

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

EDUARDO LUIZ ROSSINI

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOMARCADORES DE FUNÇÃO RENAL EM
URINA UTILIZANDO DISPOSITIVO ANALÍTICO MICROFLUÍDICO EM PAPEL**

Araraquara
2016

EDUARDO LUIZ ROSSINI

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE BIOMARCADORES DE FUNÇÃO RENAL EM
URINA UTILIZANDO DISPOSITIVO ANALÍTICO MICROFLUÍDICO EM PAPEL**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química, Universidade Estadual Paulista,
como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Química

Orientadora: Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza

Araraquara
2016

DADOS CURRICULARES

1. Dados pessoais

Nome: Eduardo Luiz Rossini

Data de nascimento: 11/04/1992

Naturalidade: Jaú – SP

Nacionalidade: Brasileiro

Estado Civil: Solteiro

Filiação: Mãe – Vânia Elvira Arriello Rossini

Pai – Dorival Rossini

E-mail: eduardoluizrossini@hotmail.com

2. Formação acadêmica

Graduação:

Bacharel em Química pela Instituto de Química – UNESP, Brasil, no período de 2010 a 2013.

Pós-graduação

Mestrado em Química Analítica pelo Instituto de Química – UNESP – Araraquara 2014 a 2015.

3. Prêmios

3.1. Analyst Poster Prize - V Workshop em Microfluídica, Royal Society of Chemistry, 2015.

3.2. Prêmio Lavoisier, CRQ-IV, 2014.

4. Trabalhos apresentados em congressos

4.1. 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia – São Paulo, 25 a 28 de maio de 2013.

Trabalho: ROSSINI, E. L.; MILANI, M. I.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R., Desenvolvimento de Método Analítico Limpo para Análise de Corante Amarantho em Groselhas por Espectroscopia de Reflectância Difusa.

4.2. XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP, Araraquara – São Paulo, 18 e 19 de setembro de 2013.

Trabalho: ROSSINI, E. L.; MILANI, M. I.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R., Desenvolvimento de Método Analítico para Análise de Aditivos em Bebidas Não Alcoólicas Aplicando Princípios da Química Verde.

4.3. 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Natal – Rio Grande do Norte, 26 a 29 de maio de 2013.

Trabalho: ROSSINI, E. L.; MILANI, M. I.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R., Metodologia alternativa ambientalmente amigável para análise de corante Bordeaux S utilizando spot-test associado à reflectância difusa.

4.4. V Workshop em Microfluídica, Campinas – São Paulo, 23 e 24 de julho de 2015.

Trabalho: ROSSINI, E. L.; MILANI, M. I.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R., Determinação simultânea de ácido úrico e creatinina utilizando PAD com detecção por imagem digital.

4.5. 55º Congresso Brasileiro de Química, Goiânia – Goiás, 02 a 06 de novembro de 2015.

Trabalho: ROSSINI, E. L.; MILANI, M. I.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R., Determinação simultânea de biomarcadores de função renal em urina utilizando dispositivo analítico microfluídico em papel.

5. Artigos aceitos ou publicados

MILANI, M. I.; ROSSINI, E. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Development of a new clean methodology with ultrasound-assisted extraction for analysis of sodium in pet food. **Analytical Methods**, v. 7, p. 2433-2436, Jan. 2015.

CASTOLDI, K.; MILANI, M. I.; ROSSINI, E. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Flow injection analysis of 5-(hydroxymethyl)-2-furaldehyde in honey by a modified Winkler method. **Analytical Sciences**, manuscrito aceito.

EDUARDO LUIZ ROSSINI

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Araraquara, 05 de janeiro de 2016.

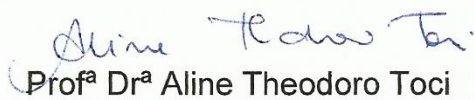
BANCA EXAMINADORA



Profª Drª Helena Redigolo Pezza - (Orientadora)
Instituto de Química - UNESP - Araraquara - SP



Prof. Dr. Emanuel Carrilho
Instituto de Química - USP / São Carlos - SP



Profª Drª Aline Theodoro Toci
Universidade Federal da Integração Latina Americana - UNILA - Foz do Iguaçu – PR

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Vânia e Dorival, se não fosse por vocês eu não estaria aqui.

Ao meu irmão, André, pelo apoio, companheirismo e paciência em todos os momentos.

À Maria Izabel, minha melhor amiga, namorada e companheira que é a maior incentivadora dos meus objetivos. Muito obrigado por estar sempre do meu lado, cuidando de mim, me apoiando e tendo paciência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por permitir que eu cumprisse mais essa etapa na minha vida.

Ao meu pai, Dorival, e minha mãe, Vânia, que me formaram do jeito que sou hoje. Também, embora não seja esse o caminho que vocês gostariam que eu seguisse, espero que sintam orgulho do que me tornei.

Ao meu irmão, André, pelo suporte e ajuda sempre que precisei.

À minha namorada, Maria Izabel, que sempre esteve ao meu lado me ajudando em momentos difíceis e compartilhando os bons momentos. Obrigado por ser desde sempre minha melhor amiga e companheira de jornada.

À minha nova família, Henrique, Angela, Ana Julia, Edna e outros, obrigado por terem me acolhido tão bem na sua casa.

À minha cunhada, Letícia, pela gentileza, simpatia e carinho que sempre teve comigo.

À professora Helena Redigolo Pezza pela orientação e confiança, pelas oportunidades e ensinamentos e pelo exemplo profissional que pretendo seguir.

Ao professor Leonardo Pezza, pelo apoio e conselhos durante o trabalho.

Aos amigos do GPF, em especial, Tiago, Dayana, Vítor, Paulo e Marcos, obrigado pelo apoio e ajuda quando precisei e, principalmente, pelos bons momentos e pelas risadas que descontraíam esse difícil caminho que decidimos seguir.

A todos os amigos de Araraquara, em especial, Patrick e Felipe, obrigado pelo companheirismo e amizade durante esse período.

Aos professores que me auxiliaram e tentaram transmitir um pouco do seu conhecimento.

Ao professor Emanuel Carrilho pelo auxílio e suporte para a realização desse projeto.

Aos membros da banca, professor Emanuel Carrilho e professora Aline Toci, pela disponibilidade, tempo dispensado e sugestões para melhora do trabalho.

Ao CNPq pelos recursos e pela bolsa concedida.

À FAPESP/CAPES (Processo nº 2014/17749-7) pela bolsa concedida e pelo auxílio financeiro.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para que mais essa etapa fosse concluída, muito obrigado.

“Pessoas quietas possuem mentes barulhentas”.

Stephen Hawking

“Demore o tempo que for para ver o que você quer da vida e depois não recue ante nenhum pretexto, porque o mundo tentará te dissuadir”.

Zaratustra

RESUMO

O nitrogênio está presente no organismo humano principalmente como constituinte das proteínas e ácidos nucleicos. O catabolismo dessas substâncias forma compostos nitrogenados conhecidos como não-proteicos. Dentre os vários compostos nitrogenados não-proteicos conhecidos, o ácido úrico e a creatinina podem ser utilizados como biomarcadores da função renal em humanos. A creatinina é proveniente da reação não enzimática de desidratação da creatina ou da desfosforilação da fosfocreatina durante o processo de contração muscular; sua concentração é utilizada como marcador clínico para avaliar a função renal. O ácido úrico é formado a partir do metabolismo das bases purínicas, por ser um composto pouco solúvel, sua deposição nas juntas das extremidades ou em outros tecidos moles gera o caso clínico conhecido como gota. Dessa forma, a creatinina e o ácido úrico são constantemente dosados em exames laboratoriais de urina. As metodologias utilizadas para a dosagem desses dois compostos vão desde os métodos clássicos, até a utilização de HPLC, eletroforese e análise em fluxo, ou seja, técnicas pouco portáteis e algumas de alto custo. Assim, a proposta do trabalho é o desenvolvimento de dispositivos analíticos microfluídicos em papel (μ PAD) para a determinação de creatinina e ácido úrico. Foram selecionados os reagentes cromogênicos para os dois analitos em estudo. Sendo o ácido pícrico em meio alcalino o reagente cromogênico para a creatinina e o Fe^{3+} e 1,10-Fenantrolina para o ácido úrico. As condições experimentais das duas reações foram otimizadas utilizando o planejamento fatorial do tipo 2^3 e o planejamento composto central. Foram otimizados os fatores concentrações dos reagentes e tempo de aquecimento. A curva de calibração para o ácido úrico foi repetitiva, com equação de reta igual a $A = 0,01651 + 0,0003864 C_{AU}$, com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,997, com limite de detecção igual a $16,5 \text{ mg L}^{-1}$ e de quantificação igual a $54,9 \text{ mg L}^{-1}$. Dos interferentes testados, apenas o ácido ascórbico demonstrou ser interferente da reação e pode ser eliminado borbulhando-se O_2 na amostra. A curva de calibração para a creatinina apresenta repetibilidade, com equação de reta igual a $A = -0,02229 + 0,0004010 C_{CRN}$, com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,998, com limite de detecção igual a $15,7 \text{ mg L}^{-1}$ e de quantificação igual a $52,4 \text{ mg L}^{-1}$, não apresentando interferentes para a reação entre os interferentes testados. A metodologia proposta foi aplicada em três urinas sintética e quatro urinas naturais. Os resultados obtidos foram confrontados com uma metodologia cromatográfica descrita na literatura. O teste estatístico de t de Student demonstrou que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos do método proposto e o comparativo.

Palavras-chave: Ácido úrico. Creatinina. Urina. μ PAD. Imagem digital.

ABSTRACT

Nitrogen is present in human organism mainly as a nucleic acid and proteins constituent. The catabolism of these substances forms nitrogen compounds known as nonproteinaceous. Among the many nonproteinaceous nitrogen compounds, uric acid and creatinine can be used as biomarkers of renal function in humans. Creatinine is derived from a non-enzymatic reaction of creatine dehydretion or dephosphorylation of phosphocreatine in the muscle contraction process; creatinine concentration is used as clinic marker to evaluate the renal function. Uric acid is formed from metabolism of purine bases and, by being a slightly soluble compound, its deposition in the joints of the extremities or other soft tissues creates a case known as gout. In this way, creatinine and uric acid are constantly dosed in urine laboratory exams. The methodologies used to determine these two compounds range from classic methods, to the used of HPLC, electrophoresis and in flow analysis, in other words, slightly portable techniques and, some of them, very expensive. Thus, this work proposes the development of microfluidic paper-based analytical devices (μ PAD) to determinate creatinine and uric acid. Chromogenic reagents were selected for both analytes in study. Picric acid in alkaline medium was chose for creatinine determination and Fe^{3+} and 1,10-phenantroline were chose for uric acid. Experimental conditions were optimized for both reactions using 2^3 factorial design and a central composite design. The factores optimized were reagents concentration and time of heating. The analytical curve to uric acid were repetitive, with a line equation equal to $A = 0,01651 + 0,00038764 C_{\text{AU}}$, with determination coefficient (R^2) equal to 0,997, and limit of detection equal to $16,5 \text{ mg L}^{-1}$ and limit of quantification equal to $54,9 \text{ mg L}^{-1}$. Of the interferents tested, only ascorbic acid was shown to be interfering the reaction and may be removed by bubbling O_2 in the sample. Calibration curve of creatinine shows itself repetitive with a linear equation equal to $A = -0,02229 + 0,0004010 C_{\text{CRN}}$, with linear coefficient (R^2) of 0,998; limits of detection and quantification were, respectively, $15,7 \text{ mg L}^{-1}$ and $52,4 \text{ mg L}^{-1}$; and none of the interferentes tested present interference during the determination. The proposed method was applied to three artificial urine samples and four natural urine samples. The obtained results were compared with a chromatographic methodology already described in literature. Statistic Student t-test shows that there is no significant difference between the results obtained by the proposed method and the comparative method.

Keywords: Uric acid. Creatinine. Urine. μ PAD. Digital image.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ilustração do sistema urinário	20
Figura 2 – Número de pacientes que se submeteram a diálise em função do ano	22
Figura 3 – Conversão de creatina e fosfocreatina em creatinina na contração muscular	23
Figura 4 – Estrutura do ácido úrico	27
Figura 5 – Os dois tipos de reflexão que constituem o fenômeno físico: a) reflexão especular produzido por um espelho; b) reflexão difusa produzido quando um feixe de luz incide um <i>spot-test</i> de um papel	32
Figura 6 – Esquema de fabricação de barreiras hidrofóbicas	36
Figura 7 – Procedimento e suporte para a realização do <i>spot-test</i>	49
Figura 8 – <i>Spot-test</i> realizado no papel de filtro com barreiras hidrofóbicas. Em (A) a reação colorimétrica para o ácido úrico e em (B) a da creatinina. A intensidade da coloração é mensurável através de medidas de reflectância ou por tratamento por imagem digital.	49
Figura 9 – Modelo de μ pad empregado e suas diferentes zonas nas quais há a impregnação de reagentes e a detecção do analito	49
Figura 10 – μ PAD utilizado para a detecção de ácido úrico (canal central) e de creatinina (canal à direita). A intensidade da coloração é mensurável por tratamento da imagem digital	50
Figura 11 – Imagem do software imagej aberto, mostrando os dados obtidos da área selecionada do <i>spot-test</i> do corante amaranato com concentração igual a $5,003 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; o histograma obtido e os resultados numéricos de rgb (canal, média, moda e desvio padrão) estão nas diferentes janelas	51
Figura 12 – Espectro de absorção do corante amaranato em meio tamponado (pH = 4,3). $\lambda_{\text{máx}} = 530 \text{ nm}$ e camaranto = $1,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$	53
Figura 13 – Curva de calibração do corante amaranato com concentrações entre $2,50 \times 10^{-5}$ a $8,004 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com detecção por espectroscopia de reflectância difusa. $\lambda = 530 \text{ nm}$	54
Figura 14 – Curvas de calibrações do corante amaranato para os canais R, G e B com concentrações entre $2,50 \times 10^{-5}$ a $8,004 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com detecção por imagem digital	54
Figura 15 – Curvas analíticas do corante amaranato com concentrações entre $2,50 \times 10^{-5}$ e $8,004 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando detecção por imagem digital com diferentes resoluções de digitalização	56
Figura 16 – Curvas analíticas do corante amaranato com concentrações entre $2,50 \times 10^{-5}$ a $8,004 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ utilizando detecção por imagem digital com diferentes áreas selecionadas em função do diâmetro	57
Figura 17 – Foto do suporte para fixação do secador utilizado para o aquecimento do meio reacional. Distância do secador para o papel é de 4 cm	58
Figura 18 – Esquema utilizado para o estudo da temperatura de aquecimento em função do tempo	58
Figura 19 – Temperatura do papel em função do tempo de aquecimento. $n = 3$.	59
Figura 20 – μ PAD semelhante ao desenvolvido por Martinez (2007)	60
Figura 21 – Imagens da seção transversal do papel antes do aquecimento (A) e após o aquecimento (B)	60
Figura 22 – Ilustração do esquema utilizado para determinar a largura do canal a ser utilizado	61

Figura 23 – Distância percorrida pela solução de corante amarantho em função do tempo para canais de diferentes larguras	61
Figura 24 – À esquerda está ilustrado as zonas de teste para o analito creatinina e à direita para o ácido úrico. Os três diâmetros de zona são 3, 4 e 5 mm	63
Figura 25 – Aumento do canal após a zona de teste fornecendo melhor coloração para a reação	63
Figura 26 – Ilustração do ensaio para determinação da interação papel-analito da creatinina	64
Figura 27 – Desenho final do μ PAD	65
Figura 28 – Diferentes volumes adicionados ao μ pad. Da esquerda para a direita os volumes utilizados foram de 4, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 μ l de solução de corante amarantho	65
Figura 29 – Proposta de reação entre a creatinina e o picrato	66
Figura 30 – Foto ilustrativa dos testes qualitativos da reação em meio aquoso de creatinina em concentrações de 1000 e 250 mg L^{-1} com ácido pícrico em (A) e ácido 3,5-dinitrobenzóico em (B), ambos em meio alcalino. Os tubos à direita de cada imagem representam o branco e à esquerda a reação na maior concentração	67
Figura 31 – Foto ilustrativa dos testes qualitativos da reação em papel de creatinina em concentrações de 1000 mg L^{-1} com ácido pícrico em (A) e ácido 3,5-dinitrobenzóico em (B), ambos em meio alcalino. O papel à direita de cada imagem representa o branco e à esquerda a reação com o analito de interesse	67
Figura 32 – Ordem de adição do analito e do reagente cromogênico. Em (A) com a ordem reagente/analito e em (B) analito/ reagente. Concentração de creatinina igual a 300 mg L^{-1}	68
Figura 33 – Espectro de absorção do produto colorido formado pela reação de Jaffé, obtido pela reflectância difusa. Concentração de creatinina igual a 300 mg L^{-1}	68
Figura 34 – Estabilidade do produto colorido formado entre 1 e 180 minutos. $\lambda = 505$ nm e canal = G. $C_{\text{crn}} = 250 \text{ mg L}^{-1}$	70
Figura 35 – Gráfico de pareto para a análise de creatinina pela reação de Jaffé com detecção por reflectância	73
Figura 36 – Gráfico de pareto para a análise de creatinina pela reação de Jaffé com detecção por imagem digital	73
Figura 37 – Gráfico de efeitos principais para a detecção por reflectância	74
Figura 38 – Gráfico de efeitos principais para a detecção por reflectância	75
Figura 39 – Superfície de resposta obtida através dos resultados da tabela 15 do planejamento composto central da tabela 14, utilizando a reflectância difusa como detecção	77
Figura 40 – Gráfico de contorno obtido através dos resultados da tabela 15 do planejamento composto central da tabela 14, utilizando a reflectância difusa como detecção	77
Figura 41 – Superfície de resposta obtida através dos resultados da tabela 15 do planejamento composto central da tabela 14, utilizando a imagem digital como detecção	78
Figura 42 – Gráfico de contorno obtido através dos resultados da tabela 15 do planejamento composto central da tabela 14, utilizando a imagem digital como detecção	78

Figura 43 – Em (A) e (B) o μ PAD com ACP em OH^- na zona de captação, sendo em (a) o branco da reação e em (B) a reação com CRN. Em (C) e (D) o ACP em OH^- na zona de teste, sendo em (D) o branco da reação e em (C) a reação com CRN	81
Figura 44 – Média e desvio-padrão da absorbância da reação colorimétrica da CRN com a variação do volume de reagentes e concentração de OH^- diferentes. $n = 3$ e $C_{\text{CRN}} = 350 \text{ mg L}^{-1}$	82
Figura 45 – Curva de calibração de absorbância em função da concentração. $C_{\text{CRN}} = 50$ a 600 mg L^{-1} . Canal de cor utilizado = verde	83
Figura 46 – Foto ilustrativa dos testes qualitativos da reação em meio aquoso do ácido úrico em concentrações de 1000 e 250 mg L^{-1} com $\text{Fe}^{3+}/1,10$ -fenantrolina em (A) e $\text{Fe}^{3+}/\text{hexacianoferrato(III)}$ em (B). Os tubos à direita de cada imagem representam o branco e à esquerda a reação na maior concentração	86
Figura 47 – Foto ilustrativa dos testes qualitativos da reação em papel do ácido úrico em concentrações de 250 mg L^{-1} com $\text{Fe}^{3+}/1,10$ -fenantrolina em (A) e $\text{Fe}^{3+}/\text{hexacianoferrato(III)}$ em (B). O papel à direita de cada imagem representa o branco e à esquerda a reação com o analito	87
Figura 48 – Reação de $1,10$ -fenantrolina com Fe^{2+} formando o $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$	87
Figura 49 – Gráfico de Job para a determinação da estequiometria da reação de Fe^{3+} e au. $\lambda = 510 \text{ nm}$	88
Figura 50 – Reação de conversão do ácido úrico a alantoína	89
Figura 51 – Reação global do ácido úrico com Fe^{3+} e $1,10$ -fenantrolina	89
Figura 52 – Ordem de adição dos reagentes e do analito no <i>spot-test</i> . Concentração de ácido úrico igual a 200 mg L^{-1}	90
Figura 53 – Espectro de absorção do produto colorido obtido da reação entre o Fe^{3+} , AU e $1,10$ -fenantrolina. $C_{\text{AU}} = 200 \text{ mg L}^{-1}$	90
Figura 54 – Estabilidade do produto colorido formado entre 1 e 120 minutos. $\lambda = 515 \text{ nm}$ e canal = G. $C_{\text{CRN}} = 200 \text{ mg L}^{-1}$	91
Figura 55 – Gráfico de pareto para a análise de ácido úrico com detecção por reflectância	95
Figura 56 – Gráfico de pareto para a análise de ácido úrico com detecção por imagem digital	95
Figura 57 – Gráfico de efeitos principais para a detecção por reflectância	96
Figura 58 – Gráfico de efeitos principais para a detecção por imagem digital	97
Figura 59 – Superfície de resposta obtida através dos resultados da tabela 30 do planejamento composto central do AU, utilizando a reflectância difusa como detecção	99
Figura 60 – Gráfico de contorno obtido através dos resultados da tabela 30 do planejamento composto central do AU, utilizando a reflectância difusa como detecção	99
Figura 61 – Superfície de resposta obtida através dos resultados da tabela 30 do planejamento composto central do AU, utilizando a imagem digital como detecção	100
Figura 62 – Gráfico de contorno obtido através dos resultados da tabela 30 do planejamento composto central do AU, utilizando a imagem digital como detecção	100
Figura 63 – Em (A) o μ PAD com Fe^{3+} na zona de detecção e $1,10$ -fenantrolina na zona de captação. Em (B) a $1,10$ -fenantrolina na zona de detecção e Fe^{3+} na zona de captação	103

- Figura 64** – Determinação de AU utilizando Fe^{3+} com H_3PO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ à esquerda e H_2SO_4 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ à direita. $C_{\text{AU}} = 300 \text{ mg L}^{-1}$ 103
- Figura 65** – Experimento para comprovar que o Fe^{3+} não fica adsorvido no papel e é arrastado pela amostra. Coloração avermelhada referente ao complexo de Fe^{3+} com tiocianato 104
- Figura 66** – Média e desvio-padrão da absorbância da reação colorimétrica do AU com a variação do volume de reagentes. $n = 3$ e $C_{\text{AU}} = 300 \text{ mg L}^{-1}$ 104
- Figura 67** – Curva de calibração de absorbância em função da raiz da concentração. $C_{\text{AU}} = 50$ a 500 mg L^{-1} . Canal de cor utilizado = verde 105
- Figura 68** – Cromatograma obtido da mistura de CRN e AU. $C_{\text{CRN}} = 10 \text{ mg L}^{-1}$ e $C_{\text{AU}} = 10 \text{ mg L}^{-1}$. $t_{r(\text{CRN})}=3,01 \text{ min}$; $t_{r(\text{AU})}=3,92 \text{ min}$ 108
- Figura 69** – Curva analítica para a creatinina pelo método comparativo por HPLC. $C_{\text{CRN}} = 2,50$ a $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ 108
- Figura 70** – Curva analítica para a ácido úrico pelo método comparativo por HPLC. $C_{\text{AU}} = 2,50$ a $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ 109
- Figura 71** – Cromatograma obtido da análise da amostra de urina sintética 1. $t_{r(\text{CRN})}=3,05 \text{ min}$; $t_{r(\text{AU})}=3,94 \text{ min}$ 110
- Figura 72** – Cromatograma obtido da análise da amostra de urina natural 2. $t_{r(\text{AU})} = 3,31 \text{ min}$; $t_{r(\text{CRN})} = 4,19 \text{ min}$ 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Metabólitos nitrogenados na urina**	23
Tabela 2 – Valores de referência para creatinina sérica e urina de 24 horas	24
Tabela 3 – Métodos analíticos utilizados para determinação de creatinina	25
Tabela 4 – Valores de referência para ácido úrico em exames de urina	28
Tabela 5 – Métodos analíticos utilizados para determinação de ácido úrico	29
Tabela 6 – Composição da urina sintética	47
Tabela 7 – Condições cromatográficas do método comparativo	52
Tabela 8 – Dados obtidos a partir das regressões das curvas analíticas da reflectância e da imagem digital	55
Tabela 9 – Relação entre cor observada, cor complementar, canal de absorção e comprimento de onda	56
Tabela 10 – Valores de intensidade do branco, de intensidade e de absorbância do produto colorido $C_{CRN} = 300 \text{ mg L}^{-1}$. $n = 3$	69
Tabela 11 – Descrição dos níveis e codificação de cada fator	71
Tabela 12 – Matriz de ensaios descrevendo os fatores codificados utilizados no planejamento experimental	72
Tabela 13 – Resultados dos ensaios do planejamento experimental por meio da reflectância e imagem digital. $C_{CRN} = 200 \text{ mg L}^{-1}$ e $n = 3$	72
Tabela 14 – Fatores codificados e não-codificados utilizados no planejamento composto central	76
Tabela 15 – Valores de absorbância de cada ensaio do planejamento utilizando detecção por reflectância ($\lambda = 505 \text{ nm}$) e imagem digital (canal verde). $C_{CRN} = 200 \text{ mg L}^{-1}$ e $n = 3$	76
Tabela 16 – Valores críticos de concentração de OH^- e de tempo de aquecimento	79
Tabela 17 – Confirmação do máximo de absorbância da superfície de resposta. $C_{CRN} = 200 \text{ mg L}^{-1}$ e $n = 3$	79
Tabela 18 – Condições experimentais para a determinação de ácido úrico em urina	80
Tabela 19 – Determinação semi-quantitativa visual de diferentes concentrações da curva analítica da CRN	83
Tabela 20 – Porcentagem de repetibilidades intra-dia e inter-dia para a creatinina	84
Tabela 21 – Fator de interferência para a creatinina dos possíveis compostos presentes na urina	85
Tabela 22 – Valores de intensidade do branco, de intensidade e absorbância do reagente na presença de ácido úrico em concentração igual a 200 mg L^{-1} . $n = 3$	91
Tabela 23 – Estudo da variação da concentração de H^+ na solução de Fe^{3+} . $n = 3$. $C_{AU} = 250 \text{ mg L}^{-1}$. $\text{pH} = 4$	92
Tabela 24 – Estudo da variação do pH do meio por meio de adição de acetato de sódio à solução de 1,10-fenantrolina. $n = 3$, $C_{AU} = 250 \text{ mg L}^{-1}$ e $C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$	92
Tabela 25 – Valores de absorbância obtido para os ensaios de aumento de sensibilidade $n = 3$, $C_{AU} = 250 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{pH} = 4$ e $C_{\text{HCl}} = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$	93
Tabela 26 – Descrição dos níveis e codificação de cada fator	94
Tabela 27 – Matriz de ensaios descrevendo os fatores codificados utilizados no planejamento experimental	94
Tabela 28 – Resultados dos ensaios do planejamento experimental por meio da reflectância e da imagem digital. $C_{AU} = 250 \text{ mg L}^{-1}$ e $n = 3$	94

Tabela 29 – Fatores codificados e não-codificados utilizados no planejamento composto central	98
Tabela 30 – Valores de absorvância de cada ensaio do planejamento utilizando detecção por reflectância ($\lambda = 515 \text{ nm}$) e imagem digital (canal verde). Concentração de AU = 250 mg L^{-1} e $n = 3$	98
Tabela 31 – Valores críticos de concentração de OH^- e de tempo de aquecimento	101
Tabela 32 – Confirmação do máximo de absorvância da superfície de resposta. Concentração de AU = 250 mg L^{-1} e $n = 3$	102
Tabela 33 – Condições experimentais para a determinação de ácido úrico em urina	102
Tabela 34 – Determinação semi-quantitativa visual de diferentes concentrações da curva analítica do AU	105
Tabela 35 – Porcentagem de repetibilidades intra-dia e inter-dia para o ácido úrico	106
Tabela 36 – Fator de interferência para os interferentes de ácido úrico em urina	107
Tabela 37 – Fator de interferência do ácido ascórbico com o borbulhamento de ar na amostra	107
Tabela 38 – Figuras de mérito obtidas pelo método comparativo por HPLC	109
Tabela 39 – Aplicação do método proposto e do método comparativo em amostras de urina sintética	110
Tabela 40 – Aplicação do método proposto e do método comparativo em amostras de urina natural	111
Tabela 41 – Comparação de parâmetros entre o método proposto e o comparativo	113
Tabela 42 – Custo de equipamento e análise pelo método comparativo e o proposto	114
Tabela 43 – Figuras de mérito de diversas metodologias descritas na literatura para determinação de creatinina	116
Tabela 44 – Figuras de mérito de diversas metodologias descritas na literatura para determinação de ácido úrico	117

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

α	Inclinação da curva analítica de A_R versus concentração do analito
ϵ	Absortividade molar
σ	Desvio-padrão da medida de 10 brancos
μ PAD	Dispositivo analítico microfluídico em papel;
$\lambda_{\text{máx.}}$	Comprimento de onda de máxima absorbância
A	Absorbância;
ACP	Ácido pícrico;
AU	Ácido úrico;
A_R	Densidade ótica para medidas de reflectância
b	Caminho ótico
B	Canal azul;
C	Concentração;
C_{AU}	Concentração de ácido úrico;
C_{CRN}	Concentração de creatinina;
CRN	Creatinina;
CMC	Concentração micelar crítica;
DAD	Detector de arranjo de diodo, do inglês <i>Diode Array Detector</i> ;
DTAB	Brometo de dodeciltrimetilamônio, do inglês <i>dodecyltrimethylammonium bromide</i> ;
ERD	Espectroscopia de reflectância difusa;
Fen	1,10 – fenantrolina;
FI	Fator de Interferência;
FIA	Análise por injeção em fluxo, do inglês <i>Flow injection analysis</i> ;
G	Canal verde;
h	Altura;
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
I	Intensidade transmitida ou intensidade da radiação refletida;
I_0	Intensidade da radiação incidente;
IRC	Insuficiência renal crônica;
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry;
k	Coeficiente de absorção;
LD	Limite de detecção;
LQ	Limite de Quantificação;
NaOAc	Acetato de sódio;
PDMS	Polidimetilsiloxano;
ppi	Pixels por polegada, do inglês <i>pixels per inch</i> ;
R	Canal vermelho;
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>relative standard deviation</i> ;
s	Coeficiente de espalhamento ou dispersão;
SDS	Dodecilsulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulphate</i> ;
SD	Desvio padrão, do inglês <i>standard deviation</i> ;
T_R	Capacidade de reflectância difusa da camada dispersa semi-infinita;
t_R	Tempo de retenção;
UV-Vis	Ultravioleta-visível
μ PAD	Dispositivo analítico microfluídico em papel, do inglês <i>microfluidic paper-based analytical device</i> ;

w	Largura;
\bar{x}	Média;
X_{AU}	Fração molar do ácido úrico.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Rins	20
1.2	Compostos nitrogenados presentes na urina	22
1.3	Creatinina	23
1.3.1	<i>Metodologias para análise de creatinina</i>	24
1.4	Ácido úrico	27
1.4.1	<i>Metodologias para análise de ácido úrico</i>	28
1.5	Considerações gerais sobre Química Verde, procedimentos e técnicas ambientalmente mais amigáveis utilizados no presente trabalho	31
1.5.1	<i>Química Verde</i>	31
1.5.2	<i>Espectroscopia de Reflectância difusa</i>	32
1.5.3	<i>Imagem digital</i>	33
1.5.4	<i>Barreiras hidrofóbicas</i>	35
2	OBJETIVOS	38
3	PARTE EXPERIMENTAL	39
3.1	Equipamentos	39
3.2	Reagentes	40
3.3	Soluções	41
3.3.1	<i>Soluções gerais</i>	41
3.3.2	<i>Soluções estoque dos analitos</i>	42
3.3.3	<i>Soluções para a calibração da imagem digital</i>	42
3.3.4	<i>Soluções para testes preliminares</i>	42
3.3.5	<i>Soluções para estabilidade do produto</i>	43
3.3.6	<i>Determinação da estequiometria da reação do ácido úrico</i>	43
3.3.7	<i>Soluções para interação papel-analito</i>	43
3.3.8	<i>Soluções para testar o aumento da sensibilidade</i>	43
3.3.9	<i>Soluções utilizadas no planejamento fatorial</i>	44
3.3.10	<i>Soluções utilizadas no planejamento composto central</i>	44
3.3.11	<i>Soluções utilizadas no μPAD</i>	45
3.3.12	<i>Soluções utilizadas na construção da curva analítica</i>	46
3.3.13	<i>Estudo de interferentes</i>	46
3.3.14	<i>Fase móvel para HPLC</i>	47
3.3.15	<i>Urina sintética</i>	47
3.3.16	<i>Urina natural</i>	47
3.4	Metodologias	48
3.4.1	<i>Spot-test</i>	48
3.4.2	<i>Dispositivo analítico microfluídico em papel (μPAD)</i>	49
3.4.3	<i>Deteção por imagem digital</i>	50
3.4.4	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)</i>	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
4.1	Calibração da deteção por imagem digital	53
4.1.1	<i>Seleção dos canais de cores</i>	53
4.1.2	<i>Influência de diferentes resoluções e áreas</i>	56
4.2	Calibração do aquecimento do meio reacional	58

4.3	Desenho do μPAD	59
4.3.1	<i>Confecção das barreiras hidrofóbicas</i>	60
4.3.2	<i>Largura dos canais</i>	60
4.3.3	<i>Diâmetro e forma das zonas</i>	62
4.3.4	<i>Interação do analito com o papel</i>	63
4.3.5	<i>Desenho final do μPAD</i>	64
4.3.6	<i>Volume do μPAD</i>	65
4.4	Creatinina	66
4.4.1	<i>Testes qualitativos</i>	66
4.4.2	<i>Obtenção do espectro de absorção e canal de maior sensibilidade</i>	68
4.4.3	<i>Estabilidade do produto da reação</i>	69
4.4.4	<i>Estudo dos fatores que podem alterar o sinal analítico</i>	70
4.4.5	<i>Otimização das condições experimentais</i>	71
4.4.5.1	Planejamento fatorial	71
4.4.5.2	Planejamento composto central	75
4.4.6	<i>Condições do μPAD</i>	80
4.4.7	<i>Curva analítica</i>	82
4.4.8	<i>Estudo de interferentes</i>	84
4.5	Ácido úrico	85
4.5.1	<i>Testes qualitativos</i>	85
4.5.2	<i>Determinação da estequiometria da reação</i>	87
4.5.3	<i>Obtenção do espectro de absorção e canal de maior sensibilidade</i>	89
4.5.4	<i>Estabilidade do produto da reação</i>	91
4.5.5	<i>Fatores que alteram o sinal analítico</i>	92
4.5.5.1	Concentração de H ⁺ e pH	92
4.5.5.2	Aquecimento do meio reacional	93
4.5.6	<i>Otimização das condições experimentais</i>	93
4.5.6.1	Planejamento fatorial	93
4.5.6.2	Planejamento composto central	97
4.5.7	<i>Condições do μPAD</i>	102
4.5.8	<i>Curva analítica</i>	104
4.5.9	<i>Estudo de interferentes</i>	106
4.6	Método comparativo – HPLC	107
4.6.1	<i>Curvas analíticas do método comparativo – HPLC</i>	107
4.7	Aplicação da metodologia em amostras	109
4.7.1	<i>Urina sintética</i>	109
4.7.2	<i>Urina natural</i>	110
4.8	Comparação das metodologias	112
5	CONCLUSÃO	118
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	119
	REFERÊNCIAS	120

1 INTRODUÇÃO

1.1 Rins

O aparelho urinário é constituído por dois rins, dois ureteres, uma bexiga e uma uretra, como ilustrado na figura 1.

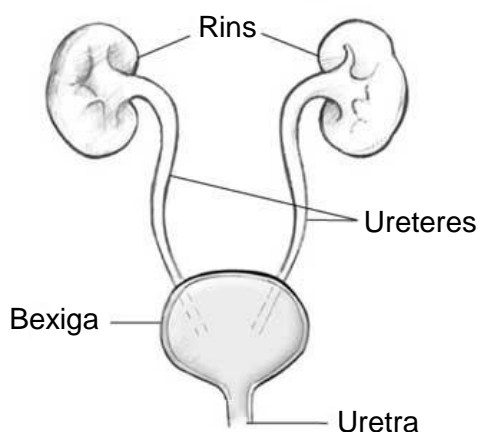


Figura 1 – Ilustração do sistema urinário
Fonte: adaptado de KIDNEY..., 2006.

Os rins têm funções que podem ser caracterizadas como excretora, reguladora e endócrina, sendo responsável pelos seguintes papéis (SOCIEDADE..., 2015a):

- Excreção de substâncias: atuam como filtros do sangue eliminando substâncias tóxicas;
- Regulação da formação dos ossos e do sangue: regulam a concentração de cálcio e fósforo no sangue e da produção de uma forma ativa da vitamina D, fundamental para a regulação da formação óssea e por produzir o hormônio eritropoietina que auxilia na maturação dos glóbulos vermelhos do sangue e da medula óssea;
- Regulação da pressão sanguínea: o controle da concentração de sódio e a quantidade de líquido no corpo que afeta a pressão sanguínea é função dos rins, além de secretarem a enzima renina que estimula a produção do hormônio aldosterona que eleva a pressão sanguínea;
- Balanço osmótico: regulam a quantidade de água e a concentração de íons e substâncias no organismo através da filtração do sangue;
- Excreção de hormônios endócrinos: além do hormônio eritropoietina, as glândulas suprarrenais liberam outros hormônios como aldosterona e a

adrenalina.

A perda das funções dos rins caracteriza a insuficiência renal, podendo ser aguda ou crônica. A insuficiência renal aguda é a perda rápida da função renal e que se mantém por períodos variáveis, o que pode resultar na falência renal. Em muitos casos a diálise pode reestabelecer as funções renais, porém, nem sempre o procedimento é eficaz (SOCIEDADE..., 2015b).

A IRC é caracterizada pela perda lenta, progressiva e irreversível das funções renais. Devido a lentidão dessa perda, o organismo passa por um processo adaptativo, que pode manter o paciente assintomático até que cerca de 50% da função renal tenha sido comprometida. Normalmente é a partir desse ponto que os sintomas se iniciam, sendo os sintomas mais comuns: anemia leve, pressão alta, edema dos olhos e pés e mudança nos hábitos de urinar e do aspecto da urina. As duas principais causas da IRC são diabetes e hipertensão, e a terceira maior causa é a glomerulonefrite, que é a inflamação dos glomérulos, a unidade funcional dos rins (SOCIEDADE..., 2015b).

É possível o tratamento do paciente apenas com medicamentos e dieta até que reste apenas de 10 a 15% da função renal, quando o funcionamento fica abaixo desses valores tornasse necessária a utilização de diálise ou transplante renal (SOCIEDADE..., 2015b).

O transplante renal é complexo e devido à compatibilidade entre receptor e doador pode demorar muito tempo, como demonstrado pelo censo de 2013 no qual a fila de espera é estimada em 31.351 pacientes (SOCIEDADE..., 2013).

A diálise é um procedimento que aumenta a sobrevida de pacientes com problemas renais, porém, é de alta complexidade, apresenta elevado custo e requer assistência altamente especializada e tecnologia avançada (CHAVES, 2002). O crescente aumento do número de pacientes que se submetem a diálise (figura 2) indica que a incidência da insuficiência renal vem aumentando com o passar dos anos.

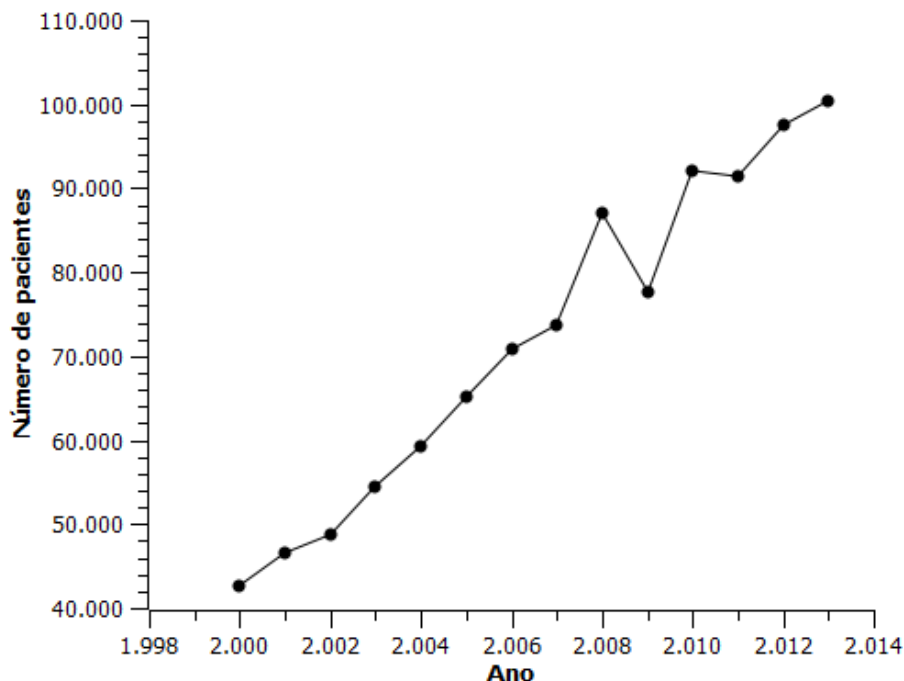


Figura 2 – Número de pacientes que se submeteram a diálise em função do ano
Fonte: elaborado pelo autor com os resultados obtidos em SOCIEDADE..., 2013.

Sendo a IRC uma doença silenciosa, a única forma de avaliar a função é através da dosagem de biomarcadores. Dois biomarcadores muito utilizados são a creatinina e o ácido úrico. Sua dosagem em urina pode fornecer informações importantes sobre a função renal, possibilitando o diagnóstico precoce o que aumenta as chances de cura ou retardamento da doença.

1.2 Compostos nitrogenados presentes na urina

O nitrogênio está em diversas biomoléculas presentes nos seres humanos. A maior fração do nitrogênio no organismo está concentrada nas proteínas e ácidos nucléicos. O catabolismo dessas substâncias resulta em mais de 15 compostos nitrogenados conhecidos como não-proteicos. Esses compostos são excretados na corrente sanguínea e os rins atuam de modo a filtrá-los, excretando-os do organismo. Dessa forma, a urina é rica em metabólitos não-proteicos, como mostrado na tabela 1 (MOTTA, 2003).

Dentre os metabólitos nitrogenados não-proteicos excretados na urina, destacam-se a creatinina e o ácido úrico, que se monitorados podem fornecer informações importantes a respeito do funcionamento dos rins (MOTTA, 2003; BASTOS, 2009).

Tabela 1 – Metabólitos nitrogenados na urina**

Metabólito**	% de nitrogênio na urina
Aminoácidos	<1
Amônia	10 – 20
Ureia	55 – 90
Creatinina	2 – 3
Ácido úrico	1 – 1,5

Fonte: adaptado de Motta (2003)

**Estes compostos compreendem cerca de 90% das substâncias não-proteicas na urina

1.3 Creatinina

A creatina pode ser sintetizada através de duas reações enzimáticas que ocorrem nos rins, fígado e pâncreas. Ela é então transportada pelo sangue ao cérebro e células musculares, onde é fosforilada a fosfocreatina. Tanto a creatina como a fosfocreatina são convertidas espontaneamente em creatinina no metabolismo da contração muscular (figura 3).

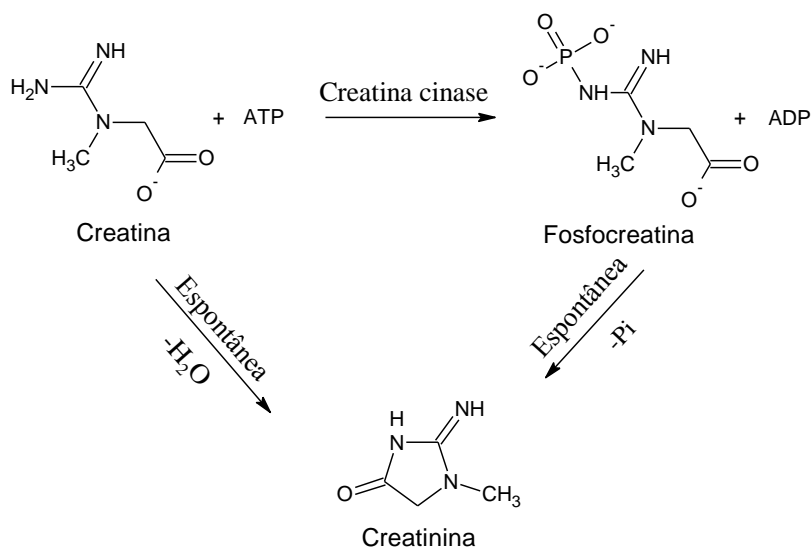


Figura 3 – Conversão de creatina e fosfocreatina em creatinina na contração muscular

Fonte: elaborada pelo autor.

A creatinina produzida pelo organismo não é aproveitada em nenhuma rota biossintética, sendo apenas um produto da creatina. Dessa forma, a creatinina difunde-se do músculo para o sangue, o qual é retirado através da filtração glomerular. A quantidade de creatinina que é excretada diariamente é proporcional à massa muscular e não é afetada pela dieta, idade, sexo ou atividade física e é cerca de 2% da reserva de creatina do organismo. Mulheres excretam menos creatinina

devido à menor massa muscular. Os valores de referência para creatinina sérica e urina de 24 horas estão descritos na tabela 2 (MOTTA, 2003). Para indivíduos saudáveis, o volume urinário de 24 horas médio é de 1,2 litros e a massa corpórea de 70 quilos. Assim, os valores de referência para mulheres em urina de 24 horas seria entre 640 e 1170 mg L⁻¹ e para homens entre 815 e 1520 mg L⁻¹.

Tabela 2 – Valores de referência para creatinina sérica e urina de 24 horas

Valores de referência para a creatinina	
Homem (sérica)	0,6 a 1,2 mg dL ⁻¹
Mulher (sérica)	0,6 a 1,1 mg dL ⁻¹
Homem (urina de 24 h)	14 a 26 mg kg ⁻¹ d ⁻¹
Mulher (urina de 24 h)	11 a 20 mg kg ⁻¹ d ⁻¹

Fonte: adaptado de Motta (2003).

A taxa de creatinina excretada é relativamente constante e independente de metabolismo proteico e fatores externos, sendo assim, é um importante marcador clínico para a função renal. Aumento da creatinina sérica e decréscimo na concentração encontrada na urina estão associados com a deterioração da função renal. Através da determinação da creatinina sérica e presente na urina é possível determinar a taxa de filtração glomerular renal, um importante indicador de disfunção renal. A excreção de creatinina pelo organismo é calculada pela equação 1:

$$\frac{\text{Conc. na urina}}{\text{Conc. sérica}} \times \text{vol. urina} \left(\frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) \times \frac{1,73}{\text{área superficial do corpo}} \quad (\text{Equação 1})$$

Taxas de excreção entre 20 a 40% indicam doença renal grave, 40 a 60% insuficiência moderada e 60 a 80% disfunção leve do nível normal para creatinina (NARAYANAN, 1980).

1.3.1 Metodologias para análise de creatinina

A determinação da creatinina em urina ou no sangue é tradicionalmente realizada através do método de Jaffé por ser simples, rápido, barato e de fácil execução. Nesse método colorimétrico, o picrato alcalino reage com a creatinina formando um produto de coloração laranja-avermelhada (complexo de Janovsky), com máximo de absorção em 510 nm. Essa reação é conhecida por ser inespecífica para a creatinina, pois muitos compostos podem fornecer resultados superestimados

ou subestimados, porém, a quantidade desses compostos presentes na urina é negligenciável (NARAYANAN, 1980; WANG, 2012). Além da reação colorimétrica, também é utilizada a reação enzimática, na qual a enzima creatinina amidohidrolase gera H_2O_2 como subproduto, que pode ser quantificado (NIEH, 2013). Outras metodologias analíticas foram desenvolvidas para a análise de creatinina em soro sanguíneo ou urina e estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Métodos analíticos utilizados para determinação de creatinina

Método analítico	Amostra	Observações	Referências
FIA com detecção espectrofotométrica no visível	Urina	Necessita de bombas peristálticas, consumo de ACP de $2,1 \text{ mg amostra}^{-1}$ e o resíduo é tratado online com $TiO_2 + H_2O_2 +$ radiação UV	CORREIA, 2004
Sistema microfluídico portátil com chip de PDMS com detecção espectrofotométrica no visível	Urina	Utiliza aquecimento, bombas de seringa e consome $1,15 \text{ mg amostra}^{-1}$ de ACP	SONGJAROEN, 2009
Reflectância difusa, com detecção no UV	-	Necessita de pré-concentração a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 h	BERGÉ-LEFRANC, 2010
Espectrofotométrico no visível	Soro	Medidas após 30 min da reação	KRISHNEGOWDA, 2013
Amperométrico	Urina	Utiliza enzimas e a análise pode sofrer interferência de vários compostos	NIEH, 2013
Eletroforese capilar com detecção espectrofotométrica no UV	Urina	Amostra necessita ser acidificada	PAVLÍCEK, 2014
HPLC com detecção no UV	Urina	Utiliza metanol na fase móvel	XIANG, 2014
HPLC com detecção no UV	Urina	Utiliza metanol na fase móvel	REMANE, 2015

Correia (2004) desenvolveu uma metodologia que emprega FIA com a reação de Jaffé para a detecção espectrofotométrica da creatinina utilizando tratamento *online* do resíduo formado. A análise em fluxo permite a determinação de $70 \text{ amostras h}^{-1}$ e proporciona um baixo consumo de reagentes ($2,1 \text{ mg amostra}^{-1}$). Porém, são necessárias bombas peristálticas para a propulsão da amostra pelo

sistema e utiliza 200 μL de amostra por análise.

Songjaroen (2009) utilizou um sistema microfluídico portátil com chip de PDMS para análise por FIA e detecção espectrofotométrica ($\lambda_{\text{máx}} = 510 \text{ nm}$) da creatinina utilizando a reação de Jaffé. O sistema microfluídico apresenta diversas vantagens como baixo consumo de reagente ($1,15 \text{ mg amostra}^{-1}$) e amostra ($5 \mu\text{L}$) e análises rápidas. Entretanto, é necessário aquecimento do chip para promoção da reação e utiliza bombas de seringa para propulsão das soluções. Difere do método descrito por Correia (2004) por ser realizado em sistema microfluídico e não realizar tratamento do resíduo formado.

Bergé-Lefranc (2010) descreveu pela primeira vez a determinação de creatinina utilizando a espectroscopia de reflectância difusa no UV. As amostras são pré-concentradas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 12 horas em meio de tampão fosfato e albumina em zeólitas do tipo mordenita, que também é utilizado como suporte sólido para as análises. Como as análises são realizadas no UV, outras substâncias orgânicas presentes na urina que também absorvem no UV podem interferir na análise. O pré-tratamento demorado pode inviabilizar a aplicação da metodologia.

O método espectrofotométrico utilizado por Krishnegowda (2013) difere dos demais por não utilizar a reação de Jaffé, mas sim a reação de oxidação do p-metilaminofenol na presença de creatinina e cobre, formando um produto colorido com λ_{max} em 530 nm. Dessa forma, elimina a interferência de vários compostos da reação de Jaffé. Porém, devido a cinética lenta da reação, são necessários 30 minutos para a realização das análises.

A amperometria foi utilizada por Nieh (2013) para análise de creatinina em urina. O método se baseia na detecção de H_2O_2 formado através da quebra da creatinina, na presença de O_2 , utilizando quatro enzimas. A análise eletroquímica pode sofrer interferência de várias substâncias do meio biológico e a utilização de quatro enzimas pode dificultar a reprodutibilidade da metodologia.

Pavlícek (2014) desenvolveu um método eletroforético capilar rápido para análise de creatinina em urina, sendo necessários apenas 1,3 minuto para realização de uma determinação. Foram utilizados dois capilares de diâmetros diferentes para separar os componentes da amostra. A principal vantagem dos métodos por eletroforese é a utilização de soluções aquosas tamponadas para realizar a separação dos componentes.

Xiang (2014) e Remane (2015) desenvolveram metodologias analíticas envolvendo separações cromatográficas por HPLC com detecção no UV para quantificação de creatinina em urina, além de outros analitos como ácido úrico, ácido homovanílico, xantina, entre outros. A cromatografia permite a determinação de várias substâncias simultaneamente, além de ser uma técnica muito robusta e confiável. Entretanto, faz uso de metanol como constituinte da fase móvel, o qual oferece riscos ao operador e ao meio ambiente.

1.4 Ácido úrico

Em seres humanos, o ácido úrico (Figura 4) é formado no fígado através do catabolismo de bases purínicas (adenosina e guanina). Os nucleosídeos purínicos são encontrados nos ácidos nucleicos (DNA e RNA) e também em outros compostos metabólitos importantes para o organismo, tais como ADP e ATP (MOTTA, 2003).

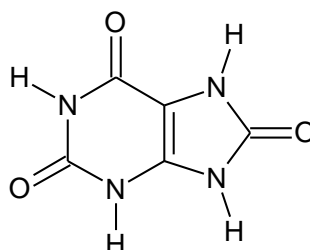


Figura 4 – Estrutura do ácido úrico
Fonte: elaborada pelo autor.

Conhecer as propriedades físico-químicas do ácido úrico é muito importante, pois dependendo das condições do meio pode haver mudança em suas propriedades. Por exemplo, o primeiro pKa do ácido úrico é de 5,4 (LIDE, 2008), assim, no sangue que apresenta pH próximo de 7,4 a forma predominante do composto é o urato de sódio. Já em urinas com o pH abaixo de 5,4 a forma predominante é do ácido úrico. Também, a forma monossódica é aproximadamente dez vezes mais solúvel que na forma totalmente protonada (BURTIS, 2001).

A hiperuricemia ocorre quando a concentração de ácido úrico no plasma ou no soro sanguíneo atinge a supersaturação, ou seja, concentrações acima de 7,0 mg dL⁻¹. O caso clínico caracterizado pela precipitação da solução supersaturada de urato monossódico nos líquidos corporais é conhecido como gota, no qual cristais de urato são depositados nas juntas das extremidades ou em outros tecidos moles.

Aproximadamente 20% dos pacientes que apresentam gota clínica também apresentam cálculos de ácido úrico no aparelho urinário (MOTTA, 2003). Também, pacientes com hiperuricemia apresentam maior incidência de IRC (BASTOS, 2009), evidenciando a importância da dosagem de ácido úrico para a prevenção da IRC.

Concentrações séricas de urato abaixo de 2,0 mg dL⁻¹ definem a hipouricemia, que tem pouca importância clínica, podendo estar relacionada com doença hepatocelular grave, defeito na reabsorção tubular renal do ácido úrico e tratamento excessivo de hiperuricemia (MOTTA, 2003; BURTIS, 2001).

Os valores de referência para ácido úrico estão descritos na tabela 4. Para indivíduos saudáveis, o volume urinário de 24 horas médio é de 1,2 litros, sendo assim, os valores de referência em urina de 24 horas estão entre 210 e 625 mg L⁻¹.

Tabela 4 – Valores de referência para ácido úrico em exames de urina

	Mulheres	Homens
Soro sanguíneo	2,6 a 6,0 mg dL ⁻¹	3,5 a 7,2 mg dL ⁻¹
Urina de 24 horas	250 a 750 mg dia ⁻¹	

Fonte: adaptado de Motta (2003).

1.4.1 Metodologias para análise de ácido úrico

A análise do ácido úrico é feita tradicionalmente pelo método colorimétrico, com o emprego do ácido fosfotúngstico em meio alcalino, gerando o azul de tungstênio, medido no comprimento de onda de 700 nm, e pelo método enzimático, no qual o ácido úrico é convertido a alantoína e peróxido de hidrogênio pela uricase. Ambos os métodos apresentam limitações, pois o método colorimétrico é sujeito a interferências de outros agentes redutores e o método enzimático além de ser de difícil automação, o produto absorve próximo a 290 nm, fora do alcance de espectrofotômetros comuns (TRIVEDI, 1978). Outras metodologias analíticas foram desenvolvidas para a determinação de ácido úrico em amostras de soro sanguíneo ou urina, sendo algumas descritas na tabela 5.

Tabela 5 – Métodos analíticos utilizados para determinação de ácido úrico

Método analítico	Amostra	Observações	Referências
Espectroscopia de reflectância difusa no visível	Soro	Análises feitas a 37 °C	STEVENS, 1983
μPAD com detecção colorimétrica por imagens digitais utilizando câmera digital	Urina e soro	Utiliza enzimas e múltiplos indicadores para as reações colorimétricas	DUNGCHAI, 2010
μPAD 3D com detecção colorimétrica por imagens digitais utilizando câmera digital	Soro	Utiliza duas enzimas para a reação e solvente orgânico para a fabricação do μPAD	CHEN, 2012
Voltametria cíclica	Urina e soro	Utiliza eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono e nanopartículas de fluoreto de hólmio	NOROOZIFAR, 2013
Espectrofotométrica no UV utilizando análise multivariada ($\lambda = 292$ nm)	Urina e soro	Utiliza os métodos de calibração dos mínimos quadrados parciais e regressão por componentes principais	KHAJEHSHARIFI, 2014
FIA com detecção quimiluminescente	Urina	Necessita de bombas peristálticas, utiliza reagente à base de prata, produzindo resíduo com o metal pesado	MA, 2014
Eletroforese capilar com detecção espectrofotométrica no UV	Urina	Amostra necessita ser alcalinizada para análise	PAVLÍCEK, 2014
HPLC com detecção no UV	Urina	Utiliza metanol na fase móvel	XIANG, 2014
μPAD com nanopartículas de ouro carregadas positivamente com detecção visual	Soro, porém, não aplicado	Utiliza nanopartículas de ouro carregadas positivamente e não foi feito um estudo quantitativo envolvendo detecção nos μPAD	KUMAR, 2015
HPLC com detecção no UV	Urina	Utiliza metanol na fase móvel	REMANE, 2015

Stevens (1983) desenvolveu uma metodologia empregando a detecção colorimétrica do H_2O_2 produzido pela ação da enzima uricase sobre o ácido úrico. A intensidade da coloração foi monitorada utilizando a espectroscopia de reflectância difusa no $\lambda_{m\acute{a}x}$ de 560 nm. As medidas são realizadas a 37 °C utilizando papel como suporte sólido.

Noroozifar (2013) construiu um eletrodo de carbono vítreo dopado com nanopartículas de fluoreto de holmio e nanotubos de carbono para a determinação de ácido úrico em amostras de soro e urina utilizando a voltametria cíclica. Porém, a preparação do eletrodo inclui várias etapas que envolvem aquecimento para secagem e em autoclave, sonicação e agitação, as quais dificultam a preparação e a reprodutibilidade da metodologia.

A metodologia desenvolvida por Khajehsharifi (2014) faz uso de espectrofotometria no UV e modelos multivariados de análise do tipo calibração dos mínimos quadrados parciais e regressão por componentes principais para determinar ácido úrico em amostras de urina e soro. O método é mais simples e barato do que os métodos eletroquímicos e cromatográficos.

Ma (2014) desenvolveu um método por FIA utilizando detecção quimiluminescente. Nele o ácido úrico aumenta drasticamente a intensidade luminosa emitida pela solução de Ag(III)-luminol. Apesar da vantagem inerente do método por FIA de altas taxas de amostragem, a utilização de prata pode gerar riscos ao operador e ao meio ambiente, além de necessitar de tratamento dos resíduos gerados.

Pavlícek (2014) desenvolveu um método eletroforético capilar rápido para análise de ácido úrico em urina, sendo necessários apenas 1,3 minuto para realização de uma determinação. Foram utilizados dois capilares de diâmetros diferentes para separação os componentes da amostra. A principal vantagem dos métodos por eletroforese é a utilização de soluções aquosas tamponadas para realizar a separação dos componentes, sendo que para análise do ácido úrico é utilizado pH alcalino.

Xiang (2014) e Remane (2015) desenvolveram metodologias analíticas envolvendo separações cromatográficas por HPLC com detecção no UV para quantificação de ácido úrico em urina, além de outros analitos como creatinina, ácido homovanílico, xantina, entre outros. A cromatografia permite a determinação de várias substâncias simultaneamente, além de ser uma técnica muito robusta e confiável. Entretanto, faz uso de metanol como constituinte da fase móvel, o qual oferece riscos ao operador e ao meio ambiente.

Dungchai (2010), Chen (2012) e Kumar (2015) desenvolveram metodologias que utilizam μ PAD para a determinação de ácido úrico em amostras biológicas. O

dispositivo analítico apresenta diversas vantagens, entre elas simplicidade, baixo custo e rapidez nas análises. As metodologias de Dungchai (2010) e Chen (2012) utilizam enzimas para oxidar o ácido úrico formando H_2O_2 , que é determinado colorimetricamente. A utilização de enzimas leva a maior seletividade, porém, a reprodutibilidade muitas vezes é prejudicada. Já a metodologia proposta por Kumar (2015) utiliza nanopartículas carregadas positivamente para determinação de ácido úrico em soro. As nanopartículas aumentam a sensibilidade do método, mas o método não foi aplicado em amostras reais para comprovar sua validade, não sendo realizado um estudo quantitativo envolvendo o dispositivo.

1.5 Considerações gerais sobre Química Verde, procedimentos e técnicas ambientalmente mais amigáveis utilizados no presente trabalho

1.5.1 Química Verde

O exame de urina é uma das formas mais antigas de diagnóstico e um dos exames mais importantes para a medicina, pois é um método não invasivo, rápido, simples e de baixo custo quando comparado a outros tipos de exame. Pode fornecer informações quanto a disfunções e patologias, nível de exposição a toxinas e utilização de drogas (LIN, 2011). Dessa forma, muitas metodologias foram desenvolvidas para analisar diversos componentes da urina. Dentre todas as técnicas descritas na literatura para análise de urina, algumas utilizam solventes orgânicos e reagentes nocivos ao ambiente e ao operador, além de demandar um longo tempo de análise e produzir grande volume de resíduos.

A Química Verde não se aplica somente à produção e uso de reagentes químicos, como também à metodologia analítica (ANASTAS, 1998; PEZZA, 2013). A Química Analítica Verde tem se tornado uma subárea muito importante da Química Verde (ANASTAS, 1998) e tem por objetivo o uso de procedimentos analíticos que minimizem ou eliminem a geração de resíduos e que seja mais benigno ao ambiente, o que pode ser atingido pelo desenvolvimento de novas metodologias analíticas ou modificação de métodos tradicionais que ainda não tenham sido descobertos, para incorporar procedimentos com os quesitos mencionados (PEZZA, 2013; ASSASSI, 2015).

1.5.2 Espectroscopia de Reflectância difusa

Em busca de alternativas que sejam ambientalmente amigáveis, muitos trabalhos descritos na literatura estão usando a Espectroscopia de Reflectância Difusa (ERD) para análise de fármacos (LUIZ, 2013), pesticidas (LIU, 2013) e contaminantes (LUIZ, 2015; OKPARANMA, 2014).

As aplicações iniciais da espectroscopia de reflectância difusa para determinações quantitativas associada a *spot-test* não apresentaram boas precisões e resultados (KEALEY, 1972). Após o desenvolvimento de fibras óticas e esferas de reflectância esse cenário mudou e a espectroscopia de reflectância difusa associada ao *spot-test* vem ganhando importância (NARAYANASWAMY, 1993).

O fenômeno da reflexão ocorre quando um feixe de luz atinge uma superfície. A reflexão especular e a reflexão difusa são dois processos que compõem esse fenômeno (figura 5).

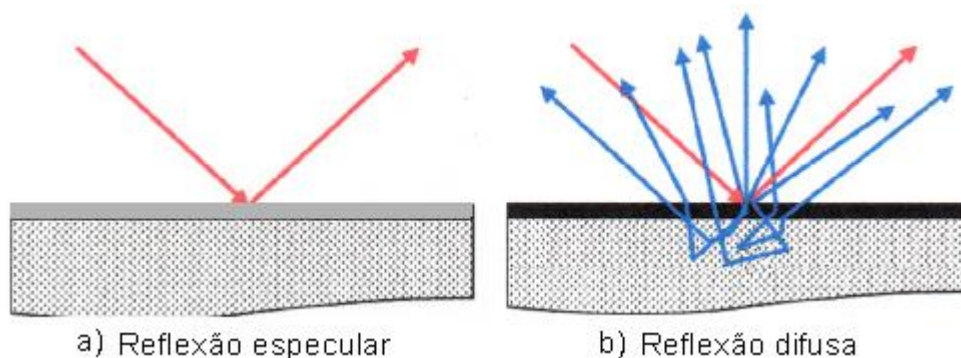


Figura 5 – Os dois tipos de reflexão que constituem o fenômeno físico: a) Reflexão especular produzido por um espelho; b) reflexão difusa produzido quando um feixe de luz incide um *spot-test* de um papel

Fonte: adaptada de Luiz (2015).

Como ilustrado na figura 5 a reflexão especular ocorre quando o feixe de luz reflete na superfície do material, sem haver transmissão através dele. Enquanto que na reflexão difusa, a radiação penetra no suporte sólido, e retorna à superfície após ocorrer absorção e dispersão parcial na camada interna do material (SVEHLA, 1975).

A teoria mais aceita para a reflectância difusa é a desenvolvida por Kubelka e Munk (GHAUCH, 1999). Nessa teoria os autores relacionam a concentração da amostra com o coeficiente de absorção (k), uma característica do analito, o coeficiente de espalhamento ou dispersão (s) e a capacidade de reflectância difusa de uma camada dispersa semi-infinita (T_R), que são dependentes do suporte sólido

(Equação 2).

$$f(T_R) = \frac{(1 - T_R)^2}{2T_R} = \frac{k}{s} \quad (\text{Equação 2})$$

Em baixas concentrações do analito a variável k é dependente da absorvidade molar (ϵ) e da concentração do analito (C) (Equação 3). Também, nessas condições para um suporte inerte (diluyente) o valor de s é determinado somente pelo diluyente e pode ser assumido como constante. Dessa forma, obtém-se uma função que relaciona a concentração com a reflectância difusa (Equação 4).

$$k = 2,303 \times \epsilon \times C \quad (\text{Equação 3})$$

$$f(T_R) = \text{Constante} \times C \quad (\text{Equação 4})$$

Em análises por reflectância, a densidade ótica para medidas de reflectância, A_R , é proporcional a T_R , que é definido como a razão da intensidade da radiação refletida (I) pela intensidade da radiação incidente (I_0) (Equação 5).

$$A_R = -\log T_R = -\log \frac{I}{I_0} \quad (\text{Equação 5})$$

Os valores de T_R variam de 0 a 1, no qual 0 representa máxima absorção do analito e 1 quando o sinal da radiação refletida é definido como o incidente, condição que é realizada com pastilhas de KBr, BaSO₄ ou MgO, que não é absorvente.

A associação da ERD com o *spot-test* permite análises mais amigáveis, pois consiste numa técnica simples, rápida, econômica e gera poucos resíduos e de baixa toxicidade, diminuindo ou eliminando os riscos ao operador ou ao meio ambiente (PEZZA, 2013). Além disso, as medidas de espectroscopia de reflectância difusa podem ser realizadas *in situ*, utilizando um reflectômetro *homemade* (SENG, 2007) ou um espectrômetro de reflectância difusa portátil.

1.5.3 Imagem digital

Com o desenvolvimento de novas tecnologias é possível obter câmeras digitais cada vez melhores com menor custo, possibilitando a disseminação da tecnologia, bem como a inclusão digital. Dessa forma, a combinação de reações colorimétricas e detecção utilizando fotografia digital oferece uma boa opção para obtenção de dados qualitativos e quantitativos visando determinações analíticas (BYRNE, 2000). Além disso, diminui o custo da análise, por substituir equipamentos caros, sendo possível ser levado a lugares inacessíveis para outras tecnologias.

Também possibilita a rápida troca de informações e dados, sendo que muitos celulares estão equipados com boas câmeras, além de ter acesso à internet.

A primeira descrição da literatura da utilização de imagem digital para detecção de analito foi por Momeni (1999), no qual foi desenvolvido um sistema para detecção quimiluminescentes da proteína ligada ao retinol. Outros autores também utilizaram a detecção por imagem digital para determinação de antibiótico (MASAWAT, 2015), aditivos alimentares (BENEDETTI, 2015; MONOSIK, 2015) e analitos de interesse biológico (BRAKTA, 2013).

O avanço da tecnologia dos computadores pessoais possibilitou o alcance da população a softwares gráficos muito eficientes, pagos, por exemplo o Photoshop®, e livres, como o ImageJ® e o Gimp®. Esses programas transformam a informação física das cores do papel ou da solução em uma estrutura quadriculada através de linguagem binárias, do tipo 0 e 1, chamado de matriz de pontos, sendo que cada ponto equivale a um pixel na imagem, com cada pixel apresentando uma intensidade específica (PACIORNIK, 2006; BENEDETTI, 2013).

Há vários modelos para a análise das cores, dentre eles os padrões RGB, CMY e HLS (PACIORNIK, 2006). Nesse trabalho, vamos nos limitar ao padrão RGB que será o utilizado para o estudo.

O padrão RGB mimetiza a percepção de cores do olho humano (PACIORNIK, 2006), pois segundo a teoria de Young-Helmholtz, o olho apresenta certas células, os cones, capazes de reconhecer cores próximas das cores vermelha (R), verde (G) e azul (B) (CARNEIRO, 2015). O padrão RGB é um modelo de adição das cores primárias, vermelha, verde e azul, que usa luz transmitida para formar as cores (YAM, 2004). Também é esse o padrão utilizado em telas que utilizam tubos de raios catódicos, como TV e monitores.

A cor é formada, pelo modelo RGB, através da soma das componentes R, G e B que variam de 0 a 255, assim, é possível obter 256^3 cores, ou seja, mais de 16,7 milhões de cores. As combinações de cores variam desde (0, 0, 0) que representa o preto, ou ausência de cor, que não apresenta contribuição das cores primárias, até o (255, 255, 255) que recebe a contribuição das três cores primárias em suas máximas intensidades, representando o branco (BENEDETTI, 2013).

1.5.4 Barreiras hidrofóbicas

O papel há muito tempo é amplamente utilizado como suporte sólido em reações de *spot-test* e como fase estacionária em cromatografia. Em *spot-test*, o analito de interesse e o reagente cromogênico são adicionados diretamente em um suporte sólido, por exemplo, papel de filtro para posterior análise por reflectância difusa ou imagem digital. A presença de barreiras hidrofóbicas sobre o suporte sólido como o papel possibilita a formação de zonas hidrofóbicas nas quais soluções aquosas não penetram, gerando zonas hidrofílicas de formato desejado, que podem melhorar a sensibilidade de metodologias analíticas. O primeiro relato na literatura da utilização de barreiras hidrofóbicas foi por Yagoda (1937).

A literatura descreve vários métodos para a fabricação de barreiras hidrofóbicas. A figura 6 descreve 12 modos de fabricação do dispositivo analítico, na qual os itens de A a C representam a fabricação manual por desenho com cera (A), desenho ou estampagem com polímero (B) e estampagem com cera (C). Nos itens D a F utilizam-se máscaras para proteger a região hidrofílica e formar as barreiras hidrofóbicas, sendo utilizada imersão em cera (D), fotolitografia (E) e serigrafia com cera (F). Nos itens G a J utilizam-se impressoras que adicionam tinta usando a impressão com tinta à base de cera (G), gravação com jato de tinta (H) e impressão com jato de tinta (I). Outro modo de fabricação é o corte ou modelagem, representado em L e K, na qual são formados canais com o auxílio de cortadores manuais (L) ou cortador a laser (K) (CATE, 2015).

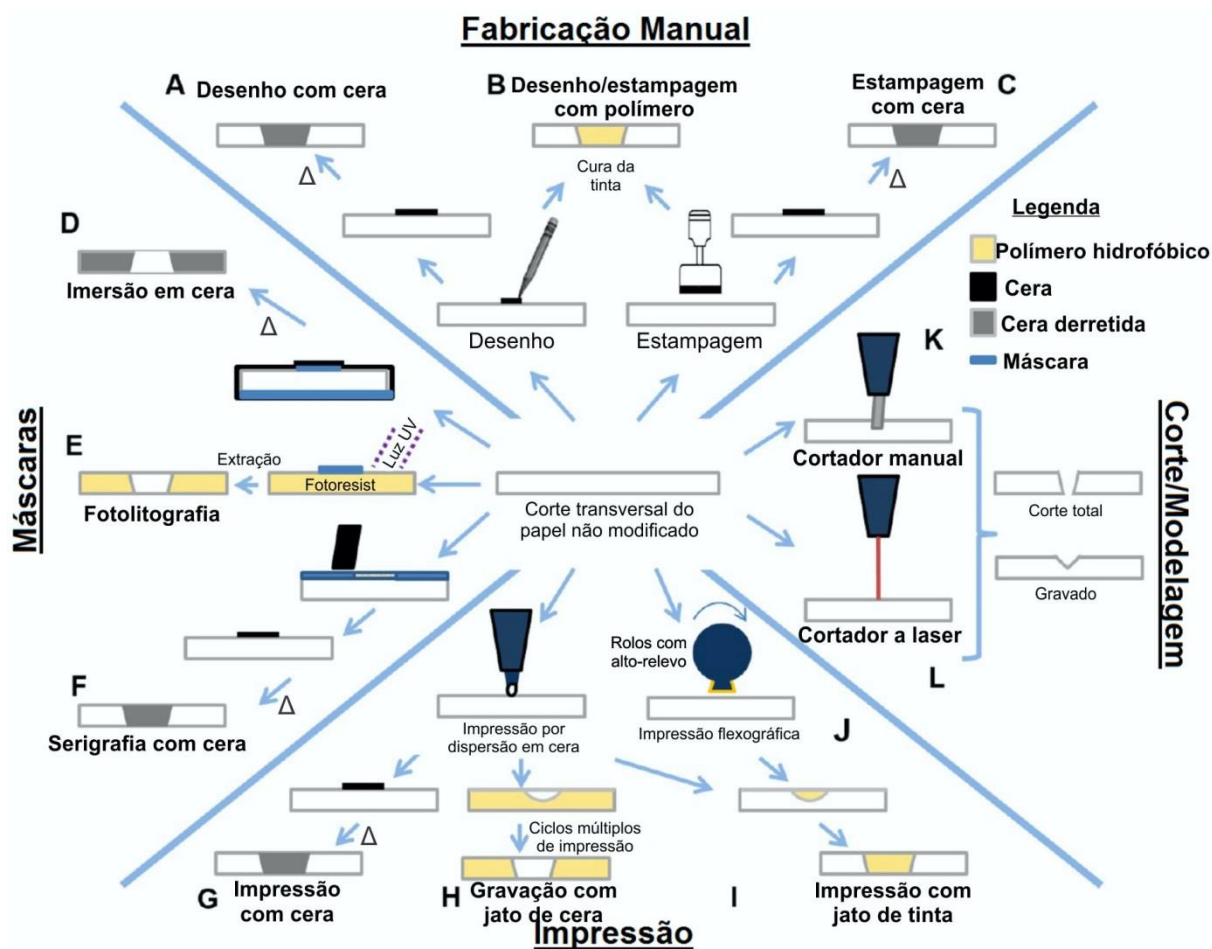


Figura 6 – Esquema de fabricação de barreiras hidrofóbicas
Fonte: adaptada de Cate (2015).

A impressão com tinta à base de cera (Figura 6 G) apresenta uma série de vantagens em relação as outras técnicas de fabricação, tais como (CARRILHO, 2009; LU, 2009): produção em larga escala, não necessita de tratamento do papel, o canal hidrofílico não é exposto a polímeros ou solventes, não são necessárias várias máscaras e pode-se criar canais abertos, semiabertos e fechados (CATE, 2015). Porém, também apresenta desvantagens como (CARRILHO, 2009; LU, 2009): o custo da impressora e dos cartuchos de cera, a necessidade de uma etapa extra de aquecimento e perda de resolução das barreiras após o aquecimento.

A diversidade de técnicas disponíveis para a fabricação das barreiras e a variedade de trabalhos da literatura utilizando-as (DORNELAS, 2015; GARCIA, 2014; MURPHY, 2015; YAMADA, 2015), demonstra a crescente importância que essa metodologia vem alcançando.

Com a possibilidade de diferentes formatos dos canais hidrofóbicos foi criado o dispositivo analítico microfluídico em papel (μ PAD), pelo grupo do professor Dr.

George Whitesides em 2007 (MARTINEZ, 2007). O μ PAD baseia-se na criação de canais hidrofílicos de formatos desejados, por meio dos quais a amostra contendo o analito de interesse é transportada para as zonas de captação, no qual há reagentes impregnados previamente que reagem com o analito. Por capilaridade os reagentes e analitos são conduzidos até a zona de teste, na qual os analitos de interesse são analisados por metodologias convenientes (MAXWELL, 2013). Nessa zona também pode haver outros reagentes necessários para a reação.

A fabricação de μ PAD para análises clínicas trouxe um modo mais rápido, econômico e que utiliza menor quantidade de amostra. Também, a detecção do analito pode ser feita utilizando imagens digitais de celulares, câmeras fotográficas e scanners. Dessa forma, o desenvolvimento dos μ PADs possibilita a realização de exames simples como de urina, sangue e saliva em vilarejos e comunidades isoladas que não possuem infraestrutura e profissionais treinados (MARTINEZ, 2010). No melhor do nosso conhecimento, não há relatos na literatura de construção de dispositivo analítico microfluídico em papel para análise colorimétrica simultânea de creatinina e ácido úrico utilizando espectroscopia de reflectância difusa e/ou imagens digitais.

2 OBJETIVOS

Geral:

No presente trabalho temos como objetivo principal a construção de um dispositivo analítico microfluídico em papel (μ PAD) para a análise simultânea de ácido úrico e creatinina em amostra de urina.

Específicos:

Avaliar a potencialidade das imagens digitais associada a softwares gráficos como método de detecção e realizar a calibração dessa técnica.

Desenvolvimento metodologias analíticas simples, rápidas, de baixo custo e ambientalmente mais amigáveis para cada um dos dois analitos:

- Escolha do reagente cromogênico;
- Determinação das condições experimentais
- Otimização dos fatores utilizando planejamento experimental;
- Estudo de interferentes;
- Construção da curva analítica;
- Determinação das figuras de mérito.

Desenvolver o desenho do dispositivo analítico e avaliar a interação papel-analito.

A determinação simultânea de ácido úrico e creatinina utilizando μ PAD em urina sintética.

Validação das metodologias analíticas com método descrito na literatura.

3 PARTE EXPERIMENTAL

A seguir serão descritas as principais características dos reagentes, soluções e equipamentos, bem como as metodologias utilizadas no presente estudo.

3.1 Equipamentos

No presente trabalho foram utilizados os seguintes equipamentos para obtenção dos resultados experimentais:

Micropipetas de volume variável de 10-100 μL , 100-1000 μL e 500-5000 μL da marca Eppendorf® e de 0,5-2,5 μL da marca Boeco® para medir volume no preparo de soluções;

Vidrarias de uso geral, tais como béqueres, erlenmeyers, placas de petri, balões volumétricos de diversos volumes classe A e bastões de vidro;

Balança analítica da marca Mettler Toledo, modelo AG204, utilizada na pesagem de reagentes e padrões;

Ultrassom da marca *Thorton*, modelo T14, com frequência de 40 kHz e potência ultrassônica de 60W, no auxílio da solubilização de reagentes;

Banho maria da marca Marconi Mini, modelo MA 126, para auxiliar na dissolução dos reagentes e controlar a temperatura da reação;

Espectrofotômetro com arranjo de fotodiodos HP 8453 com cubeta de vidro com caminho ótico de 1cm, nos ensaios realizados em solução;

Papel qualitativo n°1, marca Whatman como suporte sólido para o spot-test e para a confecção dos μPAD ;

Impressora multifuncional HP deskjet 2050 para a análise por imagem digital.

Impressora da marca Xerox® modelo Phaser™ 8560, utilizada para impressão das barreiras hidrofóbicas de cera no papel;

Estufa da marca Fanem, modelo 315 SE, utilizado para secagem de reagentes e aquecimento das barreiras de cera;

Espectrômetro portátil da marca *Ocean Optics*, modelo USB2000 com software OOIBase32, ao qual é acoplada a esfera de reflectância difusa por meio de um cabo de fibra ótica, para as medidas de reflectância;

Secador de cabelo da marca Tany, modelo PRO3000, utilizado juntamente

com garra e suporte universal para aquecimento do meio reacional;

Termômetro infravermelho sem contato da marca Omega[®], modelo OS425HT-LS, para as medidas de temperatura;

Microscópio ótico, marca Bruker, modelo Hyperion, com zoom ótico de 15 vezes acoplado com câmera marca Nikon, compara demonstrar a formação da barreira hidrofóbica no papel;

Cronômetro do relógio marca Casio, modelo W-213, utilizado para marcar o tempo de aquecimento do papel impregnado com cera e do meio reacional;

Centrífuga refrigerada da marca Hettich, modelo Universal 320R, utilizada para preparo da amostra de urina natural segundo o método comparativo;

HPLC da marca SHIMADZU LC – 20AT, com injetor automático (SIL – 20A), interface CBM – 20 A prominence e detecção DAD (SPD – M20A), equipado com coluna cromatográfica CHROMSEP SS C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), para análise pela metodologia comparativa.

3.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados durante o desenvolvimento do trabalho foram de grau analítico.

- 1,10-Fenantrolina – SIGMA ALDRICH – pureza 99 %;
- Acetato de sódio anidro – SIGMA ALDRICH – pureza 99,0 %
- Acetona – QUEMIS – pureza 99,5 %;
- Ácido 3,5-dinitrobenzóico – MERCK – pureza 99 %;
- Ácido ascórbico – MERCK – pureza 99,7 %;
- Ácido clorídrico fumegante – MERCK – pureza 37 a 38 %;
- Ácido fosfórico – MALLINCKRODT – pureza 85,3 %;
- Ácido pícrico – MERCK – para análise com teor de 99,8 %, com 0,5 mL H₂O/g;
- Ácido sulfúrico – SIGMA ALDRICH – pureza 95 a 98 %;
- Ácido úrico – SIGMA ALDRICH – pureza 99 %;
- Albumina de ovo – ACROS ORGANICS;
- Álcool etílico – TEDIA – grau HPLC pureza 90%;
- Amaranato – SIGMA ALDRICH – para análise;

- Bilirrubina – MERCK;
- Brometo de dodeciltrimetilamônio – SIGMA ALDRICH – pureza 99 %
- Carbonato de sódio – SIGMA ALDRICH – pureza 99,95 a 100,05 %;
- Cloreto de amônio – MERCK;
- Cloreto de cálcio – REAGEN – pureza 96 %;
- Cloreto de potássio – SYNTH;
- Cloreto de sódio – MALLINCKRODT – pureza 100,0 %;
- Creatina monohidratada;
- Creatinina anidra – SIGMA ALDRICH – pureza 98 %;
- Dihidrogênio fosfato de sódio – MERCK – pureza 100%
- Dodecil sulfato de sódio – SIGMA ALDRICH – pureza 98,5 %;
- Ferricianeto de potássio – SIGMA ALDRICH – pureza 99 %;
- Glicose – CHEMCO;
- Hidrogenoftalato de potássio - MERCK – pureza 99,8 %;
- Hidróxido de sódio – SIGMA ALDRICH – pureza 98,0 %;
- Metanol – J. T. Baker
- Nitrato de ferro (III) nonahidratado – SIGMA ALDRICH – pureza 98 %;
- Sulfato de sódio – MERCK;
- Tiocianato de amônio – CINÉTICA QUÍMICA – pureza 99,0%;
- Ureia – SIGMA ALDRICH;
- Água deionizada utilizada no preparo das soluções de reagentes, padrões e amostras – Millipore 0,22 μm – 18,2 M Ω .cm – 25° C;

3.3 Soluções

3.3.1 Soluções gerais

- Solução de NaOH 1 mol L⁻¹

A solução foi preparada através da dissolução de NaOH sólido e padronizada com biftalato de potássio utilizando fenolftaleína como indicador.

- Solução de HCl 1 mol L⁻¹

A solução foi preparada a partir do ácido clorídrico fumegante e padronizada com carbonato de sódio utilizando verde de bromocresol como indicador.

- Solução de H₂SO₄ 0,5 mol L⁻¹

A solução foi preparada a partir do ácido sulfúrico concentrado e padronizada com carbonato de sódio utilizando verde de bromocresol como indicador.

- Solução de H₃PO₄ 0,5 mol L⁻¹

A solução foi preparada a partir do ácido fosfórico concentrado e padronizada com hidróxido de sódio padronizado utilizando alaranjado de metila como indicador.

3.3.2 Soluções estoque dos analitos

- Solução estoque de ácido úrico 5000 mg L⁻¹

A solução estoque de ácido úrico foi preparada na concentração de 5000 mg L⁻¹, a partir da dissolução do padrão em solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

- Solução estoque de creatinina 5000 mg L⁻¹

A solução estoque de creatinina foi preparada na concentração de 5000 mg L⁻¹, a partir da dissolução do padrão em água deionizada.

3.3.3 Soluções para a calibração da imagem digital

Foi preparada uma solução estoque de $1,001 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de corante amarantho por meio da dissolução do sólido em água deionizada. As soluções de trabalho foram preparadas através de diluições convenientes da solução estoque com água deionizada.

3.3.4 Soluções para testes preliminares

- Creatinina (CRN)

- Solução de ácido pícrico¹ de concentração $1,03 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ em NaOH 0,5 mol L⁻¹;

- Solução de ácido 3,5-dinitrobenzóico de concentração $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ em NaOH 0,5 mol L⁻¹.

- Ácido úrico (AU)

- Solução de nitrato de ferro nonahidratado de concentração $1,000 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹;

¹ Foi utilizado banho de ultrassom e banho maria a 40 °C para auxiliar na solubilização do reagente.

- Solução de hexacianoferrato de ferro (III) de concentração $1,000 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.
- Solução de 1,10 – fenantrolina² de concentração de $3,001 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$

3.3.5 Soluções para estabilidade do produto

Foram utilizadas as soluções de ácido pícrico, nitrato de ferro nonahidratado e de 1,10-Fenantrolina do ensaio qualitativo para determinar a estabilidade dos produtos coloridos. No ensaio foi utilizada concentração de CRN igual a 250 mg L^{-1} e de AU igual a 200 mg L^{-1} . Foram feitas medidas por meio de imagem digital e da reflectância difusa em intervalos de tempo conhecidos.

3.3.6 Determinação da estequiometria da reação do ácido úrico

Para a determinação da estequiometria da reação de AU com Fe^{3+} foi utilizada solução de 1,10-Fenantrolina de concentração igual a $3,01 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de acetato de sódio $0,5290 \text{ mol L}^{-1}$ e solução de nitrato de ferro nonahidratado de concentração igual a $9,955 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de HCl de $0,500 \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.7 Soluções para interação papel-analito

Para esses experimentos foram utilizadas as soluções da determinação da estequiometria da reação para o ácido úrico e solução de ácido pícrico de concentração igual a $2,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, com concentração de NaOH iguais a $0,45 \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.8 Soluções para testar o aumento da sensibilidade

As soluções a seguir foram utilizadas para o aumento da sensibilidade das reações com ácido úrico e creatinina.

- Solução de SDS $0,250 \text{ mol L}^{-1}$ que foi diluída para $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ juntamente com cada um dos analitos;
- Solução de DTAB $0,250 \text{ mol L}^{-1}$ que foi diluída para $1,80 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ juntamente com cada um dos analitos;

² Todas as soluções de 1,10 – fenantrolina são preparadas em meio etanol:água (50:50) devido à baixa solubilidade do composto em água.

- Ácido úrico

Para a variação da concentração de ácido do meio foram preparadas três soluções de nitrato de ferro nonahidratado de concentração igual a $9,955 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, com concentrações de HCl de 0,500, 0,750 e 1,00 mol L^{-1} . Foi utilizada solução de 1,10-Fenantrolina de concentração igual a $3,01 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de acetato de sódio de concentrações iguais a 0,5290 mol L^{-1} para concentração de HCl igual a 0,500 mol L^{-1} , 0,8234 mol L^{-1} para concentração de HCl 0,750 mol L^{-1} e 1,117 mol L^{-1} para concentração de HCl 1,00 mol L^{-1} .

Já para a determinação do pH do meio, foram preparadas três soluções de 1,10-Fenantrolina de concentração igual a $3,01 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de NaOAc de concentrações iguais a 0,5290 mol L^{-1} para pH = 4, 0,8842 mol L^{-1} para pH = 4,5 e 1,239 mol L^{-1} para pH = 5. A solução de nitrato de ferro nonahidratado utilizada foi de concentração igual a $9,955 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de HCl de 0,500 mol L^{-1} .

3.3.9 Soluções utilizadas no planejamento fatorial

As soluções a seguir foram utilizadas para o planejamento fatorial do ácido úrico e creatinina.

- Creatinina

Foram preparadas soluções de ácido pícrico de concentrações iguais a $9,99 \times 10^{-3}$ e $2,01 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, cada uma em duplicata com concentrações de NaOH iguais a 0,5000 e 0,7502 mol L^{-1} , resultado em quatro soluções.

- Ácido úrico

Foram preparadas duas soluções de 1,10-Fenantrolina de concentrações iguais a 0,06010 e 0,1201 mol L^{-1} , em meio de NaOAc de concentração igual a 0,5290 mol L^{-1} e duas soluções de nitrato de ferro nonahidratado de concentrações iguais a 1,997 e $3,997 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de HCl 0,500 mol L^{-1} .

3.3.10 Soluções utilizadas no planejamento composto central

As soluções a seguir foram utilizadas para o planejamento composto central do ácido úrico e creatinina.

- Creatinina

Foram preparadas cinco soluções de ácido pícrico de concentração $2,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com concentrações de NaOH iguais a 0,03378, 0,03998, 0,5498, 0,6999 e 0,7623 mol L⁻¹, respectivamente.

Para a confirmação do ponto ótimo foram preparadas duas soluções de ácido pícrico de concentração igual a $2,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, com concentração de NaOH iguais a 0,4510 mol L⁻¹, para a reflectância, e 0,4370 mol L⁻¹, para a imagem digital.

- Ácido úrico

Foram preparadas cinco soluções de nitrato de ferro nonahidratado de concentrações iguais a $1,38 \times 10^{-2}$, $2,000 \times 10^{-2}$, $3,500 \times 10^{-2}$, $4,999 \times 10^{-2}$ e $5,619 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, em meio de HCl 0,500 mol L⁻¹. Uma solução de 1,10-Fenantrolina de concentração igual a $6,010 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, em meio de NaOAc de concentração igual a 0,5290 mol L⁻¹.

Para a confirmação do ponto ótimo foram preparadas duas soluções de nitrato de ferro nonahidratado de concentrações iguais a $3,79 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, para a reflectância, e $4,48 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, para a imagem digital. Foi utilizada a solução de 1,10-Fenantrolina mencionada no parágrafo anterior.

3.3.11 Soluções utilizadas no μ PAD

As soluções a seguir foram utilizadas para determinar as condições do μ PAD.

- Creatinina

Foram preparadas três soluções de ácido pícrico de concentrações iguais a $2,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ com concentração de NaOH igual a 0,437 mol L⁻¹, $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ com concentração de NaOH igual a 1,00 mol L⁻¹ e $1,00 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ com concentração de NaOH igual a 0,900 mol L⁻¹.

- Ácido úrico

Foram preparadas duas soluções de nitrato de ferro nonahidratado de concentração iguais a $4,48 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹, uma em meio de H₂SO₄ 0,25 mol L⁻¹ e outra em meio de H₃PO₄ 0,5 mol L⁻¹. Também, uma solução de 1,10-fenantrolina de concentração igual a $6,010 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ em meio de NaOAc de concentração igual

a $0,5290 \text{ mol L}^{-1}$.

3.3.12 Soluções utilizadas na construção da curva analítica

As soluções a seguir foram utilizadas para construção da curva analítica do ácido úrico e creatinina.

- Creatinina

Foi preparada solução de ácido pícrico de concentração igual a $1,00 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, com concentração de NaOH igual a $1,000 \text{ mol L}^{-1}$. O volume de $2 \mu\text{L}$ dessa solução foi aplicada a zona de captação.

As soluções de trabalho da curva analítica de concentrações iguais a 50 a 1000 mg L^{-1} foram preparadas por diluição da solução estoque, do item 3.3.2, em balão de $25,00 \text{ mL}$ e completados com água deionizada a temperatura ambiente.

- Ácido úrico

Foi preparada uma solução de nitrato de ferro nonahidratado de concentração iguais a $4,48 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de H_2SO_4 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$. Também, uma solução de 1,10-Fenantrolina de concentração igual a $6,010 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$, em meio de NaOAc de concentração igual a $0,5290 \text{ mol L}^{-1}$. O volume de $2 \mu\text{L}$ da solução de Fe (III) foi aplicada na zona de teste e o mesmo volume de 1,10-Fenantrolina na zona de captação.

As soluções de trabalho da curva analítica de concentrações iguais a 50 a 1000 mg L^{-1} foram preparadas por diluição da solução estoque, do item 3.3.2, em balão de $25,00 \text{ mL}$ e completados com água deionizada a temperatura ambiente.

3.3.13 Estudo de interferentes

Foram preparadas soluções de 200 mg L^{-1} de cada possível interferente para o AU (acetona, ácido ascórbico, albumina, bilirrubina, creatina, creatinina, glicose, piruvato, ureia, CaCl_2 , KCl, KH_2SO_4 , NaCl, Na_2SO_4 e NH_4Cl) e para a CRN (acetona, ácido ascórbico, ácido úrico, albumina, bilirrubina, creatina, glicose, piruvato, ureia, CaCl_2 , KCl, KH_2SO_4 , Na_2SO_4 , NaCl e NH_4Cl), juntamente com a mesma concentração dos analitos. Para a ureia também foi preparada a solução de concentração 2000 mg L^{-1} de ureia para 200 mg L^{-1} de analito (1:10). A solução de

bilirrubina foi preparada na concentração de 5 mg L⁻¹ juntamente com 200 mg L⁻¹ do analito (25:1).

3.3.14 Fase móvel para HPLC

A fase móvel utilizada consistia em uma mistura de solução aquosa de NaH₂PO₄ (50,00 x 10⁻³ mol L⁻¹) e metanol (95:5).

3.3.15 Urina sintética

A solução de urina sintética utilizada nas determinações de creatinina e ácido úrico foi preparada de acordo com o descrito na literatura (LAUBE, 2001), com exceção da creatinina. A composição da urina sintética está descrita na tabela 6. Foram feitas adições dos analitos e as determinações realizadas pela metodologia proposta e comparativa. A solução final teve o pH ajustado entre 8 e 9 para evitar a precipitação do ácido úrico (BURTIS, 2001).

Para a análise utilizando a metodologia desenvolvida, as amostras de urina sintética foram diluídas 3 vezes com água deionizada. Para a análise utilizando a metodologia comparativa (XIANG, 2014), as amostras foram diluídas de 10 a 30 vezes com a fase móvel.

Tabela 6 – Composição da urina sintética

Substância	Concentração (g L⁻¹)
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,10
NaCl	2,93
Na ₂ SO ₄	2,25
KH ₂ PO ₄	1,40
KCl	1,60
NH ₄ Cl	1,00
Ureia	25,00

Fonte: Adaptada de Laube (2001).

3.3.16 Urina natural

Todas amostras de urina natural analisadas foram coletadas em frascos limpos e seu pH foi ajustado entre 8 e 9 para evitar a precipitação do ácido úrico (BURTIS, 2001). A amostras foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C em geladeira. Foram coletadas amostras apenas do próprio autor do trabalho, o qual havia a certificação de tratar-se de indivíduo saudável e não faz uso de

medicamentos.

Para a análise utilizando a metodologia desenvolvida, as amostras de urina natural foram borbulhadas por 20 minutos com ar na vazão de $1,2 \text{ L min}^{-1}$ e diluídas 3 vezes com água deionizada. O preparo da amostra para a metodologia comparativa foi realizado conforme descrito na literatura (XIANG, 2014), na qual a urina natural é diluída 5 vezes com a fase móvel e as proteínas são precipitadas por centrifugação a 6000 rpm por 10 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$; o sobrenadante é diluído 3 vezes com a fase móvel e a solução final é filtrada com filtro de seringa $0,45 \mu\text{m}$.

3.4 Metodologias

A seguir estão descritas as metodologias utilizadas no desenvolvimento do trabalho e análise dos resultados.

3.4.1 *Spot-test*

O *spot-test* é um procedimento utilizado tanto em análises qualitativas quanto em quantitativas de diversos tipos de substâncias, através de sua reação com um reagente químico de identificação sobre um suporte sólido (placa de toque, papel de filtro, entre outros). Para que essa reação seja mensurável por algum método, alguma mudança deve ocorrer, tal como mudança de cor, precipitação, evolução de gás, etc.

A metodologia de *spot-test* empregada, baseia-se em medidas de reflectância difusa no comprimento de onda de máxima absorção e por meio de imagens digitais da reação colorimétrica entre o ácido úrico ou a creatinina com seus respectivos reagentes cromogênicos, sobre o papel com barreiras hidrofóbicas circulares, de diâmetro de 15 mm com espessura 0,75 mm, utilizado como suporte sólido.

Nas figuras 7 e 8 está representado um esquema de procedimento de aplicação do *spot-test* e exemplo de marcha formada após a secagem da solução aplicada.

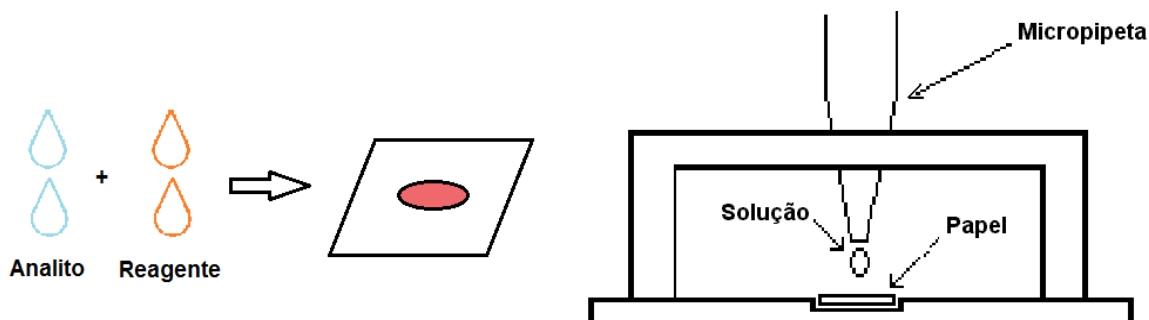


Figura 7 – Procedimento e suporte para a realização do *spot-test*
Fonte: Adaptada de Tubino (1997).

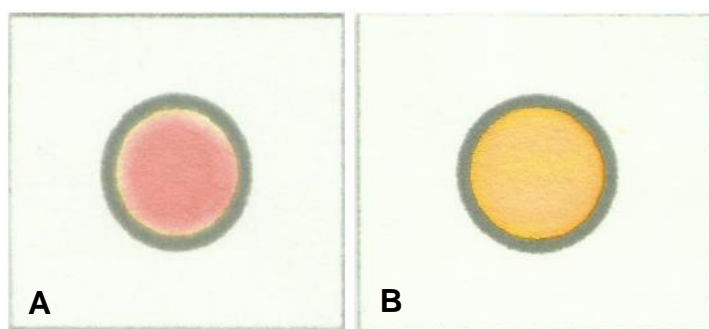


Figura 8 – *Spot-test* realizado no papel de filtro com barreiras hidrofóbicas. Em (A) a reação colorimétrica para o ácido úrico e em (B) a da creatinina. A intensidade da coloração é mensurável através de medidas de reflectância ou por tratamento por imagem digital
Fonte: Elaborada pelo autor³.

3.4.2 Dispositivo analítico microfluídico em papel (μ PAD)

Para a confecção dos canais hidrofóbicos, sejam eles circulares como os utilizados no *spot-test* ou μ PAD, os desenhos foram esquematizados com auxílio do *software* gráfico CorelDRAW X5 e a impressão é realizada na impressora que utiliza tinta sólida a base de cera. Após a impressão, o papel é aquecido em estufa a 120°C por 2 minutos, para que a cera possa penetrar nos poros do papel, formando as barreiras hidrofóbicas (Figura 9).

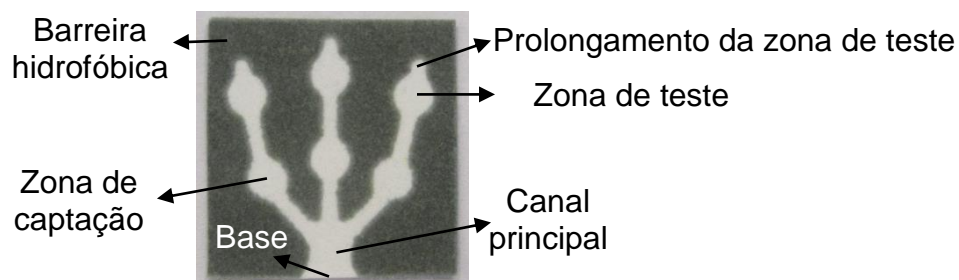


Figura 9 – Modelo de μ PAD empregado e suas diferentes zonas nas quais há a impregnação de reagentes e a detecção do analito

³ As figuras de 8 a 72 foram desenvolvidas pelo autor.

Para a análise utilizando os μ PAD, uma alíquota de amostra ou soluções padrão foi colocada numa placa de petri e então a base do dispositivo foi colocada em contato com a solução, que por capilaridade preenche todos os canais do papel. O dispositivo foi aquecido com auxílio de um secador de cabelo doméstico por 50 s e após 10 minutos foi digitalizado (Figura 10). A imagem digital é tratada como descrito no item 3.4.3.



Figura 10 – μ PAD utilizado para a detecção de ácido úrico (canal central) e de creatinina (canal à direita). A intensidade da coloração é mensurável por tratamento da imagem digital

3.4.3 Detecção por imagem digital

O tratamento das imagens por imagem digital foi empregado quando se utilizou o *spot-test*, para obter sua comparação com uma metodologia já utilizada pelo grupo que é a espectroscopia de reflectância difusa, e nas análises utilizando os dispositivos analíticos.

Para a análise por imagem digital das reações colorimétricas, inicialmente o papel onde foi realizada a reação é digitalizado com resolução de 600 ppi. Utiliza-se o scanner para que não haja variação na luminosidade durante a digitalização do papel. Também podem ser utilizadas máquinas fotográficas e câmeras de celulares e smartphones. Para o tratamento das imagens foi utilizado o *software* comercial livre ImageJ, seguindo os seguintes passos:

- Abriu-se o programa;
- Em *File* → *Open*, uma janela é aberta para a escolha do arquivo desejado;
- Escolhida a imagem, a área desejada é circulado com a ferramenta *Oval* ($w = h = 100$ para *spot-test* e 30 para μ PAD);
- Em *Analyse* → *Tools* → *Color Histogram* duas outras janelas são abertas. Uma apresenta os histogramas de cores dos canais R, G e B e a outra de resultados, mostrando média, moda e desvio padrão para cada um dos três canais da área selecionada (Figura 11).

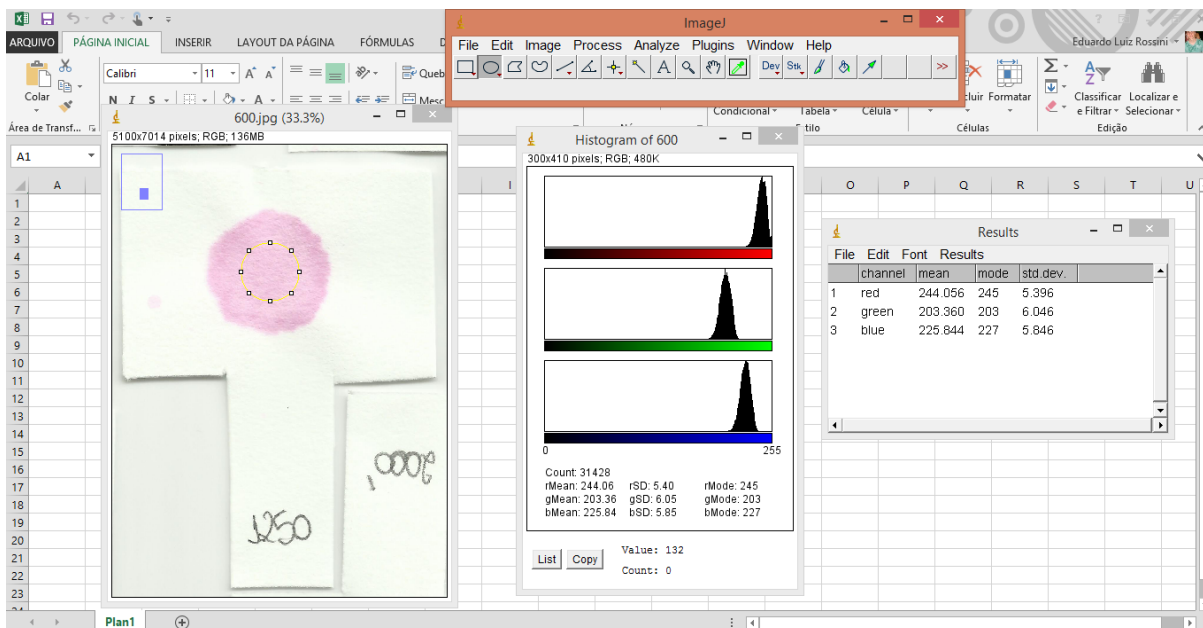


Figura 11 – Imagem do software ImageJ aberto, mostrando os dados obtidos da área selecionada do spot-test do corante amarantho com concentração igual a $5,003 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; o histograma obtido e os resultados numéricos de RGB (canal, média, moda e desvio padrão) estão nas diferentes janelas

O *software* permite que os dados numéricos sejam transferidos para outro *software* (*Edit* → *Copy*).

Os valores de média, moda e desvio padrão se referem a intensidade da cor em determinado canal, R, G ou B. A intensidade fornecida pelo histograma, que varia entre 0 e 255, pode ser comparada com a intensidade reflectiva pela reflectância difusa ou pela intensidade transmitida na espectrofotometria. A absorvância é determinada pela Lei de Lambert-Beer como (Equação 6):

$$A = -\log \frac{I}{I_0} \quad (\text{Equação 6})$$

Dessa forma, pela imagem digital é possível determinar a absorvância de determinada região da imagem, sendo que I é a intensidade de radiação de uma determinada área selecionada, fornecida pelo histograma, e I_0 a intensidade de radiação do branco da reação. No Excel calcula-se, utilizando a equação 6, os valores de absorvância através dos valores de intensidade dos canais R, G e B de cada concentração de analito. No *software* livre SciDAVis, apenas por comodidade, são gerados os gráficos desejados.

3.4.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia líquida de alta performance foi utilizada como metodologia

comparativa a fim de confrontar os resultados obtidos pela metodologia proposta e avaliar a exatidão do método que utiliza os dispositivos analíticos.

As amostras de urina sintética e natural foram analisadas pelo método desenvolvido nesse trabalho e por uma metodologia já descrita na literatura (XIANG, 2014) e os resultados foram comparados utilizando o teste estatístico de t de *Student* pareado. As condições utilizadas no método cromatográfico encontram-se descritas na tabela 7.

Tabela 7 – Condições cromatográficas do método comparativo

Variável	Condição
Fase estacionária	C18 - 5 μm
Coluna - dimensões	250 mm x 4.6 mm
Fase móvel	Solução NaH_2PO_4 $50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$: metanol (95:5)
Vazão da fase móvel	0,8 mL min^{-1}
Temperatura da coluna	25 $^\circ\text{C}$
Tempo de análise	15 min
Volume de injeção	20 μL
Detecção	Espectrofotométrica – $\lambda = 230 \text{ nm}$

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir são descritos os resultados obtidos no desenvolvimento do trabalho.

4.1 Calibração da detecção por imagem digital

Para a calibração da imagem digital, a área de seleção da imagem, a resolução do scanner e os canais de cor R, G e B devem ser estudados, pois nos instrumentos utilizados existem diferentes resoluções de aquisição, diferentes áreas que podem ser selecionadas e a utilização de diferentes canais de cor.

4.1.1 Seleção dos canais de cores

Como referência foi utilizada uma metodologia já empregada pelo grupo de pesquisa, a análise de corante amarantho por espectroscopia de reflectância difusa. O espectro de absorção do corante está ilustrado na figura 12. A figura 13 ilustra a curva de calibração do corante amarantho obtida meio dessa técnica, sendo que absorbância é função da raiz da concentração do corante.

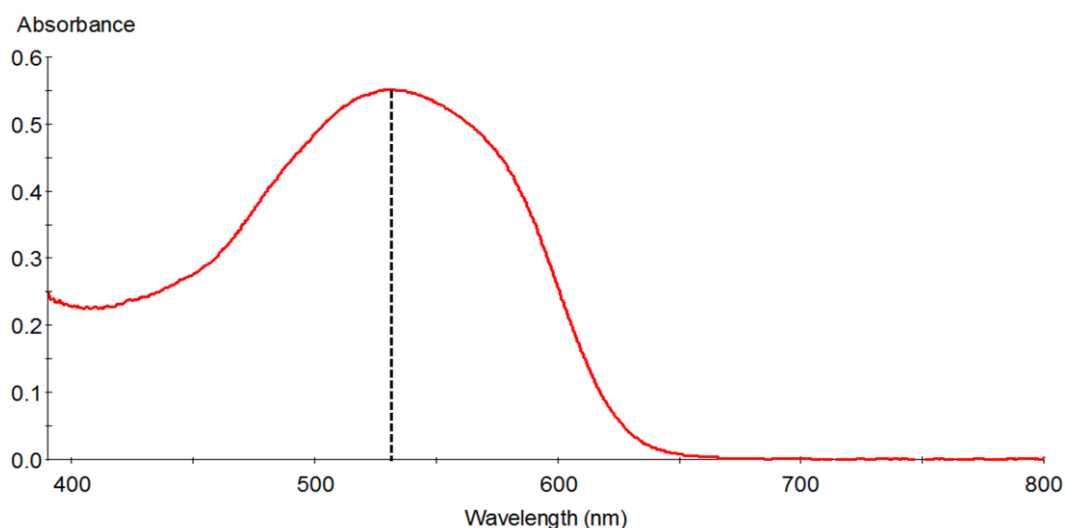


Figura 12 – Espectro de absorção do corante amarantho em meio tamponado (pH = 4,3). $\lambda_{\text{máx}} = 530$ nm e $C_{\text{amaranto}} = 1,50 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$

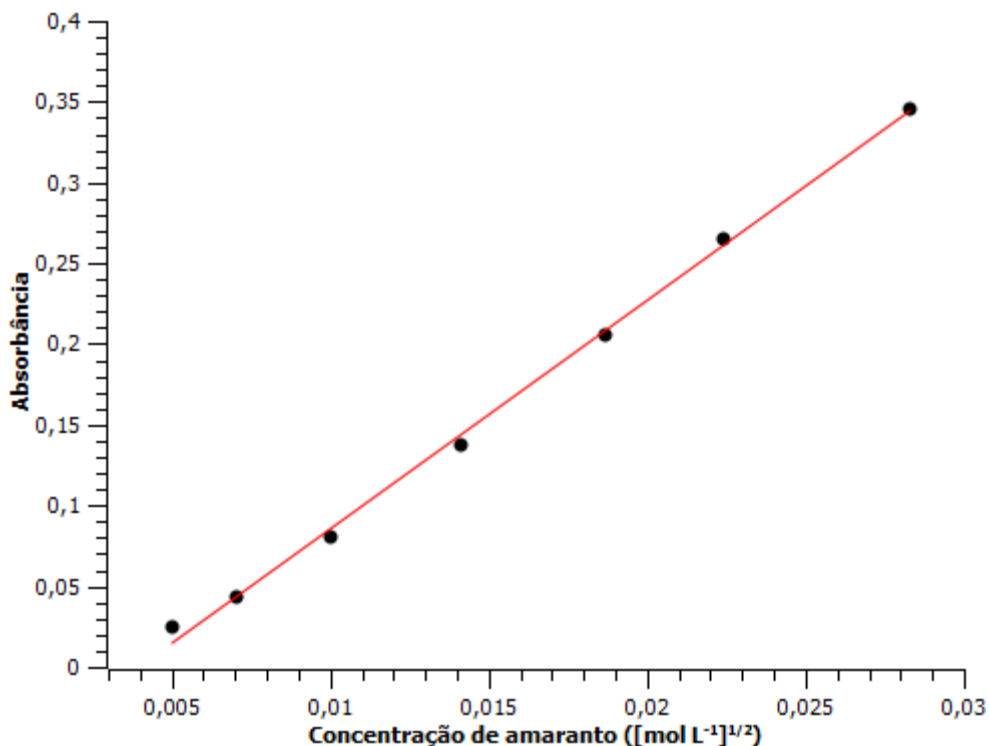


Figura 13 – Curva de calibração do corante amaranço com concentrações entre $2,50 \times 10^{-5}$ a $8,004 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com detecção por espectroscopia de reflectância difusa. $\lambda = 530 \text{ nm}$

Os mesmos *spot-test* foram digitalizados utilizando resolução de 600 ppi. A área selecionada foi circular com 100 pixels de diâmetro. As curvas de calibração obtidas para os diferentes canais R, G e B estão apresentadas na figura 14.

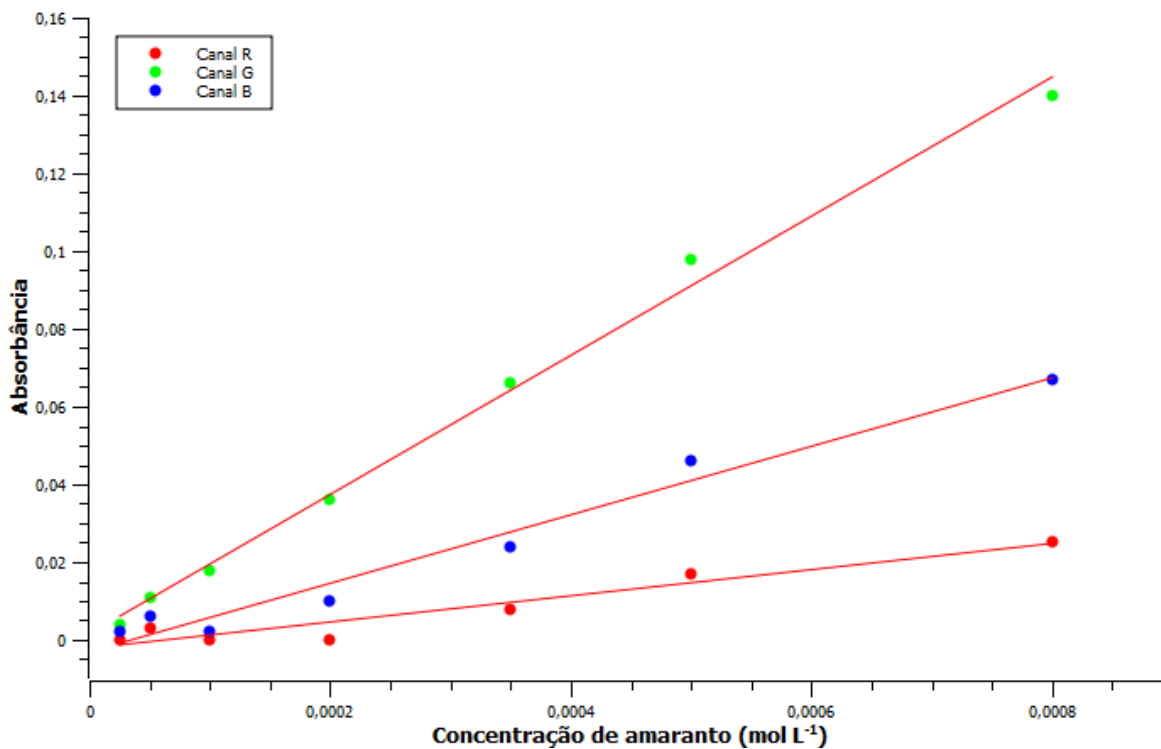


Figura 14 – Curvas de calibrações do corante amaranço para os canais R, G e B com concentrações entre $2,50 \times 10^{-5}$ a $8,004 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ com detecção por imagem digital

A tabela 8 apresenta os dados obtidos das regressões das curvas analíticas da reflectância e da imagem digital.

Tabela 8 – Dados obtidos a partir das regressões das curvas analíticas da reflectância e da imagem digital

Detecção	R ²	Equação da reta	Comprimento de onda	Canal
Reflectância	0,9974	$A = -0,053 + 14,097 C^{1/2}$	530 nm	-
Imagem digital	0,9277	$A = -0,0016 + 32,179 C$	-	R
Imagem digital	0,9957	$A = 0,012 + 179,28 C$	-	G
Imagem digital	0,9737	$A = -0,002 + 85,661 C$	-	B

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pela tabela 8 é possível observar que tanto para a reflectância, que é uma técnica já muito empregada, quanto para a imagem digital, a faixa linear é entre $2,50 \times 10^{-5}$ a $8,004 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de amarantho. Porém, a relação linear para a reflectância é entre absorbância e raiz da concentração, já para a imagem é entre absorbância e concentração.

É evidente pela figura 14 e pela tabela 8 que há diferença entre as respostas para os três diferentes canais de cor. A sensibilidade analítica é dada pela inclinação da curva analítica, quanto maior a inclinação, maior a sensibilidade. Assim, o canal G, verde, apresenta maior sensibilidade, enquanto que o R, vermelho, apresenta menor sensibilidade e o B, azul, sensibilidade intermediária. Isso ocorre devido ao processo de absorção da luz pelo corante. A cor observada pelo olho, que é transmitida ou refletida pelo corante ou outra substância é complementar a luz absorvida pela substância (tabela 9), ou seja, enxerga-se o corante vermelho porque o amarantho absorve a luz verde. Dessa forma, o canal de maior absorção é o G (verde). Também, o canal verde apresentou a melhor linearidade dentre os três canais, pois obteve o maior R², próximo ao obtido pela reflectância difusa.

Tabela 9 – Relação entre cor observada, cor complementar, canal de absorção e comprimento de onda

Cor observada	Cor complementar	Canal de cor absorvida	Intervalo de comprimento de onda
Azul	Alaranjada	Vermelho (R)	605 – 700
Vermelha	Verde	Verde (G)	500 – 560
Amarela	Roxo	Azul (B)	420 – 480

Fonte: Adaptada de Benedetti, 2013.

4.1.2 Influência de diferentes resoluções e áreas

Para verificar a influência de diferentes resoluções no sinal analítico, foram traçadas diferentes curvas analíticas do corante amaranth com diferentes resoluções, 75, 100, 200, 300, 600 e 1200 ppi, utilizando o canal verde que apresenta maior sensibilidade e melhor linearidade (Figura 15). O diâmetro da área selecionada da imagem foi fixado em 100 pixels. Foi escolhido o formato circular para a área, pois é dependente apenas de uma variável, o diâmetro, e porquê o *spot-test* e as zonas de teste de μ PAD são circulares.

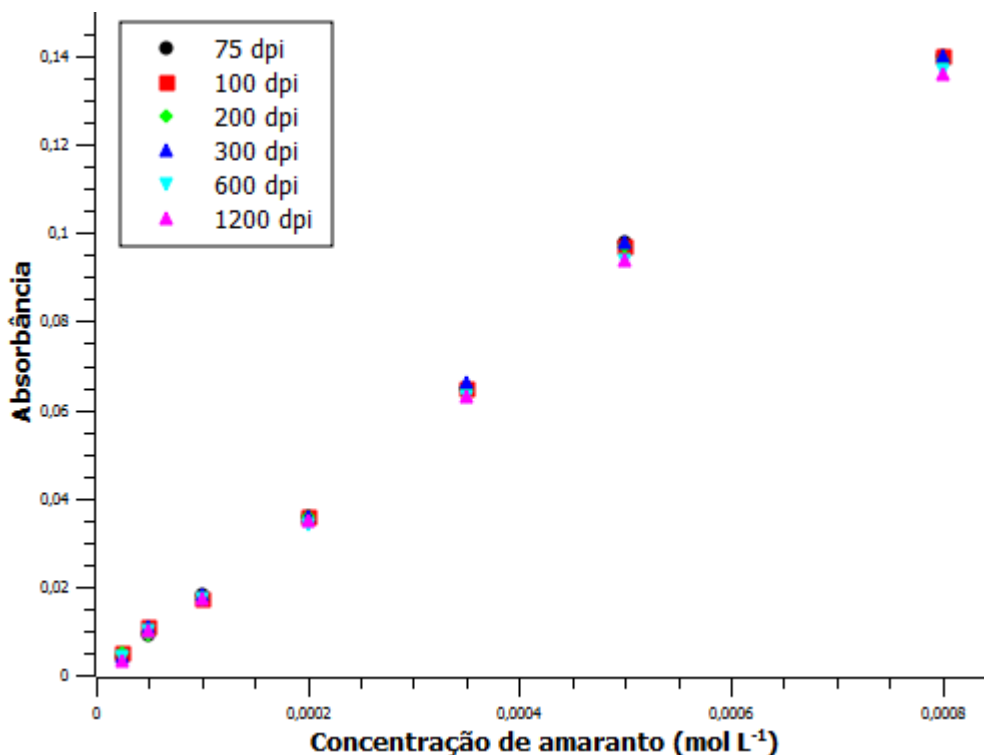


Figura 15 – Curvas analíticas do corante amaranth com concentrações entre $2,50 \times 10^{-5}$ e $8,004 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ utilizando detecção por imagem digital com diferentes resoluções de digitalização

Na figura 15 apresenta as diferentes curvas analíticas obtidas para o corante

amaranto utilizando diferentes resoluções de digitalização. É possível observar que não há diferença significativa entre os valores de cada ponto ou da curva analítica para as diferentes resoluções. Dessa forma, conclui-se que a variável resolução não influencia significativamente o sinal analítico. Para as futuras digitalizações foi utilizado a resolução de 600 ppi, por razão de *spot-test* e os μ PAD serem pequenos, essa resolução não forma uma imagem granulada, permitindo melhor visualização. Também não é excessivamente alta, não gerando arquivos “pesados”.

A influência de diferentes áreas no momento da análise pelo *ImageJ* foi estudada traçando-se diferentes curvas analíticas do corante amaranto na qual a área selecionada foi circular de diâmetro variando entre 10 e 200 pixels.

A figura 16 apresenta as diferentes curvas analíticas do corante amaranto construídas utilizando diferentes áreas de seleção durante a análise das imagens digitalizadas. É possível observar que não há diferença significativa entre os valores de cada ponto ou da curva analítica para as diferentes áreas selecionadas. Dessa forma, conclui-se que a variável área selecionada não influencia significativamente no sinal analítico. Nas futuras análises foram utilizadas áreas de diâmetro igual a 100 pixels para o *spot-test*, devido ao seu maior tamanho, e de 30 pixels para o μ PAD.

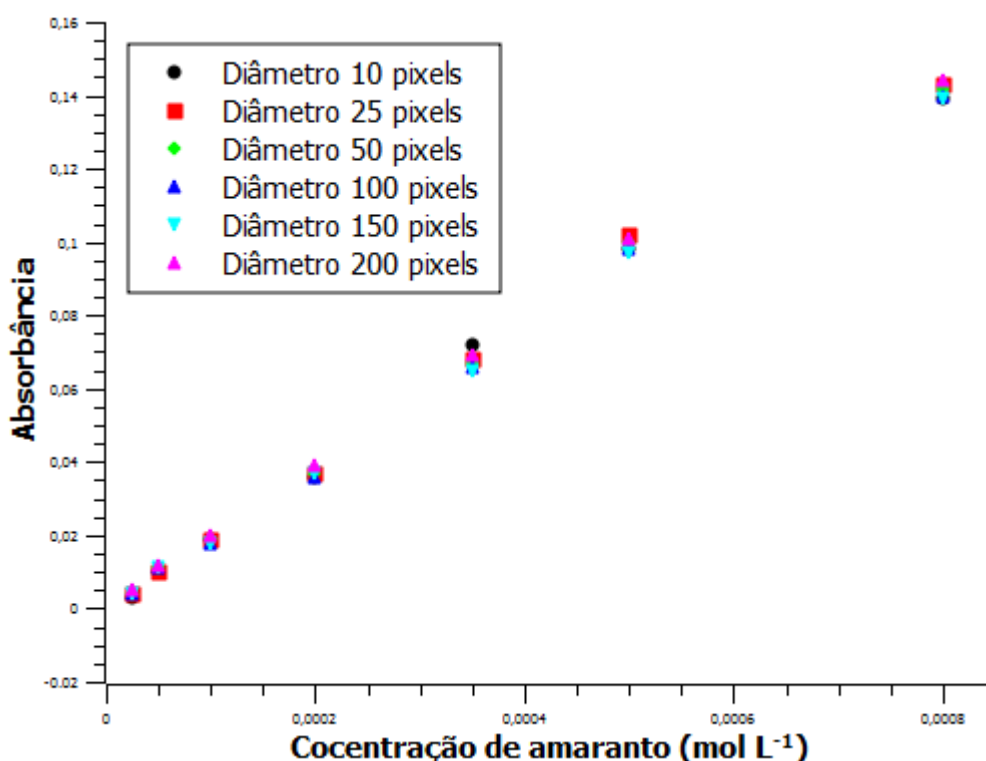


Figura 16 – Curvas analíticas do corante amaranto com concentrações entre $2,50 \times 10^{-5}$ a $8,004 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ utilizando detecção por imagem digital com diferentes áreas selecionadas em função do diâmetro

4.2 Calibração do aquecimento do meio reacional

O aquecimento do meio reacional foi feito com auxílio de um secador de cabelos doméstico a 4 cm do papel, como mostrado na figura 17.

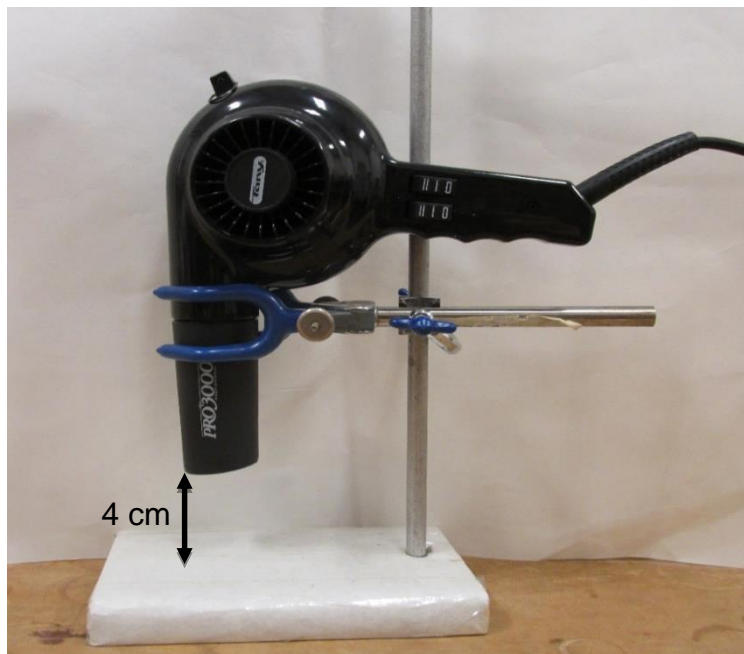


Figura 17 – Foto do suporte para fixação do secador utilizado para o aquecimento do meio reacional. Distância do secador para o papel é de 4 cm

Para determinar a temperatura que o papel é submetido, em função do tempo, utilizou-se um termômetro de infravermelho, conforme ilustrado na figura 18.



Figura 18 – Esquema utilizado para o estudo da temperatura de aquecimento em função do tempo

O papel foi submetido ao aquecimento por 100 segundos e a temperatura foi registrada por 140 segundos (Figura 19). O experimento foi realizado em triplicata.

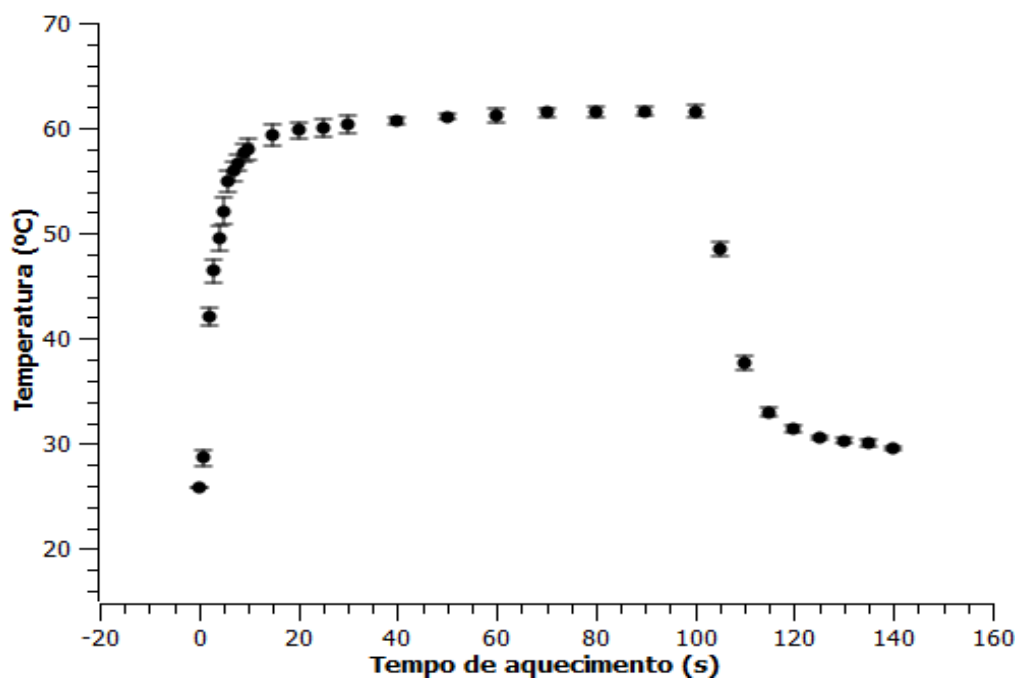


Figura 19 – Temperatura do papel em função do tempo de aquecimento. $n = 3$

Pela figura 19 é possível observar que inicialmente há um rápido aquecimento que se estabiliza após 20 segundos, em temperatura próxima a 60 °C, gerando um patamar de temperatura. Após o desligamento do secador em 100 segundos há uma rápida queda da temperatura. Também, foi medida a temperatura do papel com 50 segundos de aquecimento, a temperatura obtida pelo planejamento para a determinação dos analitos, obtendo-se a média de temperatura igual a $(61,1 \pm 0,4)$ °C, para $n = 5$.

4.3 Desenho do μ PAD

O dispositivo analítico microfluídico em papel como pode ser visto na figura 9, é composto de canais que levam a amostra até a zona de captação e de teste, por isso é importante estudar a largura dos canais, a forma e tamanho das zonas de captação e teste e o tamanho geral do dispositivo. O desenho a partir do qual o dispositivo deste trabalho foi baseado é apresentado na figura 20, o qual é semelhante àquele projetado por Martinez (2007), com modificações que incluíram uma zona de captação e prolongamento após a zona de teste.



Figura 20 – μPAD semelhante ao desenvolvido por Martinez (2007)

4.3.1 *Confecção das barreiras hidrofóbicas*

Antes do aquecimento do papel a tinta de cera está depositada apenas na superfície do papel, sendo que só após o aquecimento a cera derrete penetrando no papel. A figura 21 foi obtida da seção transversal do papel impresso com auxílio de um microscópio óptico com aumento de 15 vezes. Como pode ser na figura 21 A, a cera antes do aquecimento recobre apenas a superfície do papel. Já após o aquecimento, representado pela figura 21 B, a cera penetrou no papel formando a barreira hidrofóbica. As manchas coloridas são pequenas quantidades das outras tintas da impressora (ciano, magenta e amarela) que acabam sendo impressas junto com a tinta preta.

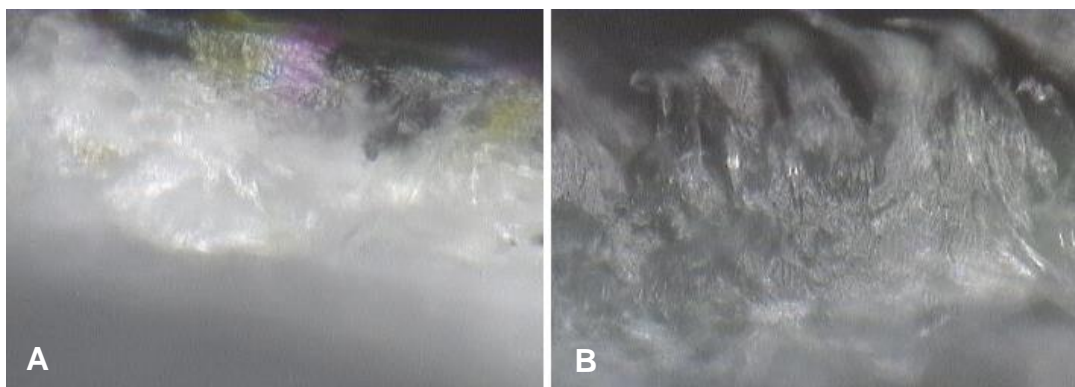


Figura 21 – Imagens da seção transversal do papel antes do aquecimento (A) e após o aquecimento (B)

4.3.2 *Largura dos canais*

Para estudar a velocidade em que a solução é transportada pelos canais hidrofílicos, foi utilizado o esquema ilustrado na figura 22. Nele o papel com diferentes larguras de canal entra em contato com a solução de corante amarantho

que começa a ascender por capilaridade. A distância percorrida pelo corante em função do tempo é descrita na figura 23.

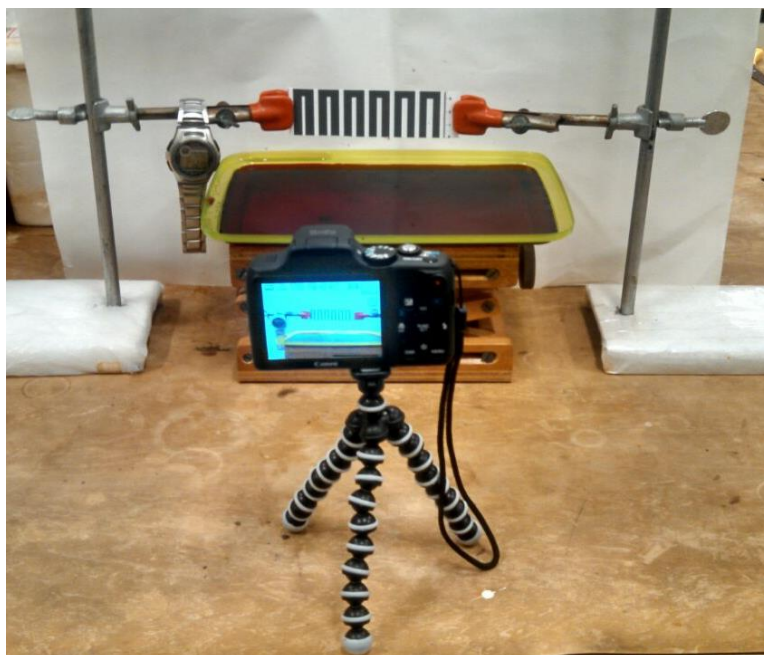


Figura 22 – Ilustração do esquema utilizado para determinar a largura do canal a ser utilizado

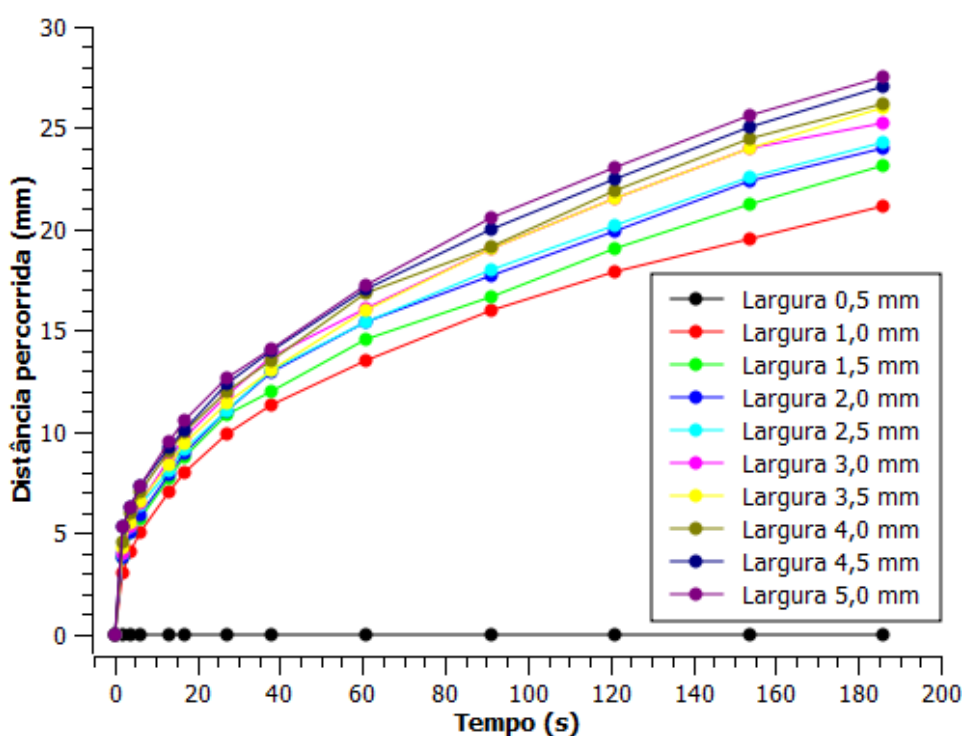


Figura 23 – Distância percorrida pela solução de corante amaranço em função do tempo para canais de diferentes larguras

Pela figura 23 é possível observar que, exceto para largura de 0,5 mm, a velocidade de ascensão da solução de corante é maior inicialmente e diminui com o

aumento da distância percorrida, pois ao aumentar a distância percorrida o volume de solução evaporado é maior, diminuindo a velocidade. Para canais com larguras menores a velocidade de ascensão foi menor, pois a resistência da solução para percorrer o papel aumenta (EVANS, 2014).

Para escolher a melhor largura do canal deve-se levar em conta a velocidade de ascensão da solução (maior largura, maior velocidade) e que com o aumento da largura, aumenta-se a quantidade de amostra necessária para preencher todo o μ PAD. Dessa forma, foi escolhido a largura de 2 mm, pois apresenta velocidade e volume de amostra intermediários.

4.3.3 *Diâmetro e forma das zonas*

Diferente do dispositivo ilustrado na figura 20 é necessária a zona de captação antes da zona de teste, como apresentado na figura 9, pois se os reagentes para a determinação do ácido úrico fossem adicionados na mesma zona haveria formação do produto colorido mesmo na ausência do analito.

Determinada a largura dos canais, determinou-se o diâmetro e a forma das zonas de captação e teste. As formas gerais que as zonas podem ter são: circular, quadrada e losango. A forma quadrada dificulta a transferência de reagente da zona de captação, pois o retém. Assim, esse formato é mais indicado para reagentes insolúveis na amostra (MARTINEZ, 2010). O formato de losango favoreceria a transferência do reagente e da amostra da zona de captação para a de teste, o que poderia aumentar o sinal analítico. Porém, não foi isso o observado, pois as absorvâncias obtidas utilizando-se zonas em losango (CRN – $0,157 \pm 0,002$; AU – $0,132 \pm 0,007$) foram próximas das obtidas para zonas circulares (CRN – $0,154 \pm 0,003$; AU – $0,129 \pm 0,006$). Dessa forma, optou-se por utilizar zonas no formato circular, pois são mais simples, dependendo somente de uma variável, o diâmetro.

Foram avaliados os diâmetros de 3, 4 e 5 mm para as zonas. Com o aumento do diâmetro aumenta-se o volume necessário de amostra e nesse caso também o de reagente. A figura 24 ilustra diferentes diâmetros de zonas para os dois analitos estudados.



Figura 24 – À esquerda está ilustrado as zonas de teste para o analito creatinina e à direita para o ácido úrico. Os três diâmetros de zona são 3, 4 e 5 mm

Na figura 24 as intensidades das colorações das diferentes zonas estão próximas para o mesmo analito, isso porque foi necessário mais reagente conforme houve o aumento do diâmetro. Também, na zona de teste é possível observar visualmente maior uniformidade da coloração com a diminuição do diâmetro. Porém, o diâmetro de 3 mm dificulta a visualização por ter uma diferença muito pequena em relação ao canal. Dessa forma, foi escolhido o diâmetro de 4 mm, pois fornece uma boa diferenciação do canal, sem necessitar de grande aumento no volume de reagente e aumento do volume da amostra.

Observou-se que o aumento do canal após a zona de teste, como o mostrado na figura 25, fornece melhor distribuição da coloração pela zona de teste para a CRN e aumenta a área da coloração da reação com o AU.



Figura 25 – Aumento do canal após a zona de teste fornecendo melhor coloração para a reação

4.3.4 Interação do analito com o papel

Uma preocupação quando se utiliza μ PAD é que o analito possa ficar retido no papel e não se distribuir igualmente no dispositivo. Para descobrir se há retenção, eluição ou se o analito se distribui igualmente, um dispositivo constituído apenas de um canal sem zonas, foi colocado em contato com solução dos dois analitos separadamente e deixou-se que a amostra percorresse toda a extensão do canal.

Após a secagem, dividiu-se o canal em duas metades idênticas que foi transferido para *ependorfs* diferentes. A cada *ependorf* foi adicionado 20 μL da solução de reagente cromogênico juntamente com 1 mL de água para o AU e 1 mL de NaOH 0,44 mol L⁻¹ para a CRN, como ilustrado na figura 26. Para a reação da creatinina, os *ependorfs* foram incubados a 35°C por 15 minutos, para que a reação fosse completa, pois segundo a literatura a temperatura acelera a reação (NARAYANAN, 1980). Cada experimento foi realizado em triplicata para cada analito.

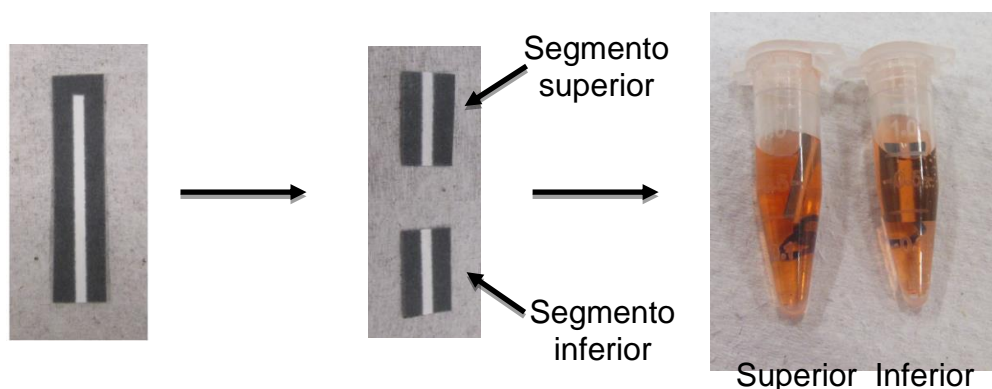


Figura 26 – Ilustração do ensaio para determinação da interação papel-analito da creatinina

A absorbância das soluções superiores e inferiores foram medidas no comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{AU}} = 510 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{CRN}} = 500 \text{ nm}$). Obteve-se para o ácido úrico a absorbância média da parte superior foi igual a $0,408 \pm 0,069$ e da parte inferior igual a $0,397 \pm 0,055$ e para a creatinina na parte superior $0,745 \pm 0,024$ e inferior $0,762 \pm 0,013$. Os resultados foram tratados estatisticamente, obtendo-se valores de t de Student iguais a 0,211 e 0,901 para ácido úrico e creatinina, respectivamente. O teste demonstra que não há diferença significativa entre os valores superior e inferior, uma vez que os valores de t de Student calculados não excedem os valores tabelados para dois graus de liberdade e intervalo de confiança de 95% (4,303). Dessa maneira, concluiu-se que nenhum dos dois analitos ficam retidos no papel e ambos se distribuem uniformemente pelo canal.

4.3.5 Desenho final do μPAD

Nos ensaios descritos anteriormente determinou-se a largura do canal (2 mm) e o diâmetro das zonas (4 mm). Na confecção final do desenho do dispositivo foram

estabelecidos três canais com duas zonas, pois foram analisados dois analitos e um terceiro para determinar se a cor da amostra interfere na análise. Esses três canais estão conectados no canal principal. Para fornecer solução suficiente para os três canais, o canal principal tem largura de 4 mm, chanfrado na base para coletar toda a solução da amostra. O desenho final do μ PAD é ilustrado na figura 27.

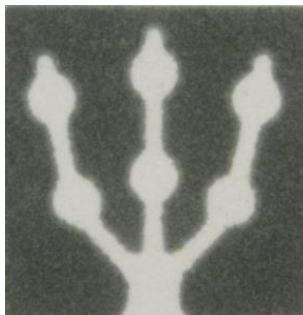


Figura 27 – Desenho final do μ PAD

4.3.6 Volume do μ PAD

Solução de corante amarantho foi utilizada para descobrir qual o volume necessário para preencher o dispositivo analítico. A figura 28 ilustra volumes crescentes de corante adicionados ao dispositivo. O volume de 10 μ L é suficiente para preencher todos os canais hidrofílicos.

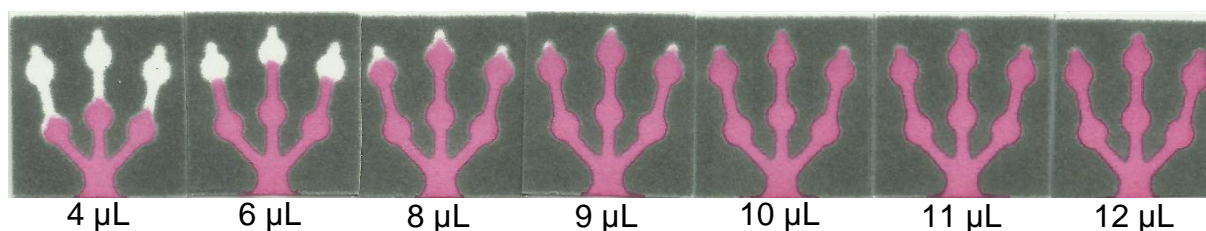


Figura 28 – Diferentes volumes adicionados ao μ PAD. Da esquerda para a direita os volumes utilizados foram de 4, 6, 8, 9, 10, 11 e 12 μ L de solução de corante amarantho

O volume selecionado para os ensaios futuros foi de 10 μ L, porém, de modo a tornar a análise mais prática e considerando que em lugares remotos uma micropipeta pode não estar disponível para dispensar esse volume. Dessa forma, foi testado a reprodutibilidade do dispositivo em absorver um volume de água constante. Para o ensaio foi transferido uma alíquota de 20 μ L (calibrado em $19,5 \pm 0,6$) μ L a 25°C e $n = 10$) para uma placa de petri de massa conhecida e logo após a água preencher os canais hidrofílicos, o dispositivo era retirado. A água resultante era pesada e calculado seu volume. Foi encontrado que o dispositivo absorve (10,3

$\pm 0,7$) μL a 25°C e $n = 10$. Isso demonstra que não é necessária uma micropipeta para realizar as análises, pois o volume absorvido é aproximadamente constante.

4.4 Creatinina

Os ensaios realizados para o desenvolvimento do método de análise para a creatinina são descritos a seguir.

4.4.1 Testes qualitativos

Os reagentes p-dimetilaminocinamaldeído (p-DAC) e p-dimetilaminobenzaldeído (p-DAB) são muito utilizados em reações colorimétricas pois podem ser utilizados como reagentes cromogênicos para analitos que contenham nitrogênio em sua composição, como sulfonamidas (CATELANI, 2014) e bromoprida (LIMA, 2014). A creatinina e o ácido úrico apresentam nitrogênios em sua estrutura. Também, a ureia, componente nitrogenado majoritário da urina, produz compostos coloridos com o p-DAC e p-DAB (TOLEDO, 2014). Assim, para que não haja etapas de *clean-up* da amostra esses dois reagentes não foram utilizados.

Segundo descrito por Narayanan (1980), a reação de Jaffé (figura 29) é a mais utilizada por ser simples, rápida, barata e de fácil execução. Através dessa reação, o picrato alcalino reage com a creatinina produzindo um produto de coloração alaranjada (complexo de Janovsky).

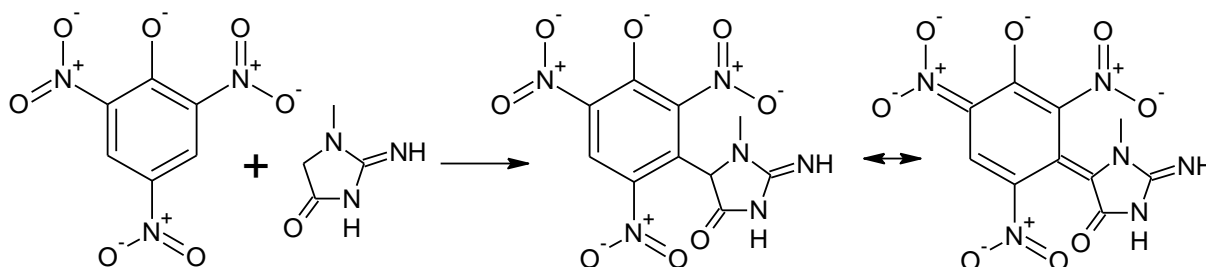


Figura 29– Proposta de reação entre a creatinina e o picrato

O ácido pícrico e o ácido 3,5 – dinitrobenzóico, da classe do ácido pícrico (ACP) foram submetidos a reação, em meio alcalino, com a creatinina em meio aquoso e em papel. As figuras 30 e 31 apresentam os testes qualitativos,

meramente ilustrativo, na qual a creatinina em concentrações de 1000 e 250 mg L⁻¹ foi adicionada aos dois reagentes, para determinar se ocorreria a reação e qual a coloração do produto formado.

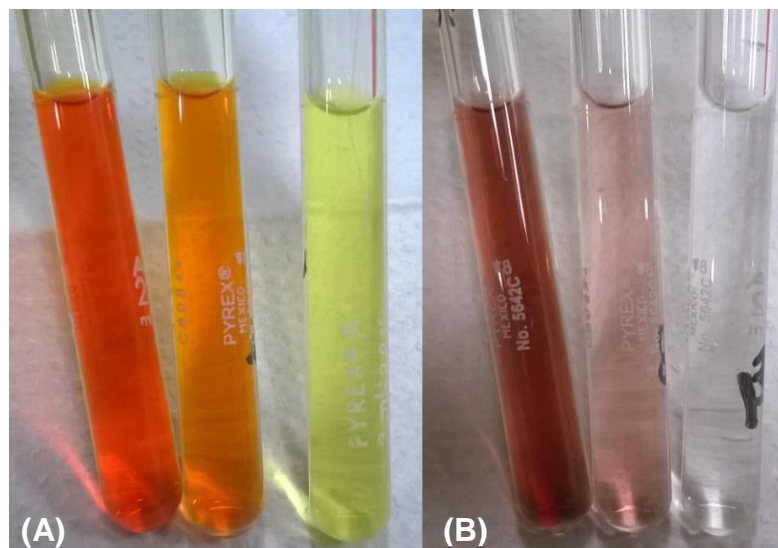


Figura 30 – Foto ilustrativa dos testes qualitativos da reação em meio aquoso de creatinina em concentrações de 1000 e 250 mg L⁻¹ com ácido pícrico em (A) e ácido 3,5-dinitrobenzóico em (B), ambos em meio alcalino. Os tubos à direita de cada imagem representam o branco e à esquerda a reação na maior concentração

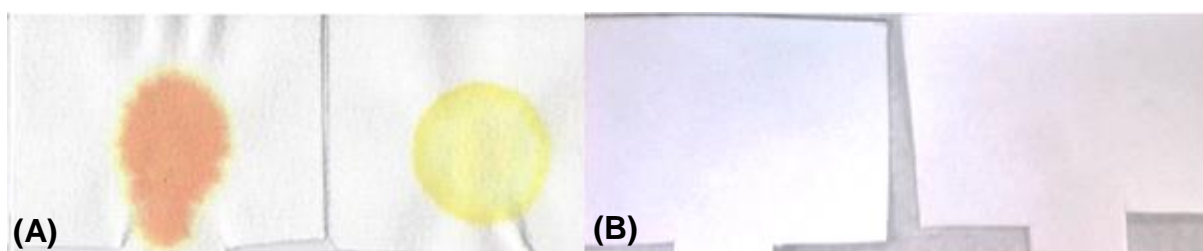


Figura 31 – Foto ilustrativa dos testes qualitativos da reação em papel de creatinina em concentrações de 1000 mg L⁻¹ com ácido pícrico em (A) e ácido 3,5-dinitrobenzóico em (B), ambos em meio alcalino. O papel à direita de cada imagem representa o branco e à esquerda a reação com o analito de interesse

Pelas figuras 30 e 31 foi possível observar que há mudança de coloração entre as reações sem e com creatinina. Para a reação com ácido pícrico, o produto formado com a creatinina apresenta coloração alaranjada, já com o ácido 3,5-dinitrobenzóico apresenta cor vermelho amarronzado. Quando a reação foi conduzida no papel, a reação com o ACP também forneceu a coloração alaranjada observada em meio aquoso, já na reação da creatinina com o ácido 3,5-dinitrobenzóico foi observada uma coloração muito fraca, mesmo na concentração de 1000 mg L⁻¹. Dessa forma, descartou-se a utilização do ácido 3,5 – dinitrobenzóico, pois a metodologia seria menos sensível que com o ACP.

4.4.2 Obtenção do espectro de absorção e canal de maior sensibilidade

Após a determinação do reagente cromogênico a ser utilizado para a reação colorimétrica da creatinina, foi determinada a melhor ordem de adição dos reagentes. Para isso foram aplicados 15 μL de cada solução no suporte de papel, resultando no spot test apresentado na figura 32.

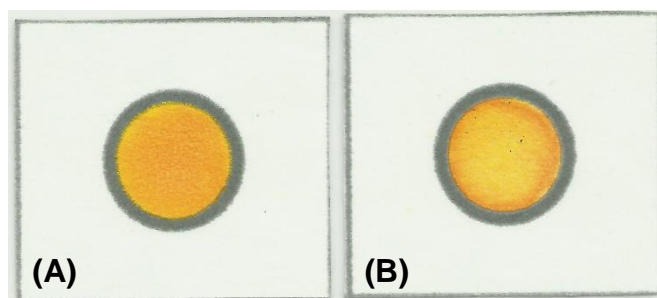


Figura 32 – Ordem de adição do analito e do reagente cromogênico. Em (A) com a ordem reagente/analito e em (B) analito/ reagente. Concentração de creatinina igual a 300 mg L^{-1}

Pelos *spot-test* foi possível concluir que a melhor ordem de adição, a que forneceu uma mancha central e mais uniforme foi a reagente depois analito (figura 32 A). Após isso, foi obtido o espectro de absorção do produto colorido utilizando medidas de reflectância difusa (Figura 33).

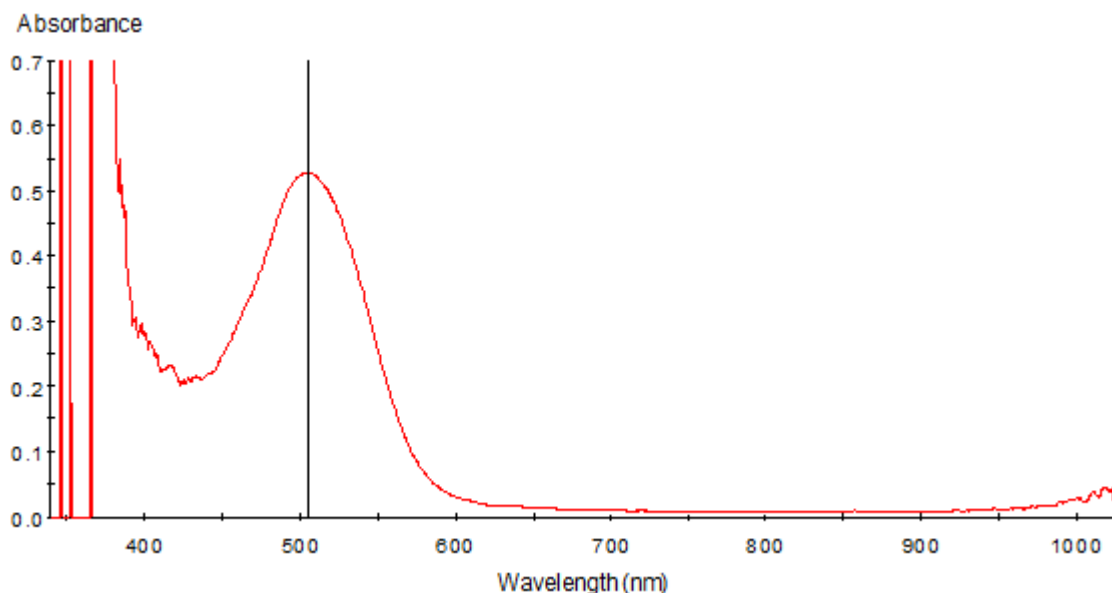


Figura 33 – Espectro de absorção do produto colorido formado pela reação de Jaffé, obtido pela reflectância difusa. Concentração de creatinina igual a 300 mg L^{-1}

Como pode ser observado na figura 33 o comprimento de máxima absorção do produto formado é 505 nm. Pela tabela 9 é provável que o canal de maior

sensibilidade seja o Verde, G. Para determinar o canal de maior sensibilidade, o *spot-test* que foi utilizado na determinação do espectro foi digitalizado, obtendo-se os dados da tabela 10.

Tabela 10 – Valores de intensidade do branco, de intensidade e de absorbância do produto colorido
 $C_{CRN} = 300 \text{ mg L}^{-1}$. $n = 3$

Canal de cor	Intensidade branco	Intensidade	Absorbância
Vermelho (R)	252,086	243,968	0,014
Verde (G)	250,042	169,220	0,170
Azul (B)	81,780	80,781	0,005

Fonte: Elaborada pelo autor⁴.

Como era esperado, o canal de maior absorção e conseqüentemente o de maior sensibilidade é o verde, G. Também, é possível observar que a resposta analítica utilizando a imagem digital é cerca de três vezes menor do que com a reflectância difusa (Figura 33).

4.4.3 Estabilidade do produto da reação

A avaliação da estabilidade do produto colorido formado foi realizada por medidas de reflectância difusa e de imagem digital um minuto após a realização da aplicação até três horas (Figura 34).

⁴ As tabelas de 10 a 44 foram elaboradas pelo autor.

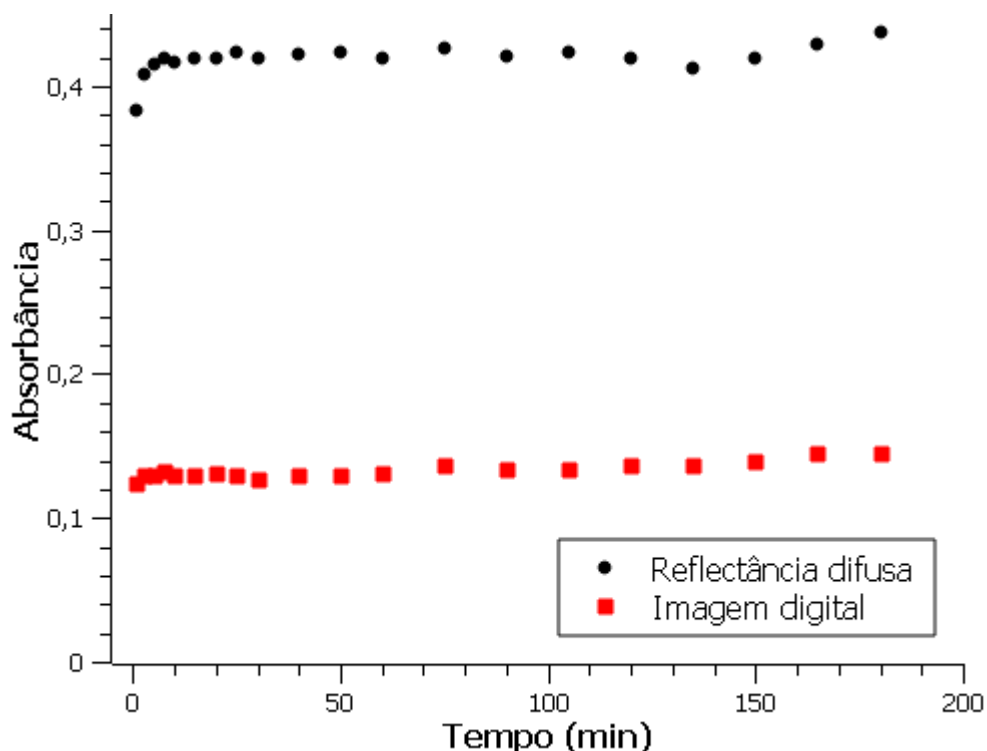


Figura 34 – Estabilidade do produto colorido formado entre 1 e 180 minutos. $\lambda = 505 \text{ nm}$ e canal = G. $C_{\text{CRN}} = 250 \text{ mg L}^{-1}$

Os resultados obtidos no estudo de estabilidade do produto colorido demonstram que o produto apresenta estabilidade de 2,5 a 180 minutos, pois os valores de absorbância pelos dois métodos são aproximadamente constantes nesse intervalo de tempo. Dessa forma, esse tempo é razoável para as leituras após a aplicação e secagem.

4.4.4 Estudo dos fatores que podem alterar o sinal analítico

Foram testadas estratégias para o aumento da absorbância do produto formado, ou seja, aumentar a sensibilidade da metodologia, tais como, adição de surfactante e aquecimento. Foi utilizado o surfactante catiônico SDS, com concentração de $10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, acima da concentração micelar crítica ($\text{CMC} = 8,1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (HINZE, 1993)) e o surfactante aniônico DTAB em concentração de $18,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{CMC} = 11,0 \text{ a } 16,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (HINZE, 1993)).

O aquecimento do meio reacional foi feito por 60 segundos com auxílio de um secador de cabelo doméstico.

A adição de SDS a solução de ACP em meio básico faz com que haja a precipitação do reagente. Também, a adição de surfactante ao meio reacional faz

com que a solução adicionada ao *spot-test* ou ao μ PAD ultrapasse a barreira hidrofóbica, dessa forma, não é possível adicionar surfactantes ao meio reacional quando se utiliza barreiras hidrofóbicas construídas com impressora a base de cera.

A absorvância do *spot-test* sem aquecimento foi de $0,171 \pm 0,034$ para a reflectância e $0,057 \pm 0,002$ para a imagem digital. Com aquecimento a absorvância foi de $0,212 \pm 0,011$ para a reflectância e $0,071 \pm 0,008$ para a imagem digital ($C_{CRN} = 200 \text{ mg L}^{-1}$; $n = 3$). O aquecimento aumentou o sinal analítico em aproximadamente 25%, o que era esperado, pois na literatura a reação é descrita como dependente da temperatura (NARAYANAN, 1980).

4.4.5 Otimização das condições experimentais

A otimização das condições experimentais foi feita utilizando planejamento fatorial e na sequência o planejamento composto central.

4.4.5.1 Planejamento fatorial

Utilizando o *software* estatístico Minitab 16 foi elaborada uma matriz de planejamento fatorial do tipo 2^3 , na qual os fatores estudados foram: concentração de ácido pícrico, concentração de OH^- e tempo de aquecimento. Na tabela 11 está descrito os fatores utilizados, juntamente com seus níveis e codificações. Na tabela 12 estão os níveis de cada fator em cada ensaio realizado.

Tabela 11 – Descrição dos níveis e codificação de cada fator

Fatores	Mínimo (-1)	Máximo (+1)
Concentração de ACP (mol L^{-1})	0,01	0,02
Concentração de OH^- (mol L^{-1})	0,50	0,75
Tempo de aquecimento (s)	10	60

Tabela 12 – Matriz de ensaios descrevendo os fatores codificados utilizados no planejamento experimental

Ensaio	Concentração de ACP	Concentração de OH ⁻	Tempo de aquecimento
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1

Os resultados de absorvância obtidos por meio da reflectância e da imagem digital estão dispostos na tabela 13.

Tabela 13 – Resultados dos ensaios do planejamento experimental por meio da reflectância e imagem digital. C_{CRN} = 200 mg L⁻¹ e n = 3

Ensaio	Absorvância ($\lambda = 505 \text{ nm}$)	Absorvância (canal verde)
1	0,356±0,014	0,081±0,004
2	0,380±0,011	0,088±0,005
3	0,355±0,005	0,083±0,003
4	0,376±0,018	0,092±0,004
5	0,526±0,008	0,132±0,006
6	0,510±0,023	0,143±0,006
7	0,435±0,009	0,101±0,006
8	0,432±0,017	0,119±0,008

O tratamento dos dados obtidos foi realizado com auxílio dos *softwares* estatísticos Minitab 16 e STATISTICA versão 7. As figuras 35 e 36 representam os gráficos de pareto quando a detecção é realizada com a reflectância e com a imagem digital, respectivamente.

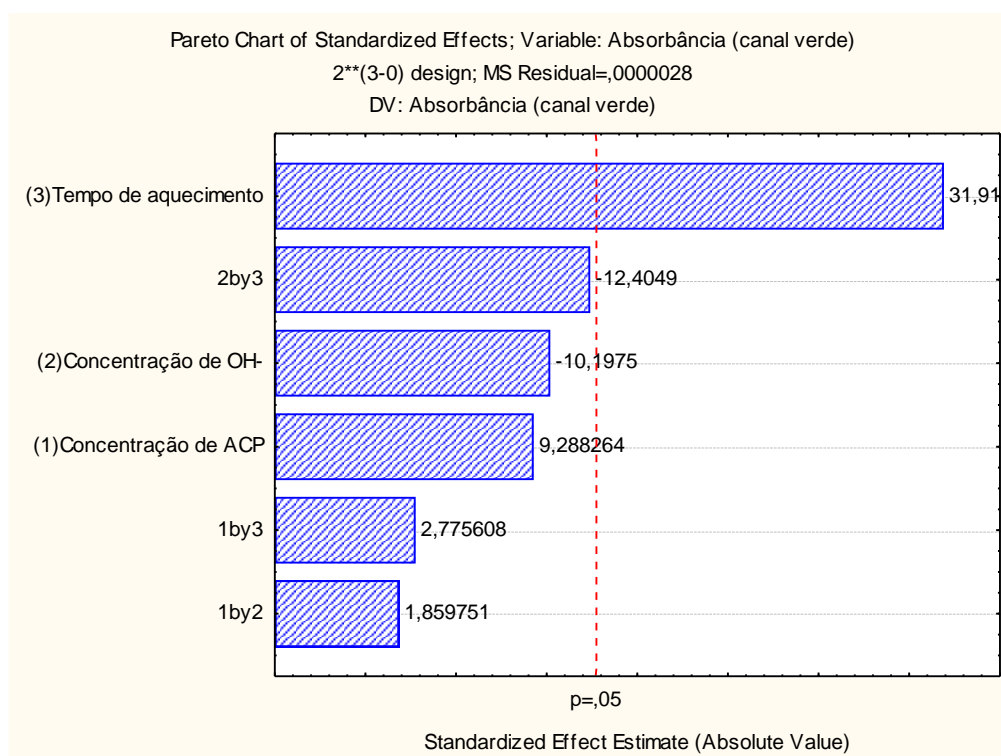


Figura 35 – Gráfico de pareto para a análise de creatinina pela reação de Jaffé com detecção por reflectância

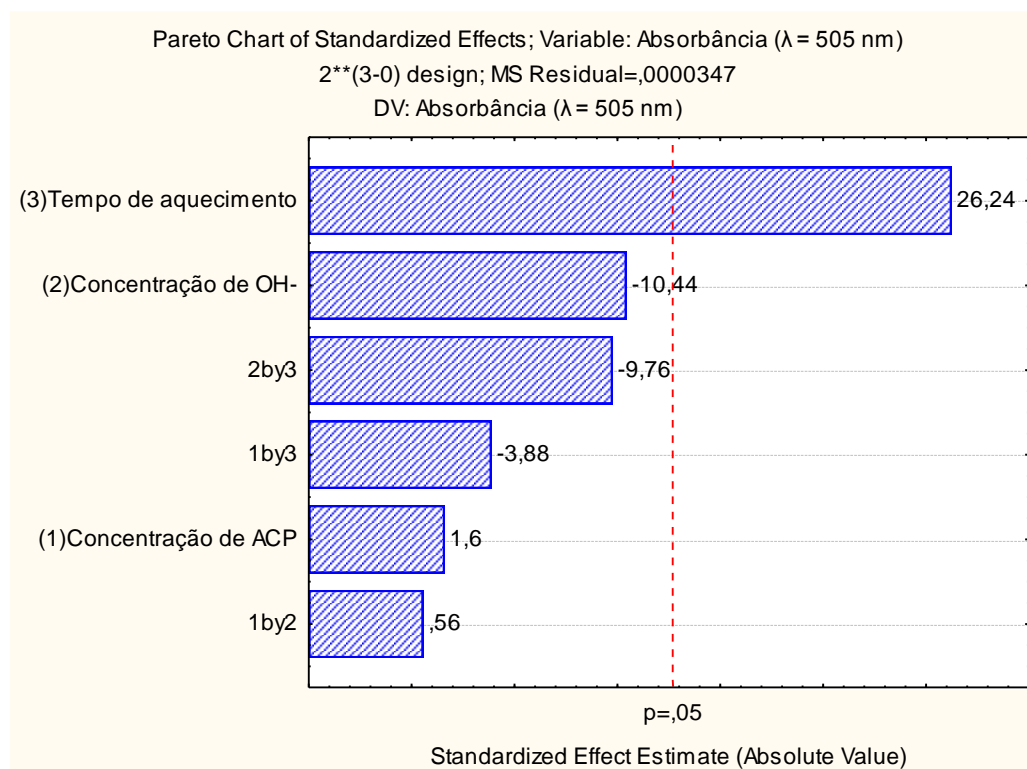


Figura 36 – Gráfico de pareto para a análise de creatinina pela reação de Jaffé com detecção por imagem digital

Através dos gráficos de pareto é possível verificar que o fator que mais influencia o sistema e que altera significativamente o sistema, com intervalo de confiança de 95 % ($p = 0,05$), é o tempo de aquecimento. O fator de menor influência é a concentração de ácido pícrico e o de influência intermediária é a concentração de OH^- . Para entender melhor os resultados e facilitar a análise foram construídos gráficos de efeitos principais para cada técnica.

As figuras 37 e 38 mostram os gráficos de efeitos principais dos fatores para a reflectância e a imagem digital, respectivamente. O nível do fator que fornece maior absorbância é o ponto localizado acima da linha horizontal, dessa forma, pelos gráficos é possível observar que a maior absorbância é alcançada quando a concentração de ACP e o tempo de aquecimento estão no maior nível e quando a concentração de OH^- está no nível mínimo. Quanto maior a inclinação maior a influência do efeito na resposta, logo, o tempo de aquecimento é o efeito de maior influência.

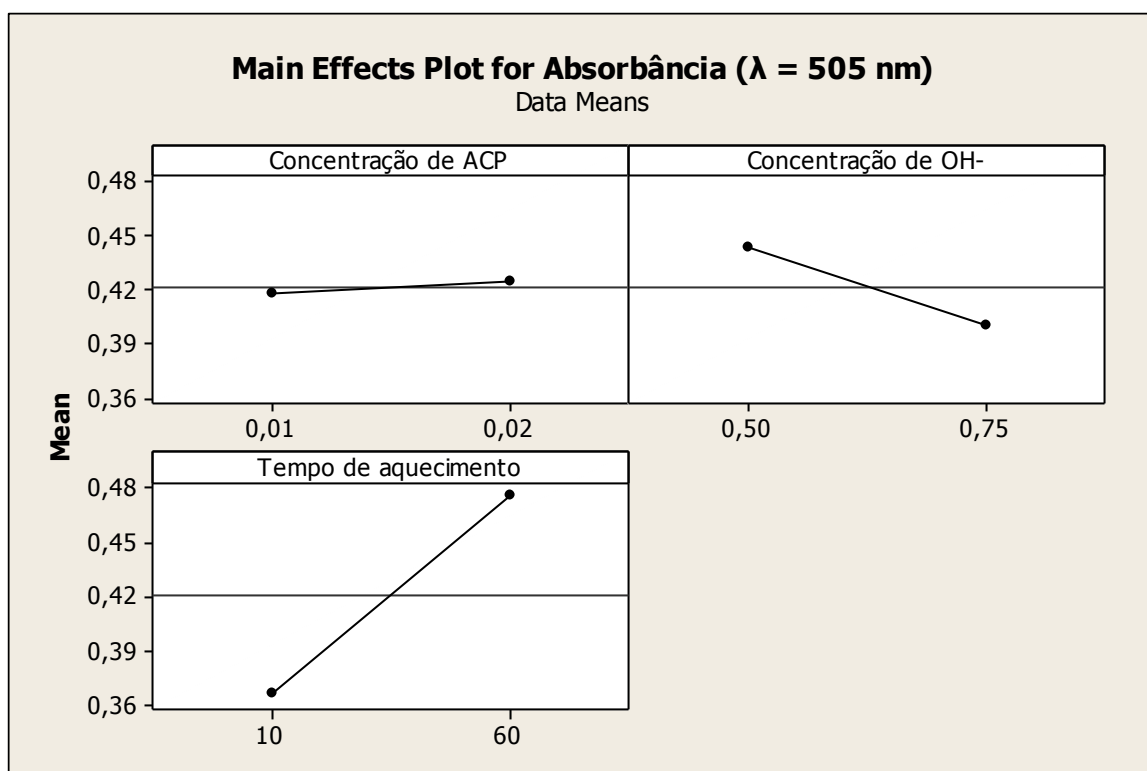


Figura 37 – Gráfico de efeitos principais para a detecção por reflectância

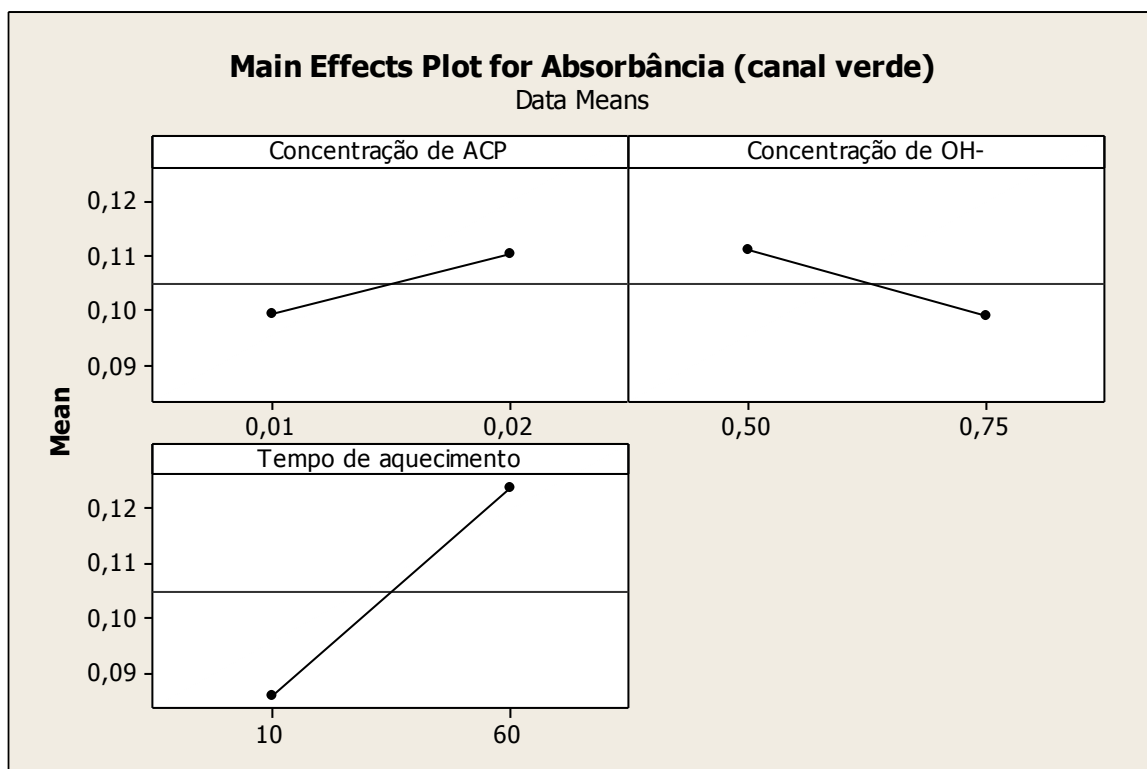


Figura 38 – Gráfico de efeitos principais para a detecção por reflectância

Tendo em vista os resultados obtidos, um novo planejamento, o planejamento composto central ou superfície de resposta, foi realizado para encontrar a condição experimental ótima. Foram utilizadas as duas variáveis de maior influência, o fator de menor influência, a concentração de ACP, foi mantido no nível de maior resposta ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$).

4.4.5.2 Planejamento composto central

A partir dos ensaios do planejamento fatorial 2^3 , verificou-se que a influência dos fatores no sinal analítico foi em ordem decrescente: tempo de aquecimento, concentração de OH^- e concentração de ACP. Dessa forma, o novo planejamento foi utilizado para encontrar as melhores condições de análise, ou seja, que forneça a maior resposta analítica, em relação as duas variáveis de maior influência, o tempo de aquecimento e a concentração de OH^- .

Na são tabela 14 apresentados os valores codificados e não-codificados para os fatores utilizados no planejamento.

Tabela 14 – Fatores codificados e não-codificados utilizados no planejamento composto central

Ensaio	Tempo de aquecimento	Concentração de OH ⁻	Tempo de aquecimento (s)	Concentração de OH ⁻ (mol L ⁻¹)
1	-1	-1	15	0,40
2	1	-1	75	0,40
3	-1	1	15	0,70
4	1	1	75	0,70
5	-1,41	0	2,6	0,55
6	1,41	0	87,4	0,55
7	0	-1,41	45	0,34
8	0	1,41	45	0,76
9	0	0	45	0,55
10	0	0	45	0,55
11	0	0	45	0,55
12	0	0	45	0,55
13	0	0	45	0,55

Na são tabela 15 apresentados os valores de absorbância para cada ensaio do planejamento utilizando as duas técnicas.

Tabela 15 – Valores de absorbância de cada ensaio do planejamento utilizando detecção por reflectância ($\lambda = 505 \text{ nm}$) e imagem digital (canal verde). $C_{CRN} = 200 \text{ mg L}^{-1}$ e $n = 3$

Ensaio	Absorbância ($\lambda = 505 \text{ nm}$)	Absorbância (canal verde)
1	0,384±0,010	0,083±0,005
2	0,540±0,020	0,161±0,002
3	0,384±0,010	0,089±0,005
4	0,459±0,006	0,091±0,004
5	0,471±0,027	0,128±0,009
6	0,497±0,018	0,120±0,001
7	0,607±0,025	0,197±0,007
8	0,534±0,021	0,164±0,010
9	0,581±0,009	0,189±0,003
10	0,593±0,018	0,181±0,009
11	0,555±0,028	0,178±0,011
12	0,551±0,034	0,177±0,010
13	0,586±0,013	0,189±0,007

Os gráficos de superfície de resposta e curva de nível dos dados apresentados na tabela 15 estão representados nas figuras de 39 a 42.

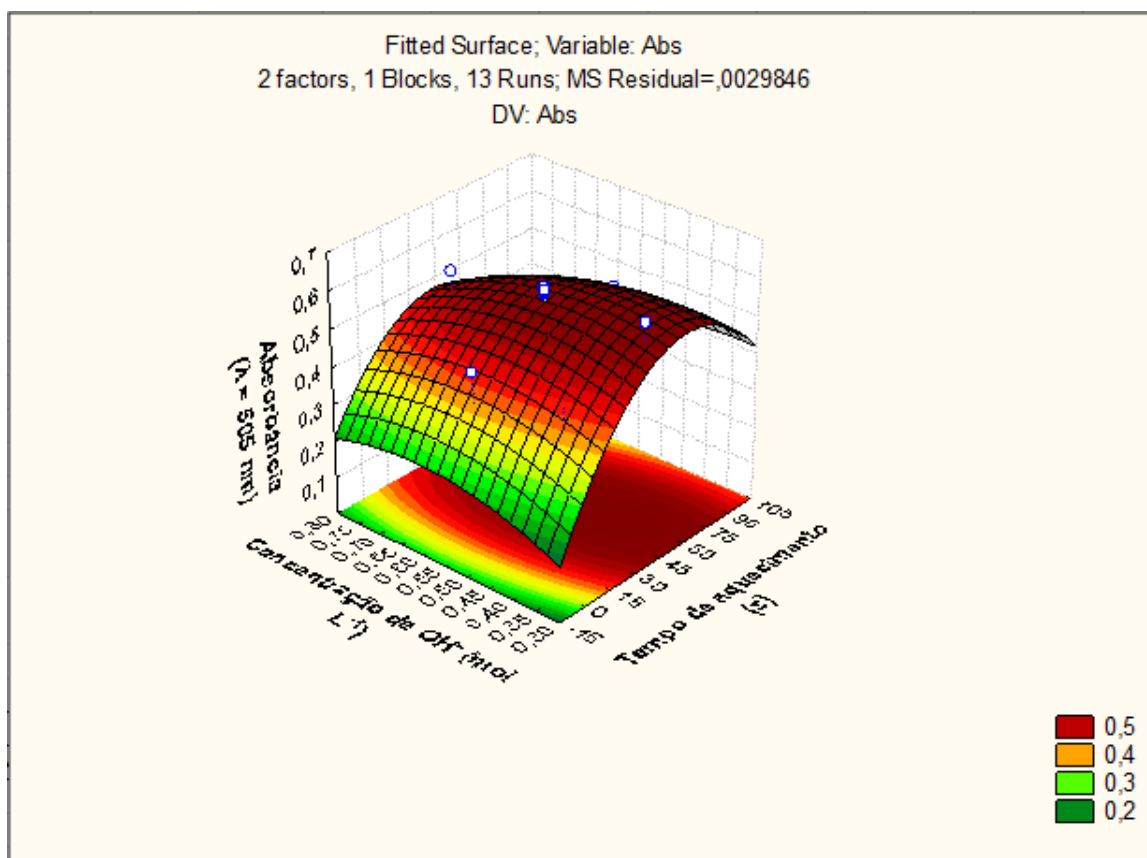


Figura 39 – Superfície de resposta obtida através dos resultados da tabela 15 do planejamento composto central da tabela 14, utilizando a reflectância difusa como detecção

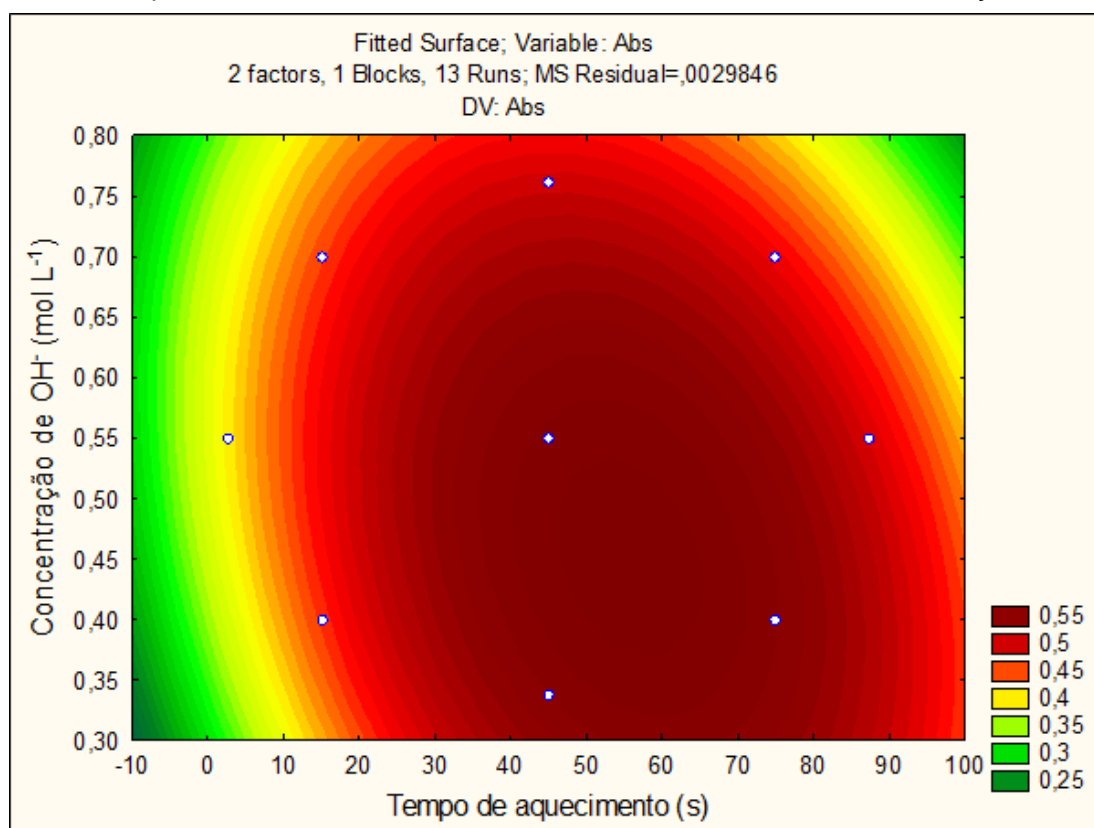


Figura 40 – Gráfico de contorno obtido através dos resultados da tabela 15 do planejamento composto central da tabela 14, utilizando a reflectância difusa como detecção

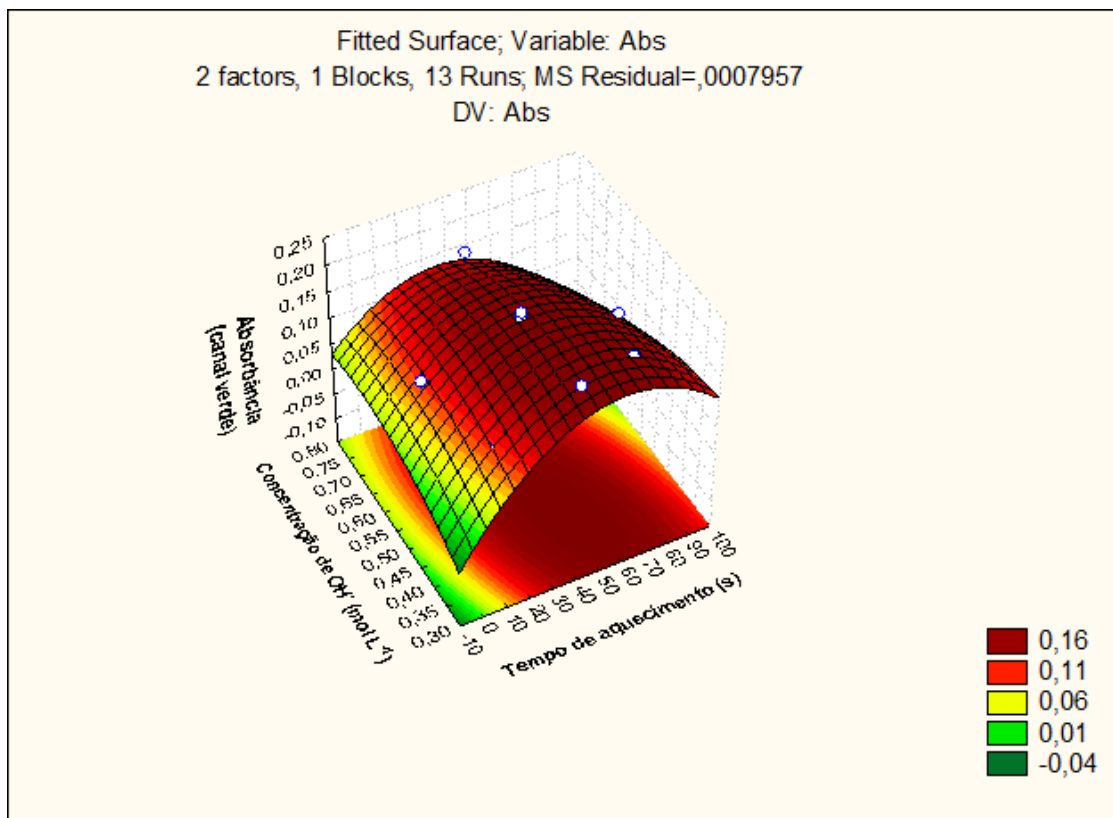


Figura 41 – Superfície de resposta obtida através dos resultados da tabela 15 do planejamento composto central da tabela 14, utilizando a imagem digital como detecção

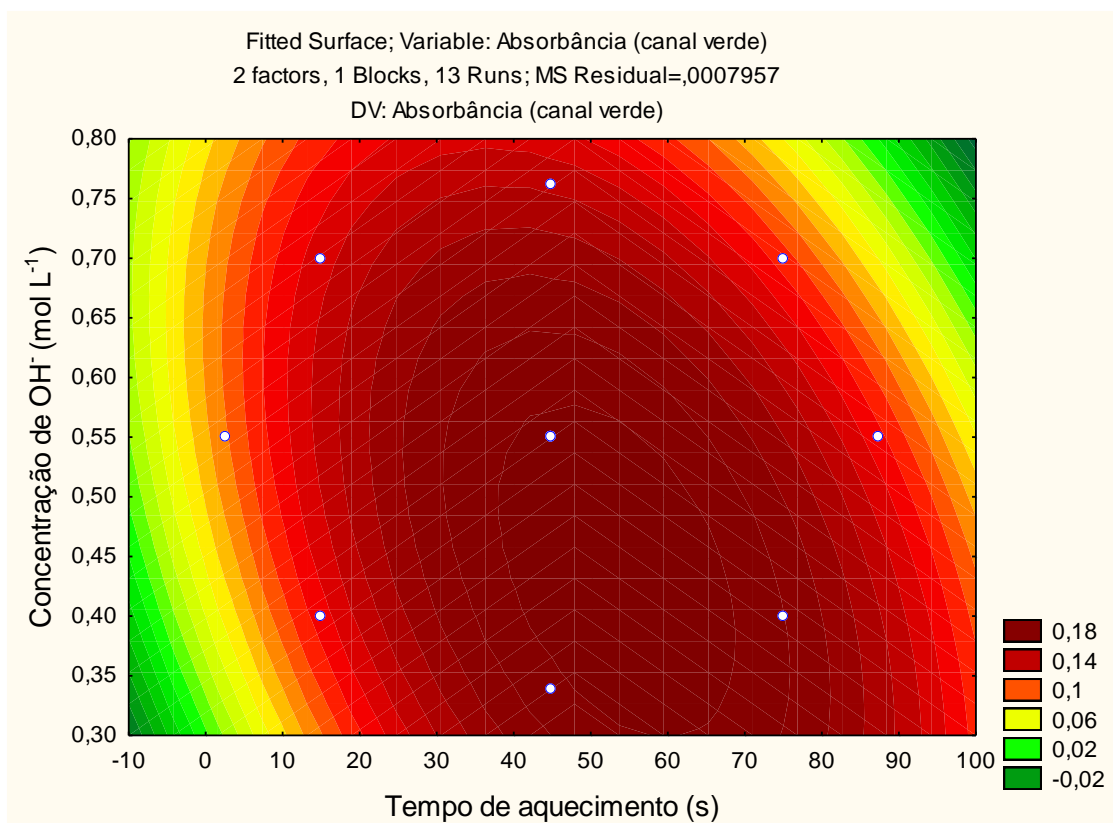


Figura 42 – Gráfico de contorno obtido através dos resultados da tabela 15 do planejamento composto central da tabela 14, utilizando a imagem digital como detecção

Através das figuras 39 a 42 é possível observar que há uma região de maior absorvância situada entre concentração de OH^- de 0,37 a 0,52 mol L^{-1} e entre tempo de aquecimento de 40 a 70 segundos. Essa região é demarcada pela coloração vermelha mais escura das figuras. Essa região fornece as condições ótimas de concentração de OH^- e tempo de aquecimento, ou seja, maior sensibilidade analítica.

A equação para a curva de nível utilizando a reflectância difusa como detecção é:

$$\text{Abs} = -0,04057 + 0,01018t - 0,00007t^2 + 1,16686C_{\text{OH}^-} - 1,01677C_{\text{OH}^-}^2 - 0,00450tC_{\text{OH}^-} \quad (\text{Equação 7})$$

A equação para a curva de nível utilizando a imagem digital como detecção é:

$$\text{Abs} = -0,14673 + 0,00670t - 0,00005t^2 + 0,72012C_{\text{OH}^-} - 0,56663C_{\text{OH}^-}^2 - 0,00421tC_{\text{OH}^-} \quad (\text{Equação 8})$$

As equações das curvas de nível fornecem os valores críticos dos dois fatores estudados, como pode ser visto na tabela 16.

Tabela 16 – Valores críticos de concentração de OH^- e de tempo de aquecimento

Técnica	Concentração de OH^- (mol L^{-1})	Tempo de aquecimento (s)
Reflectância difusa	0,451	55,6
Imagem digital	0,437	53,3

Pela tabela 16 é possível verificar que houve boa concordância quanto aos pontos críticos pelas duas técnicas. As duas equações da superfície fornecem valores máximos de absorvância iguais a 0,587 e 0,189 para reflectância e imagem digital, respectivamente. Para confirmar experimentalmente os valores teóricos de máxima absorvância, foram realizados experimentos com os valores críticos dos reagentes. Os resultados estão descritos na tabela 17 e demonstram que não há diferença significativa entre os valores experimentais e teóricos, uma vez que os valores de t de Student calculados não excedem o valor tabelado de 4,303 para dois graus de liberdade e intervalo de confiança de 95%.

Tabela 17 – Confirmação do máximo de absorvância da superfície de resposta. $C_{\text{CRN}} = 200 \text{ mg L}^{-1}$ e $n = 3$

Técnica	Absorvância teórica	Absorvância experimental	t calculado ^a
Reflectância difusa	0,587	0,586±0,015	0,085
Imagem digital	0,189	0,184±0,006	1,580

^a Valores críticos de t ao nível de confiança de 95% e dois graus de liberdade; t tabelado igual a 4,303.

A otimização das condições experimentais utilizando planejamento experimental fez com que o sinal analítico para a reação aumentasse. Utilizando as condições não otimizadas antes do planejamento a absorbância do canal verde apresentou o valor de 0,071 com aquecimento e utilizando as condições fornecidas pelo planejamento fatorial o valor foi de 0,143, na condição de maior influência dos fatores. Nas condições otimizadas o valor de absorbância foi de 0,184.

4.4.6 Condições do μ PAD

Os experimentos anteriores foram realizados para determinar as condições experimentais ideais para o desenvolvimento da metodologia de análise de creatinina em urina (Tabela 18). Devido a concordância dos resultados entre as técnicas de detecção, selecionou-se a imagem digital por ser a mais acessível comercialmente.

Tabela 18 – Condições experimentais para a determinação de ácido úrico em urina

Variável	Concentração de OH ⁻ (mol L ⁻¹)	Concentração de ácido pícrico (mol L ⁻¹)	Tempo de aquecimento ^a (s)
Variável otimizada	0,437	0,02	50

^a Obtido através da média dos tempos de aquecimento para a CRN e AU.

Iniciou-se os experimentos da reação colorimétrica da creatinina no dispositivo analítico, determinando-se em qual zona seria colocado o reagente para obter uma coloração mais uniforme. Porém, ao adicionar o reagente em uma das zonas e adicionar a amostra após o reagente seco, não houve reação imediata, somente no outro dia é que a coloração alaranjada característica do produto formado foi observada. Dessa forma, buscou-se estratégias para que mesmo após a secagem do reagente, a reação entre ACP e creatinina ocorresse em pouco tempo.

Duplicando-se a concentração de OH⁻ do reagente a reação ocorreu mais rápido, com aparecimento da coloração após o aquecimento. É provável que parte do hidróxido interaja com os grupos OH da celulose, não estando disponível para a reação desejada. Dessa maneira, é necessário o aumento da concentração de OH⁻ no reagente. Ao aumentar a concentração de hidróxido no meio, a solubilidade do ácido pícrico diminui, assim, para dobrar a concentração de OH⁻ é preciso diminuir pela metade a concentração de ACP.

Com as novas condições foi determinada em qual zona seria colocado o reagente para obter uma coloração mais uniforme.

Pela figura 43 A e B é possível verificar que quando o reagente se encontra na zona de captação a coloração da zona de teste é mais uniforme e todo o reagente reage com a creatinina. Também, quando o reagente está na zona de captação o efeito meia lua, que é o efeito conhecido quando o formato que o produto colorido assume é o da figura 43 C e D, é diminuído.

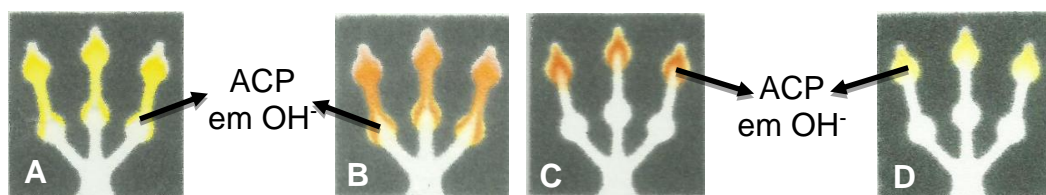


Figura 43 – Em (A) e (B) o μ PAD com ACP em OH^- na zona de captação, sendo em (A) o branco da reação e em (B) a reação com CRN. Em (C) e (D) o ACP em OH^- na zona de teste, sendo em (D) o branco da reação e em (C) a reação com CRN

O volume adicionado dos reagentes em cada zona é importante, pois o aumento do volume adicionado aumenta o sinal analítico e diminui o desvio padrão (EVANS, 2014). Por isso, em cada zona foi adicionado volumes crescentes de reagentes de 0,5 a 3 μL , para estudar sua influência. Os resultados obtidos estão descritos na figura 44 e demonstram que com o aumento do volume de reagente houve aumento da absorvância e diminuição do desvio-padrão. Para a concentração de OH^- igual a 1,0 mol L^{-1} , o patamar de absorvância de aproximadamente 0,175 e o menor desvio-padrão, são alcançados em um volume menor do que em concentração de OH^- igual a 0,9 mol L^{-1} . Dessa forma, será utilizado 2 μL do reagente preparado em meio de concentração de OH^- igual a 1,0 mol L^{-1} .

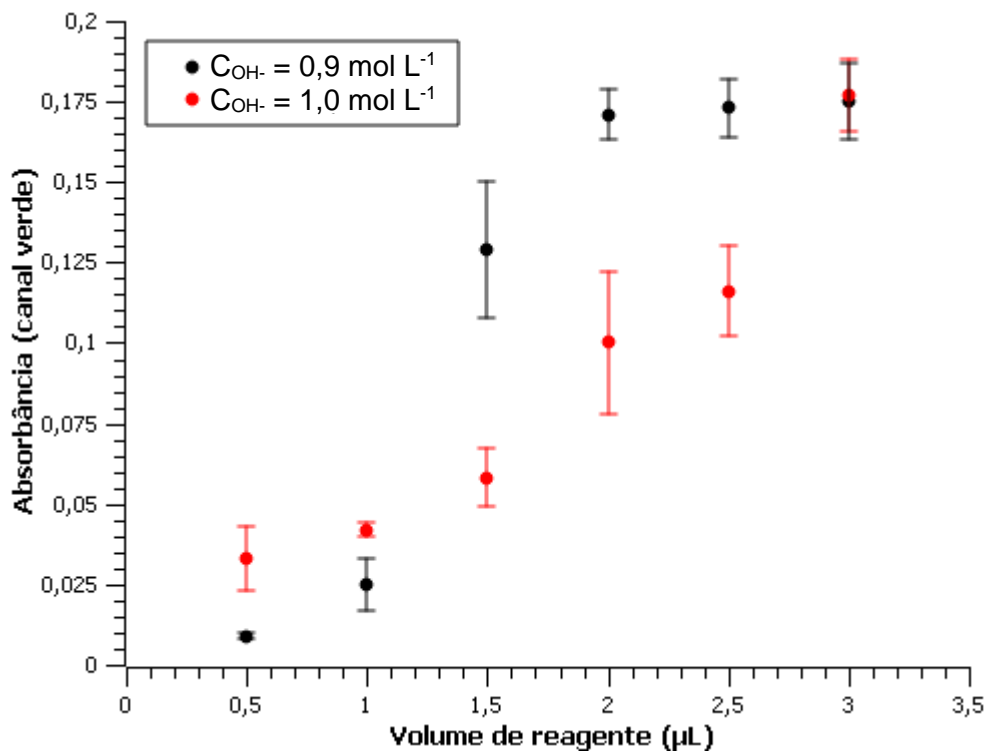


Figura 44 – Média e desvio-padrão da absorbância da reação colorimétrica da CRN com a variação do volume de reagentes e concentração de OH^- diferentes. $n = 3$ e $C_{CRN} = 350 \text{ mg L}^{-1}$

4.4.7 Curva analítica

Com as condições experimentais otimizadas foi construída uma curva de calibração de concentração de creatinina, variando de 50 a 600 mg L^{-1} , em função da absorbância do canal verde. Pela figura 45 é possível concluir que há relação linear entre absorbância e concentração na faixa estudada.

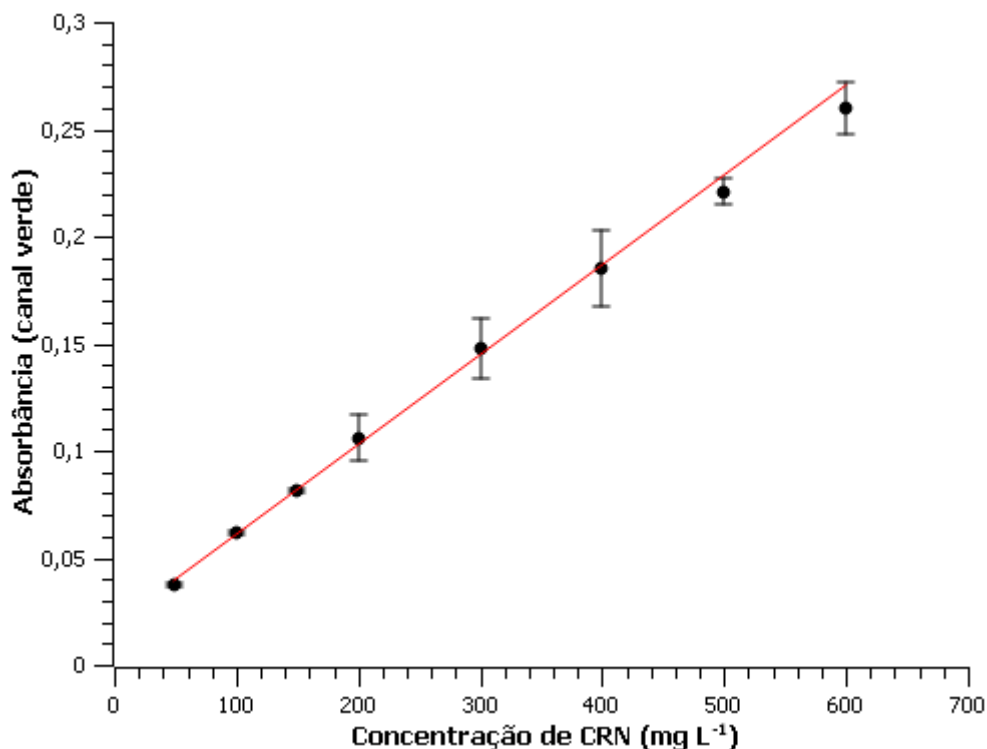


Figura 45 – Curva de calibração de absorvância em função da concentração. $C_{CRN} = 50$ a 600 $mg L^{-1}$. Canal de cor utilizado = verde

A curva de calibração apresenta a seguinte equação de reta: $A = 0,02229 + 0,0004010 C_{CRN}$, com coeficiente de determinação (R^2) igual a 0,998.

A determinação semi-quantitativa visual pode ser feita através dos resultados apresentados na paleta de cores da tabela 19.

Tabela 19 – Determinação semi-quantitativa visual de diferentes concentrações da curva analítica da CRN

Concentração de CRN ($mg L^{-1}$)	0	50	100	150	200	300	400	500	600
Zona de teste									

O limite de detecção, LD, e de quantificação, LQ, foram calculados como definidos pela IUPAC (LONG, 1983) seguindo as equações 9 e 10. Sendo que a média da absorvância de 10 brancos foi de 0,0010 e o desvio-padrão de 0,0021.

$$LD = \frac{3 \times SD \text{ branco}}{\text{inclinação da curva analítica}} \quad (\text{Equação 9})$$

$$LQ = \frac{10 \times \text{SD branco}}{\text{inclinação da curva analítica}} \quad (\text{Equação 10})$$

Dessa forma, o LD e LQ para o método proposto foram de 15,7 e 52,4 mg L⁻¹, respectivamente.

Os limites inferiores dos valores de referência para indivíduos normais, descritos no item 1.3, são de 640 mg L⁻¹ para mulheres e 815 mg L⁻¹ para homens. Como o LD e o LQ são muito menores que esses limites inferiores, é possível aplicar a metodologia desenvolvida em amostras com muito menos creatinina que os valores de referência, como são os casos de pacientes com insuficiência renal.

A repetibilidade da curva analítica é expressa pela porcentagem do desvio padrão relativo (%RSD) (TAVERNIERS, 2004) e é definida pela equação 11:

$$\%RSD = \frac{100 \times \text{SD}}{\bar{x}} \quad (\text{Equação 11})$$

A repetibilidade pode variar conforme a matriz e a concentração do analito. Para amostras biológicas o valor pode variar até cerca de 15 % nas concentrações limites e 10% para as demais concentrações (HUBER, 1998). Os valores obtidos de %RSD para as repetibilidades intra-dia e inter-dia encontram-se na tabela 20. Pode-se verificar que as porcentagens calculadas estão abaixo do limite aceitável, dessa maneira, a metodologia é repetitiva.

Tabela 20 – Porcentagem de repetibilidades intra-dia e inter-dia para a creatinina

Concentração (mg L ⁻¹)	Repetibilidade intra-dia (%RSD)	Repetibilidade inter-dia (%RSD)
150	3,3	3,8
400	2,6	4,6

4.4.8 Estudo de interferentes

O estudo de interferência foi realizado através do cálculo do fator de interferência para os compostos descritos em 3.3.13. O fator de interferência é calculado utilizando a seguinte equação 12 (ANDRADE, 1993):

$$FI = \frac{\text{Abs}(\text{analito} + \text{interferente})}{\text{Abs}(\text{analito})} \quad (\text{Equação 12})$$

Um fator de interferência, FI, igual a 1,00 significa que o composto não perturba o sistema nas condições estudadas. Um FI maior que 1,00 significa que o

composto exerce interferência positiva, aumentando o sinal analítico, enquanto que FI menor que 1,00 significa que há interferência negativa, na qual o composto diminui o sinal analítico. A interferência de um composto é significativa quando $FI < 0,90$ ou $FI > 1,10$ (ALMEIDA, 2008).

Pela tabela 21 é possível concluir que nenhum dos compostos testados apresenta interferência na determinação da creatinina, pois todos os fatores de interferência estão entre 0,96 e 1,04.

Tabela 21 – Fator de interferência para a creatinina dos possíveis compostos presentes na urina

Composto (Relação analito:interferente)	Fator de interferência (reflectância)	Fator de interferência (imagem digital)
Acetona (1:1)	1,00	1,01
Ácido ascórbico (1:1)	1,02	1,00
Ácido úrico (1:1)	1,00	1,02
Albumina (1:1)	1,00	0,99
Bilirrubina (25:1)	1,00	1,01
Creatina (1:1)	0,97	0,97
Glicose (1:1)	1,00	1,00
Piruvato (1:1)	1,01	1,02
Ureia (1:1)	1,01	1,02
Ureia (1:10)	1,02	0,99
CaCl ₂ (1:1)	0,98	0,96
KCl (1:1)	1,03	1,01
KH ₂ SO ₄ (1:1)	1,01	1,01
Na ₂ SO ₄ (1:1)	0,99	0,99
NaCl (1:1)	1,03	1,04
NH ₄ Cl (1:1)	1,01	1,02

4.5 Ácido úrico

Os resultados descritos a seguir foram realizados para o desenvolvimento da metodologia para análise do ácido úrico.

4.5.1 Testes qualitativos

Tradicionalmente o ácido úrico em soro, plasma ou urina é determinado pelo método colorimétrico que emprega o ácido fosfotúngstico em meio alcalino, formando o azul de tungstênio, medido no comprimento de onda de 700 nm. Porém,

pode ocorrer turvação da solução no decorrer da reação devido a precipitação de proteínas, além de compostos como ácido ascórbico e glicose reduzir o ácido fosfotúngstico produzindo resultados elevados falsos (TRIVEDI, 1978).

O método do ácido fosfotúngstico se baseia no fato de o ácido úrico ser um agente redutor, ou seja, apresenta a capacidade de reduzir substâncias se oxidando. Essa propriedade foi utilizada para desenvolver a nova metodologia.

O Fe^{3+} na presença de ácido úrico é reduzido a Fe^{2+} . O hexacianoferrato(III) de potássio, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, e a 1,10-Fenantrolina foram testados como agentes cromogênicos. A solução de hexacianoferrato(III) e Fe^{3+} apresenta coloração levemente amarelada, que ao adicionar solução de ácido úrico se torna azul, devido à redução do Fe^{3+} livre e no complexo a Fe^{2+} , gerando o azul da Prússia. Nas condições utilizadas houve precipitação do produto colorido, o que representa um problema para medidas por espectrofotometria, mas não por reflectância difusa utilizando reação em papel. A solução de 1,10-Fenantrolina e Fe^{3+} apresenta coloração amarelada, porém, ao adicionar solução de ácido úrico se torna avermelhada, devido à redução do Fe^{3+} a Fe^{2+} , gerando o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$. As reações em meio aquoso e em papel com os dois reagentes estão ilustradas nas figuras 46 e 47, respectivamente.

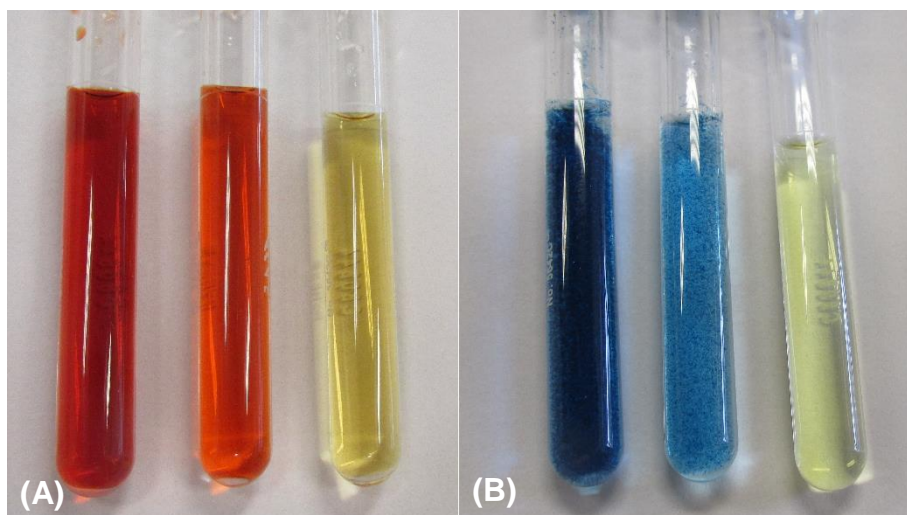


Figura 46 – Foto ilustrativa dos testes qualitativos da reação em meio aquoso do ácido úrico em concentrações de 1000 e 250 mg L^{-1} com Fe^{3+} /1,10-Fenantrolina em (A) e Fe^{3+} /hexacianoferrato(III) em (B). Os tubos à direita de cada imagem representam o branco e à esquerda a reação na maior concentração

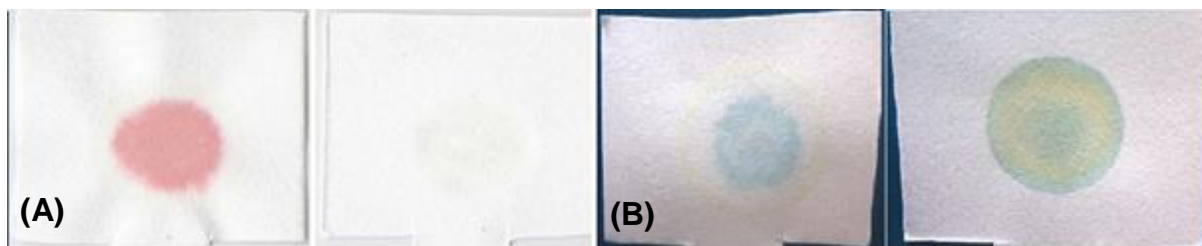


Figura 47 – Foto ilustrativa dos testes qualitativos da reação em papel do ácido úrico em concentrações de 250 mg L^{-1} com Fe^{3+} /1,10-Fenantrolina em (A) e Fe^{3+} /hexacianoferrato(III) em (B). O papel à direita de cada imagem representa o branco e à esquerda a reação com o analito

Diferente do que ocorreu em meio aquoso, o branco da reação de Fe^{3+} /hexacianoferrato (III) apresentou absorção no mesmo comprimento de onda do produto colorido, com crescente absorbância com o passar do tempo. Já a reação Fe^{3+} /1,10-Fenantrolina com e sem ácido úrico apresentou boa diferenciação do branco e do analito. Porém, o branco também apresentou coloração, mas depois de decorrido muito tempo. Para diminuir a possível interferência da adição de Fe^{3+} e 1,10 – fenantrolina, os dois são adicionados separadamente, essa solução não alterou a coloração do branco da reação com hexacianoferrato (III). Dessa forma, foram selecionados os reagentes Fe^{3+} e 1,10-Fenantrolina para a nova metodologia de análise de ácido úrico.

4.5.2 Determinação da estequiometria da reação

A reação de complexação do ferro (II) é bem conhecida e está descrita na literatura. Nela três moléculas de 1,10-Fenantrolina combinam-se, por meio de doação de pares de elétrons, com um íon Fe^{2+} formando o complexo $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$ de coloração avermelhada, como descrito na figura 48.

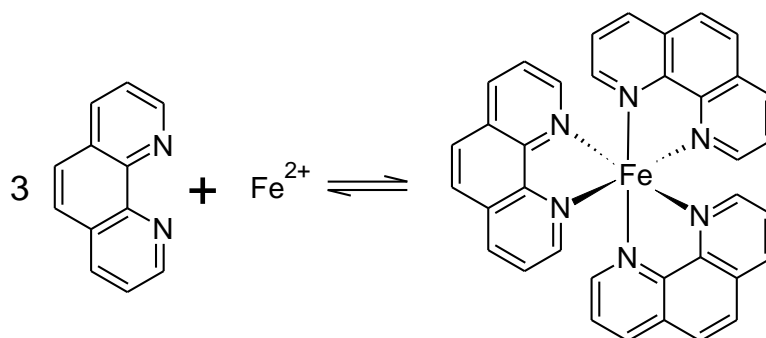


Figura 48 – Reação de 1,10-Fenantrolina com Fe^{2+} formando o $[\text{Fe}(\text{fen})_3]^{2+}$

A reação entre o Fe^{3+} e o ácido úrico não está descrita na literatura. Dessa

forma, é importante determinar a estequiometria dessa reação. Para isso foi utilizado o método de Job, ou método das Variações Contínuas (SURESHA, 2008). Nele soluções de Fe^{3+} e ácido úrico em concentrações analíticas iguais são misturadas de maneira que o volume total e o número de mols total de cada uma das misturas sejam constantes, mas a razão molar dos reagentes deve variar de forma sistemática. Dessa forma, foram preparadas soluções variando a fração molar de ácido úrico e utilizando excesso de 1,10 – fenantrolina. A absorvância da solução foi medida no comprimento de onda de 510 nm com auxílio do espectrofotômetro em cubeta de vidro de 1,0 cm de caminho ótico. A figura 49 representa os resultados obtidos.

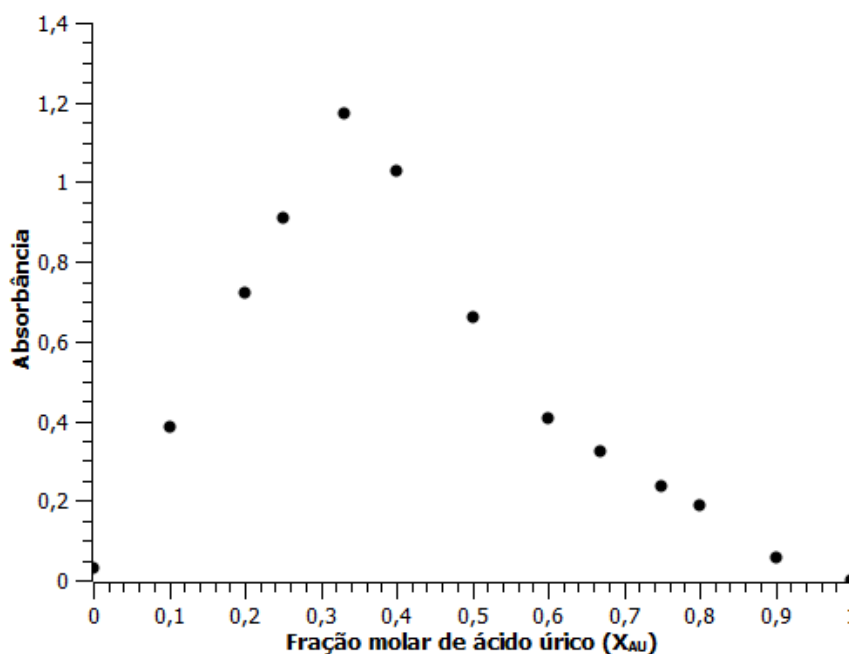


Figura 49 – Gráfico de Job para a determinação da estequiometria da reação de Fe^{3+} e AU. $\lambda = 510$ nm

Pela figura 49 é possível identificar o máximo de absorvância na fração molar, X_{AU} , igual a 0,33, ou seja, a maior absorvância ocorre quando a relação estequiométrica é 1 AU : 2 Fe^{3+} , sendo essa a estequiometria da reação.

Simoyi (2003) descreve que o produto para a reação de oxidação do ácido úrico é a alantoína. A reação de conversão do ácido úrico a alantoína está descrita na figura 50. Dessa maneira, acredita-se que o produto da reação do AU com o Fe^{3+} seja a alantoína como ilustrado na figura 51.

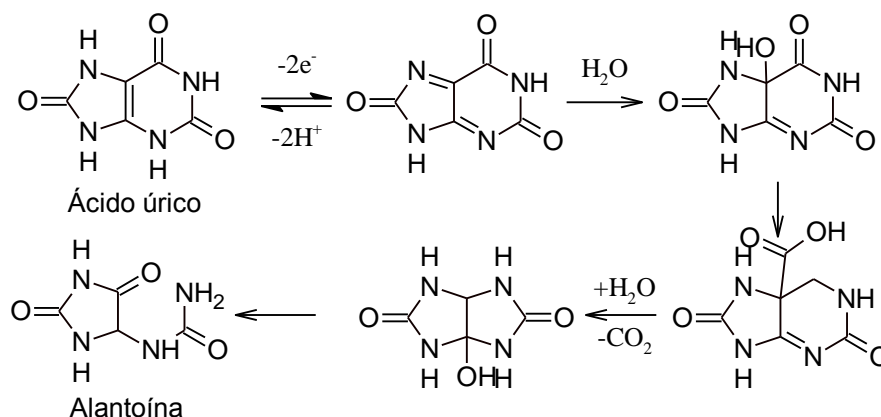


Figura 50 – Reação de conversão do ácido úrico a alantoína

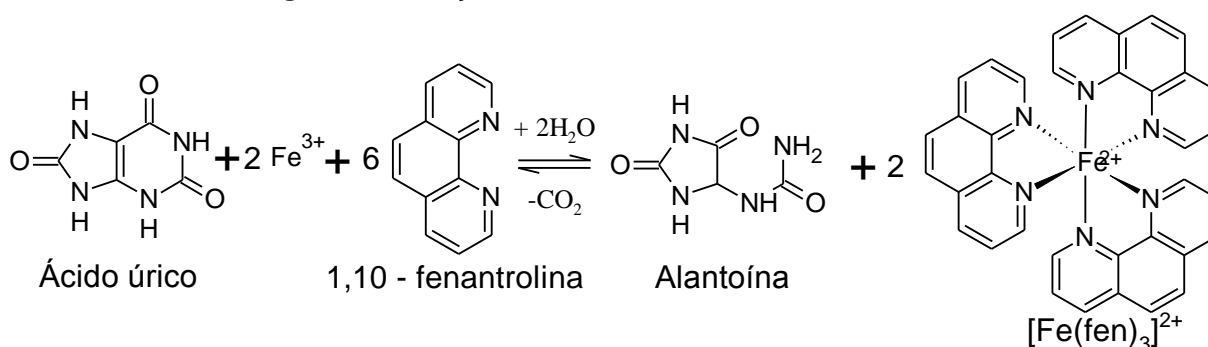


Figura 51 – Reação global do ácido úrico com Fe³⁺ e 1,10 – fenantrolina

4.5.3 Obtenção do espectro de absorção e canal de maior sensibilidade

Determinados os reagentes cromogênicos a serem utilizados e a estequiometria da reação, o desenvolvimento da nova metodologia de análise de ácido úrico foi iniciada com a determinação da ordem de adição dos reagentes. Foi utilizado 10 µL de cada reagente ou analito. A figura 52 ilustra as diferentes ordens de adição.

Pelos *spot-test* é possível concluir que a melhor ordem de adição, a que fornece uma mancha central, mais uniforme e mais intensa, é Fe³⁺ + AU + 1,10 – fenantrolina. Após essa definição, foi obtido o espectro de absorção do produto colorido utilizando a reflectância difusa (Figura 53).

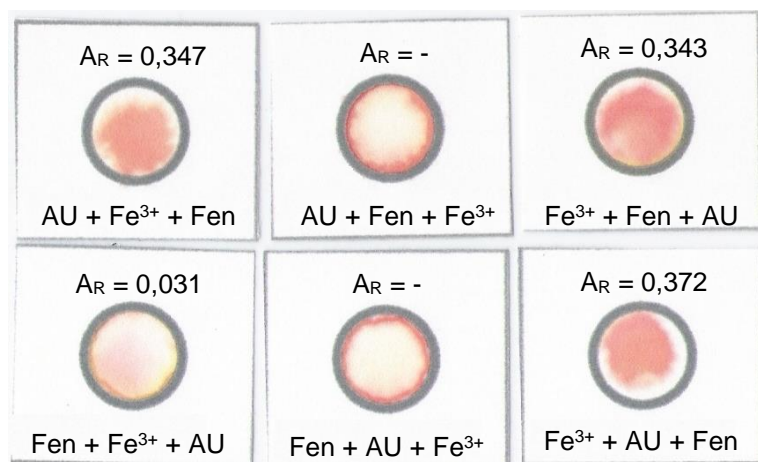


Figura 52 – Ordem de adição dos reagentes e do analito no *spot-test*. Concentração de ácido úrico igual a 200 mg L⁻¹

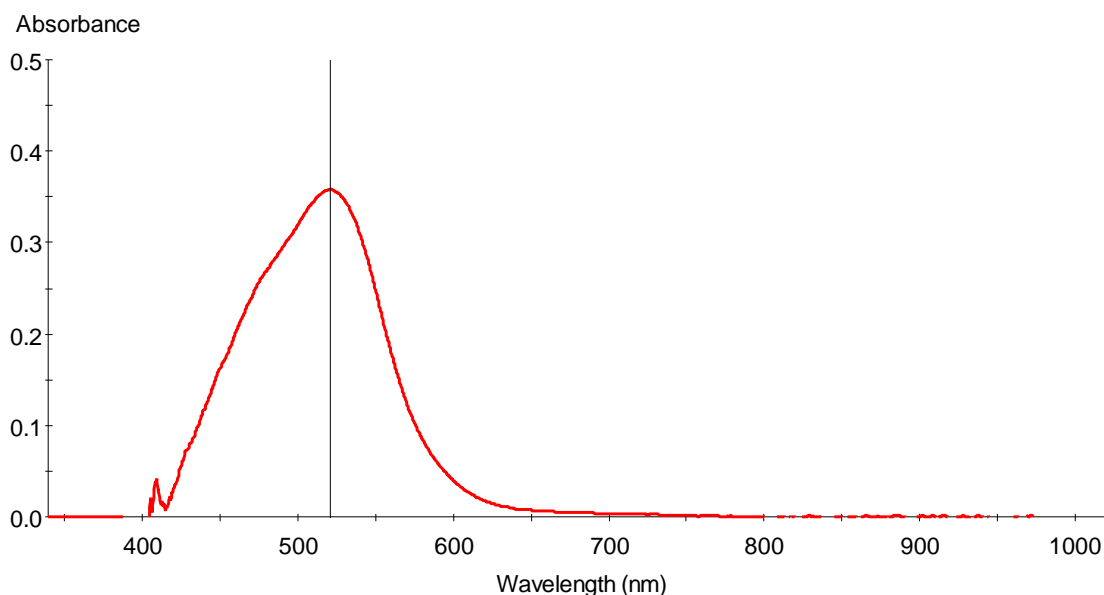


Figura 53 – Espectro de absorção do produto colorido obtido da reação entre o Fe³⁺, AU e 1,10 – fenantrolina. $C_{AU} = 200 \text{ mg L}^{-1}$

Como pode ser observado na figura 53 o comprimento de máxima absorção do produto formado é 515 nm. Pela tabela 9, também, é provável que nessa reação o canal de maior sensibilidade seja o Verde, G. Para determinar o canal de maior sensibilidade o *spot-test* que foi utilizado na determinação do comprimento de onda de máxima absorção foi digitalizado; os dados obtidos estão descritos na tabela 22.

Tabela 22 – Valores de intensidade do branco, de intensidade e absorbância do reagente na presença de ácido úrico em concentração igual a 200 mg L⁻¹. n = 3

Canal de cor	Intensidade branco	Intensidade	Absorbância
Vermelho (R)	247,482	242,805	0,008
Verde (G)	233,056	165,740	0,148
Azul (B)	189,506	151,082	0,098

Como era esperado, o canal de maior absorção e conseqüentemente o de maior sensibilidade é o verde, G. Da mesma forma que para a creatinina a detecção por imagem digital é menos sensível do que a reflectância difusa.

4.5.4 Estabilidade do produto da reação

A avaliação da estabilidade do produto colorido formado foi realizada por medidas de reflectância difusa e de imagem digital um minuto após a realização da aplicação até duas horas (Figura 54).

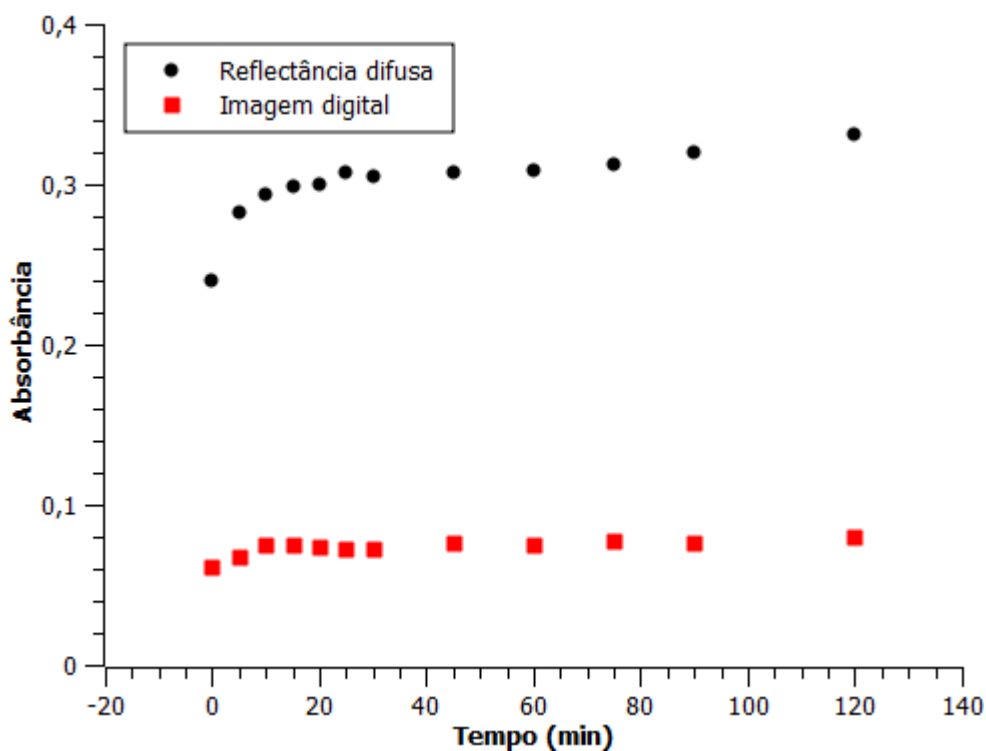


Figura 54 – Estabilidade do produto colorido formado entre 1 e 120 minutos. $\lambda = 515$ nm e canal = G. C_{CRN} = 200 mg L⁻¹

Os resultados obtidos no estudo de estabilidade do produto colorido demonstram que o produto apresenta estabilidade de 10 a 75 minutos, pois os valores de absorvância pelos dois métodos são aproximadamente constantes nesse

intervalo de tempo. Dessa forma, esse tempo é razoável para as leituras após a aplicação e secagem.

4.5.5 Fatores que alteram o sinal analítico

4.5.5.1 Concentração de H⁺ e pH

Dependendo do pH a solução de Fe³⁺ pode sofrer hidrólise gerando hidroxocomplexos de ferro e/ou precipitado de hidróxido de ferro (BAES, 1976). Para evitar a precipitação e manter no meio o ferro na forma iônica é necessário manter o meio ácido. Assim, foram feitos experimentos com concentrações de HCl variando entre 0,5 a 1 mol L⁻¹ para verificar se a concentração de H⁺ altera a resposta analítica, como mostrado na tabela 23.

Segundo a literatura, a faixa de pH na qual a metodologia, empregando 1,10-Fenantrolina como complexante de Fe²⁺ é quantitativa, é de 2 a 9 (SANDELL, 1959). Dessa forma, é necessário ajustar o pH do meio após a adição do ferro (III) em meio ácido para garantir que esteja nessa faixa. Assim, foram feitos experimentos com a adição de acetato de sódio à solução de 1,10-Fenantrolina para que ao misturar os reagentes fosse formado um tampão de pH na faixa de 4 a 5, cujos resultados encontram-se na tabela 24.

Tabela 23 – Estudo da variação da concentração de H⁺ na solução de Fe³⁺. n = 3. C_{AU} = 250 mg L⁻¹. pH = 4

Concentração HCl (mol L ⁻¹)	Absorbância (reflectância) (λ = 515 nm)	Absorbância (imagem) (canal verde)
0,50	0,376±0,011	0,145±0,005
0,75	0,384±0,047	0,142±0,009
1,0	0,372±0,031	0,144±0,010

Tabela 24 – Estudo da variação do pH do meio por meio de adição de acetato de sódio à solução de 1,10 – fenantrolina. n = 3, C_{AU} = 250 mg L⁻¹ e C_{HCl} = 0,5 mol L⁻¹

pH	Absorbância (reflectância) (λ = 515 nm)	Absorbância (imagem) (canal verde)
4	0,376±0,011	0,145±0,005
4,5	0,392±0,009	0,148±0,006
5	0,379±0,014	0,141±0,011

Pelos resultados das tabelas 23 e 24 é possível observar que não há variação

significativa com a mudança da concentração de H^+ na solução de Fe^{3+} e nem pela alteração do pH. Dessa forma, será utilizada a concentração de HCl igual a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e pH igual a 4 por motivo de economia de reagentes.

4.5.5.2 Aquecimento do meio reacional

A estratégia para o aumento da sensibilidade da reação colorimétrica do ácido úrico foi a mesma utilizada para a creatinina, o aquecimento com o secador de cabelos por 60 segundos. A adição de surfactante também não pode ser utilizada por ultrapassar as barreiras hidrofóbicas.

Como pode ser observado na tabela 25, o aquecimento aumentou o sinal analítico em aproximadamente 20%, dessa maneira, o aquecimento será um dos fatores utilizados no planejamento experimental.

Tabela 25 – Valores de absorvância obtido para os ensaios de aumento de sensibilidade $n = 3$, $C_{AU} = 250 \text{ mg L}^{-1}$, $pH = 4$ e $C_{HCl} = 0,5 \text{ mol L}^{-1}$

Estratégia	Absorvância (reflectância) ($\lambda = 515 \text{ nm}$)	Absorvância (imagem) (canal verde)
Sem aquecimento	$0,371 \pm 0,025$	$0,139 \pm 0,012$
Com aquecimento	$0,447 \pm 0,027$	$0,168 \pm 0,004$

4.5.6 *Otimização das condições experimentais*

A otimização das condições experimentais foi feita utilizando planejamento fatorial e na sequência o planejamento composto central.

4.5.6.1 Planejamento fatorial

Foi elaborada uma matriz de planejamento fatorial do tipo 2^3 , com auxílio do *software* estatístico Minitab 16, na qual os fatores estudados foram: concentração de 1,10 – fenantrolina, concentração de Fe^{3+} e tempo de aquecimento. Na tabela 26 são descritos os fatores utilizados, juntamente com seus níveis e codificações. Na tabela 27 são descritos os níveis de cada fator em cada ensaio realizado.

Tabela 26 – Descrição dos níveis e codificação de cada fator

Fatores	Mínimo (-1)	Máximo (+1)
Concentração de Fe ³⁺ (mol L ⁻¹)	0,02	0,04
Concentração de 1,10-Fenantrolina (mol L ⁻¹)	0,06	0,12
Tempo de aquecimento (s)	10	60

Tabela 27 – Matriz de ensaios descrevendo os fatores codificados utilizados no planejamento experimental

Ensaio	Concentração de Fe ³⁺	Concentração de 1,10 – fenantrolina	Tempo de aquecimento
1	-1	-1	-1
2	-1	+1	-1
3	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	-1	+1	+1
7	+1	-1	+1
8	+1	+1	+1

Os resultados de absorbância obtidos por meio da reflectância e da imagem digital estão dispostos na tabela 28.

Tabela 28 – Resultados dos ensaios do planejamento experimental por meio da reflectância e da imagem digital. C_{AU} = 250 mg L⁻¹ e n = 3

Ensaio	Absorbância (λ = 515 nm)	Absorbância (canal verde)
1	0,343±0,026	0,138±0,002
2	0,371±0,035	0,172±0,008
3	0,295±0,007	0,135±0,007
4	0,366±0,016	0,178±0,001
5	0,378±0,047	0,180±0,011
6	0,385±0,014	0,192±0,010
7	0,335±0,036	0,172±0,002
8	0,396±0,015	0,189±0,007

O tratamento dos dados obtidos foi realizado com auxílio dos *softwares* estatísticos Minitab 16 e STATISTICA versão 7. As figuras 55 e 56 representam os gráficos de pareto quando a detecção é realizada com a reflectância e com a imagem digital, respectivamente.

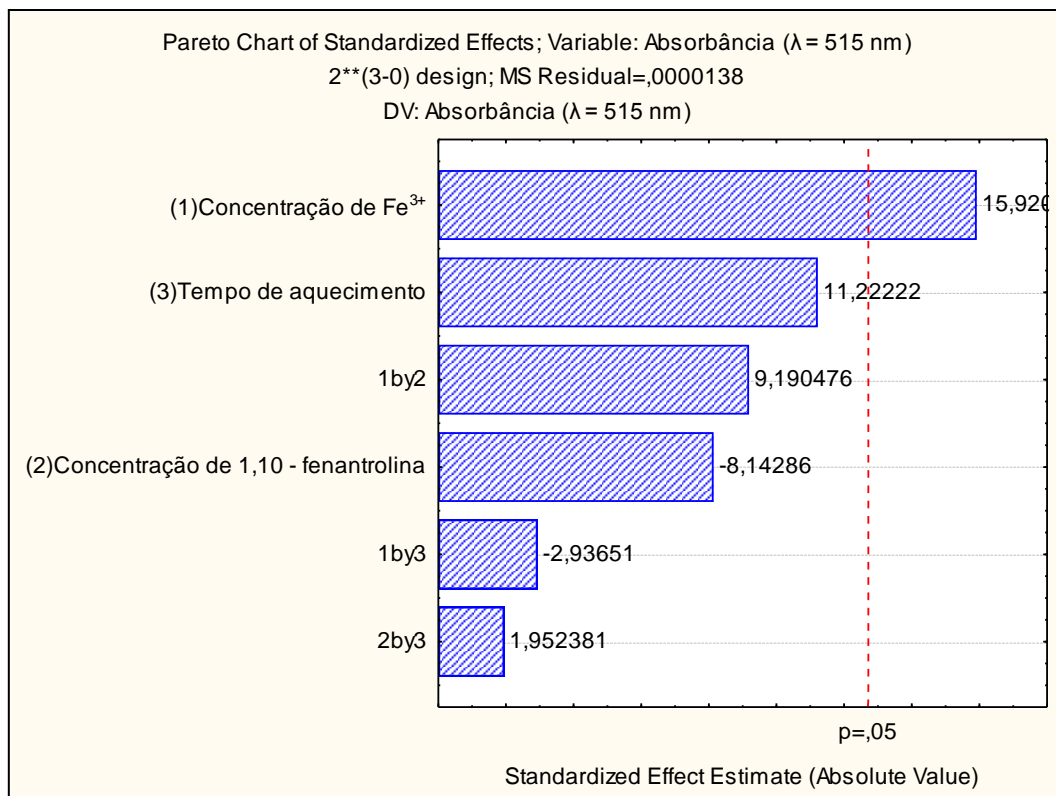


Figura 55 – Gráfico de pareto para a análise de ácido úrico com detecção por reflectância

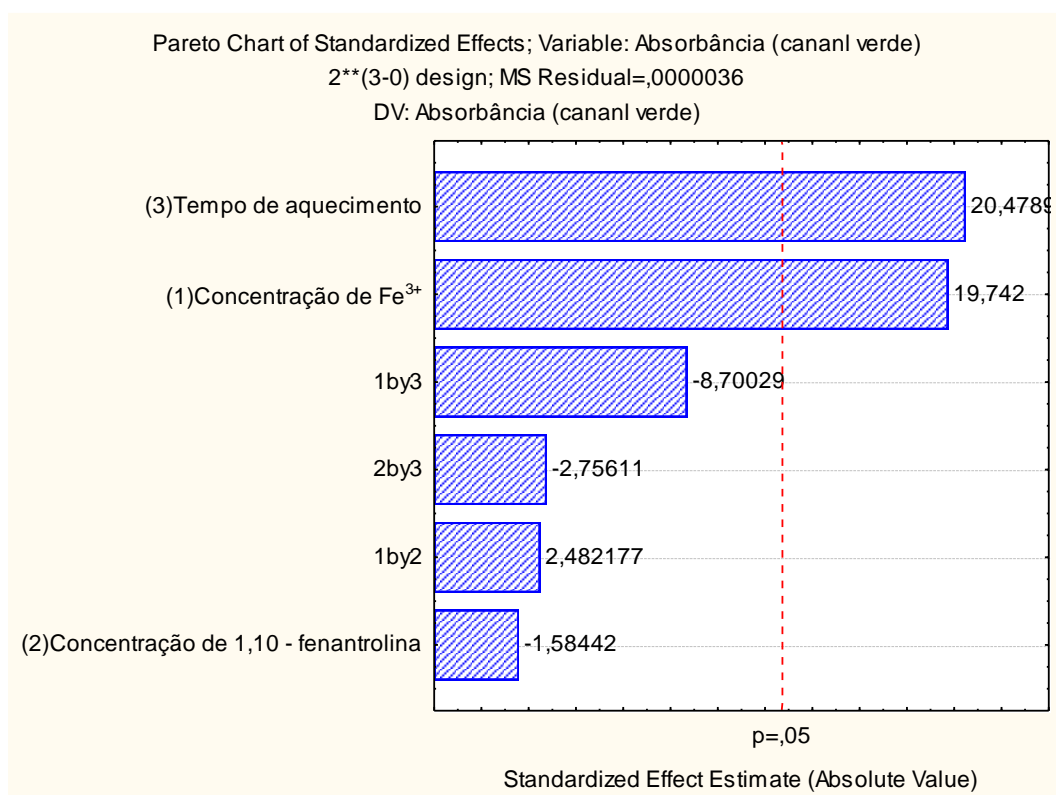


Figura 56 – Gráfico de pareto para a análise de ácido úrico com detecção por imagem digital

Por meio do gráfico de pareto com detecção por imagem digital é possível

verificar que os fatores que mais influenciam o sistema e que alteram significativamente o sistema, com intervalo de confiança de 95 % ($p = 0,05$), é a concentração de Fe^{3+} e o tempo de aquecimento. O fator de menor influência é a concentração de 1,10 - fenantrolina. Para entender melhor os resultados e facilitar a análise foram construídos gráficos de efeitos principais para cada técnica.

As figuras 57 e 58 representam os gráficos de efeitos principais dos fatores para a reflectância e a imagem digital, respectivamente. As duas técnicas fornecem que a maior sensibilidade ocorre quando a concentração de Fe^{3+} e o tempo de aquecimento estão no maior nível e quando a concentração de 1,10-Fenantrolina está no menor nível. Pela detecção por imagem, que irá ser utilizado na detecção do μPAD , os fatores de maior influência são o tempo de aquecimento seguindo pela concentração de Fe^{3+} , o que concorda com o gráfico de pareto.

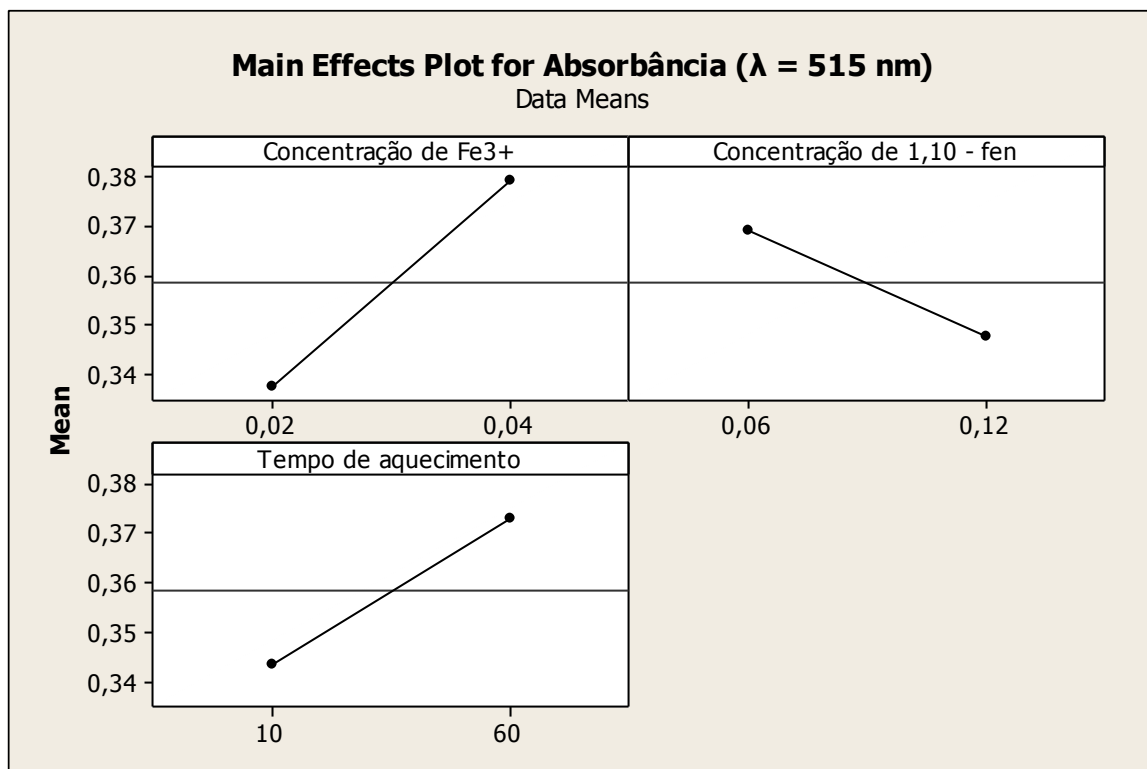


Figura 57 – Gráfico de efeitos principais para a detecção por reflectância

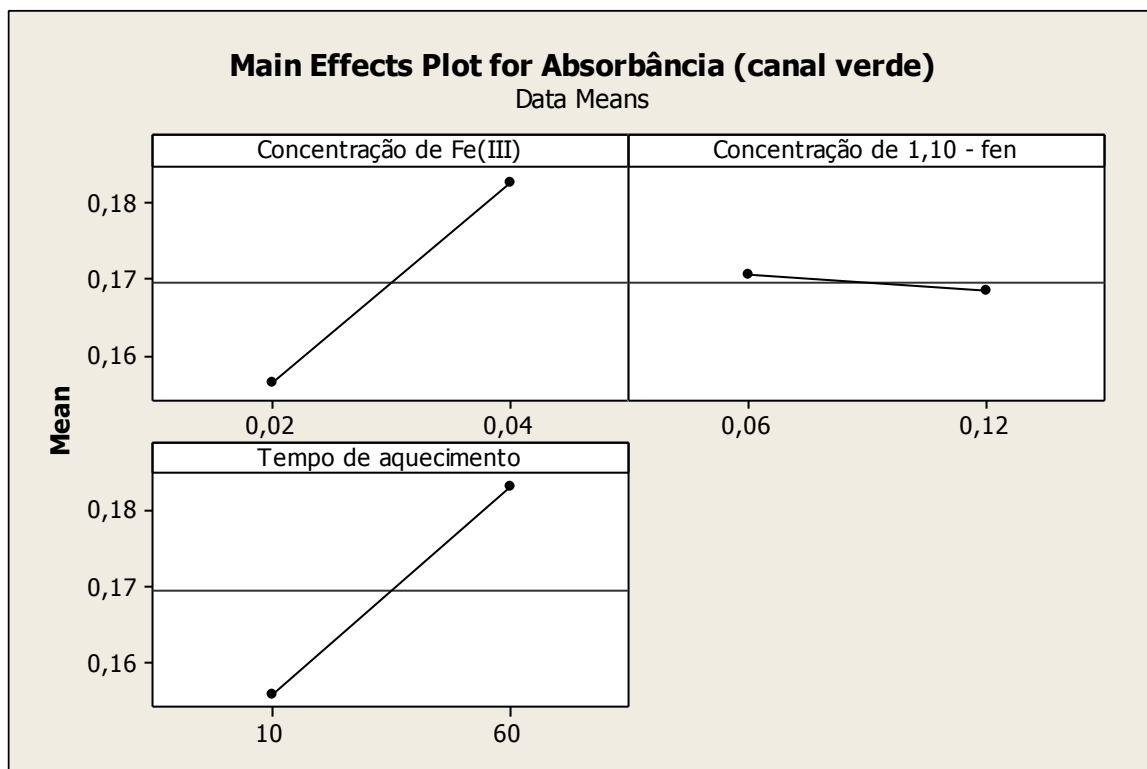


Figura 58 – Gráfico de efeitos principais para a detecção por imagem digital

Tendo em vista os resultados obtidos, um novo planejamento, o planejamento composto central ou superfície de resposta, foi realizado com duas variáveis de maior influência para encontrar a condição experimental ótima, a concentração de 1,10 - fenentrolina, de menor influência, foi mantido no nível de maior resposta (0,06 mol L⁻¹).

4.5.6.2 Planejamento composto central

A partir dos ensaios do planejamento fatorial 2³ da imagem digital, a técnica que será utilizada nos μ PAD, verificou-se que a influência dos fatores no sinal analítico foi em ordem decrescente: tempo de aquecimento, concentração de Fe³⁺ e concentração de 1,10 - fenantrolina. Dessa forma, o novo planejamento encontrará as melhores condições de análise, ou seja, que forneça a maior resposta analítica, em relação as duas variáveis de maior influência, o tempo de aquecimento e a concentração de Fe³⁺.

Na tabela 29 são apresentados os valores codificados e não-codificados para os fatores utilizados no planejamento.

Tabela 29 – Fatores codificados e não-codificados utilizados no planejamento composto central

Ensaio	Tempo de aquecimento	Concentração de Fe ³⁺	Tempo de aquecimento (s)	Concentração de Fe ³⁺ (mol L ⁻¹)
1	-1	-1	15	0,020
2	1	-1	75	0,020
3	-1	1	15	0,050
4	1	1	75	0,050
5	-1,41	0	2,6	0,035
6	1,41	0	87,4	0,035
7	0	-1,41	45	0,014
8	0	1,41	45	0,056
9	0	0	45	0,035
10	0	0	45	0,035
11	0	0	45	0,035
12	0	0	45	0,035
13	0	0	45	0,035

Na tabela 30 são apresentados os valores de absorvância para cada ensaio do planejamento utilizando as duas técnicas.

Tabela 30 – Valores de absorvância de cada ensaio do planejamento utilizando detecção por reflectância ($\lambda = 515 \text{ nm}$) e imagem digital (canal verde). Concentração de AU = 250 mg L⁻¹ e n = 3

Ensaio	Absorvância ($\lambda = 515 \text{ nm}$)	Absorvância (canal verde)
1	0,413±0,004	0,178±0,009
2	0,447±0,013	0,192±0,004
3	0,404±0,016	0,211±0,007
4	0,397±0,008	0,217±0,004
5	0,406±0,016	0,203±0,008
6	0,411±0,018	0,205±0,008
7	0,377±0,015	0,191±0,011
8	0,453±0,016	0,232±0,011
9	0,450±0,028	0,231±0,014
10	0,441±0,026	0,230±0,013
11	0,445±0,027	0,228±0,013
12	0,435±0,001	0,225±0,004
13	0,459±0,011	0,235±0,010

Os gráficos de superfície de resposta e curva de nível dos dados apresentados na tabela 28 estão representados nas figuras de 59 a 62.

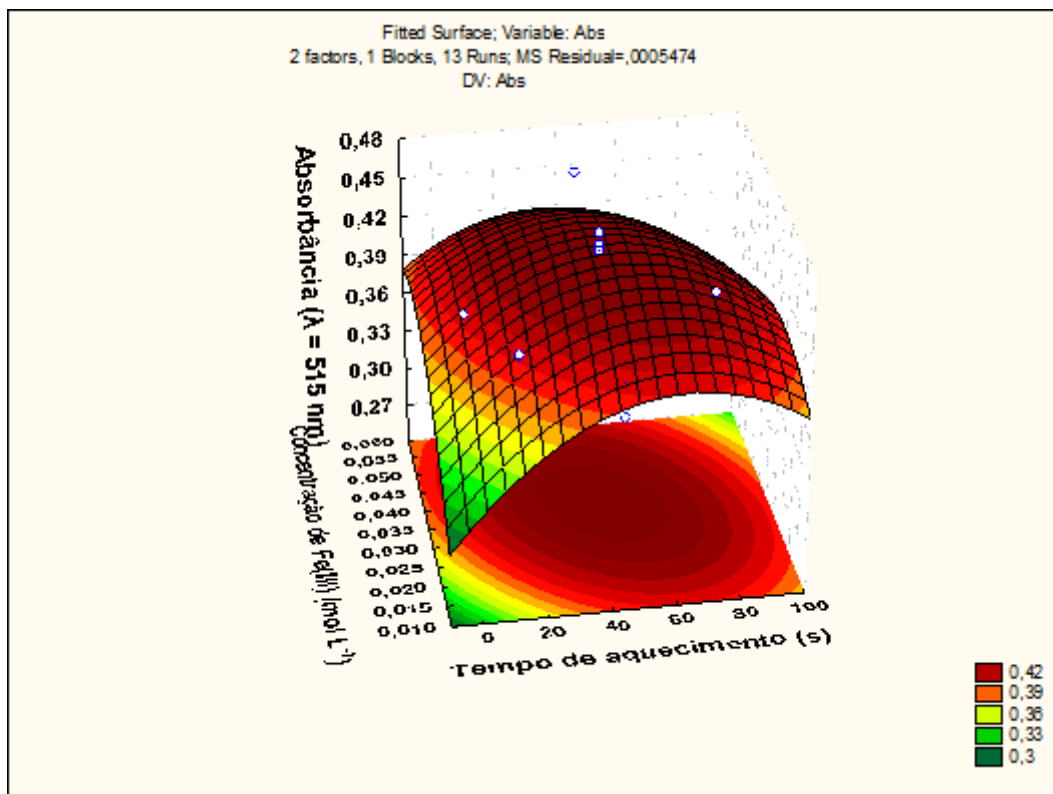


Figura 59 – Superfície de resposta obtida através dos resultados da tabela 30 do planejamento composto central do AU, utilizando a reflectância difusa como detecção

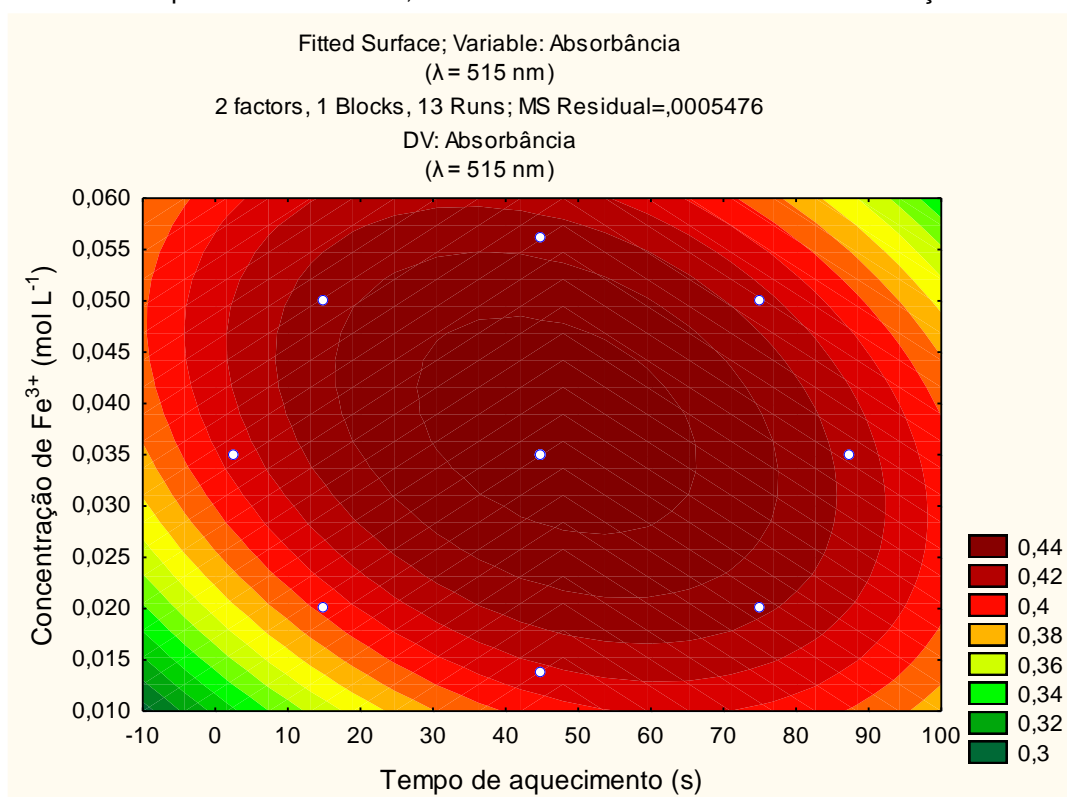


Figura 60 – Gráfico de contorno obtido através dos resultados da tabela 30 do planejamento composto central do AU, utilizando a reflectância difusa como detecção

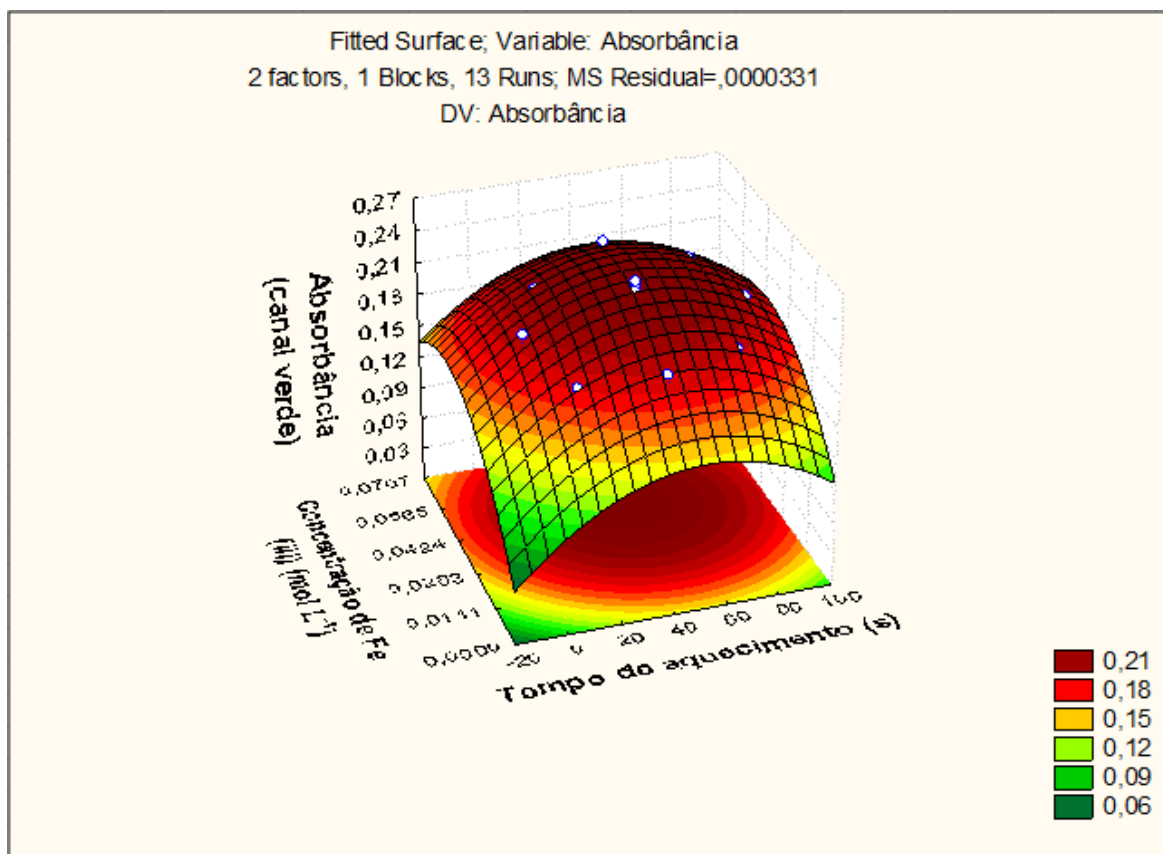


Figura 61 – Superfície de resposta obtida através dos resultados da tabela 30 do planejamento composto central do AU, utilizando a imagem digital como detecção

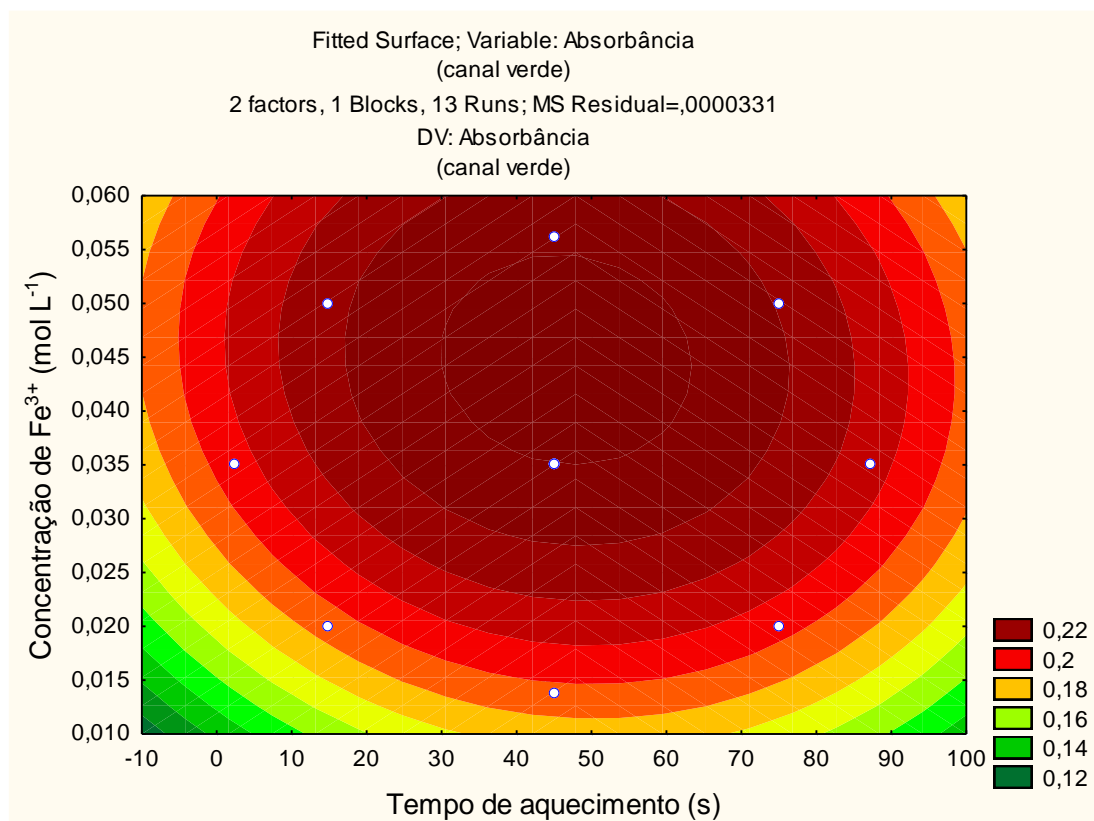


Figura 62 – Gráfico de contorno obtido através dos resultados da tabela 30 do planejamento composto central do AU, utilizando a imagem digital como detecção

Pelas figuras 59 a 62 é possível observar que há uma região de maior absorvância situada entre tempo de aquecimento de 30 a 60 segundos, sendo que há uma ligeira diferença entre a faixa de concentração de Fe^{3+} que fornece maior absorvância pelas duas técnicas. A reflectância fornece a faixa de 0,028 a 0,048 mol L^{-1} e a imagem digital de 0,036 a 0,053 mol L^{-1} . Nessas duas regiões há maior absorvância e, conseqüentemente, maior sensibilidade para a metodologia

A equação para a curva de nível utilizando a reflectância difusa como detecção é:

$$\text{Abs} = 0,269 + 0,00272t - 0,00002t^2 + 6,004C_{\text{Fe}^{3+}} - 65,093C_{\text{Fe}^{3+}}^2 - 0,0228tC_{\text{Fe}^{3+}} \text{ (Equação 13)}$$

A equação para a curva de nível utilizando a imagem digital como detecção é:

$$\text{Abs} = 0,0914 + 0,00173t - 0,00002t^2 + 4,600C_{\text{Fe}^{3+}} - 49,417C_{\text{Fe}^{3+}}^2 - 0,00377tC_{\text{Fe}^{3+}} \text{ (Equação 14)}$$

As equações das curvas de nível fornecem os valores críticos dos dois fatores estudados, como pode ser visto na tabela 31.

Tabela 31 – Valores críticos de concentração de OH^- e de tempo de aquecimento

Técnica	Concentração de Fe^{3+} (mol L^{-1})	Tempo de aquecimento (s)
Reflectância difusa	0,0379	47,0
Imagem digital	0,0448	46,7

Pela tabela 31 é possível verificar que houve boa concordância quanto ao tempo de aquecimento crítico. Há uma pequena diferença entre as concentrações de Fe^{3+} críticas. As duas equações da superfície fornecem valores máximos de absorvância iguais a 0,447 e 0,235 para reflectância e imagem digital, respectivamente. Para confirmar experimentalmente os valores teóricos de máxima absorvância, foram realizados experimentos com os valores críticos dos reagentes. Os resultados estão descritos na tabela 32 e demonstram que não há diferença significativa entre os valores experimentais e teóricos, uma vez que os valores de t de Student calculados não excedem o valor tabelado de 4,303 para dois graus de liberdade e intervalo de confiança de 95%.

Tabela 32 – Confirmação do máximo de absorvância da superfície de resposta. Concentração de AU = 250 mg L⁻¹ e n = 3

Técnica	Absorvância teórica	Absorvância experimental	t calculado ^a
Reflectância difusa	0,447	0,443	1,286
Imagem digital	0,235	0,246	2,231

a - Valores críticos de t ao nível de confiança de 95% e dois graus de liberdade; t tabelado igual a 4,303.

A otimização das condições experimentais utilizando planejamento experimental fez com que o sinal analítico para a reação aumentasse. Utilizando as condições não otimizadas antes do planejamento a absorvância do canal verde apresentou o valor de 0,168 com aquecimento e utilizando as condições fornecidas pelo planejamento fatorial o valor foi de 0,192, na condição de maior influência dos fatores. Nas condições otimizadas o valor de absorvância foi de 0,246.

4.5.7 Condições do μ PAD

Os experimentos anteriores foram realizados para determinar as condições experimentais ideais para o desenvolvimento da metodologia de análise de ácido úrico em urina (Tabela 33).

As condições utilizadas para o desenvolvimento da metodologia são as obtidas pela imagem digital, pois são próximas da obtida pela reflectância e essa será a técnica utilizada na detecção dos μ PAD.

Tabela 33 – Condições experimentais para a determinação de ácido úrico em urina

Variável	Concentração de Fe ³⁺ (mol L ⁻¹)	Concentração de 1,10-Fenantrolina (mol L ⁻¹)	Tempo de aquecimento ^a (s)
Variável otimizada	0,0448	0,06	50

^a – Obtido através da média dos tempos de aquecimento para a CRN e AU.

Iniciou-se os experimentos da reação colorimétrica do ácido úrico no dispositivo analítico, determinando-se em qual zona seria colocado cada reagente, pois se fossem adicionados na mesma zona haveria formação do produto colorido mesmo sem analito, como descrito no item 4.3.3. A figura 63 ilustra a adição dos reagentes nas duas posições.

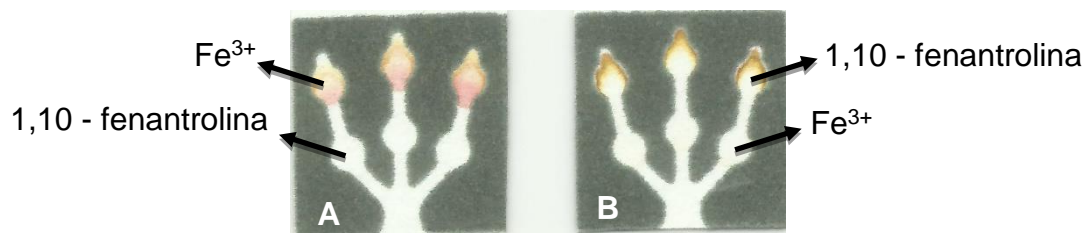


Figura 63 – Em (A) o μ PAD com Fe^{3+} na zona de detecção e 1,10-Fenantrolina na zona de captação. Em (B) a 1,10-Fenantrolina na zona de detecção e Fe^{3+} na zona de captação

É possível observar que foi obtida uma coloração melhor e de mesma coloração do *spot-test* quando o Fe^{3+} é adicionado na zona de teste e 1,10-Fenantrolina na zona de captação. Nessa condição o efeito meia lua também é diminuído.

Observou-se que com o passar do tempo a zona com Fe^{3+} , antes de receber a amostra, adquiria coloração amarelada. Isso ocorria devido ao fato de o íon ferro estar em presença de HCl, um ácido volátil. Dessa forma, foram utilizados ácidos fixos, H_2SO_4 e H_3PO_4 , para diminuir esse problema. Foram preparadas soluções de Fe^{3+} em HCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e em H_2SO_4 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ e H_3PO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ para igualar a concentração de H^+ no meio. Na própria solução de Fe^{3+} foi possível notar diferença na coloração, a solução contendo HCl tem cor esverdeada, enquanto que a em meio de H_2SO_4 é levemente esverdeada e em H_3PO_4 incolor. No papel, as zonas com Fe^{3+} com ácido sulfúrico ou fosfórico não apresentaram nenhuma coloração, mesmo após transcorrido muito tempo. Para determinar qual dos dois ácidos será utilizado, foi analisada uma solução de AU utilizando os dois ácidos. Pela figura 64 pode-se ver que quando é utilizado ácido fosfórico a coloração se concentra no início da zona, já com ácido sulfúrico a coloração preenche quase toda a zona de teste. Assim, pode-se imaginar que o ferro fique adsorvido no papel, porém, pela figura 65 foi comprovado que o Fe^{3+} é arrastado pela amostra. Dessa maneira, é melhor utilizar o H_2SO_4 , pois facilita o tratamento por imagem digital e a visualização da coloração.

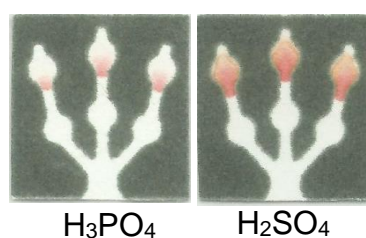


Figura 64 – Determinação de AU utilizando Fe^{3+} com H_3PO_4 $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ à esquerda e H_2SO_4 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ à direita. $C_{\text{AU}} = 300 \text{ mg L}^{-1}$



Figura 65 – Experimento para comprovar que o Fe^{3+} não fica adsorvido no papel e é arrastado pela amostra. Coloração avermelhada refere-se ao complexo de Fe^{3+} com tiocianato

Para determinar o volume de reagente em cada zona foram adicionados volumes crescentes de reagentes de 0,5 a 3 μL . Os resultados obtidos estão descritos na figura 66 e demonstram que com o aumento do volume de reagente houve aumento da absorbância até um patamar de 0,120 e diminuição no desvio-padrão. Também, que o volume de 2 μL fornece baixo desvio e está no patamar absorbância, sendo esse o volume otimizado.

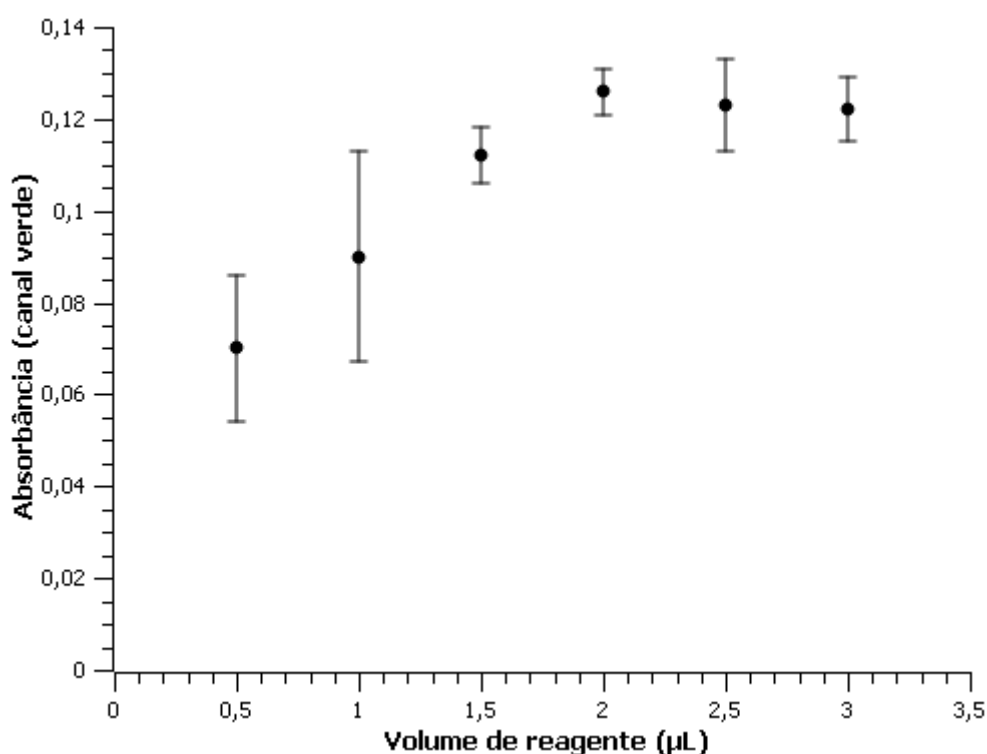


Figura 66 – Média e desvio-padrão da absorbância da reação colorimétrica do AU com a variação do volume de reagentes. $n = 3$ e $C_{\text{AU}} = 300 \text{ mg L}^{-1}$

4.5.8 Curva analítica

Com as condições experimentais otimizadas foi construída uma curva de calibração de concentração de creatinina, variando de 50 a 500 mg L^{-1} , em função da absorbância do canal verde. Pela figura 67 é possível concluir que há relação linear entre absorbância concentração na faixa estudada.

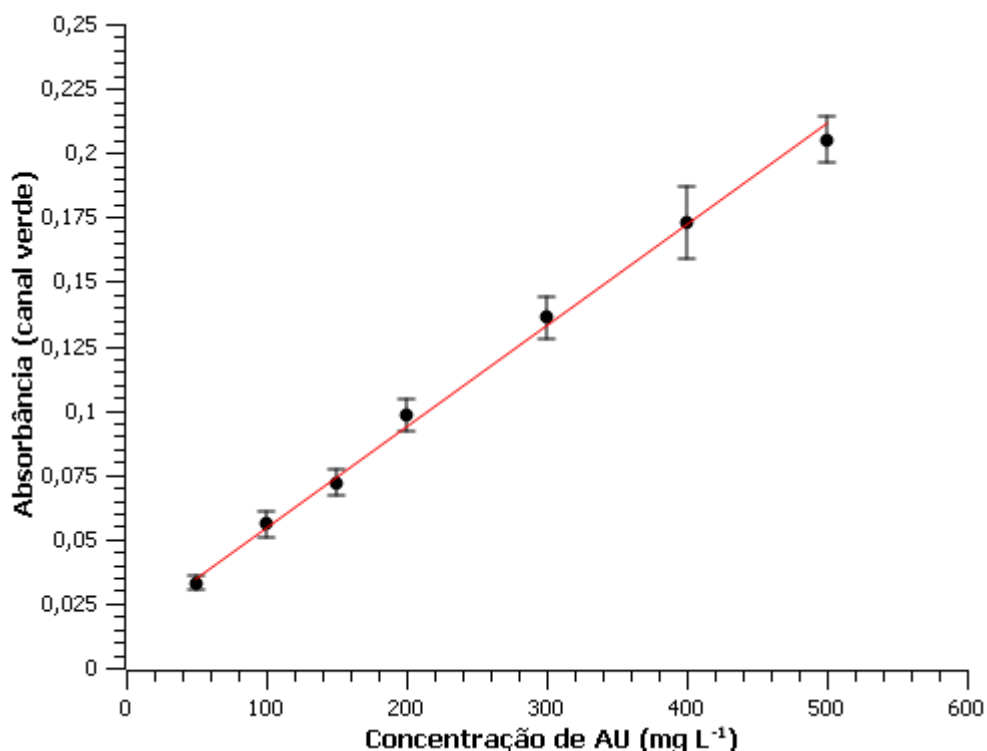


Figura 67 – Curva de calibração de absorvância em função da raiz da concentração. $C_{AU} = 50$ a 500 mg L^{-1} . Canal de cor utilizado = verde

A curva de calibração apresenta a seguinte equação de reta: $A = 0,01651 + 0,0003864 C_{AU}$, com coeficiente de determinação (R^2) igual a $0,997$.

A determinação semi-quantitativa visual pode ser feita através dos resultados apresentados na paleta de cores da tabela 34.

Tabela 34 – Determinação semi-quantitativa visual de diferentes concentrações da curva analítica do AU

Concentração de AU (mg L^{-1})	0	50	100	150	200	300	400	500
Zona de teste								

O limite de detecção, LD, e de quantificação, LQ, foram calculados como definidos pela IUPAC (LONG, 1983) seguindo as equações 9 e 10. Sendo que a média da absorvância de 10 brancos foi de $0,0017$ e o desvio-padrão de $0,0021$.

Dessa forma, o LD e LQ para o método proposto foram de $16,5$ e $54,9$ mg L^{-1} , respectivamente.

O limite inferior do valor de referência para indivíduos normais, descritos no

item 1.4, é de 210 mg L⁻¹. Como o LD e o LQ são muito menores que esse limite inferior, é possível aplicar a metodologia desenvolvida em amostras com muito menos ácido úrico que os valores de referência.

A repetibilidade da curva analítica é expressa pela porcentagem do desvio padrão relativo (%RSD) (TAVERNIERS, 2004). Os valores obtidos de %RSD para as repetibilidades intra-dia e inter-dia encontram-se na tabela 35. Pode-se verificar que que as porcentagens calculadas estão abaixo do limite aceitável (15 % nas concentrações limites e 10% para as demais concentrações (HUBER, 1998)).

Tabela 35 – Porcentagem de repetibilidades intra-dia e inter-dia para o ácido úrico

Concentração (mg L ⁻¹)	Repetibilidade intra-dia (%RSD)	Repetibilidade inter-dia (%RSD)
200	5,8	6,7
400	4,0	8,3

4.5.9 Estudo de interferentes

O estudo de interferência foi realizado através do cálculo do fator de interferência para os compostos descritos em 3.3.13. O cálculo do fator de interferência foi realizado utilizando a equação 12 (ANDRADE, 1993):

Um fator de interferência, FI, igual a 1,00 significa que o composto não perturba o sistema nas condições estudadas. Um FI maior que 1,00 significa que o composto exerce interferência positiva, aumentando o sinal analítico, enquanto que FI menor que 1,00 significa que há interferência negativa, na qual o composto diminui o sinal analítico. A interferência de um composto é significativa quando $FI < 0,90$ ou $FI > 1,10$ (ALMEIDA, 2008).

Pela tabela 36 é possível concluir que apenas o ácido ascórbico apresenta interferência positiva na determinação de ácido úrico, fato que se era esperado devido à propriedade redutora do composto, semelhante ao ácido úrico. O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, é solúvel em água e tem papel fundamental na síntese do colágeno. Por não ser produzida pelo organismo é ingerido através da alimentação, principalmente frutas cítricas, ou suplementos. O excesso ingerido dessa vitamina não é aproveitada pelo organismo, sendo eliminado na urina.

Tabela 36 – Fator de interferência para os interferentes de ácido úrico em urina

Composto (Relação analito:interferente)	Fator de interferência (reflectância)	Fator de interferência (imagem digital)
Acetona (1:1)	1,03	1,01
Ácido ascórbico (1:1)	1,27	1,39
Albumina (1:1)	0,98	0,97
Bilirrubina (20:1)	0,99	0,99
Creatina (1:1)	0,96	0,98
Creatinina (1:1)	0,96	0,99
Glicose (1:1)	1,00	0,99
Piruvato (1:1)	1,04	1,03
Ureia (1:1)	0,98	0,98
Ureia (1:10)	0,97	0,99
CaCl ₂ (1:1)	1,04	0,98
KCl (1:1)	1,00	0,98
KH ₂ SO ₄ (1:1)	0,99	0,96
Na ₂ SO ₄ (1:1)	1,04	1,00
NaCl (1:1)	1,01	0,98
NH ₄ Cl (1:1)	1,01	1,00

Essa interferência do ácido ascórbico pode ser eliminada pela adição de O₂ na amostra. Assim, para anular a interferência do ácido ascórbico, foi testado o borbulhamento de ar comprimido. Na tabela 37 é demonstrado que o borbulhamento por 20 minutos é suficiente para retirar o ácido ascórbico da amostra, ou seja, seu fator de interferência está entre 0,9 e 1,1, como descrito na literatura (GOUVEIA, 1995). Para o experimento foi utilizado fluxo de ar de aproximadamente 1,2 L/min.

Tabela 37 – Fator de interferência do ácido ascórbico com o borbulhamento de ar na amostra

Tempo de borbulhamento (min)	Fator de interferência Reflectância	Fator de interferência Imagem
0	1,27	1,39
10	1,11	1,09
20	1,03	1,02

4.6 Método comparativo – HPLC

4.6.1 Curvas analíticas do método comparativo – HPLC

Foram construídas duas curvas analíticas para a creatinina e para o ácido úrico de concentrações de 2,50 a 50,0 mg L⁻¹ dos analitos representadas nas figuras 69 e 70, respectivamente. A figura 68 ilustra um cromatograma das curvas analíticas

dos analitos. O pico com tempo de retenção da creatinina é de 3,01 min e do ácido úrico 3,92 min.

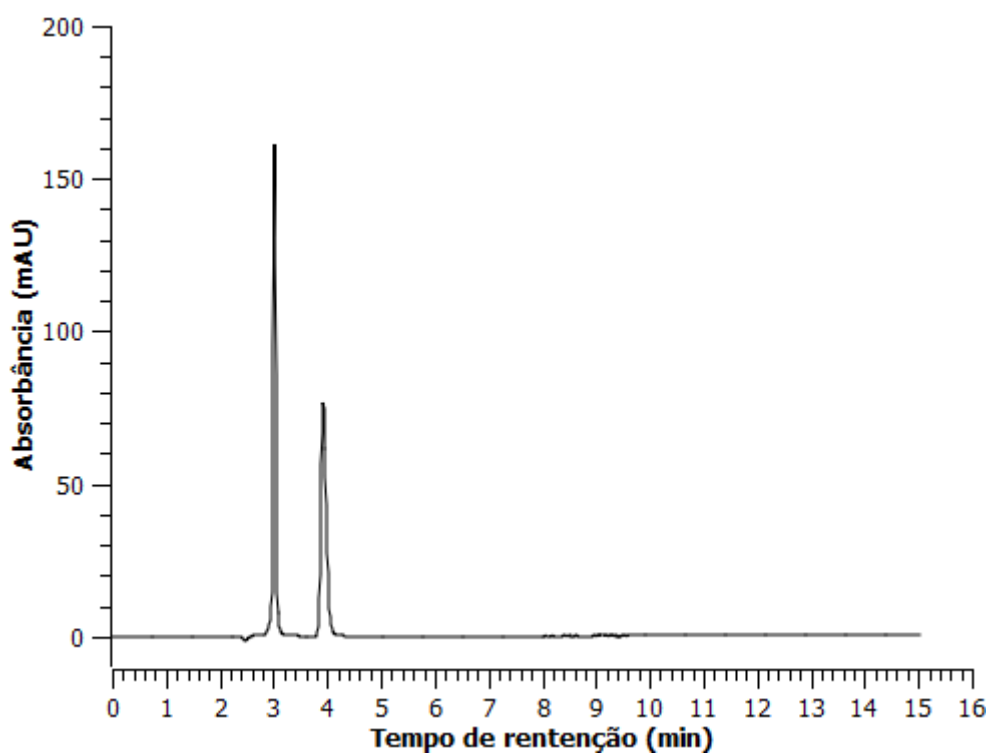


Figura 68 – Cromatograma obtido da mistura de CRN e AU. $C_{CRN} = 10 \text{ mg L}^{-1}$ e $C_{AU} = 10 \text{ mg L}^{-1}$.
 $t_{R(CRN)} = 3,01 \text{ min}$; $t_{R(AU)} = 3,92 \text{ min}$

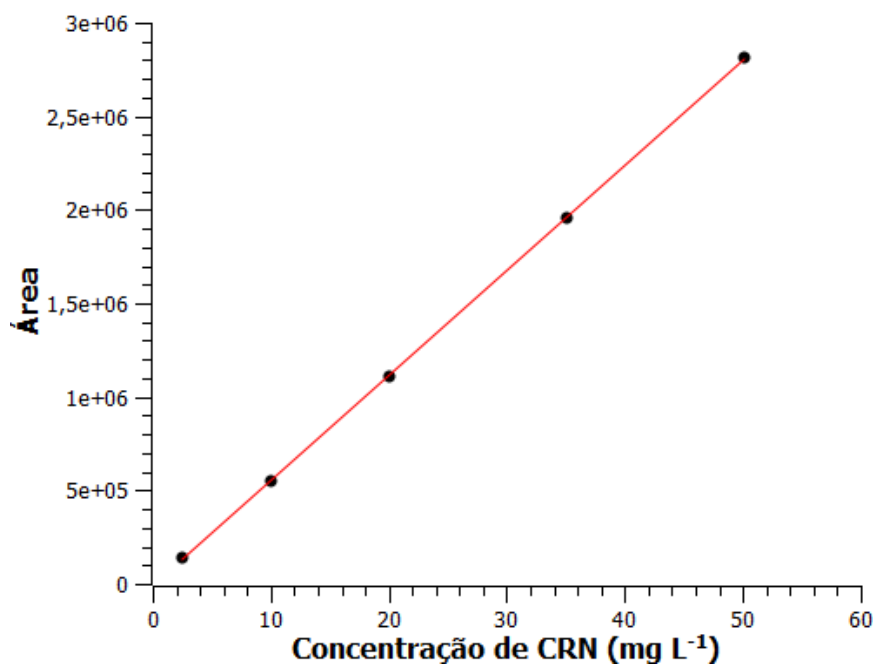


Figura 69 – Curva analítica para a creatinina pelo método comparativo por HPLC. $C_{CRN} = 2,50$ a $50,0 \text{ mg L}^{-1}$

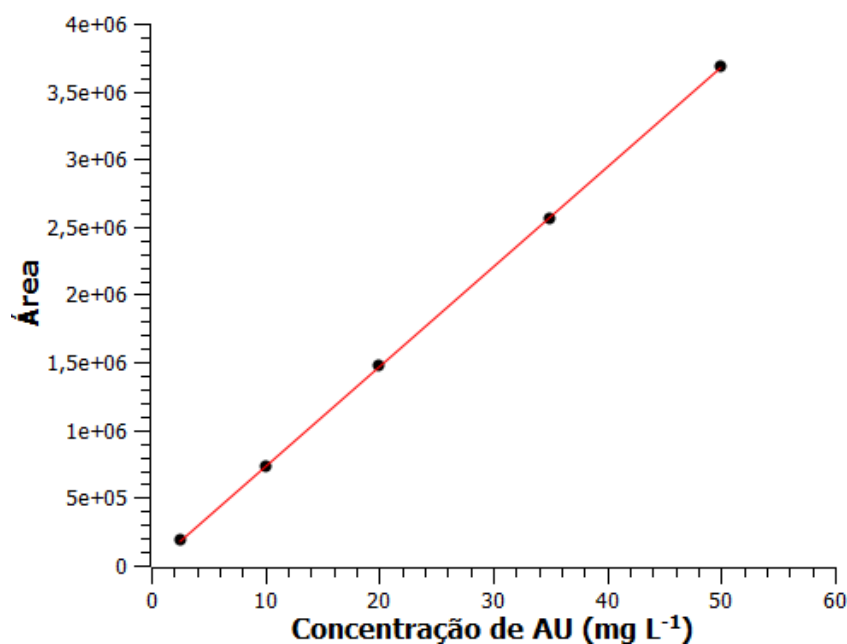


Figura 70 – Curva analítica para a ácido úrico pelo método comparativo por HPLC. $C_{AU} = 2,50$ a $50,0$ mg L^{-1}

Na tabela 38 estão descritas as figuras de mérito obtidas pelo método comparativo por HPLC.

Tabela 38 – Figuras de mérito obtidas pelo método comparativo por HPLC

Analito	Coefficiente de determinação (R^2)	Equação de reta
Creatinina	0,99996	$\text{Area} = - 11482,98 + 56267,62 C_{CRN}$
Ácido úrico	0,99996	$\text{Area} = 332,3401 + 73518,34 C_{AU}$

4.7 Aplicação da metodologia em amostras

A metodologia desenvolvida foi aplicada a amostras de urina sintética e natural e os resultados obtidos foram confrontadas com os resultados obtidos pela metodologia comparativa por HPLC (XIANG, 2014).

4.7.1 Urina sintética

Foram preparadas três amostras de urina sintética como descrito no item 3.3.15. As amostras foram analisadas pela metodologia proposta e pela comparativa. Na tabela 39 estão descritos os resultados obtidos pelos dois métodos. Foi realizado o tratamento estatístico utilizando o teste de t de Student e os

resultados demonstram que não há diferença significativa entre as médias das concentrações dos analitos encontradas com os dois métodos, uma vez que os valores de t de Student calculados não excedem o valor tabelado de 4,303 para dois graus de liberdade e intervalo de confiança de 95%. A figura 71 ilustra um cromatograma obtido de uma análise de urina sintética por HPLC.

Tabela 39 – Aplicação do método proposto e do método comparativo em amostras de urina sintética

Amostra	Concentração CRN (mg L ⁻¹)		t calc. ^b	Concentração AU (mg L ⁻¹)		t calc. ^b
	Método proposto	Método comparativo		Método proposto	Método comparativo	
1	281±14	304±0	2,816	214±21	225±0	0,878
2	736±6	748±0	2,959	585±31	599±0	0,758
3	1202±41	1211±1	0,393	918±72	908±0	0,234

^b Valores críticos de t ao nível de confiança de 95% e dois graus de liberdade; t tabelado igual a 4,303.

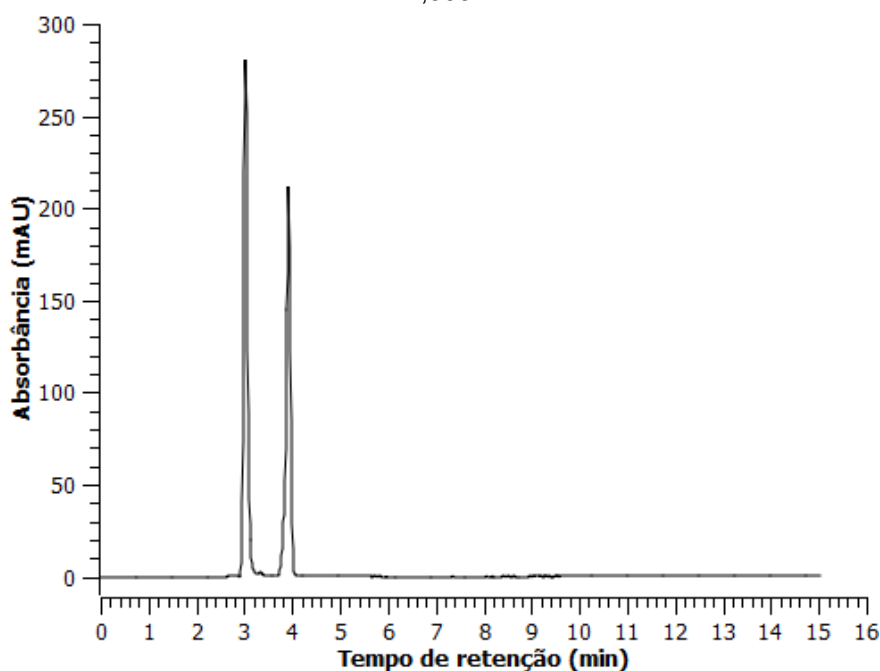


Figura 71 – Cromatograma obtido da análise da amostra de urina sintética 1. $t_{R(CRN)}=3,05$ min; $t_{R(AU)}=3,94$ min

4.7.2 Urina natural

Foram coletadas quatro amostras de urina natural como descrito no item 3.3.16. As amostras foram analisadas pela metodologia proposta e pela comparativa. Na tabela 40 estão descritos os resultados obtidos pelos dois métodos.

Foi realizado o tratamento estatístico utilizando o teste de t de Student e os resultados demonstram que não há diferença significativa entre as médias das concentrações dos analitos encontradas com os dois métodos, uma vez que os valores de t de Student calculados não excedem o valor tabelado de 4,303 para dois graus de liberdade e intervalo de confiança de 95%, demonstrando que a metodologia desenvolvida é exata. Para amostras biológicas os valores de %RSD devem ser menores que 15% para concentrações limites e menores que 10% para as demais concentrações (HUBER, 1998). Dessa maneira, como todos os valores de %RSD para as determinações de urina sintética e natural, utilizando a metodologia desenvolvida, estão entre 0,81 e 9,81%, a metodologia pode ser considerada precisa.

Considerando o volume de urina de 24 horas de 1,2 L e a massa corpórea de 67 kg para o autor do trabalho é possível estimar as concentrações dos analitos na urina. Os níveis de ácido úrico estão entre 259,2 e 520,8 mg dia⁻¹ e de creatinina estão entre 17,30 e 27,89 mg kg⁻¹ dia⁻¹. Pelas tabelas 2 e 4, os níveis de ácido úrico na urina estão dentro dos níveis normais (250 a 750 mg dia⁻¹) e os níveis de creatinina, com exceção da amostra 4, estão dentro dos níveis normais para homens (14 a 26 mg kg⁻¹ d⁻¹). Como as amostras coletadas não foram as urinas de 24 horas e sim uma alíquota em um horário do dia, não necessariamente o autor pode ter algum problema renal, pois na alíquota coletada da amostra 4 a urina podia estar mais concentrada. Para análises clínicas deve-se coletar a urina de 24 horas. A figura 72 ilustra um cromatograma obtido de uma análise de urina natural por HPLC.

Tabela 40 – Aplicação do método proposto e do método comparativo em amostras de urina natural

Amostra	Concentração CRN (mg L ⁻¹)		t calc. ^b	Concentração AU (mg L ⁻¹)		t calc. ^b
	Método proposto	Método comparativo		Método proposto	Método comparativo	
1	1009±77	976±15	0,628	356±33	339±3	0,805
2	1143±61	1154±1	0,302	434±36	443±7	0,363
3	1049±30	1045±0	0,237	216±15	226±5	1,106
4	1627±45	1630±8	0,131	338±22	338±16	0,023

^b Valores críticos de t ao nível de confiança de 95% e dois graus de liberdade; t tabelado igual a 4,303.

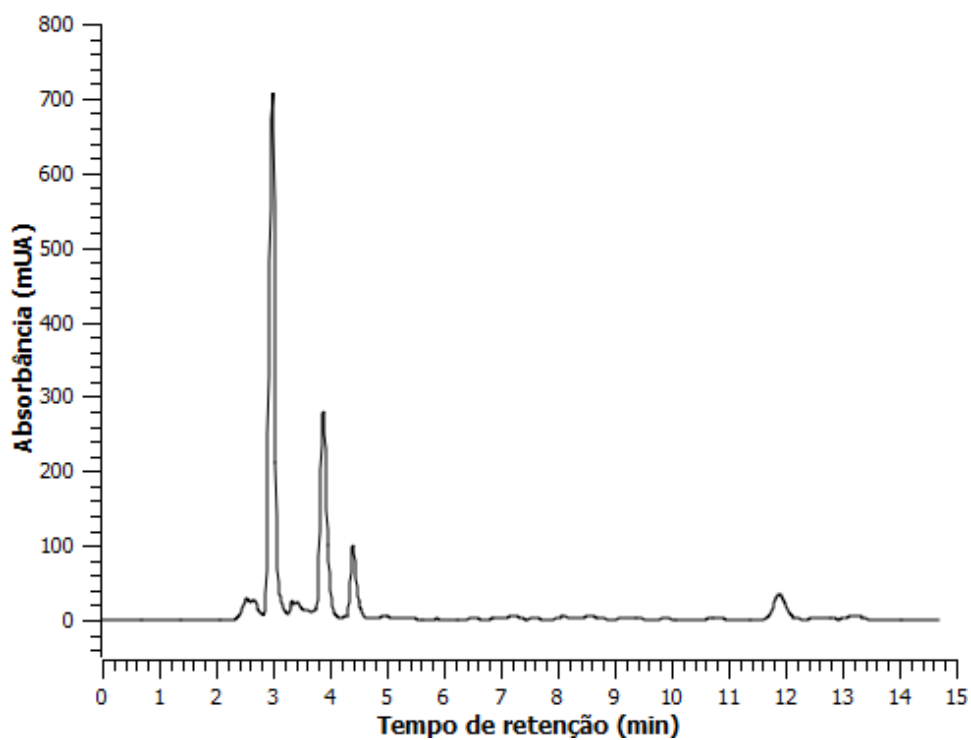


Figura 72 – Cromatograma obtido da análise da amostra de urina natural 2. $t_{R(AU)} = 3,31$ min; $t_{R(CRN)} = 4,19$ min

4.8 Comparação das metodologias

Na tabela 41 é apresentada uma comparação entre o método proposto e o método descrito na literatura (HPLC) para a determinação simultânea dos analitos em estudo.

Tabela 41 – Comparação de parâmetros entre o método proposto e o comparativo

Parâmetro	Método proposto	Método comparativo (XIANG, 2014)
Uso de solvente orgânico	-	Metanol
Formação de resíduos	Resíduo sólido (μ PAD), incinerável	Resíduo com metanol (15 mL por amostra) Resíduo com metanol (60 mL para limpeza HPLC)
Preparo da amostra	Simples, rápido e sem pré-tratamento	Com pré-tratamento da amostra
Reagente cromogênico CRN (massa)	Ácido pícrico $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (9 μg) em NaOH $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (82 μg)	-
Reagente cromogênico AU (massa)	$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{ H}_2\text{O}$ $4,48 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (37 μg) em H_2SO_4 $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ (49 μg) e 1,10-Fenantrolina $6,010 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (20 μg) em meio de NaOAc $0,5290 \text{ mol L}^{-1}$ (88 μg)	-
Volume de cada reagente	2 μL	-
Volume de solvente	-	15 mL por análise + 60 mL para limpeza
Volume de amostra	10 μL	20 μL
Tempo de análise ^a	12,5 min por amostra	30 minutos por amostra

^a Tempo de análise tendo as soluções utilizadas já prontas.

Através da tabela 41 é possível concluir que o método desenvolvido é mais amigável ao ambiente e ao operador, pois não utiliza metanol como no método por HPLC. O metanol é uma substância tóxica que pode ser absorvido pela pele, por inalação ou por ingestão, devido a sua miscibilidade com água. Sua absorção causa irritação aos olhos, pele e sistema respiratório, causa também vômito, vertigem, dores de cabeça, distúrbios visuais, danos ao nervo ótico entre outros problemas sérios (O'NEIL, 2006), sendo o seu uso uma desvantagem para a saúde do operador. A quantidade de resíduo formado no método proposto é negligenciável e encontra-se no estado sólido, sendo facilmente tratável por incineração, devido a fácil combustão do papel, enquanto que o resíduo com metanol pode ser tratado pelo processo foto-fenton (NOGUEIRA, 2007), que é mais demorado e de maior custo que a simples incineração do dispositivo.

Para a análise simultânea do AU e da CRN em um μ PAD são necessários 6 μL de reagente, o que representa 285 μg de compostos impregnados no papel,

sendo esse volume e essa massa de reagentes negligenciável quanto à formação de resíduos. O volume de amostra utilizado pelo método proposto é metade do utilizado no método cromatográfico. O tempo de análise, não incluindo preparo de soluções, para o método proposto é de 12,5 minutos por amostra, menor que pela metodologia de HPLC são necessários 30 minutos, pois além da análise há a centrifugação e filtragem da amostra.

Um importante fator que se deve considerar é o custo total da análise, que envolve custo de equipamentos para as análises e reagentes. A comparação do custo envolvendo as duas metodologias é apresentado na tabela 42.

Tabela 42 – Custo de equipamento e análise pelo método comparativo e o proposto

Parâmetro	Custo Método proposto	Custo Método comparativo (XIANG, 2014)
Solvente ^a	Água deionizada	Análise: Metanol (R\$ 0,02/amostra) + Solução NaH ₂ PO ₄ 50 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹ (R\$ 0,08/amostra) Limpeza e acondicionamento equipamento: Metanol (R\$ 6,00)
Reagente cromogênico CRN	< R\$ 0,01/análise	-
Reagente cromogênico AU	< R\$ 0,01/análise	-
Papel	R\$ 0,02/dispositivo	-
Tinta sólida (cera)	< R\$ 0,01/dispositivo	-
Equipamento ^b	Secador de cabelo doméstico (R\$ 70,00) + impressora multifuncional (R\$ ~200,00) + impressora de cera (R\$ ~4.600,00)	HPLC – DAD (US\$ ~150.000,00) + Coluna C18 (R\$ ~3.000,00) + centrífuga (€\$~7.000,00) + filtro seringa (R\$ 7,08)
Custo por análise ^c	R\$ 0,02	R\$ 7,18 + limpeza e acondicionamento

^a Não incluso o custo de água deionizada.

^b Não incluso o custo de computador para o tratamento dos dados dos dois métodos.

^c Não incluso o custo do equipamento e do operador.

Pelas informações fornecidas é possível concluir que o custo de equipamento é muito menor para os equipamentos utilizados no método proposto, além de o mesmo não necessitar de operador treinado e nem de laboratório especializado, podendo ser aplicado em lugares mais afastados. O custo da análise é de R\$ 0,02

para o método proposto e de R\$ 7,18 por análise para o método por HPLC, mas o método cromatográfico necessita de acondicionamento e limpeza do equipamento, o que encarece mais a análise (sem incluir o custo do equipamento).

As tabelas 43 e 44 ilustram as figuras de mérito e o tratamento da amostra para diversas metodologias de análise de ácido úrico e creatinina descritas na literatura.

O tratamento da amostra pelo método proposto é simples, de fácil execução e de baixo custo quando comparado a metodologias que necessitam de centrifugação, desproteinização, filtração em filtros de seringa ou ultrafiltração. O limite de detecção obtido para a metodologia desenvolvida é menor que o LD de métodos que utilizam μ PAD, demonstrando maior sensibilidade. Porém, é maior que para as determinações envolvendo espectrofotometria, separações cromatográficas e eletroforéticas e detecção eletroquímica, pois essas técnicas são conhecidamente mais robustas e sensíveis.

Tabela 43 – Figuras de mérito de diversas metodologias descritas na literatura para determinação de creatinina

Método analítico	Amostra	Preparo da amostra	LD (mg L⁻¹)	LQ (mg L⁻¹)	Faixa linear (mg L⁻¹)	Referências
FIA com detecção espectrofotométrica no visível	Urina	Sem pré-tratamento	-	-	0,25 – 2500	CORREIA, 2004
Sistema FIA microfluídico portátil com chip de PDMS	Urina	Centrifugação e diluição de 50 vezes	3,3	-	0 – 40	SONGJAROEN, 2009
Reflectância difusa, com detecção no UV	-	Pré-concentração utilizando zeólita	-	-	0 – 185	BERGÉ-LEFRANC, 2010
Espectrofotométrica no visível	Soro	-	0,016	0,055	0,50 – 70	KRISHNEGOWDA, 2013
Amperometria	Urina	Diluição com tampão fosfato	1,36	-	1,36 – 56,5	NIEH, 2013
Eletroforese capilar com detecção espectrofotométrica no UV	Urina	Diluição e filtragem em membrana 0,45 µm	2,4	7,9	5 – 70	PAVLÍCEK, 2014
HPLC com detecção no UV	Urina	Diluição de 15 vezes com a fase móvel, centrifugação e filtragem em membrana 0,45 µm	0,010	-	10 – 200	XIANG, 2014
HPLC com detecção no UV	Urina	Diluída 10 vezes	-	100	100 – 2000	REMANE, 2015
µPAD com detecção colorimétrica por imagens digitais utilizando câmera digital	Urina	Borbulhamento de ar por 20 min e diluição de 3 vezes	15,7	52,4	50 – 600	Este trabalho

Tabela 44 – Figuras de mérito de diversas metodologias descritas na literatura para determinação de ácido úrico

Método analítico	Amostra	Preparo da amostra	LD (mg L ⁻¹)	LQ (mg L ⁻¹)	Faixa linear (mg L ⁻¹)	Referências
Espectroscopia de reflectância difusa no visível	Soro	-	-	-	-	STEVENS, 1983
Espectrofotométrica no UV utilizando análise multivariada	Urina e soro	Soro: desproteínização com Cl ₃ CCOOH e centrifugação Urina: centrifugação	-	-	1,68 – 28,58	KHAJEHSHARIFI, 2014
FIA com detecção quimiluminescente	Urina	Diluição de 1000 com água bidestilada	3,36 x 10 ⁻⁴	-	1,68 x 10 ⁻³ – 0,841	MA, 2014
Voltametria cíclica	Urina e soro	Sem pré-tratamento	0,0101	-	0,0336 – 84,0	NOROOZIFAR, 2013
μPAD 3D com detecção colorimétrica por imagens digitais utilizando câmera	Soro	Ultrafiltrado em tubo de 10kD e centrifugado	48,2	-	50,4 - 168	CHEN, 2012
μPAD com detecção colorimétrica por imagens digitais utilizando câmera digital	Urina e soro	Sem pré-tratamento	-	-	16,81 – 1177	DUNGCHAI, 2010
μPAD com nanopartículas de ouro carregadas positivamente com detecção visual	Soro, porém, não aplicado	Não aplicado em amostra	-	-	33,2 – 83	KUMAR, 2015
Eletroforese capilar com detecção espectrofotométrica no UV	Urina	Diluição e filtragem em membrana 0,45 μm	0,9	3,0	10 – 70	PAVLÍCEK, 2014
HPLC com detecção no UV	Urina	Diluição de 15 vezes com a fase móvel, centrifugação e filtragem em membrana 0,45 μm	0,025	-	7,5 – 150	XIANG, 2014
HPLC com detecção no UV	Urina	Diluída 10 vezes	-	25	100 – 1000	REMANE, 2015
μPAD com detecção colorimétrica por imagens digitais utilizando câmera digital	Urina	Borbulhamento de ar por 20 min e diluição de 3x	16,5	54,9	50 – 500	Este trabalho

5 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a potencialidade da detecção colorimétrica por imagem digital associada a dispositivos analíticos microfluídicos em papel para a determinação simultânea de creatinina e ácido úrico. Pelos resultados apresentados, a detecção por imagem digital pode ser usada em substituição a reflectância difusa, apesar da técnica ser menos sensível que a ERD. A técnica é barata, simples e rápida, pode ser utilizada *in situ* com auxílio de câmeras de smartphones e câmeras fotográficas, sendo que os dados podem ser enviados em tempo real para laboratórios e médicos, permitindo a utilização da metodologia em locais remotos.

Os dispositivos analíticos desenvolvidos são portáteis, baratos, necessitam de pequenos volumes de amostra e de reagente, são compatíveis com amostras biológicas, descartáveis e facilmente incineráveis, não gerando resíduos e podem integrar diversos procedimentos analíticos em uma única plataforma. A fabricação das barreiras hidrofóbicas pode ser feita de diversas maneiras, o que facilita a inclusão à essa tecnologia.

As etapas de planejamento experimental foram válidas, pois aumentaram consideravelmente a resposta analítica da reação. Apenas o ácido ascórbico interferiu na reação do ácido úrico, sendo prontamente eliminado pelo borbulhamento de ar na amostra.

As metodologias desenvolvidas para análise de creatinina e ácido úrico utilizando os dispositivos analíticos demonstraram ser inovadoras pois integram essas duas análises em um dispositivo, possibilitando a avaliação da função renal do paciente. Também, as metodologias apresentadas são exatas, precisas, rápidas, simples, de baixo custo, fornecem resultado confiáveis e estão em consonância com os princípios da Química Verde, pois gera quantidade de resíduo negligenciável, não faz uso de solventes orgânicos tóxicos e elimina etapas de preparo da amostra.

Antes do desenvolvimento desse trabalho não havia descrições na literatura de metodologias para determinação de creatinina utilizando μ PAD e os métodos de determinação de ácido úrico em sua maioria utilizam a enzima uricase imobilizadas no papel ou detecção eletroquímica. Dessa maneira, o presente trabalho contribuiu com duas novas metodologias integradas em um mesmo dispositivo.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas futuras de trabalho no grupo de pesquisa podem ser citadas a utilização do dispositivo desenvolvido para análise de outros componentes de interesse clínico em urina, para integrar as análises já desenvolvidas, ou saliva, por exemplo; também o dispositivo pode ser aplicado em outros tipos de análises, tais como amostras alimentícias, ambientais e forenses.

A utilização do secador de cabelos doméstico restringe a emprego da metodologia à locais com energia elétrica, dessa forma, outras formas de aquecimento mais simples poderão ser avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. S.; EIRAS, S. P. Avaliação do emprego de 8-hidroxiquinolina e mistura homogênea dos solventes água-etanol-clorofórmio para a determinação de íons Al^{3+} . **Horizonte Científico**, v. 3, n. 2, fev. 2009. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/download/4053/3017>>. Acesso em: 15 jun. 2015.
- ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green chemistry: theory and practice**. New York: Oxford University Press, 1998. 135 p.
- ANDRADE, J. C.; BRUNS, R. E.; EIRAS, S. P. Catalytic determination of molybdenum (VI) in plants using mono-segmented continuous-flow analysis and spectrophotometric detection. **Analyst**, v. 118, p. 213-217, Feb. 1993.
- ASSASSI, A. L. et al. Green analytical method development for statin analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1380, p. 104-110, 2015.
- BAES, C. F. Jr.; MESMER, R. E. **The hydrolysis of cations**. New York: John Wiley & Sons, 1976. 489 p.
- BASTOS, R. M. R. et al. Hiperuricemia: um marcador para doença renal crônica pré-clínica? **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 31, n. 1, p. 32-38, jan. 2009.
- BENEDETTI, L. P. S. **Determinação in situ de analitos de interesse alimentício empregando tratamento de imagens digitais de spot tests**. 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.
- BENEDETTI, L. P. S. et al. A digital image-based method employing a spottest for quantification of ethanol in drinks. **Analytical Methods**, v. 7, p. 4138-4144, 2015.
- BERGÉ-LEFRANC, D. et al. The extraction of creatinine from a physiological medium by a microporous solid and its quantification by diffuse reflectance UV spectroscopy. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 129, p. 144-148, 2010.
- BHAKTA, S. A. et al. Determination of nitrite in saliva using microfluidic paper-based analytical devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 809, p. 117-122, Nov. 2013.
- BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R. **Tietz fundamentals of clinical chemistry**. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001. 1091 p.
- BYRNE, L. et al. Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 517-522, 2000.
- CARNEIRO, T. C. T. V. **Percepção das cores**. Disponível em: <<http://www2.ic.uff.br/~aconci/curso/percep~1.htm>>. Acesso em: 10 de out. 2015.

CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, p. 7091-7095, 2009.

CATE, D. M. et al. Recent developments in paper-based microfluidic devices. **Analytical Chemistry**, v. 87, p. 19-41, 2015.

CATELANI, T. A. et al. A simple and rapid screening method for sulfonamides in honey using a flow injection system coupled to a liquid waveguide capillary cell. **Talanta**, v. 121, p. 281-287, Jan. 2014.

CHAVES, L. D. P. et al. Estudo da sobrevivência de pacientes submetidos a hemodiálise e estimativa de gastos no município de Ribeirão Preto-SP. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 36, n. 2, p. 193-199, 2002.

CHEN, X. et al. Determination of glucose and uric acid with bienzyme colorimetry on microfluidic paper-based analysis devices. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 35, p. 363-368, Mar. 2012.

CORREIA, P. R. M. et al. Green analytical chemistry in undergraduate laboratories: flow-injection determination of creatinine in urine with photochemical treatment of waste. **The Chemical Educator**, v. 9, n. 4, p. 242-246, May 2004.

DORNELAS, K. L.; DOSSI, N.; PICCIN, E. A simple method for patterning poly(dimethylsiloxane) barriers in paper using contact-printing with low-cost rubber stamps. **Analytica Chimica Acta**, v. 858, p. 82-90, 2015.

DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S. Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, p. 227-233, June 2010.

EVANS, E. et al. Rational selection of substrates to improve color intensity and uniformity on microfluidic paper-based analytical devices. **Analyt**, v. 139, p. 2127-2132, Feb. 2014.

GARCIA, P. T. et al. A handheld stamping process to fabricate microfluidic paper-based analytical devices with chemically modified surface for clinical assays. **RSC Advances**, v. 4, p. 37637-37644, Aug. 2014.

GHAUCH, A. et al. Quantitative measurements of ammonium, hydrogenophosphate and Cu(II) by diffuse reflectance spectrometry. **Talanta**, v. 48, p. 385-392, 1999.

GOUVEIA, S. T.; FATIBELLO FILHO, O.; NÓBREGA, J. A. Flow injection spectrophotometric determination of cyclamate in low calorie soft drinks and sweeteners. **Analyt**, v. 120, p. 2009-2012, July 1995.

HINZE, W. L.; PRAMAURO, E. A critical review of surfactant-mediated phase separations (cloud-point extractions): theory and applications. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 133-177, 1993.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC Magazine**. 1999. Disponível em: <<http://geocities.internetarchaeology.org/HotSprings/Spa/6896/methval.pdf>>. Acesso em: 06 abr. 2014.

KEALEY, D. Quantitative reflectometry-I: principles and scope. **Talanta**, v. 19, p. 1563-1571, 1972.

KHAJEHSHARIFI, H. et al. The comparison of partial least squares and principal component regression in simultaneous spectrophotometric determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid in real samples. **Arabian Journal of Chemistry**, Feb. 2014. In press. doi:10.1016/j.arabjc.2014.02.006.

KIDNEY & UROLOGY FOUNDATION OF AMERICA. **Urinary system and how it works**. New York, 2006. Disponível em: <http://www.kidneyurology.org/Library/Urologic_Health.php/Urinary_system_and_how_works.php>. Acesso em: 24 dez. 2015.

KRISHNEGOWDA, A. et al. Spectrophotometric assay of creatinine in human serum sample. **Arabian Journal of Chemistry**, July 2013. In press. doi:10.1016/j.arabjc.2013.07.030

KUMAR, A. et al. A paper based microfluidic device for easy detection of uric acid using positively charged gold nanoparticles. **Analyst**, v. 140, p. 1817-1821, Jan. 2015.

LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, p. 367-374, June 2001.

LIDE, D. R. (Ed.) **CRC handbook of chemistry and physics**. 89th ed. Boca Raton: CRC Press, 2008.

LIMA, L. S. et al. Sensitive flow-injection spectrophotometric analysis of bromopride. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 133, p. 597-604, May 2014.

LIN, C. C. et al. Urine analysis in microfluidic devices. **Analyst**, v. 136, p. 2669-2688, May 2011.

LIU, Y. et al. Micro-analysis by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy with chemometric methods. **Analyst**, v. 138, p. 6617-6622, Aug. 2013.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection: a closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, p. 715A-724A, June 1983.

LU, Y. et al. Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. **Electrophoresis**, v. 30, p. 1497-1500, 2009.

LUIZ, V. H. M.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Rapid determination of furosemide by combined spot test/diffuse reflectance spectroscopy to detect doping in sport. **Microchemical Journal**, v. 109, p. 68-72, Apr. 2013.

LUIZ, V. H. M. et al. Rapid determination of lead in progressive hair dye lotion by spot test/diffuse reflectance spectroscopy with a paper platform. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 10, p. 2137-2143, 2015.

MA, L. et al. Investigation of a novel Ag(III) chemiluminescence system and its mechanism for determination of uric acid in human urine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 5, p. 867-872, 2014.

MARTINEZ, A. W. et al. Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 3-10, Jan. 2010.

MASAWAT, P.; HARFIELD, A.; NAMWONG, A. An iPhone-based digital image colorimeter for detecting tetracycline in milk. **Food Chemistry**, v. 184, p. 23-29, 2015.

MAXWELL, E. J.; MAZZEO, A. D.; WHITESIDES, G. M. Paper-based electroanalytical devices for accessible diagnostic testing. **MRS Bulletin**, v. 38, p. 309-314, Apr. 2013.

MOMENI, N. et al. CCD-camera based capillary chemiluminescent detection of retinol binding protein. **Analytica Chimica Acta**, v. 387, p. 21-27, 1999.

MONOSIK, R.; SANTOS, V. B. dos; ANGNES, L. A simple paper-strip colorimetric method utilizing dehydrogenase enzymes for analysis of food components. **Analytical Methods**, v. 7, p. 8177-8184, 2015.

MOTTA, V. T. Nitrogênio não-protéico. In: _____. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. 4. ed. Porto Alegre: Médica Missau, 2003. Cap. 15, p. 232-246.

NARAYANAN, S.; APPLETON, H. D. Creatinine: a review. **Clinical Chemistry**, v. 26, n. 8, p. 1119-1126, Feb. 1980.

NARAYANASWAMY, R. Optical chemical sensors: transduction and signal processing. **Analyst**, v. 118, p. 317-322, 1993.

NIEH, C. H. et al. Amperometric biosensor based on reductive H₂O₂ detection using pentacyanoferrate-bound polymer for creatinine determination. **Analytica Chimica Acta**, v. 767, p. 128-133, Jan. 2013.

NOGUEIRA, R. F. P. et al. Fundamentos e aplicações ambientais dos processos de Fenton e foto-Fenton. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 400-408. 2007.

NOROOZIFAR, M. et al. Sensitive and selective determination of uric acid in real samples by modified glassy carbon electrode with holmium fluoride nanoparticles/multi-walled carbon nanotube as a new biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 188, p. 65-72, June 2013.

OKPARANMA, R. N.; COULON, F.; MOUAZEN, A. M. Analysis of petroleum-contaminated soils by diffuse reflectance spectroscopy and sequential ultrasonic solvent extraction-gas chromatography. **Environmental Pollution**, v. 184, p. 298-305, Aug. 2014.

O'NEIL, M. J. (Ed.). **The merck index**. 14th ed. Whitehouse Station: Merck, 2006.

PACIORNIK, S. et al. Scanner image analysis in the quantification of mercury using spot-tests. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 1, v. 17, p. 156-161, 2006.

PAVLÍČEK, V. et al. Very fast electrophoretic determination of creatinine and uric acid in human urine using a combination of two capillaries with different internal diameters. **Electrophoresis**, v. 35, p. 956-961, Aug. 2014.

PEZZA, H. R. **Química analítica verde**: algumas contribuições. 2013. 51 f. Tese (Livre Docência) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

REMANE, D. et al. Validation of a multi-analyte HPLC-DAD method for determination of uric acid, creatinine, homovanillic acid, niacinamide, hippuric acid, indole-3-acetic acid and 2-methylhippuric acid in human urine. **Journal of Chromatography B**, v. 998/999, p. 40-44, 2015.

SANDELL, E. B. Iron. In: _____. **Colorimetric determination of traces of metals**. 3rd. ed. New York: Interscience Publishers, 1959. v. 3, chap. 22, p. 522-542.

SENG, S.; KITA, M. New analytical method for the determination of detergent concentration in water by fabric dyeing. **Journal of Chemical Education**, v. 84, n. 11, p. 1803-1805, Nov. 2007.

SIMOYI, M. F. et al. Allantoin, the oxidation product of uric acid is present in chicken and turkey plasma. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 135, p. 325-335, 2003.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Censo de diálise**. 2013. 41 slides em Power Point. Disponível em: <http://www.sbn.org.br/pdf/censo_2013-14-05.pdf>. Acesso em: 26 out. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Compreendendo os rins**. [2015a]. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/publico/compreendendo-o-rim>>. Acesso em: 26 out. 2015.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. **Insuficiência renal**. [2015b]. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br/publico/insuficiencia-renal>>. Acesso em: 26 out. 2015.

SONGJAROEN, T. et al. Portable microfluidic system for determination of urinary creatinine. **Analytica Chimica Acta**, v. 647, p. 78-83, May 2009.

STEVENS, J. F.; NEWALL, R. G. Application of reflectance spectroscopy to the estimation of uric acid, urea and glucose: an evaluation of the Ames Seralyzer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 36, p. 9-13, Aug. 1983.

SURESHA, S. A. et al. A new spectrophotometric method for hydrogen sulphide through electrolytically generated Mn(III) with o-tolidine. **E-Journal of Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 93-99, Jan. 2008.

SVEHLA, G. (Ed.). **Instrumentation for spectroscopy, analytical atomic absorption and fluorescence spectroscopy, diffuse reflectance spectroscopy**. Amsterdam: Elsevier, 1975. 391 p. (Comprehensive analytical chemistry, v. 4).

TAVERNIERS, I.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

TOLEDO, P. R. A. B. **Desenvolvimento de metodologia analítica ambientalmente mais amigável para a determinação de ureia em matrizes diversas**. 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

TRIVEDI, R. C. et al. New ultraviolet (340 nm) method for assay of uric acid in serum and plasma. **Clinical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 562-566, Jan. 1978.

TUBINO, M.; ROSSI, A. V.; MAGALHÃES, M. E. A. Quantitative spot tests of Fe(III), Cr(IV) and Ni(II) by reflectance measurements. **Analytical Letters**, v. 30, n. 2, p. 271-282, 1997.

WANG, S. et al. Rapid determination of creatinine in human urine by microchip electrophoresis with LED induced fluorescence detection. **Chromatographia**, v. 75, p. 1287-1293, Aug. 2012.

XIANG, L.-W. et al. Determination of gouty arthritis' biomarkers in human urine using reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 4, n. 2, p. 153-158, 2014.

YAGODA, H. Applications of confined spot tests in analytical chemistry. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 79-82, Feb. 1937.

YAM, K. T.; PAPADAKIS, S. E. A simple digital imaging method for measuring and analyzing color of food surfaces. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 137-142, 2004.

YAMADA, K. et al. Distance-based tear lactoferrin assay on microfluidic paper device using interfacial interactions on surface-modified cellulose. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, p. 24864-24875, 2015.