica fundida (75 µm de diâmetro interno, 63,5 cm de comprimento total e 55 cm da injeção até a janela de detecção) foram adquiridos da Polymicro Technologies (Phoenix, AZ). Antes da injeção e separação da amostra, o capilar foi condicionado por 5 minutos individualmente com NaOH 1M, água e tampão de corrida. A amostra foi injetada no capilar por 4 segundos por injeção de pressão, com voltagem de separação aplicada de 14100 V. O eletrólito de suporte consistia em tampão HEPES 30 mM a pH 8, 5, SDS 4 mM e β-ciclodextrina éter sulfobutílico 2 mM.

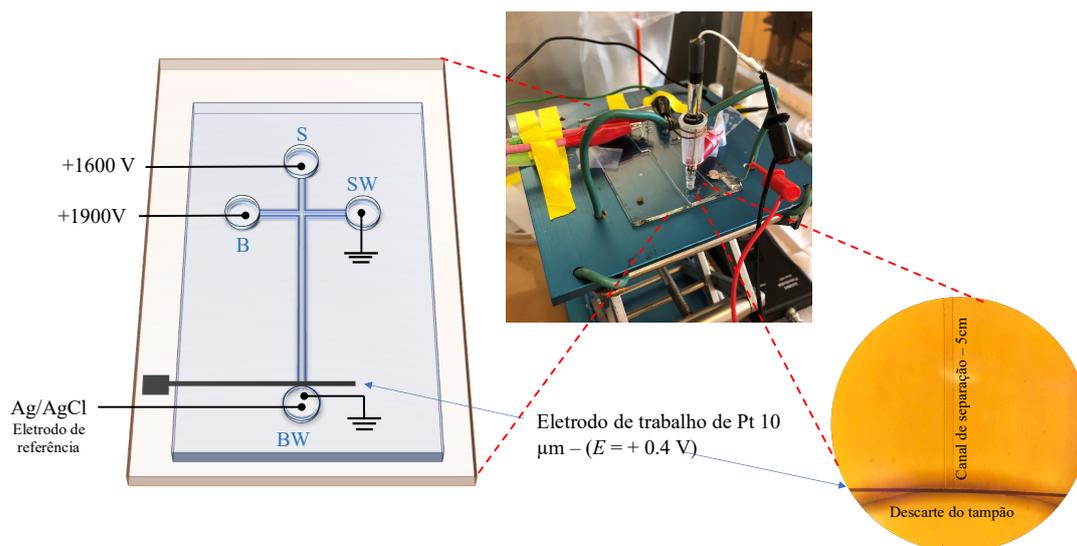
3.3.5 Microchip eletroforese com detecção eletroquímica (ME-EC)

A configuração pseudo-end-channel foi empregada para o alinhamento do eletrodo com o canal de separação (Figura 41). Os canais do microchip foram lavados com álcool isopropílico

e depois com eletrólito de fundo (BGE) durante 5 minutos cada antes da análise. Para a separação, foi utilizada uma fonte de alimentação de alta tensão UltraVolt (Ronkonkoma, NY, EUA), sendo controlada por um programa LabView (National Instruments, Austin, TX, EUA) escrito internamente. Sob condições otimizadas, a separação foi obtida utilizando um BGE consistindo em tampão HEPES 30 mM a pH 8, 5, SDS 4 mM e β -ciclodextrina éter sulfobutílico 2 mM. A introdução da amostra foi realizada utilizando um método de injeção eletrocínética descrito pelo Susan Lunte Group (HULVEY; FRANKENFELD; LUNTE, 2010b; MENESES *et al.*, 2015). Uma *gate* foi criada na junção do dispositivo t simples aplicando +1900 V no reservatório de amostra e +1600 V no reservatório tampão, mantendo os outros dois reservatórios (amostra e resíduos tampão) aterrados. A injeção da amostra no canal de separação foi obtida fluando a tensão no reservatório tampão por 1,0 s.

Um sistema de detecção de dois eletrodos foi utilizado para detecção amperométrica, utilizando um potenciostato isolado sem fio de dois canais (Pinnacle Technology, Inc., Lawrence, KS, EUA). A aquisição de dados foi realizada utilizando o software Sirenia (Pinnacle Technology). Ag / AgCl (BASi, West Lafayette, IN, EUA) foi utilizado como eletrodo de referência e toda a análise dos dados foi realizada com os softwares Origin 9.0 (OriginLab, Northampton, MA, EUA) ou Microsoft Excel.

Figura 41 – Sistema ME-EC utilizado no trabalho e posicionamento do eletrodo.



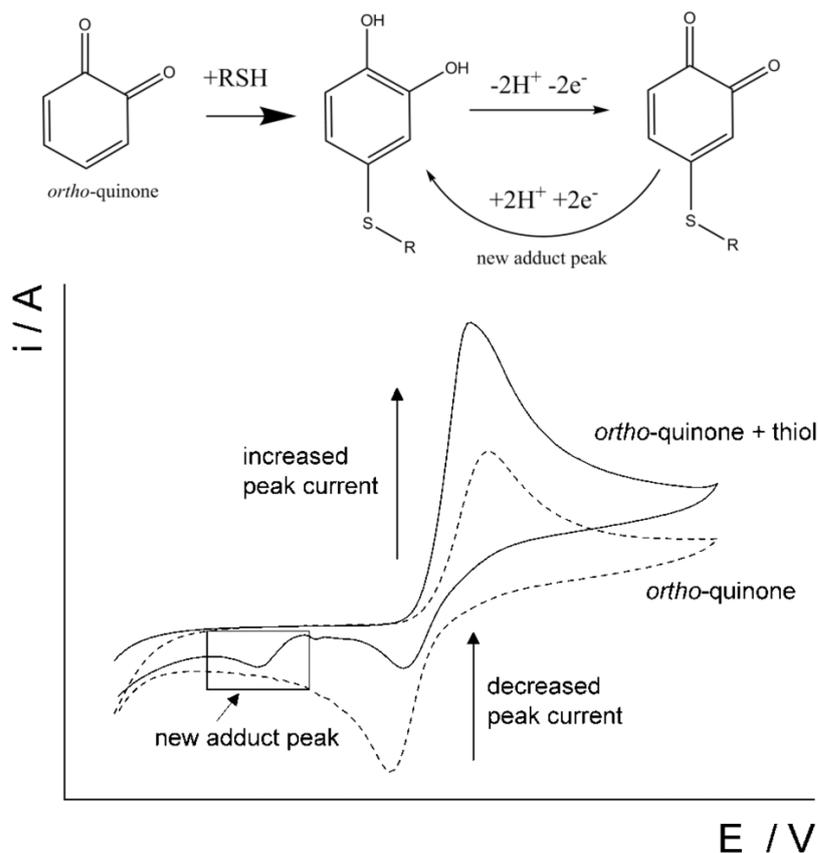
Fonte: Elaborado por Weerasekara (2021).

3.4 Resultado e discussão

3.4.1 Estudos preliminares

Estudos preliminares foram realizados com o intuito de serem estabelecidas condições experimentais iniciais para a detecção e separação dos analitos e assegurar a viabilidade da metodologia proposta. Assim, foram utilizadas as condições experimentais Lee e colaboradores (2014). No trabalho proposto, os autores reportaram o desenvolvimento de um eletrodo do tipo *screen-printed* para a detecção de homocisteína e glutatona na presença de cisteína usando catecol. Para tanto, os autores utilizaram a estratégia de uma reação de adição de Michael do catecol eletroquimicamente oxidado (formando uma orto-quinona) com os tióis (Figura 42).

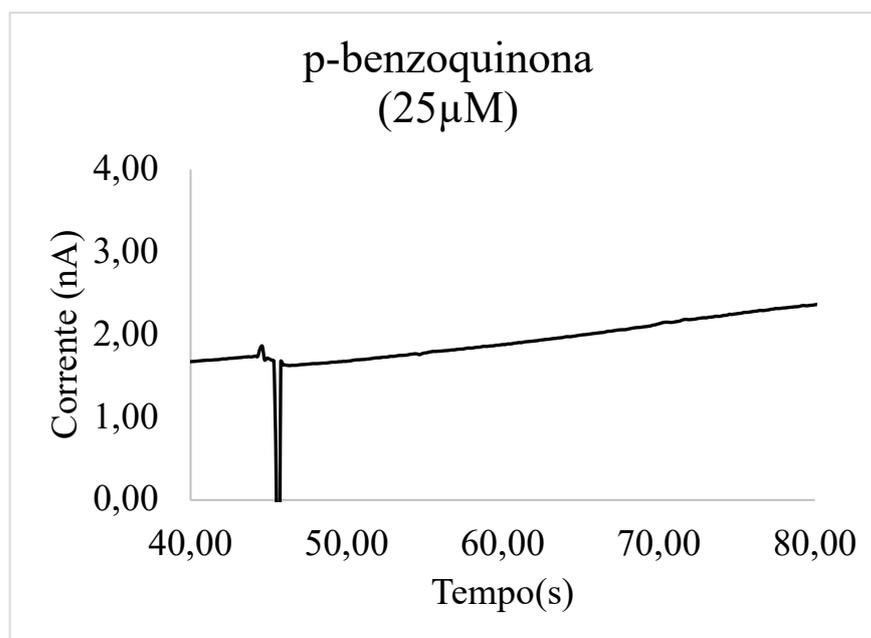
Figura 42 – Esquema da reação entre os tióis (RSH) e a orto-quinona presente no trabalho de Lee e colaboradores (2014).



Fonte: Lee e colaboradores, 2014.

Como resultado da reação, um novo composto é formado e novos picos mais próximos de 0V podem ser utilizados para a determinação indireta dos tióis. Essa estratégia, aplicada ao trabalho aqui desenvolvido, possibilitaria uma detecção com menores voltagens aplicadas, evitando assim o aparecimento de sinais interferentes nas análises. Assim, utilizou-se uma estratégia baseada no uso da *p*-benzoquinona (*p*-BQN), uma vez que sua estrutura permite uma reação similar à reação que ocorre com o catecol, mas possui a vantagem de ter uma etapa a menos, haja vista que a *p*-benzoquinona já está oxidada. Assim, um teste inicial (Figura 43) foi realizado apenas com essa molécula para observar a presença ou não de picos referentes a essa espécie.

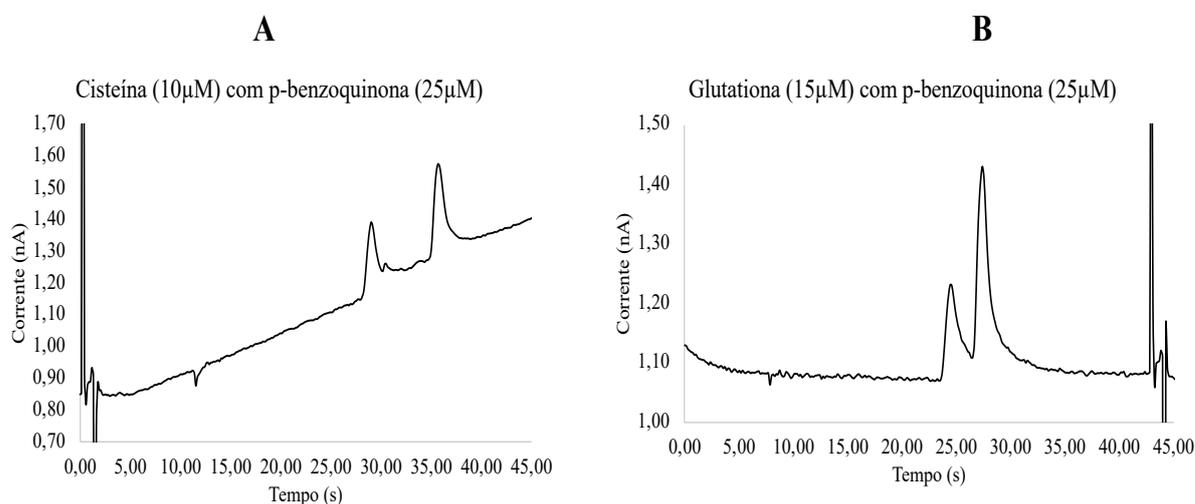
Figura 43 – Eletroferograma para *p*-benzoquinona. Condições experimentais: Microchip PDMS/Vidro. Canal de separação: 5cm. Eletrólito de suporte: Tampão fosfato (10mM, pH 2.5), SDS 8mM, EDTA 1mM E_{det} : +0.6V / E_{inj} : +1600V , E_{sep} : +1900V



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Com base nos dados apresentados na Figura 43, podemos observar que nenhum sinal referente à oxidação da *p*-benzoquinona foi observado. Esse comportamento está de acordo com o esperado, visto que a espécie não é passível de oxidação, diferentemente do catecol. Assim, a próxima etapa consistiu na análise de glutatona e cisteína na presença de *p*-BQN para avaliar a presença de picos característicos desses analitos. Os resultados referentes a cisteína e glutatona podem ser observados nas Figuras 44A e 44B abaixo:

Figura 44 – A) eletroferograma referente à mistura entre cisteína (10 μM) com p-BQN (25 μM) e B) eletroferograma referente à mistura entre glutatona (15 μM) com p-BQN (25 μM). Condições experimentais: Microchip PDMS/Vidro. Canal de separação: 5cm. Eletrólito de suporte: Tampão fosfato (10mM, pH 2.5), SDS 8mM, EDTA 1mM E_{det} : +0.6V / E_{inj} : +1600V , E_{sep} : +1900V



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A Figura 44A indica que a reação da p-BQN com a cisteína produziu dois picos, sendo um deles obtido em aproximadamente 30 segundos e o segundo pico em aproximadamente 40 segundos. De forma similar, a Figura 44B mostra que a reação de glutatona com p-BQN produziu igualmente dois picos em 25 e 30 segundos. De acordo com a metodologia proposta por Lee e colaboradores (2014), os resultados esperados seriam de apenas um pico para cada analito. Assim, investigações posteriores foram realizadas na presença tanto de glutatona quanto cisteína em concentrações diferentes para verificar o perfil do eletroferograma e identificar cada um dos analitos. Assim, experimentos foram realizados tendo como base as concentrações das espécies descritas na Tabela 12 abaixo:

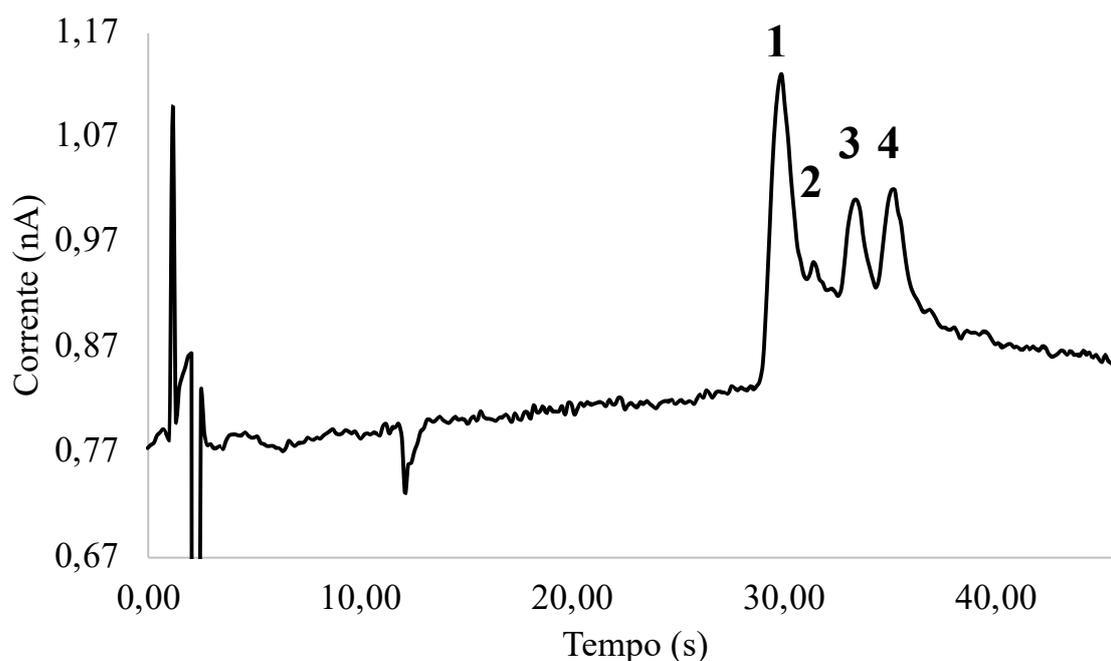
Tabela 12 – Concentrações utilizadas para o experimento preliminar de verificação da sequência dos analitos cisteína e glutatona na presença de p-BQN.

Experimento	Cisteína (μM)	Glutaciona (μM)	p-BQN (μM)
A	5	10	15
B	10	10	20
C	10	15	25
D	15	15	40

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Os experimentos basearam-se na hipótese da reação completa e na proporção 1:1 entre os analitos e a p-BQN, de forma tal a obter diferenças nas áreas dos picos referentes à cisteína e glutathiona e, deste modo identificar cada um dos analitos. Assim, o perfil de picos denotado na Figura 45 abaixo foi obtido em todos os experimentos, mostrando a presença de quatro picos em cada eletroferograma. Esses picos foram designados como picos 1, 2, 3 e 4.

Figura 45 – Perfil dos eletroferogramas obtidos durante os experimentos com mistura de cisteína, glutathiona e p-BQN. Condições experimentais: Microchip PDMS/Vidro. Canal de separação: 5cm. Eletrólito de suporte: Tampão fosfato (10mM, pH 2.5), SDS 8mM, EDTA 1mM E_{det} : +0.6V / E_{inj} : +1600V , E_{sep} : +1900V

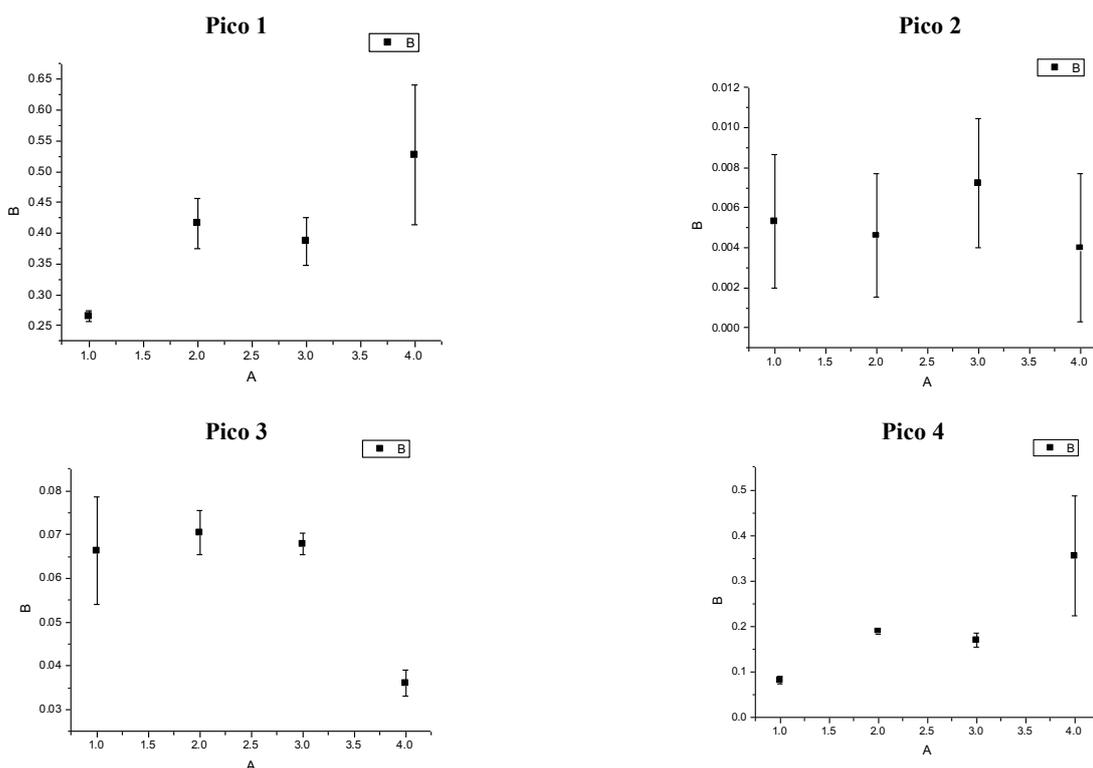


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Para designar cada um dos picos acima e estimar o tempo de migração das espécies, a área de cada pico foi calculada conforme a 46 abaixo. Podemos observar que a área do pico 1 apresentou um incremento substancial durante os quatro experimentos. Como a única substância que obteve um aumento da sua concentração durante os experimentos foi a p-BQN, podemos inferir que o pico 1 é referente a essa substância. Como a p-BQN não é oxidável, esse pico refere-se à hidroquinona, molécula análoga à p-BQN em que os grupos carboxila foram

reduzidos a fenóis. Analisando o pico 2 podemos perceber que a sua área, apesar do alto desvio padrão, se mantém praticamente constante. Deste modo, podemos inferir que este pico é sistemático e não se refere às substâncias analisadas. O terceiro pico manteve-se praticamente constante nos três primeiros experimentos, tendo um decréscimo substancial na sua área no último experimento. Esse perfil não reflete o comportamento esperado para a variação da concentração de nenhuma substância analisada e, portanto, a partir dos dados disponíveis para o pico 3 não é possível inferir se este é referente à glutathiona ou cisteína. Por outro lado, o pico 4 apresenta perfil condizente com a variação da concentração da cisteína, uma vez que os experimentos B e C apresentam resultados similares e o experimento D exibe aumento substancial na área. Assim, podemos inferir que o pico 4 é referente à cisteína e, como consequência, o pico 3 é referente à glutathiona.

Figura 46 – Gráficos referentes às análises de área de pico para determinação de cada analito presente na mistura entre p-BQN, glutathiona e cisteína.

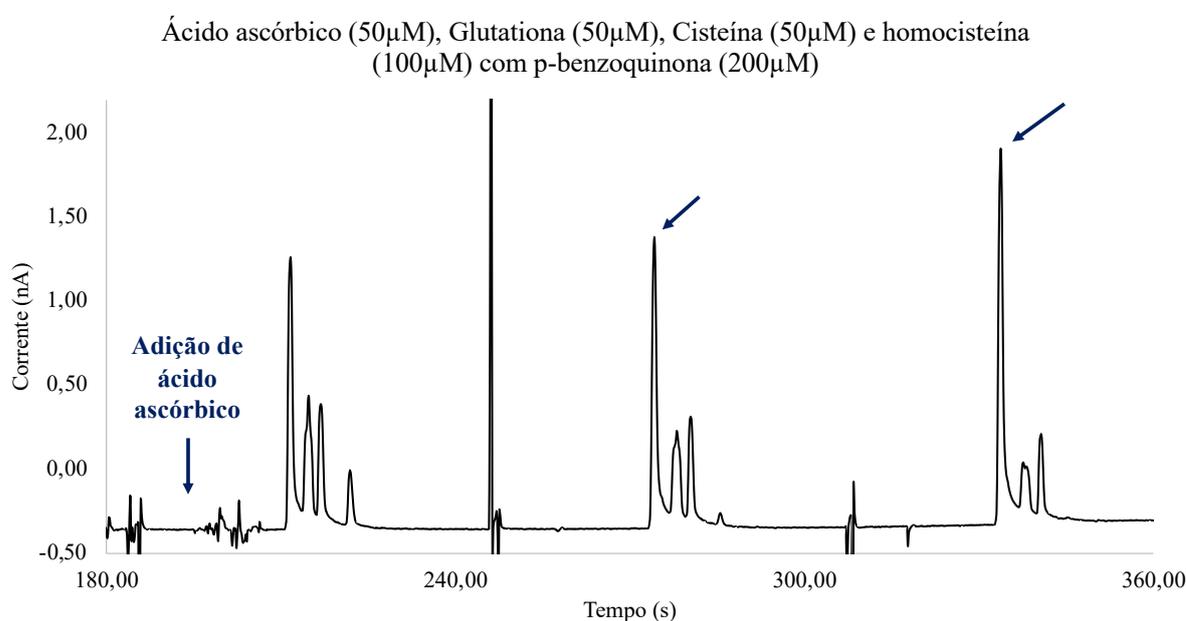


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Apesar da identificação dos analitos através do experimento anterior, algumas problemáticas referentes a metodologia utilizada inviabilizaram o desenvolvimento do projeto. Uma delas refere-se à adição de homocisteína e ácido ascórbico para a separação na mistura. Conforme podemos observar na Figura 47 abaixo, a adição de uma certa quantidade de solução

de ácido ascórbico no reservatório da amostra durante a corrida ocasionou o aumento do primeiro pico que é referente, de acordo com os dados obtidos na análise anterior, à p-BQN. Além disso, percebemos uma tendência geral de comigração entre os picos 2 e 3, além do fato de que o pico 5 apresenta uma diminuição substancial durante análises em sequência, afetando diretamente a reprodutibilidade dos eletroferogramas, um fator negativo no desenvolvimento da metodologia proposta.

Figura 47 – Experimento de adição de ácido ascórbico durante eletroferograma para identificação dos picos. Condições experimentais: Microchip PDMS/Vidro. Canal de separação: 5cm. Eletrólito de suporte: Tampão fosfato (10mM, pH 2.5), SDS 8mM, EDTA 1mM e 1mM β ciclodextrina sulfatada. E_{det} : +1.0V / E_{inj} : +1600V, E_{sep} : +1900V.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Diante do exposto, a necessidade de uma metodologia mais robusta e confiável mostrou-se primordial, uma vez que a metodologia baseada na p-BQN não se mostrou eficiente. Assim, os experimentos subsequentes utilizaram uma metodologia baseada no mesmo princípio, porém com resultados com uma melhor reprodutibilidade.

3.4.2 Metodologia baseada na reação da menadiona com tióis

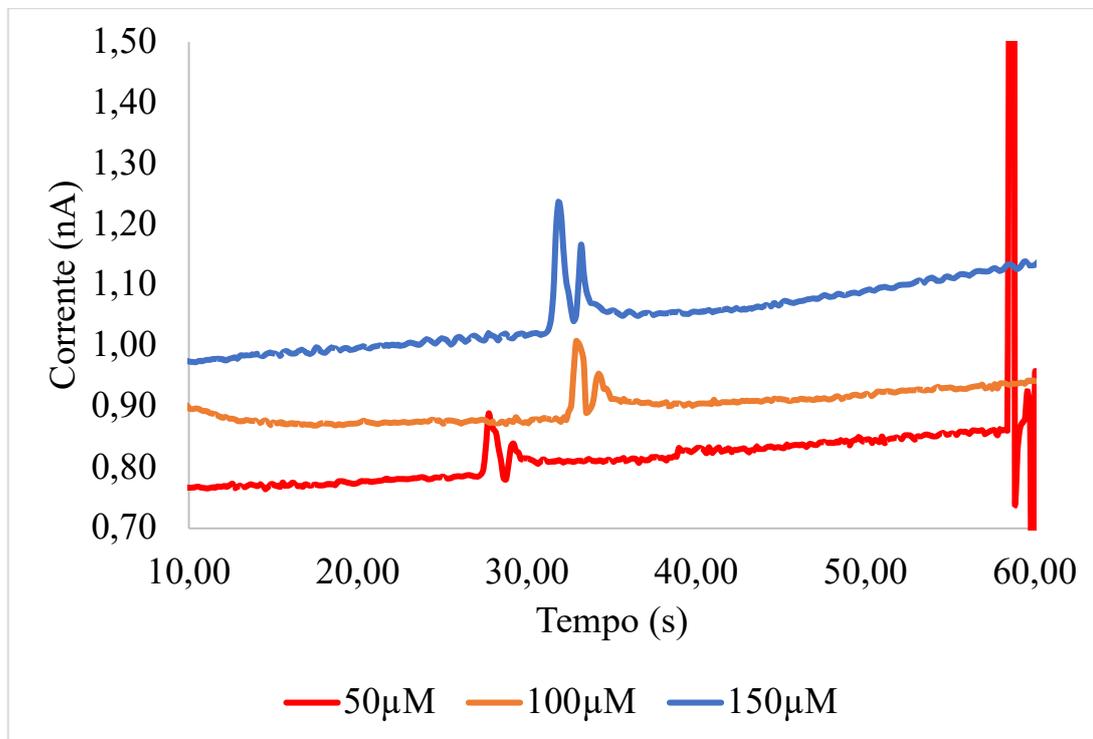
A menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) é uma quinona também conhecida como vitamina K. Do ponto de vista biológico, a menadiona apresenta diversas funções como por exemplo manutenção da estrutura óssea e armazenamento de carboidratos (HASSAN, 2013).

Uma das principais vantagens da menadiona em comparação com a p-BQN é o fato de possuir apenas uma posição disponível para a reação com os tióis. Assim, testes foram realizados utilizando esse reagente com base no trabalho de Elgawish e colaboradores (2015).

3.4.2.1 Avaliação da reação entre menadiona e glutatona

Diferentes concentrações de glutatona foram avaliadas para avaliar a viabilidade da metodologia proposta. Tomando como referência a altura dos picos, podemos dizer que a concentração de glutatona é proporcional à altura do primeiro pico de cada eletroferograma (Figura 48). Assim como nos resultados obtidos para a p-BQN, observamos a presença de um pico adicional que foi posteriormente investigado.

Figura 48 – Avaliação da reação de ranitidina com p-BQN utilizando a metodologia proposta por Elgawish e colaboradores. Condições experimentais: Microchip PDMS/Vidro. Canal de separação: 5cm. Eletrólito de suporte: Tampão HEPES (30mM, pH 8.5), SDS 8mM, EDTA 1mM e 1mM β ciclodextrina sulfatada. E_{det} : +0.6V / E_{inj} : +1600V , E_{sep} : +1900V.



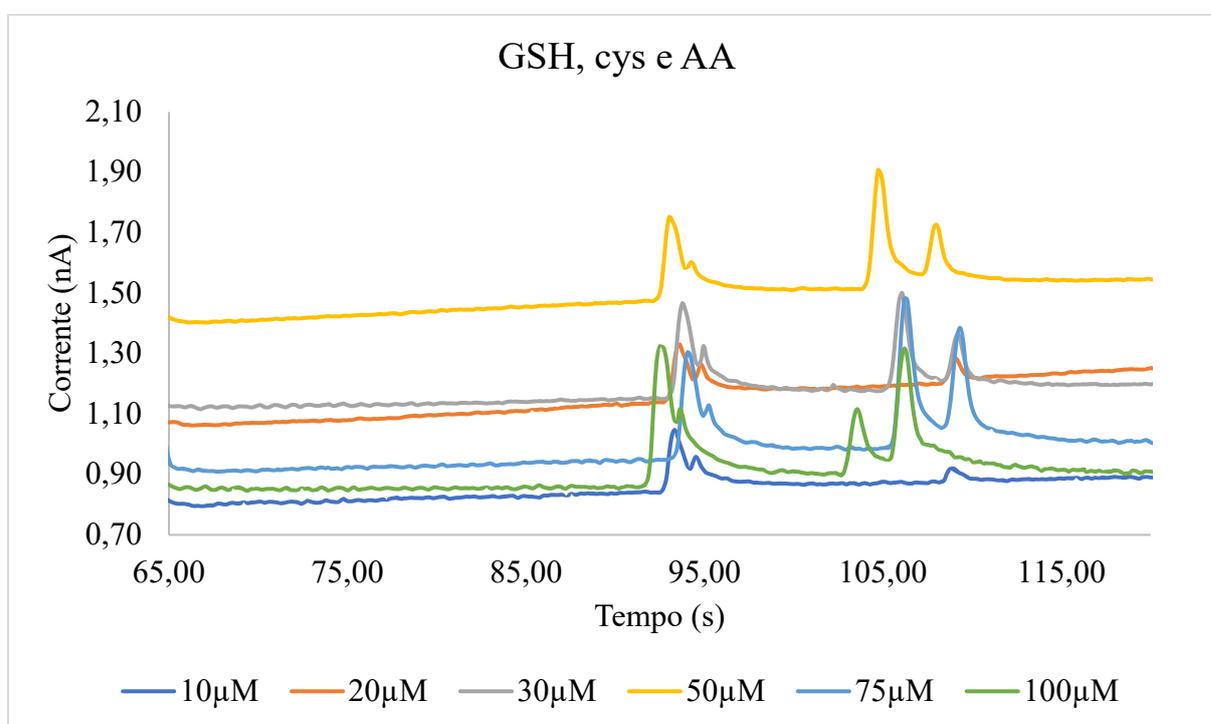
Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

3.4.2.2 Avaliação do sistema de separação com glutatona, cisteína e ácido ascórbico

Com o indicativo de que a altura do pico é proporcional à concentração de glutatona, investigações subsequentes exploraram o comportamento de outros analitos com base na nova metodologia. Desta forma, cisteína foi incluída ao meio reacional e verificou-se que sua migração ocorre após a glutatona. De forma análoga, ácido ascórbico foi adicionado e sua migração ocorre após a cisteína. A partir deste entendimento, experimentos posteriores foram realizados.

Assim, cisteína e ácido ascórbico foram avaliados juntamente com a glutatona, de forma similar aos experimentos realizados com base na Tabela 12. Assim, utilizando as condições experimentais presentes no item anterior, eletroferogramas com diferentes concentrações de glutatona, cisteína e ácido ascórbico, na faixa de 10 – 100 μM foram realizados, conforme a Figura 49 abaixo:

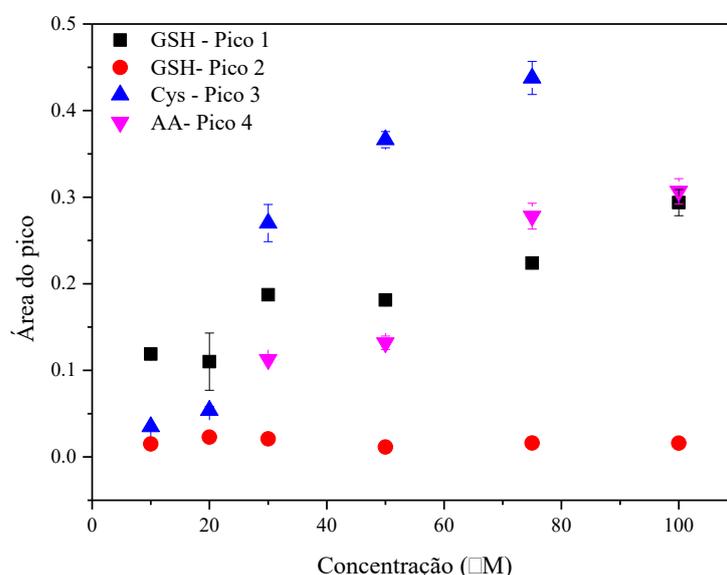
Figura 49 – Eletroferogramas para GSH, cys e AA (10 – 100 μM) com base na reação de derivatização com menadiona. Condições experimentais: Microchip PDMS/Vidro. Canal de separação: 5cm. Eletrólito de suporte: Tampão HEPES (30mM, pH 8.5), SDS 8mM, EDTA 1mM e 1mM β ciclodextrina sulfatada. E_{det} : +0.6V / E_{inj} : +1600V E_{sep} : +1900V.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Com base no perfil observado para os eletroferogramas da Figura 48, uma análise acerca da correlação da concentração dos analitos e a área dos picos foi realizada. Assim, podemos observar na Figura 50 que a área dos picos 1, 3 e 4 (glutathiona, cisteína e ácido ascórbico, respectivamente) é proporcional à concentração dos analitos. O pico 2 apresentou área praticamente constante, independentemente da concentração dos analitos. Portanto, podemos inferir que se trata de um pico sistemático associado à glutathiona.

Figura 50 – Estudo das áreas dos picos para GSH, cys e AA com o aumento da concentração.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Essa análise possibilitou o entendimento de que há uma viabilidade da metodologia proposta, uma vez que os três analitos puderam ser quantificados de maneira satisfatória. Para um melhor entendimento da reação de derivatização com a menadiona e as migrações das espécies, experimentos utilizando eletroforese capilar foram realizados.

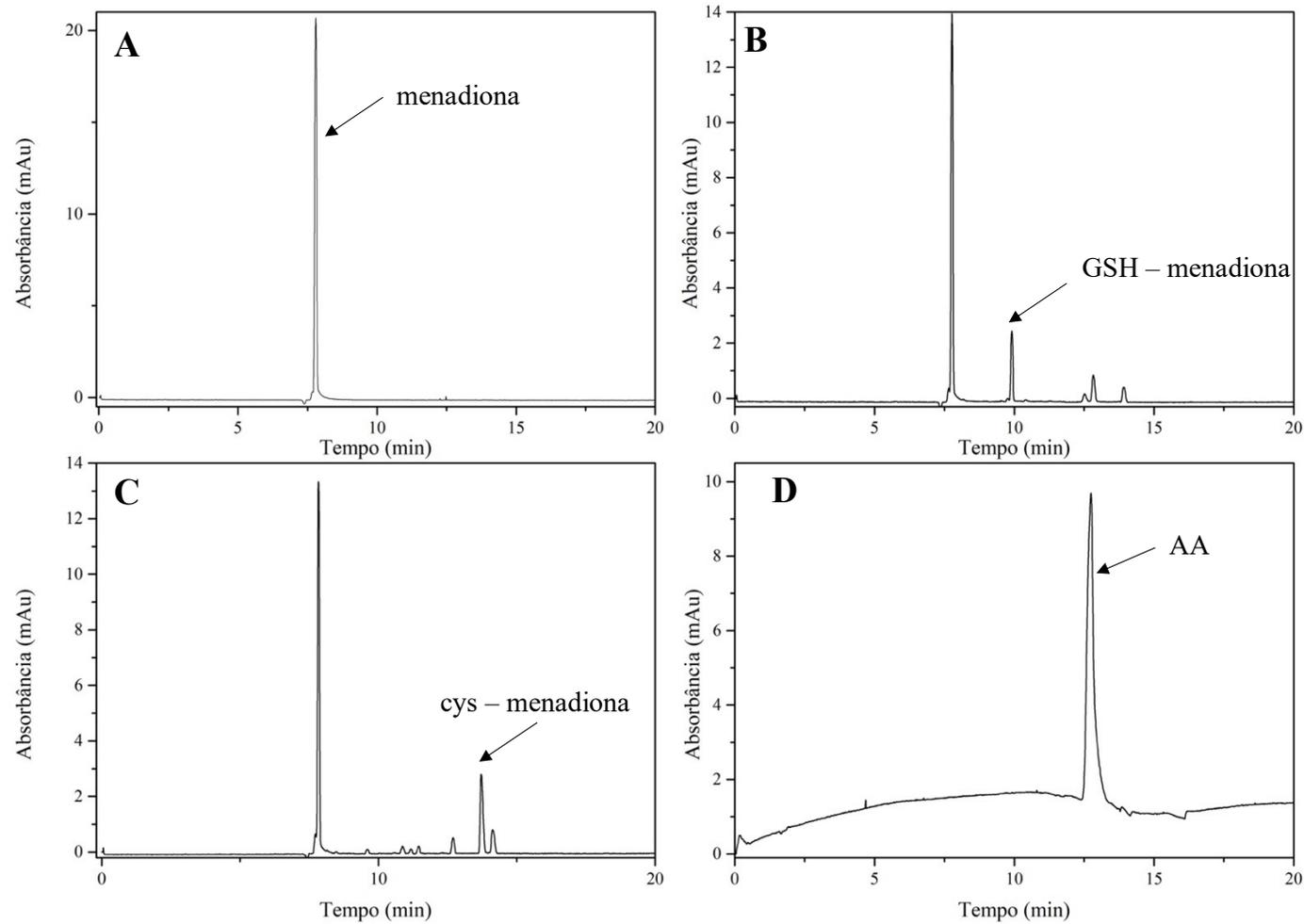
3.4.3 Avaliação do procedimento utilizando eletroforese capilar

Sendo a eletroforese capilar uma metodologia de referência para o desenvolvimento de trabalhos utilizando microchip eletroforese, uma avaliação utilizando eletroforese capilar foi realizada para entender a separação das espécies. Assim, a reação da menadiona com glutathiona e cisteína foi realizada conforme procedimento previamente apresentado.

Inicialmente, a menadiona foi investigada separadamente dos outros analitos. Utilizando uma concentração de 400 μM , podemos observar na Figura 51A que o agente derivatizante possui tempo de migração de 7,795 minutos e área de 111 mAU·s. Quando comparamos com a reação entre menadiona e glutatona (GSH-MD, Figura 51B), observamos novamente o pico presente em cerca de 7,70 minutos e um pico adicional, referente a GSH-MD, em 9,91 minutos. Uma vez que a concentração de menadiona utilizada nos dois experimentos foi a mesma, podemos dizer que parte da menadiona foi convertida no produto GSH-MD, uma vez que a área do pico correspondente à menadiona no segundo experimento foi de 68,63 mAU·s. Além disso, como o produto GSH-MD apresenta razão carga/massa maior do que a MD, o seu tempo de migração é maior, o que justifica o produto formado migrar cerca de 2 minutos após a MD.

A Figura 51C apresenta os resultados obtidos para a reação entre menadiona e cisteína, obtendo o produto cys-MD. Pode-se observar novamente o pico característico da menadiona em 7,83 minutos e o pico referente ao produto cys-MD com tempo de migração de 13,716 minutos. O raciocínio utilizado para a formação de GSH-MD pode ser utilizado para explicar o tempo de migração de cys-MD. O pico referente à menadiona apresenta área de 67,55 mAU·s, o que indica que parte da menadiona reagiu com a cisteína dando origem a cys-MD, que apresenta área de 19,93 mAU·s. O ácido ascórbico (Figura 51D) foi analisado de forma individual em concentração igual aos analitos (100 μM). Na ausência da menadiona, um pico com migração em 12,744 minutos foi observado, tendo uma área de 141,23 mAU·s.

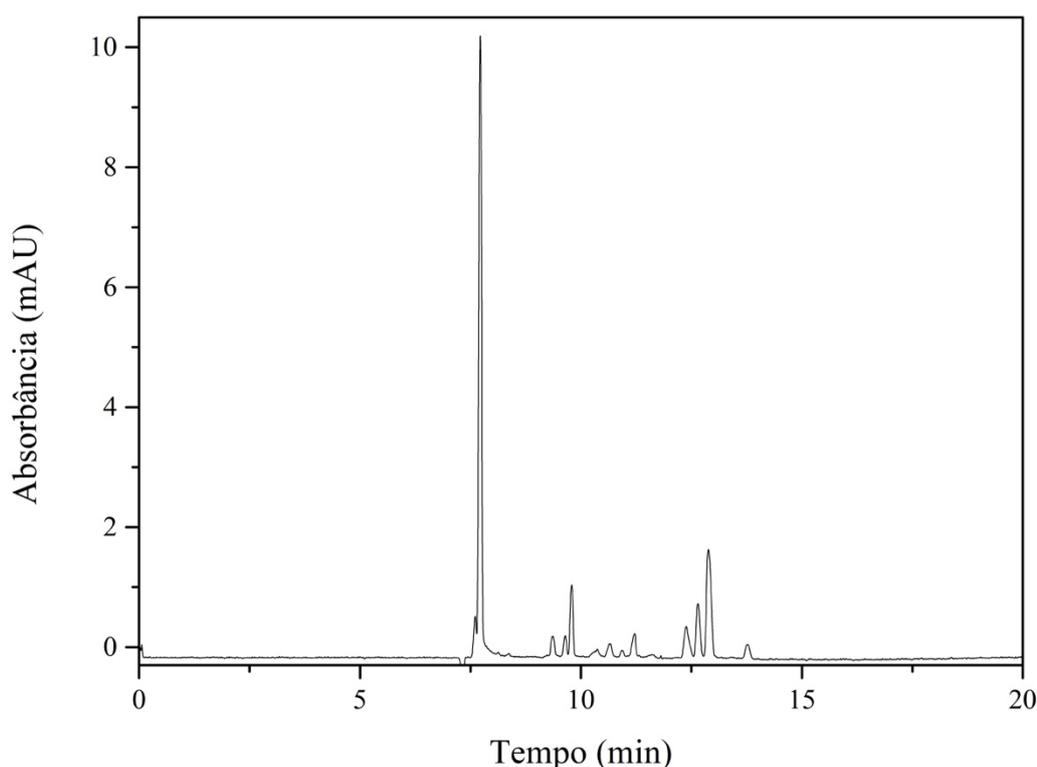
Figura 51 – Eletroferogramas obtidos a partir dos experimentos de eletroforese capilar. A) Menadiona (400 μ M); B) Menadiona e glutatona (400 μ M e 100 μ M, respectivamente); C) Menadiona e cisteína(400 μ M e 100 μ M, respectivamente) e D) Ácido ascórbico (100 μ M).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

Assim, uma solução equimolar contendo todos os três analitos foi analisando, utilizando procedimento idêntico ao utilizado no microchip eletroforese. Com base nos resultados presentes na Figura 52, podemos observar que a separação das espécies foi obtida de forma satisfatória utilizando eletroforese capilar. Entretanto, diferenças foram observadas entre os resultados obtidos na seção 3.4.2.2. A ordem de migração apresentou uma diferença entre os picos de cisteína e ácido ascórbico na metodologia utilizando eletroforese capilar, fato este que necessitaria uma investigação mais profunda para elucidar as diferenças observadas.

Figura 52 – Resultados obtidos para o eletroferograma com mix de glutathiona, cisteína e ácido ascórbico (100 μ M cada) com menadiona (400 μ M).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023

3.4.4 Estudo da performance do sistema microfluídico

A otimização do sistema microfluídico foi realizada levando em consideração parâmetros experimentais, físicos e químicos para a separação e detecção dos analitos. Assim, composição do BGE (tipo de tampão, concentração de SDS e ciclodextrina), potencial de detecção no eletrodo de trabalho e voltagens de injeção e separação foram investigados.

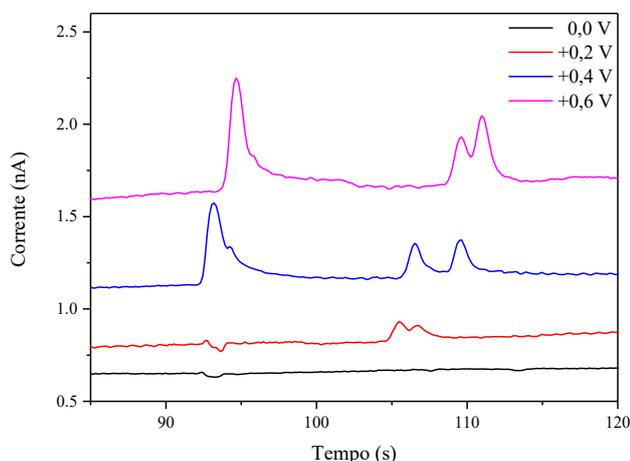
3.4.4.1 Otimização do potencial de eletrodo

A otimização do potencial de eletrodo configura-se como uma etapa fundamental para o desenvolvimento de uma metodologia baseada em microchip eletroforese com detecção eletroquímica. Durante uma detecção amperométrica, quanto maior o potencial aplicado, maior o número de espécies que podem sofrer reações de oxidação ou redução na superfície do eletrodo. Deste modo, potenciais de oxidação e/ou redução próximos de 0,0V são desejáveis, uma vez que indicam um menor número de espécies interferentes para as metodologias a serem desenvolvidas.

Assim, quatro diferentes potenciais de oxidação (0,0 V; +0,2 V; +0,4 V e +0,6 V) foram avaliados. Com base nos dados presentes na Figura 53, pode-se observar que nenhum pico reportado em 0,0 V. Sendo assim, a utilização do microchip eletroforese com detecção eletroquímica nesse potencial não é viável. Um fenômeno semelhante acontece em +0,2 V. Nesse potencial não é possível observar a oxidação de GSH-MD, o que inviabiliza o uso do dispositivo proposto.

Nos potenciais de +0,4 V e +0,6 V é possível observar a presença dos três picos referentes a GSH-MD, cys-MD e AA. Uma melhor separação entre cys-MD e AA é observada com o potencial de +0,4 V quando comparada com o potencial de +0,6 V. Além disso, a separação das espécies é obtida num menor tempo nesse potencial. Assim, como esse potencial apresenta as características reportadas e permite uma detecção em um potencial relativamente baixo, o potencial de +0,4 V foi selecionado e utilizado durante as otimizações posteriores.

Figura 53 – Estudo do potencial aplicado no eletrodo de trabalho



3.4.4.2 Avaliação da concentração do tampão

A concentração do tampão é um dos parâmetros mais importantes no desenvolvimento de metodologias analíticas, sobretudo aquelas em que a concentração do tampão reflete diretamente a força iônica do meio. Numa separação eletroforética, a força iônica reflete diretamente na mobilidade efetiva (μ_{ef}) de uma espécie, isto é, a resultante da composição entre a mobilidade eletroforética e eletroosmótica (TERABE, 1992)

Quanto maior a força iônica, menor será a μ_{ef} , como reportado por Ibrahim e colaboradores (2012). Assim, estudos foram realizados para averiguar a influência do sistema tampão. Concentrações na faixa de 10 – 40 mM do tampão HEPES foram investigadas, mantendo fixa as outras condições experimentais. A mobilidade efetiva é importante pois define a velocidade eletroforética (V_{eof}) de uma dada espécie (AHMADZADEH *et al.*, 2008). Se o campo elétrico, E , e o potencial zeta, ζ , da parede do capilar são homogêneos por todo o comprimento do canal, podemos definir a velocidade eletroforética como o produto da mobilidade eletroforética pela força do campo elétrico, conforme a equação 7:

$$V_{eof} = \mu_{eof} E \quad \text{Equação 7}$$

A força do campo elétrico pode ser definida como o produto da densidade de corrente e da resistividade. Considerando dois campos locais E_1 e E_2 em duas regiões com diferentes concentrações (tampão 1 e tampão 2, por exemplo), teríamos a Equação 8 para a força do campo elétrico:

$$E_{1,2} = \frac{E_0 \rho_{1,2}}{\rho_1 \chi + \rho_2 (1 - \chi)} \quad \text{Equação 8}$$

Em que ρ é a resistividade do tampão, χ é o comprimento do capilar preenchido. Quando apenas um tampão é utilizado, o sistema é uniforme e a força do campo é dada pela Equação 9 abaixo:

$$E_0 = \frac{V}{L} \quad \text{Equação 9}$$

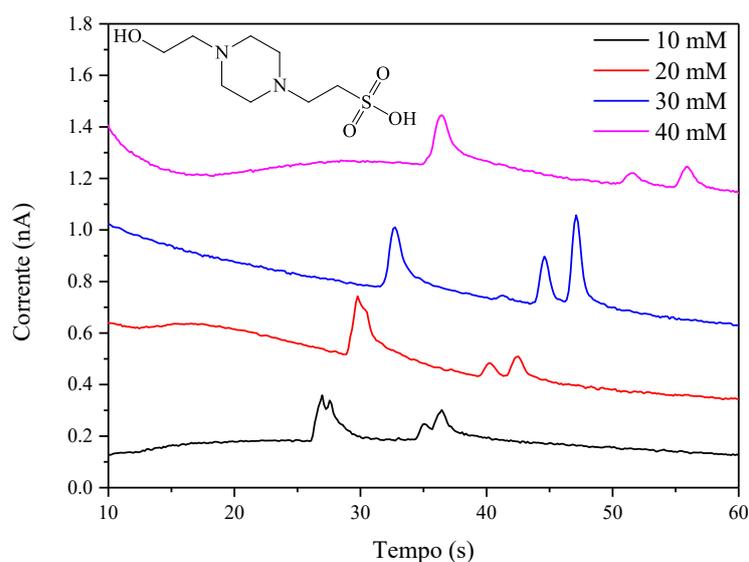
Em que V é a diferença de potencial e L é o comprimento do capilar. De acordo com a equação, o campo elétrico. A equação 2 nos diz que a força do campo elétrico numa região de baixa resistência é maior do que E_0 e que a força do campo elétrico numa região de alta resistência é maior do que E_0 . Enquanto os valores absolutos para E_1 e E_2 dependem de χ , a proporção entre os dois campos é uma razão que depende apenas da resistividade. A resistividade pode ser definida como uma medida da dificuldade que uma corrente elétrica tem para atravessar um determinado material quando ele estiver conectado com uma fonte de tensão

elétrica. A relação entre os campos elétricos e as resistividades podem ser observadas na Equação 10:

$$\frac{E_1}{E_2} = \frac{\rho_1}{\rho_2} \quad \text{Equação 10}$$

As resistividades ρ_1 e ρ_2 são inversamente proporcionais às concentrações C_1 e C_2 de um dado sistema tampão. Assim, os íons dentro da região de menor concentração encontram-se sujeitos a um maior campo elétrico e se movem mais rapidamente do que os íons dentro de uma região de alta concentração (AHMADZADEH *et al.*, 2008; HAYES; KHETERPAL; EWING, 1999; HENRY, 2006). Sendo assim, os resultados obtidos para a avaliação da concentração do tampão estão presentes na Figura 54 abaixo, em que o aumento da concentração levou à diminuição da velocidade eletroforética dos analitos.

Figura 54 – Eletroferogramas da separação de glutatona, cisteína e ácido ascórbico. Condições experimentais: PDMS/Glass microchip – 5cm separation channel BGE: HEPES (pH 8.5), SDS 4mM, SBE- β -CD 2mM ; Edet: +0.4V / Einj: +1600V , Esep: +1900V



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Com base no gráfico podemos observar que a concentração de 10mM possui o menor tempo de corrida, com os analitos sendo detectados em menos de 40 segundos. Entretanto, essa concentração do tampão possui alta resistividade e a resolução dos picos de cisteína e ácido ascórbico não é satisfatória. O aumento da concentração diminui a resistividade e a separação dos picos passa a ter uma melhor resolução nas outras condições avaliadas. Com base nos parâmetros de resolução e forma dos picos e tempo de corrida, a concentração de

30mM foi escolhida como a ideal, uma vez que apresenta a melhor resposta para os parâmetros avaliados.

4.4.4.3 Avaliação da concentração do surfactante

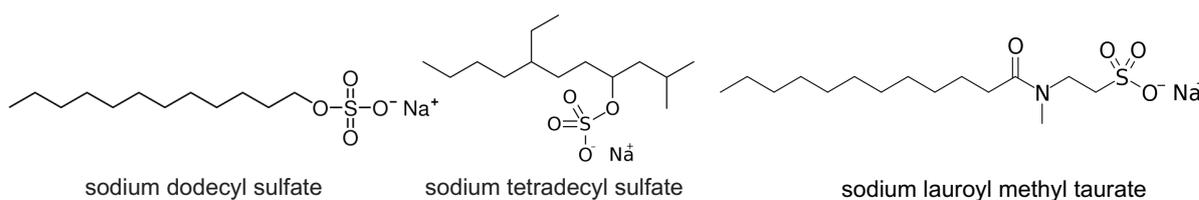
Um surfactante é um agente de superfície ativa em que uma região é atraída pela água (sendo, portanto, uma região hidrofílica) e a outra região é repelida pela água (região hidrofóbica). Os surfactantes apresentam diversas aplicações e, nas separações eletroforética, as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas afetam a seletividade das separações. Uma vez que o PDMS apresenta baixo potencial zeta, que pode ser definido como uma medida da carga elétrica ao redor de partículas coloidais, se faz necessário a adição de surfactantes para aprimorar o fluxo eletroosmótico e possibilitar separações (BECKERS; BOČEK, 2002; GUAN; NOBLITT; HENRY, 2012; TERABE, 1992).

Existem quatro classes de surfactantes: aniônicos, catiônicos, não iônicos e zwitteriônicos. Apesar de existirem diversos surfactantes comercialmente disponíveis, os surfactantes utilizados em separações eletroforéticas devem obedecer a uma série de características, como serem solúveis no tampão a fim de gerar micelas e a solução micelar formada deve ser homogênea, transparente e possuir baixa viscosidade (HANCU *et al.*, 2013).

As micelas formadas possuem a capacidade de interagir com os analitos a nível molecular, tendo como base interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Como resultado desse processo de interação, até mesmo analitos neutros podem se ligar às micelas. De uma forma geral, as micelas apresentam superfície carregada e o analito apresenta carga oposta, levando a uma atração eletrostática entre eles.

Considerando que a maior parte dos analitos interagem com os surfactantes na sua porção hidrofílica, essa região tem maior importância na seletividade. Assim, não há diferença considerável em se utilizar o SDS (dodecil sulfato de sódio) ou o STS (tetradecil sulfato de sódio), presentes na Figura 55 abaixo. Por outro lado, um surfactante como o LMT (*sodium lauroyl methyl taurate*) apresenta uma diferença considerável na estrutura da região hidrofílica, gerando uma seletividade diferente quando comparado ao SDS (TERABE, 1992).

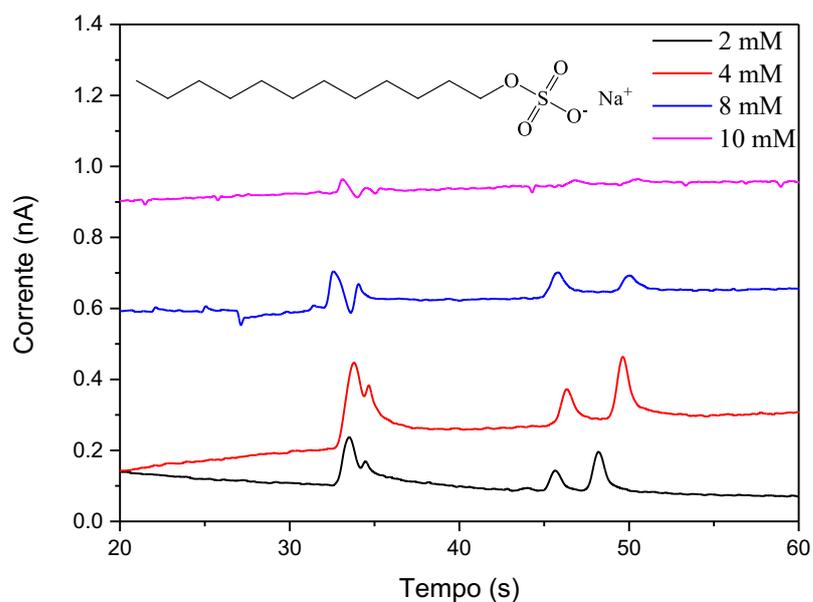
Figura 55 – Estruturas do SDS e STS e LMT. A diferença estrutural da cadeia carbônica hidrofóbica exerce pouca diferença na seletividade de analitos polares. Por outro lado, as diferenças estruturais na região hidrofílica apresentam grande efeito na seletividade.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A influência da concentração do surfactante SDS foi investigada para melhorar a resolução de separação dos analitos. Assim, diferentes concentrações de SDS (2mM, 4mM, 8mM e 10mM) foram avaliadas e os resultados estão presentes na Figura 56 abaixo:

Figura 56 – Efeito da concentração de SDS na separação das espécies.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Com as micelas de SDS, a ordem de eluição é obtida com ânions, neutros e cátions. Os ânions estarão presentes na solução devido às repulsões eletrostáticas com a micela negativa. Na sequência, moléculas neutras são separadas devido à hidrofobicidade que apresentam e, por fim, os cátions apresentam migração devido à forte atração eletrostática com a micela (WÄTZIG; LLOYD, 1995).

O aumento da concentração de SDS tem alguns efeitos como por exemplo o aumento da condutividade do eletrólito de suporte, fato este que pode ser observado experimentalmente pelo aumento das correntes apresentadas na fonte de alta tensão. O aumento da temperatura do

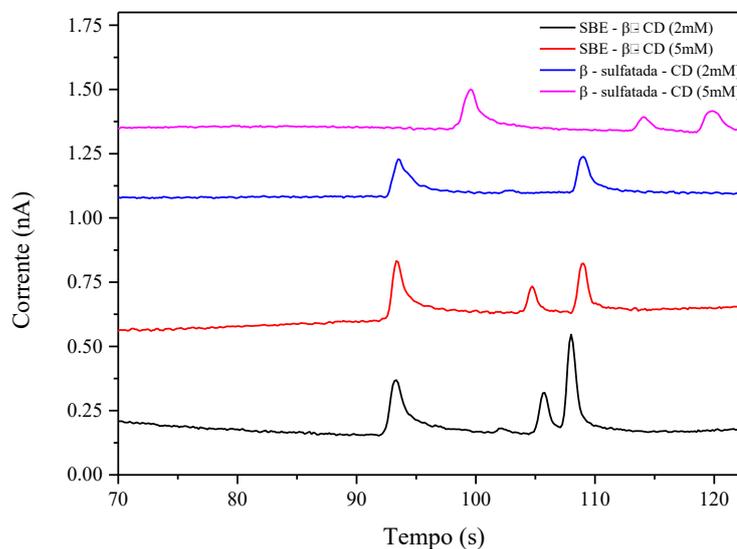
canal é conhecido como efeito Joule e gradientes térmicos são gerados dentro do capilar devido à ineficiência na dissipação do calor. Assim, o calor dissipado não é igual ao calor produzido e a temperatura dentro do capilar ou canal pode aumentar levando à evaporação do tampão, ocasionando bolhas que atrapalham a passagem de corrente dentro do capilar (JÚNIOR, 2019; SONG, S. H.; KWAK; JUNG, 2009; WÄTZIG; LLOYD, 1995; WEINBERGER, 2000). Além disso, o aumento da força iônica devido a adição de SDS tende a reduzir o fluxo eletroosmótico, conforme podemos observar na Figura 56. É possível observar que em concentrações baixas de SDS o tempo de migração das espécies é menor, ou seja, o fluxo eletroosmótico é maior. Quando há um aumento substancial na concentração de SDS, como nas concentrações de 8mM e 10mM, pode-se observar que o tempo de migração aumenta. Para a concentração de 10mM, não é possível observar picos bem definidos. Assim, levando em consideração o perfil dos picos, o tempo de migração e o efeito Joule, a concentração de 4mM foi definida como ótima nessa etapa e foi utilizada nas otimizações posteriores.

4.4.4.4 *Avaliação da concentração e do efeito de ciclodextrinas*

Ciclodextrinas são oligossacarídeos com formato molecular cilíndrico. A sua superfície exterior é hidrofílica, enquanto as cavidades internas são hidrofóbicas (TERABE, 1992). Existem três tipos comuns de ciclodextrinas (α , β e γ), as quais diferem entre si com base no tamanho da cavidade. As propriedades das ciclodextrinas como por exemplo o tamanho nanométrico e as cavidades quirais/apolares fazem com que essas macromoléculas possuam grandes aplicações dentro da química analítica, especialmente dentro do campo das separações (SZENTE; SZEMÁN, 2013).

Nas décadas de 1980 e 1990, várias aplicações das ciclodextrinas para o desenvolvimento de métodos analíticos baseadas em separações foram desenvolvidas. Mais recentemente, alguns trabalhos mostraram o potencial das ciclodextrinas como seletores de quiralidade (HANCU *et al.*, 2015). Assim, foram avaliadas duas diferentes β -ciclodextrinas (SBE- β -CD e β -CD – sulfatada) em dois níveis diferentes de concentração (2 e 5mM). Os resultados obtidos estão presentes na Figura 57 abaixo:

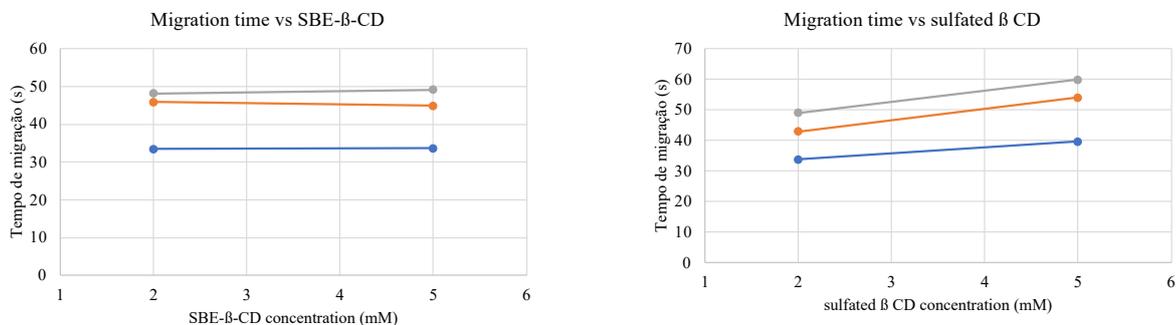
Figura 57 – Avaliação das ciclodextrinas SBE- β -CD e β -CD – sulfatada



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Ciclodextrinas são moléculas neutras e não apresentam mobilidade eletroforética (HANCU *et al.*, 2013). A sua concentração deve ser controlada de forma que as condições experimentais possam ser otimizadas. De acordo com o trabalho de Hancu e colaboradores (2015), o aumento da concentração das ciclodextrinas leva ao aumento do tempo de migração, devido ao maior tempo em que o analito fica presente na forma associada à ciclodextrina. Outro fator reportado pelos autores é o aumento da viscosidade do tampão, o que leva à diminuição da mobilidade dos analitos. Esses fatores foram observados nessa etapa experimental e podemos observar de forma mais efetiva nas Figuras 58A e 58B abaixo, em que podemos evidenciar que o aumento da concentração leva ao aumento do tempo de migração das espécies, sobretudo quando a ciclodextrina β -CD – sulfatada é utilizada. Uma vez que o uso das ciclodextrinas proporcionou, de uma forma geral, numa boa resolução entre os analitos, a otimização nessa etapa foi realizada com base no menor tempo de migração possível para as espécies. Assim, apesar da separação utilizando a SBE- β -CD numa concentração de 5mM ter apresentado uma melhor resolução entre os picos, a SBE- β -CD na concentração de 2mM foi escolhida como a ideal para os experimentos posteriores pois utiliza uma menor concentração de ciclodextrina e possibilita uma separação satisfatória.

Figura 58 – Tempo de migração dos analitos em função do tipo e concentração das ciclodextrinas.

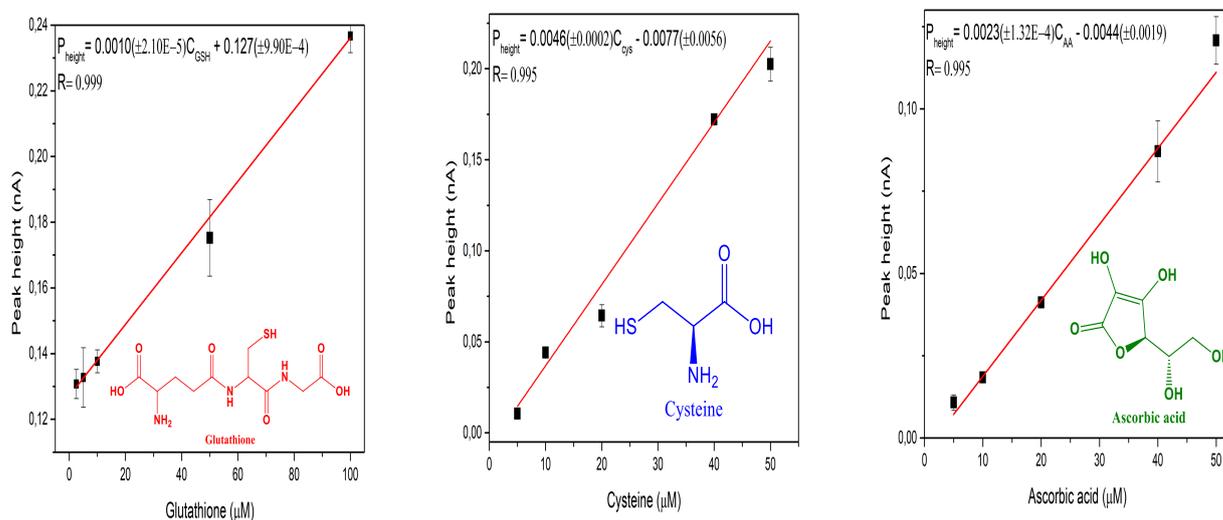


Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

3.4.5 Curva analítica para a metodologia proposta

Uma vez que os parâmetros avaliados para a separação e determinação dos analitos foram otimizados, curvas analíticas foram construídas para cada um dos analitos (Figura 59).

Figura 59 – Curvas analíticas para glutathiona, cisteína e ácido ascórbico sob condições otimizadas.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Assim, a Tabela 13 apresenta um quadro resumo dos dados obtidos a partir da construção das curvas analíticas. Com base nos dados apresentados na Tabela 13 podemos inferir que as faixas lineares para os três analitos estão dentro das concentrações desses analitos

indicadas na literatura em meio intracelular. Trabalhos recentes presentes na literatura indicam que as concentrações de glutatona, cisteína e ácido ascórbico no sangue humano são de 4,70 μ M, 250 μ M e 45,30 μ M, respectivamente. Já para os eritrócitos, as concentrações dos analitos estão na faixa de 0,40 – 3,0 mM para glutatona, 9 – 57 μ M para ácido ascórbico e 1 – 50 μ M para cisteína (T ERVE, VAN *et al.*, 2013; WANG, X. *et al.*, 2012). Com base nos dados presentes na literatura e nos dados obtidos durante a construção da curva analítica, podemos inferir que a metodologia proposta é adequada para a determinação desses analitos em amostras biológicas.

Tabela 13 – Resumo dos principais parâmetros analíticos referentes às curvas analíticas para a metodologia proposta.

Espécie	Curva analítica	Coefficiente de correlação linear	Faixa linear (μ mol L ⁻¹)	Sensibilidade
Glutaciona	$P_{altura} = 0,0010(\pm 2,10 \times 10^{-5}) C_{GSH} + 0,127 (\pm 9,90 \times 10^{-4})$	0,999	2,5 – 100	0,0010
Cisteína	$P_{altura} = 0,0046(\pm 0,0002) C_{cys} - 0,0077 (\pm 0,0056)$	0,995	5 – 50	0,0046
Ácido ascórbico	$P_{altura} = 0,0023(\pm 1,34 \times 10^{-4}) C_{AA} - 0,0044 (\pm 0,0019)$	0,995	5 – 50	0,0023

Além disso, pode-se observar que a maior faixa linear obtida foi referente à glutatona. Como consequência, a sensibilidade do método é substancialmente cerca de duas vezes menor do que a curva analítica construída para a cisteína e cerca de quatro vezes menor do que a curva analítica obtida para o ácido ascórbico, que apresentam faixa linear menor.

3.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento da metodologia proposta para a determinação de tióis biológicos e ácido ascórbico foi satisfatória, tendo em vista os resultados obtidos ao longo do trabalho. A utilização da metodologia baseada na reação dos tióis com a menadiona provou-se efetiva, uma vez que uma série de parâmetros analíticos foram otimizados, como o potencial aplicado no eletrodo de trabalho, a concentração do tampão, a concentração de SDS e de ciclodextrinas. Essas otimizações evidenciam que a concentração medida dos analitos é dependente desses parâmetros. Sob condições ótimas, a construção das curvas analíticas evidenciam a potencialidade da metodologia desenvolvida, visto que os valores obtidos viabilizam a utilização da metodologia proposta em amostras complexas, como amostras derivadas de sangue humano.

3.6 PERSPECTIVAS

- Avaliar a reação da menadiona com outros tióis biológicos relevantes e adicioná-los ao sistema ME-EC;
- Realizar estudos para avaliar possíveis interferentes ao método;
- Realizar análise com amostras reais tais como fluidos biológicos e alimentos;

REFERÊNCIAS

- AHMADZADEH, H. *et al.* Revisiting electroosmotic flow: An important parameter affecting separation in capillary and microchip electrophoresis. **Chemical Engineering Communications**, fev. 2008. v. 195, n. 2, p. 129–146.
- ALIZADEH, A. *et al.* **Electroosmotic flow: From microfluidics to nanofluidics. Electrophoresis**. John Wiley and Sons Inc.
- AL-SHEHRI, S. S. Reactive oxygen and nitrogen species and innate immune response. **Biochimie**, 2021. v. 181, p. 52–64.
- BECKER, H.; LOCASCIO, L. E. Polymer microfluidic devices. **Talanta**, 2002. v. 56, n. 2, p. 267–287.
- BECKERS, J. L.; BOČEK, P. Multiple effect of surfactants used as additives in background electrolytes in capillary zone electrophoresis: Cetyltrimethylammonium bromide as example of model surfactant. **Electrophoresis**, 2002. v. 23, n. 12, p. 1947–1952.
- CAO, C. *et al.* A simple highly selective probe for discriminative visualization of endogenous cysteine, homocysteine and glutathione in living cells via three separated fluorescence channels. **Talanta**, 1 nov. 2020. v. 219.
- CÁRDENAS-AGUAYO, M. D. C. *et al.* **The role of tau Oligomers in the onset of Alzheimer’s disease neuropathology. ACS Chemical Neuroscience**. American Chemical Society.
- CLAESON, A. S. *et al.* A standardized protocol for comparable analysis of GSH/GSSG by UHPLC-ESI-MSMS for human plasma. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 2019. v. 1104, p. 67–72.
- COLTRO, Wendell Karlos Tomazelli *et al.* **Microsistemas de Análises Químicas. Introdução, Tecnologias de Fabricação, Instrumentação e Aplicações. Química Nova**, 2007. v. 30, n. 8, p. 1986–2000.
- DAI, J. *et al.* **Recent progress in the development of fluorescent probes for detection of biothiols. Dyes and Pigments**. Elsevier Ltd.
- ELGAWISH, M. S.; KISHIKAWA, N.; KURODA, N. Quinones as novel chemiluminescent probes for the sensitive and selective determination of biothiols in biological fluids. **Analyst**, 21 dez. 2015. v. 140, n. 24, p. 8148–8156.
- FERIN, R.; PAVÃO, M. L.; BAPTISTA, J. Methodology for a rapid and simultaneous determination of total cysteine, homocysteine, cysteinylglycine and glutathione in plasma by isocratic RP-HPLC. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, 1 dez. 2012. v. 911, p. 15–20.
- FISCHER, D. J. *et al.* Amperometric detection in microchip electrophoresis devices: Effect of electrode material and alignment on analytical performance. **Electrophoresis**, 2009. v. 30, n. 19, p. 3324–3333.
- FORGACSOVA, A. *et al.* Ultra-high performance hydrophilic interaction liquid chromatography – Triple quadrupole tandem mass spectrometry method for determination of cysteine, homocysteine, cysteinyl-glycine and glutathione in rat plasma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 5 fev. 2019. v. 164, p. 442–451.
- FRIEND, J.; YEO, L. Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane. **Biomicrofluidics**, 2010. v. 4, n. 2, p. 1–5.
- GABRIEL, E. F. M. *et al.* Hydrodynamic injection on electrophoresis microchips using an electronic micropipette. **Talanta**, 1 jan. 2017. v. 162, p. 19–23.
- GALINDO-ROSALES, F. J. Complex fluid-flows in microfluidics. **Complex Fluid-Flows in Microfluidics**, 2017. p. 1–111.

- GARCÍA, C. D.; CHUMBIMUNI-TORRES, K. Y.; CARRILHO, E. **Electrophoresis Capillary Electrophoresis and Microchip Capillary**. III ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2013.
- GERSON, J. E.; CASTILLO-CARRANZA, D. L.; KAYED, R. **Advances in therapeutics for neurodegenerative tauopathies: Moving toward the specific targeting of the most toxic tau species**. *ACS Chemical Neuroscience*. American Chemical Society.
- GIUSTARINI, D. *et al.* Glutathione, glutathione disulfide, and S-glutathionylated proteins in cell cultures. **Free Radical Biology and Medicine**, 2015. v. 89, p. 972–981.
- _____ *et al.* Assessment of glutathione/glutathione disulphide ratio and S-glutathionylated proteins in human blood, solid tissues, and cultured cells. **Free Radical Biology and Medicine**, 2017. v. 112, n. May, p. 360–375.
- GUAN, Q.; NOBLITT, S. D.; HENRY, C. S. Electrophoretic separations in poly(dimethylsiloxane) microchips using a mixture of ionic and zwitterionic surfactants. **Electrophoresis**, jan. 2012. v. 33, n. 2, p. 379–387.
- HANCU, G. *et al.* Principles of micellar electrokinetic capillary chromatography applied in pharmaceutical analysis. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, 2013. v. 3, n. 1, p. 1–8.
- _____ *et al.* Cyclodextrine Screening for the Chiral Separation of Carvedilol by Capillary Electrophoresis. Shaheed Beheshti University of Medical Sciences and Health Services Iranian Journal of Pharmaceutical Research. [S.l.]: [s.n.], 2015.
- HASSAN, G. S. Menadione. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**. [S.l.]: Academic Press Inc., 2013, V. 38, p. 227–313.
- HAYES, M. A.; KHETERPAL, I.; EWING, A. G. **Effects of Buffer pH on Electroosmotic Flow Control by an Applied Radial Voltage for Capillary Zone Electrophoresis**. *Anal. Chem.* [S.l.]: [s.n.], 1999.
- HENRY, C. S. **Microchip Capillary Electrophoresis**. Totowa: Humana Press, 2006.
- HOSSEINZADEH, L. *et al.* Determination of homocysteine using a dopamine-functionalized graphene composite. **Microchemical Journal**, 1 jun. 2021. v. 165.
- HU, K. *et al.* Nanoelectrodes for intracellular measurements of reactive oxygen and nitrogen species in single living cells. **Current Opinion in Electrochemistry**, 2020. v. 22, p. 44–50.
- HULVEY, M. K.; FRANKENFELD, C. N.; LUNTE, S. M. Separation and detection of peroxynitrite using microchip electrophoresis with amperometric detection. **Analytical Chemistry**, 2010a. v. 82, n. 5, p. 1608–1611.
- _____ ; _____ ; _____. Separation and detection of peroxynitrite using microchip electrophoresis with amperometric detection. **Analytical Chemistry**, 1 mar. 2010b. v. 82, n. 5, p. 1608–1611.
- IBRAHIM, A.; ALLISON, S. A.; COTTET, H. Extracting information from the ionic strength dependence of electrophoretic mobility by use of the slope plot. **Analytical Chemistry**, 6 nov. 2012. v. 84, n. 21, p. 9422–9430.
- JÚNIOR, J. G. F. **Desenvolvimento de um dispositivo microfluídico híbrido pdms/vidro para a detecção e separação de glifosato e ampa em amostras ambientais**. [S.l.]: Universidade Federal de Alagoas, 2019.
- KAMIŃSKA, A. *et al.* Simultaneous determination of total homocysteine, cysteine, glutathione, and N-acetylcysteine in brain homogenates by HPLC. **Journal of Separation Science**, 1 ago. 2018. v. 41, n. 16, p. 3241–3249.
- KHAN, Abad *et al.* A new HPLC method for the simultaneous determination of ascorbic acid and aminothiols in human plasma and erythrocytes using electrochemical detection. **Talanta**, 15 maio. 2011. v. 84, n. 3, p. 789–801.
- LEE, P. T.; LOWINSOHN, D.; COMPTON, R. G. The use of screen-printed electrodes in a proof of concept electrochemical estimation of homocysteine and glutathione in the presence of Cysteine using catechol. **Sensors (Switzerland)**, 12 jun. 2014. v. 14, n. 6, p. 10395–10411.

- LEE, S. *et al.* Recent progress on the development of glutathione (GSH) selective fluorescent and colorimetric probes. **Coordination Chemistry Reviews**, 2018. v. 366, p. 29–68. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2018.03.021>>.
- LENARDÃO, J. *et al.* “GREEN CHEMISTRY”-OS 12 PRINCÍPIOS DA QUÍMICA VERDE E SUA INSERÇÃO NAS ATIVIDADES DE ENSINO E PESQUISA. **Quim. Nova**. [S.l.]: [s.n.], 2003.
- MALIK, M.; NARWAL, V.; PUNDIR, C. S. **Ascorbic acid biosensing methods: A review. Process Biochemistry**. Elsevier Ltd.
- MANDAL, M. *et al.* Reactive Oxygen Species (ROS) and Reactive Nitrogen Species (RNS) in plants—maintenance of structural individuality and functional blend. **Advances in Redox Research**, jul. 2022. v. 5, p. 100039.
- MARTIN, R. S. *et al.* In-channel electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis using an electrically isolated potentiostat. **Analytical Chemistry**, 1 mar. 2002. v. 74, n. 5, p. 1136–1143.
- MENESES, D. *et al.* Evaluation of in-channel amperometric detection using a dual-channel microchip electrophoresis device and a two-electrode potentiostat for reverse polarity separations. **Electrophoresis**, 2015. v. 36, n. 3, p. 441–448.
- NGUYEN, Q. K. *et al.* Synthesis and application of polycation-stabilized gold nanoparticles as a highly sensitive sensor for molecular cysteine determination. **Microchemical Journal**, 1 set. 2021. v. 168.
- NJUS, D. *et al.* **Ascorbic acid: The chemistry underlying its antioxidant properties. Free Radical Biology and Medicine**. Elsevier Inc.
- NOVIANA, E. *et al.* Microfluidic Paper-Based Analytical Devices: From Design to Applications. **Chemical Reviews**, 2021.
- PASAS, S. A.; MARTIN, R. S.; LUNTE, S. M. Recent developments in amperometric detection for microchip. **Electrophoresis**, 2002. v. 2683, n. November, p. 1–11. Disponível em: <<papers://d32519d5-83a5-42d0-9481-c6b25a06c86f/Paper/p2856>>.
- PENG, G. *et al.* Highly sensitive and selective determination of Hg(II) based on microfluidic chip with on-line fluorescent derivatization. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, 2018. v. 204, n. Ii, p. 1–6. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.06.006>>.
- PINHEIRO, K. M. P.; REZENDE, K. C. A.; COLTRO, Wendell K.T. Sample injection methods in electrophoretic microsystems. **Química Nova**, 2021. v. 44, n. 5, p. 575–583.
- QUEIROZ, S. C. Do N. De; JARDIM, I. C. S. F. **Eletroforese Capilar. Chemkeys - Liberdade para aprender**, 1993. p. 1–22.
- RANG, Y. **DEVELOPMENT OF QUANTITATIVE ON-LINE CONCENTRATION TECHNIQUE FOR CAPILLARY ELECTROPHORESIS BY INKJET**. [S.l.: s.n., s.d.].
- SCOTT, S. M.; ALI, Z. **Fabrication methods for microfluidic devices: An overview. Micromachines**. MDPI AG.
- SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos da Química Analítica**. 9ª edição ed. São Paulo: Cengage Learning, 2017.
- SONG, S. H.; KWAK, B. S.; JUNG, H. II. Analysis and utilization of Joule heating in an electromagnet integrated microfluidic device for biological applications. **Current Applied Physics**, 2009. v. 9, n. 4 SUPPL., p. e287–e290. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cap.2009.06.023>>.
- SZENTE, L.; SZEMÁN, J. Cyclodextrins in analytical chemistry: Host-guest type molecular recognition. **Analytical Chemistry**, 3 set. 2013. v. 85, n. 17, p. 8024–8030.
- ’T ERVE, T. J. VAN *et al.* The concentration of glutathione in human erythrocytes is a heritable trait. **Free Radical Biology and Medicine**, 2013. v. 65, p. 742–749.
- TAGLIARO, F. *et al.* A brief introduction to capillary electrophoresis. [S.l.]: [s.n.], 1998.

- TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos.pdf. **Química Nova**, 1996. v. 19, n. 2, p. 173–181.
- _____. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, 1997. v. 20, n. 5, p. 493–511.
- TERABE, S. **Micellar Electrokinetic Chromatography**. [S.l.]: [s.n.], 1992.
- TSAO, C. W. Polymer microfluidics: Simple, low-cost fabrication process bridging academic lab research to commercialized production. **Micromachines**, 2016. v. 7, n. 12.
- VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants and markers of oxidative damage in human blood: Main analytical methods for their determination. **Química Nova**, 2007. v. 30, n. 5, p. 1323–1338.
- VAZA, F. A. S.; OLIVEIRA, C. L. M. DE; OLIVEIRAA, M. A. L. DE. Fundamentals of capillary electrophoresis: An animation approach. **Química Nova**, 1 jun. 2015. v. 38, n. 5, p. 732–737.
- WANG, X. *et al.* Quantification of glutathione in plasma samples by HPLC using 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan as a fluorescent labeling reagent. **Journal of Chromatographic Science**, fev. 2012. v. 50, n. 2, p. 119–122.
- WANG, Yingchun *et al.* Three-in-One Detector by 3D Printing: Simultaneous Contactless Conductivity, Ultraviolet Absorbance, and Laser-Induced Fluorescence Measurements for Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, 31 jan. 2023. v. 95, n. 4, p. 2146–2151.
- WANG, Yuanhang *et al.* A fully functional palmtop microchip electrophoresis analyzer with laser-induced fluorescence detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, dez. 2022. v. 372, p. 132645.
- WÄTZIG, H.; LLOYD, D. K. Effect of pH and sodium dodecyl sulfate concentration on the analytical window in the direct-injection analysis of plasma samples by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, 1995. v. 16, n. 1, p. 57–63. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/elps.1150160112>>.
- WEINBERGER, R. **Practical Capillary Electrophoresis**. 2nd editio ed. Orlando: [s.n.], 2000.
- WHATLEY, H. Basic Principles and Modes of Capillary Electrophoresis. **Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis**. [S.l.]: [s.n.], 2001, p. 21–58.
- WIEDMER, S. K.; RIEKKOLA, M.-L. Capillary electromigration techniques. **Particle Separation Techniques**. [S.l.]: Elsevier, 2022, p. 659–688.
- WU, Y. *et al.* An end-channel amperometric detector for microchip capillary electrophoresis. **Talanta**, 8 out. 2004. v. 64, n. 2, p. 338–344.
- XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. Soft lithography. **Annual Review of Material science**, 1998. v. 28, n. 12, p. 153–184.
- YAO, X.; WANG, Yuting; CHEN, G. Simultaneous determination of aminothiols, ascorbic acid and uric acid in biological samples by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Biomed. Chromatogr**, 2007. v. 21, p. 520–526. Disponível em: <www.interscience.wiley.com>.

4 CONCLUSÃO GERAL

Considerando que a utilização dos sistemas miniaturizados com aplicações dentro da química analítica é de suma importância dentro do contexto científico, social e tecnológico atual, pode-se concluir que as metodologias aqui apresentadas são alternativas para a resolução de problemas presentes na sociedade, como a verificação rápida e eficiente de um medicamento e a possibilidade de testes com amostras biológicas com uma frequência analítica elevada. Assim, espera-se que as metodologias desenvolvidas neste trabalho possam ser posteriormente utilizadas para o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem um retorno direto para a sociedade dos investimentos efetuados em recursos humanos e desenvolvimento científico.