UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

EDUARDO LUIZ ROSSINI

ANÁLISES EM DISPOSITIVOS DE PAPEL: SÍNTESE DE *CARBON DOT* APLICADA À DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE CLÍNICO E *PAPER-SPRAY IONIZATION* PARA DETECÇÃO DIRETA DE *DOPING* ESPORTIVO

Araraquara
2020

EDUARDO LUIZ ROSSINI

ANÁLISES EM DISPOSITIVOS DE PAPEL: SÍNTESE DE *CARBON DOT* APLICADA À DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS DE INTERESSE CLÍNICO E *PAPER-SPRAY IONIZATION* PARA DETECÇÃO DIRETA DE *DOPING* ESPORTIVO

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

Orientadora: Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza

Araraquara
2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Rossini, Eduardo Luiz
R835a Análises em dispositivos de papel: síntese de *carbon dot* aplicada à determinação de compostos de interesse clínico e *paper-spray ionization* para detecção direta de *doping* esportivo / Eduardo Luiz Rossini. – Araraquara : [s.n.], 2020
173 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Helena Redigolo Pezza

1. Microfluídica. 2. Fluorimetria. 3. Nanopartículas. 4. Espectrometria de massa. 5. Química clínica. I. Título.

Bibliotecária Responsável: Ana Carolina Gonçalves Bet - CRB8/8315

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Análises em dispositivos de papel: síntese de *carbon dot* aplicada à determinação de compostos de interesse clínico e *paper-spray ionization* para detecção direta de doping esportivo"

AUTOR: EDUARDO LUIZ ROSSINI
ORIENTADORA: HELENA REDIGOLO PEZZA
COORIENTADOR: JOSE ANCHIETA GOMES NETO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:

Prof.ª Dr.ª HELENA REDIGOLO PEZZA
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. PAULO CLAIRMONT FEITOSA DE LIMA GOMES
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. CLOVIS AUGUSTO RIBEIRO
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. IVO MILTON RAIMUNDO JUNIOR
Departamento de Química Analítica / Instituto de Química - UNICAMP - Campinas

Profª. Drª. ANA RITA DE ARAUJO NOGUEIRA
Embrapa Pecuária Sudeste / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA - São Carlos

Araraquara, 14 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES

1. Dados pessoais

Nome: Eduardo Luiz Rossini
Nome em citações: Rossini, E. L.; Rossini, Eduardo Luiz; Rossini, Eduardo L.
Data de nascimento: 11/04/1992
Naturalidade: Jaú – SP
Nacionalidade: Brasileiro
Estado Civil: Solteiro
Filiação: Mãe – Vânia Elvira Arriello Rossini / Pai – Dorival Rossini
Endereço Profissional: Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Química Analítica, Rua Prof. Francisco Degni, 55, Bairro Quitandinha, Araraquara, 14800-060, SP - Brasil
E-mail: elrossini.1@gmail.com

2. Formação acadêmica

2.1. Graduação:

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

  Trabalho de Conclusão de Curso orientado pela Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza intitulado “Desenvolvimento de método analítico limpo para análise de corante amaranto por espectroscopia de reflectância difusa”.

  Bolsista do CNPq e FAPESP (Processo n. 2013/09701-1).

2.2. Pós-graduação

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

  Dissertação orientada pela Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza intitulada “Determinação simultânea de biomarcadores de função renal em urina utilizando dispositivo analítico microfluídico em papel”. Bolsista do CNPq (Processo n. 132646/2014-5) e FAPESP (Processo n. 2014/17749-7).

- Doutorado em Química Analítica pelo Instituto de Química – UNESP – Araraquara, 2016 a 2019.

  Tese orientada pela Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza intitulada “Análises em dispositivos de papel: síntese de *carbon dot* aplicada à determinação de compostos de interesse clínico e *paper-spray ionization* para detecção direta de *doping* esportivo”. Bolsista do CNPq (Processo n. 140503/2016-1) e FAPESP (Processo n. 2016/20847-6).

- Doutorado sanduíche na *Ohio State University* – Departamento de Química e Bioquímica – Columbus/OH, outubro/2018 a setembro/2019.

  Projeto orientado pelo Prof. Dr. Abraham K. Badu-Tawiah e pela Profa. Dra. Helena Redigolo Pezza intitulado “*Paper-spray mass spectrometry as a tool for doping detection*”. Bolsista da FAPESP (Processo n. 2018/05993-1).

3. Prêmios

- *Best Poster Award – European Chemistry Conference*, Madridge, Roma, Itália, 2018.

- *Analyst Poster Prize* - V Workshop em Microfluídica, *Royal Society of Chemistry,* Campinas, Brasil, 2015.

- Prêmio Lavoisier, CRQ-IV, 2014.

- Certificado de Honra ao Mérito ao melhor aluno da turma, Instituto de Química - UNESP/CAr, Araraquara, Brasil, 2014.

4. Artigos

- ROSSINI, E. L.; KULYK, D. S.; ANSU, E.; SAHRAEIAN, T.; PEZZA, H. R.; BADU-TAWIAH, A. K. Direct analysis of doping agents in raw urine using hydrophobic paper spray mass spectrometry. Submetido para periódico especializado.

- MILANI, M. I.; ROSSINI, E. L.; CATELANI, T. A.; PEZZA, L.; TOCI, A. T.; PEZZA, H. R. Authentication of roasted and ground coffee samples containing multiple adulterants using NMR and a chemometric approach. **Food Control**, v. 112, p. 107104, 2020. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107104.

- LIMA, L. S.; ROSSINI, E. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Bioactive paper platform for detection of hydrogen peroxide in milk. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 227, p. 117774, 2020. https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117774.

- LUIZ, V. H. M.; LIMA, L. S.; ROSSINI, E. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Paper platform for determination of bumetanide in human urine samples to detect doping in sports using digital image analysis. **Microchemical Journal**, v. 147, p. 43-48, 2019. https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.006.

- ROSSINI, E. L.; MILANI, M. I.; PEZZA, H. R. Green synthesis of fluorescent carbon dots for determination of glucose in biofluids using a paper platform. **Talanta**, v. 201, p. 503-510, 2019. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.04.045.

- ROSSINI, E. L.; MILANI, M. I.; CARRILHO, E.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Simultaneous determination of renal function biomarkers in urine using a validated paper-based microfluidic analytical device. **Analytica Chimica Acta**, v. 997, p. 16-23, 2018. https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.10.018.

- SILVESTRE, A. L. P.; MILANI, M. I.; ROSSINI, E. L.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. A paper platform for colorimetric determination of aluminum hydrochloride in antiperspirant samples. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 204, p. 432-435, 2018. https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.06.049.

- MILANI, M. I.; ROSSINI, E. L.; CASTOLDI, K.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Paper platform for reflectometric determination of furfural and hydroxymethylfurfural in sugarcane liquor. **Microchemical Journal**, v. 133, p. 286-292, 2017. https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.03.046.

- ROSSINI, E. L.; MILANI, M. I.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. New eco-friendly methodology for determination of amaranth dye in foodstuffs using diffuse reflectance spectroscopy. **Analytical Methods**, v. 8, p. 4086-4092, 2016. https://doi.org/10.1039/c5ay02723c.

- KASTOLDI, 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**, v. 32, p. 413-417, 2016. https://doi.org/10.2116/analsci.32.413.

- 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 foods. **Analytical Methods**, v. 7, p. 2433-2436, 2015. https://doi.org/10.1039/C4AY02892A.

5. Trabalhos apresentados em eventos científicos

- *European Chemistry Conference*, Roma – Itália, 4 a 6 de julho de 2018.
  Trabalho: ROSSINI, E. L.; MILANI, M. I.; PEZZA, H. R. Novel carbon dot for glucose analysis using standard addition paper device. 2018.

- 18º Encontro Nacional de Química Analítica, Florianópolis – Santa Catarina, 18 a 21 de setembro de 2016.
  Trabalho: ROSSINI, E. L.; MILANI, M. I.; PEZZA, L.; PEZZA, H. R. Construção de reflectômetro *homemade* e aplicação na análise de corantes.

- 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.

- 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.

- 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.

- 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.

- 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 amaranto em groselhas por espectroscopia de reflectância difusa.

6. Participação em eventos

- *Central Ohio Mass Spec Discussion Group* (COH-MSDG), 2019.
- Escola de Verão em Química, Araraquara, 2018.
- *European Chemistry Conference*, Roma, 2018.
- XXXVII Escola de Verão em Química, São Carlos, 2017.
- 18° Encontro Nacional de Química Analítica, Florianópolis, 2016.
- VI *Workshop* em Microfluídica, Campinas, 2016.
- 55° Congresso Brasileiro de Química, Goiânia, 2015.
- V *Workshop* em Microfluídica, Campinas, 2015.
- 37ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Natal, 2014.
- XXV Congresso de Iniciação Científica da UNESP: 25 anos de discussão das atividades de Iniciação Científica, Araraquara, 2013.
- 36ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de São Pedro, 2013.

7. Supervisão de Iniciação Científica

- Supervisão da aluna de graduação Amanda Letícia Polli Silvestre no projeto intitulado “Plataforma de papel para análise colorimétrica de sulfonamidas em amostras de medicamentos veterinários”, setembro/2016 a fevereiro/2017. Bolsista do PIBIC/CNPq.

- Supervisão do aluno de graduação Felipe de la Rua Müzel no projeto intitulado “Plataforma de papel para spot-test e DLLME para detecção de furosemida em doping”, setembro/2017 a março/2018. Bolsista do PIBIC/CNPq.

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 e companheirismo em todos os momentos.

À Maria Izabel, minha melhor amiga, noiva e companheira de aventuras 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 noiva, melhor amiga e companheira, Maria Izabel, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me ajudando nas horas difíceis e compartilhando os bons momentos. Obrigado me apoiar por desde sempre e ser minha companheira de jornada, pois se estou onde estou, é por sua causa.

Ao Henrique, Angela, Ana Julia e tia Edna, obrigado por terem me acolhido tão bem na sua casa e serem parte da minha vida.

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

Ao professor Abraham K. Badu-Tawiah pela orientação e oportunidade de trabalhar e aprender no seu grupo de pesquisa.

Aos amigos do GPFF e LATIG, em especial, Liliane, Aninha, Bruno, Richard, Laura, Geórgia, Felipe, Tiago e Dayana, obrigado pelo apoio e ajuda quando precisei e, principalmente, pelos bons momentos, pelos cafés e pelas risadas que descontraiam esse difícil caminho que decidimos seguir.

Aos amigos do *Badu's research group*, em especial, Devin, Sierra, Kavya, Ben, Suji, Dmytro e Taghi que me acolheram tão bem longe de casa e me ajudaram muito nessa nova etapa.

À Karla e à Poliana que foram minha família em Columbus.

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

Aos membros da banca, professores Ana Rita, Clóvis, Ivo e Paulo, pela disponibilidade, tempo dispensado e sugestões para melhorar esse texto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2016/20847-6 e 2018/05993-1) pelas bolsas concedidas e pelo auxílio financeiro.

Ao CNPq (Processo n° 140503/2016-1) pelos recursos e pela bolsa concedida.

Aos professores e funcionários do IQ e, também, a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para que mais essa etapa fosse concluída, muito obrigado.

“*Somewhere, something incredible is waiting to be known*”.

Carl Sagan

“Quiet people have the loudest minds”.

Stephen Hawking

“A tarefa é não tanto para ver o que ninguém viu ainda, mas pensar o que ninguém ainda pensou, sobre o que todo mundo vê”.

Erwin Schrödinger

RESUMO

A primeira parte deste trabalho foi desenvolvida no laboratório Fritz Feigl-UNESP/CAr, na qual foi descrito um novo *carbon dot* (CD) sintetizado a partir de ácido cítrico e tiramina usando uma rota em única etapa por meio de aquecimento por micro-ondas doméstico. O CD sintetizado apresenta emissão no azul quando irradiado com luz UV, que foi suprimida na presença de H_2O_2 e peroxidase. O CD foi utilizado para desenvolver metodologias para quantificar glicose em amostras biológicas utilizando plataforma de papel. O método desenvolvido foi aplicado em amostras de soro e urina certificadas, e não há diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos usando o dispositivo de papel com adição de padrão e as amostras certificadas. Também foram desenvolvidas metodologias utilizando 3D-µPAD com o reagente fluorescente e enzimas oxidase para quantificação de glicose e lactato em amostras de saliva. O preparo de amostra foi simples e rápido e o método foi validada utilizando adição de padrão e recuperação, além de ser aplicado em amostras de soro certificadas, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os resultados obtidos e os valores de referência. A segunda parte deste trabalho foi desenvolvida no *Badu's research group* na The Ohio State University durante o período sanduiche com bolsa da FAPESP, na qual foi desenvolvida a quantificação direta de agentes dopantes em amostras de urina sem tratamento da amostra por PS-MS. *Paper-spray mass spectrometry* é um método de ionização em condições ambientes que combina as vantagens das plataformas de papel com a confiabilidade das análises de espectrometria de massas, reduzindo o tempo de análise e o consumo de reagente e de solventes orgânicos. O uso de substâncias ilícitas para aumentar a desempenho de atletas em esportes é proibido e considerado *doping.* A superfície do papel foi tratada com triclorometilsilano utilizando reação em fase gasosa para aumentar a ionização dos compostos alvo. Essa abordagem foi aplicada para análise de dois agentes anabólicos (trembolona e clembuterol) e dois diuréticos (furosemida e hidroclorotiazida) em amostras de urina. Após a otimização das condições experimentais, os métodos desenvolvidos apresentaram repetibilidade satisfatória e boa correlação linear entre concentração e intensidade absoluta. Foram alcançados limites de detecção na faixa de sub-ng mL^{-1}, abaixo dos níveis de desempenho mínimos requeridos pela WADA, utilizando o método de PS-MS com papel hidrofóbico sem nenhuma etapa de preparo ou *clean-up* da amostra. Os métodos propostos foram aplicados em amostras de urina fortificadas com os agentes dopantes e se mostraram rápidos, simples, sensíveis, exatos e precisos.

Palavras-chave: *Carbon dot*. Glicose. Lactato. Saliva. µPAD. Imagem digital. *Paper-spray*. Espectrometria de massas. *Doping*. Agentes anabolizantes. Diuréticos. Urina.

ABSTRACT

The first part of this work was developed on the Fritz Feigl-UNESP/CAr laboratory, in which a novel carbon dot synthesized from citric acid and tyramine was described using a one-step microwave heating route. Under UV irradiation, the CD displayed blue emission that was quenched in the presence of H_2O_2 and peroxidase. This property was used to develop method to quantify glucose in biological samples using a paper platform. The method developed was applied in the analysis of certified serum and urine samples, and there were no statistically significant differences between the certified concentrations and the results obtained using the paper device with standard additions. In addition, it was developed method using 3D-µPAD, the CD fluorescence reagent and oxidase enzymes to quantify glucose and lactate in saliva samples. The sample preparation used was simple and fast. The method was validated in saliva samples utilizing standard addition and recovery, and applied in the analysis of certified serum samples, and there were no statistically significant differences between the certified concentrations and the results obtained using the 3D-µPAD. The second part of this work was developed at the *Badu's research group* at The Ohio State University during the internship period funded by FAPESP, in which a direct quantification of doping agents in urine samples with no sample preparation by PS-MS was developed. Paper-spray mass spectrometry (PS-MS) is an ambient ionization method that combines the advantages of the paper platform with the reliability of MS analysis, reducing the consumption of time, reagent, and organic solvent. The use of illicit substances to improve enhance athletic performance in sport is forbidden and considered doping. The paper surface was treatment with trichloromethylsilane (TCMS) using a gas-phase reaction to increase the target compounds ionization. This approach was applied for the analysis of two anabolic agents (trenbolone and clenbuterol) and two diuretics (furosemide and hydrochlorothiazide) in urine samples. Under optimized conditions, the developed methods presented satisfactory repeatability and a good correlation between concentration and absolute intensity. Highly sensitive detections as low as sub-ng mL^{-1} which is below the minimum required performance levels (MRPL) proposed by the WADA has been reached using the hydrophobic PS-MS without any pre-concentration and clean-up step. The proposed methods were applied in fortified urine samples with doping agents and showed to be fast, simple, sensitive, accurate and precise.

Keywords: Carbon dot. Glucose. Lactate. Saliva. µPAD. Digital image. Paper-spray. Mass spectrometry. Doping. Anabolic agents. Diuretics. Urine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Comparação das dimensões de diferentes estruturas. 26
Figura 1.2 – Níveis de energia de um átomo até o *bulk* de um mesmo material. 28
Figura 1.3 – Levantamento do número de publicações de trabalhos relativos à *carbon dot* em função do ano, no período de 2004 a 2019, feito utilizando a plataforma *Scifinder*® utilizando a palavra *carbon dot.* 31
Figura 1.4 – Estratégias *top-down* e *bottom-up* para síntese de nanopartículas. 32
Figura 1.5 – Estados de spin dos elétrons das moléculas. Em (a) é representado o estado eletrônico fundamental singleto com os spins emparelhados. Em (b) e (c) são mostrados os estados eletrônicos excitados. Caso os spins estejam emparelhados no estado excitado, a molécula está no estado singleto (b). Se os spins estejam desemparelhados, a molécula está em um estado excitado tripleto (c). 36
Figura 1.6 – Diagrama de níveis de energia, ou diagrama de Jablonski, de uma molécula hipotética. 37
Figura 1.7 – Levantamento do número de publicações de trabalhos relativos à µPAD em função do ano, no período de 2000 a 2019, feito utilizando a plataforma *Scifinder*® utilizando a palavra *paper-based analytical device.* 40
Figura 1.8 – Esquema dos diferentes modos para a confecção de barreiras hidrofóbicas. 42
Figura 1.9 – (a) Detalhamento dos componentes de uma impressora com tinta à base de cera da marca Xerox®: 1) *Display* frontal, 2) Trajetória do papel, 3) Rolo de pressão para transferência, 4) Pré-aquecedor de papel, 5) Fusão da cera, 6) Reservatório de cera derretida, 7) Rolo de impressão, 8) Cabeça de impressão, 9) *Kit* de manutenção, 10) Reservatório de descarte, 11) Armazenamento de papel, 12) Armazenamento de cera sólida e 13) Conexões e saídas eletrônicas. (b) Esquema de como é feita a impressão utilizando a impressora com tinta à base de cera. 43
Figura 1.10 – Confecção e utilização das plataformas de papel para determinação por adição de padrão. A. *Layout* dos *spot-tests*; B. Impressão dos *spot-tests*; C. Aquecimento para formação das barreiras hidrofóbicas; D. *Spot-test* pronto, E. Adição da mistura de GOx, Pox e CD; F. Adição da amostra e padrões de glicose; G. Iluminação UV para detecção por fluorimetria utilizando imagem digital; H. Tratamento das imagens por software gráfico. 56
Figura 1.11 – Confecção e utilização do 3D-µPAD. A. Design dos 3D-µPADs; B. Impressão dos 3D-µPADs; C. Aquecimento para formação das barreiras hidrofóbicas; D. 3D-µPAD pronto; E. Dobradura do 3D-µPAD; F. 3D-µPAD no suporte metálico com imã para análise; G. Adição da amostra; H. Última camada retirada do 3D-µPAD; I. Câmara UV para detecção por fluorimetria utilizando imagem digital. 57
Figura 1.12 – Gráfico de efeitos principais da matriz da Tabela 1.2. C_{H2O2} = 50 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{Pox} = 30 U mL^{-1}, pH = 6 e n = 3. 61
Figura 1.13 – Variação da razão molar TIR/AC para a síntese dos CD. Tempo de síntese = 120 s, C_{H2O2} = 75 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{Pox} = 30 U mL^{-1}, pH=6 e n=3. 62
Figura 1.14 – Espectro de absorção e fotografia da cubeta da dispersão de CD diluída 5 vezes. 63
Figura 1.15 – Espectros de excitação e emissão de fluorescência para o CD. Fotografia da dispersão de CD sob luz UV (365 nm). pH=6. 64
Figura 1.16 – Espectros de emissão variando a comprimento de onda de excitação. pH = 6. 65
Figura 1.17 – Variação do máximo de emissão com o aumento na concentração de CD no reagente utilizado. pH = 6. 66
Figura 1.18 – Variação na intensidade de fluorescência dos CD com o pH. 67
Figura 1.19 – Efeito da concentração de NaCl na fluorescência dos CD. pH=6 e n=3. 68
Figura 1.20 – Espectro de FTIR e estrutura do ácido cítrico. 69
Figura 1.21 – Espectro de FTIR e estrutura da tiramina. 70
Figura 1.22 – Espectro de FTIR do CD. 71

Figura 1.23 – Reação de condensação entre o ácido cítrico e a tiramina. 72
Figura 1.24 – Espectro de ^{1}H-NMR *presat* da solução de ácido cítrico (600MHz, D_2O) 72
Figura 1.25 – Espectro de ^{1}H-NMR *presat* da solução de tiramina (600MHz, D_2O). 73
Figura 1.26 – Espectro de ^{1}H-NMR *presat* da dispersão de CD (600MHz, D_2O). 73
Figura 1.27 – Imagem de TEM do CD sintetizado. Distribuição do tamanho das nanopartículas. 75
Figura 1.28 – Resposta dos CD frente aos compostos analisados. C = 100 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{H2O2} = 50 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{Pox} = 30 U mL^{-1} e n = 3. 76
Figura 1.29 – Proposta de mecanismo para a supressão da fluorescência do CD em presença de H_2O_2 e Pox. 77
Figura 1.30 – Intensidade de fluorescência das componentes RGB em função da velocidade do obturador da câmera fotográfica. (t = 1, 0,8, 0,6, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/8, 1/10 e 1/13 s). n = 5. 78
Figura 1.31 – Curva analítica de concentração de quinino em função da intensidade das componentes RGB. 79
Figura 1.32 – *Spot-test* utilizado na calibração da fluorescência. Concentrações de sulfato de quinino em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} iguais a 2,50, 5,00, 7,50, 10,0 15,0, 20,0 e 25,0 x 10^{-6} mol L^{-1}. 79
Figura 1.33 – Supressão da fluorescência com o aumento da concentração de CD no reagente. C_{H2O2} = 10 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{Pox} = 30 U mL^{-1}. 81
Figura 1.34 – Reação de oxidação da glicose utilizando a enzima glicose oxidase em meio contendo oxigênio formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio. 82
Figura 1.35 – Curva de adição de padrão e a obtenção da concentração de glicose na amostra. n = 3. 83
Figura 1.36 – Diferentes volumes de solução de corante amaranto adicionados ao µPAD. Da esquerda para a direita os volumes utilizados foram de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 µL de solução de corante amaranto. 85
Figura 1.37 – Diferentes volumes de água deionizada adicionados ao µPAD. Da esquerda para a direita os volumes utilizados foram de 0, 35, 40, 45, 55, 65, 75 e 80 µL de água deionizada. 86
Figura 1.38 – Resposta dos CD frente aos compostos analisados na presença de GOX e Pox. C = 50,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{GOx} = 120 U mL^{-1} e C_{Pox} = 30 U mL^{-1}. 87
Figura 1.39 – Curva analítica de supressão em função da concentração de glicose. C_{GLI} = 5,00 a 50,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{GOx} = 120 U mL^{-1} e C_{Pox} = 30 U mL^{-1}. Componente de cor = azul (B). 87
Figura 1.40 – Reação de oxidação do lactato utilizando a enzima lactato oxidase em meio contendo oxigênio formando piruvato e peróxido de hidrogênio. 90
Figura 1.41 – Resposta dos CD frente aos compostos analisados. C = 20,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{LOx} = 50 U mL^{-1} e C_{Pox} = 30 U mL^{-1}. 90
Figura 1.42 – Curva analítica de supressão em função da concentração de lactato. C_{LAC} = 2,50 a 20,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{LOx} = 50 U mL^{-1} e C_{Pox} = 30 U mL^{-1}. Componente de cor utilizada = azul (B). 91
Figura 2.1 – Os componentes básicos de um espectrômetro de massas. 107
Figura 2.2 – Representação esquemática do processo de ionização por electrospray. 109
Figura 2.3 – Ilustração de um sistema de PS-MS. 111
Figura 2.4 – Levantamento do número de publicações de trabalhos relativos ao uso de PS-MS em função do ano, no período de 2010 a 2019, feito utilizando a plataforma *Scifinder*® utilizando as palavras *paper-spray mass spectrometry*. 113
Figura 2.5 – Esquema da parte interna de um espectrômetro de massas *Finnigan LTQ Linear Ion Trap*, *Thermo Scientific* ®. 114
Figura 2.6 – Ilustração do funcionamento da ejeção de íons pelo LQT de acordo com a razão *m/z* do íon. 115
Figura 2.7 – Estruturas dos agentes anabólicos (a) trembolona e (b) clembuterol. 119
Figura 2.8 – Estruturas dos diuréticos (a) furosemida e (b) hidroclorotiazida. 121

Figura 2.9 – Esquema da configuração utilizada na silanização em fase de vapor. 1. Dessecador; 2. Válvula; 3. Sistema de bomba de vácuo; 4. Disco de plástico do dessecador; 5. Triângulos de papel; 6. Organosilano. 127
Figura 2.10 – Configuração do espectrômetro de massas utilizado para realização dos experimentos com PSI. 128
Figura 2.11 – Representação esquemática da configuração utilizada na análise de compostos em urina utilizando PS-MS. 129
Figura 2.12 – Modificação do papel através da silanização dos grupos hidroxil presente na superfície do papel utilizando vapor de triclorosilano para criação uma camada hidrofóbica. 132
Figura 2.13 – Espectro de massas obtido por meio de PS-MS em modo íon positivo para solução de trembolona (MM 270) preparada em MeOH:H_2O (1:1) utilizando papel hidrofóbico tratado com TCTFPS por 120 min. Espectro de CID-MS^2 para o íon protonado da trembolona está inserido na figura. Energia de colisão = 23 eV. C_{TREM} = 1000 ng mL^{-1}. 132
Figura 2.14 – Proposta de padrão de fragmentação via CID-MS^2 proposto do íon trembolona protonado (*m/z* 271) no modo íon positivo. A fragmentação apresenta os principais íons fragmentos em *m/z* 253, 227 e 199. 133
Figura 2.15 – Espectro de massas obtido por meio de PS-MS em modo íon positivo para solução de clembuterol (MM 277) preparada em MeOH:H_2O (1:1) utilizando papel hidrofóbico tratado com TCTFPS por 120 min. Espectro de CID-MS^2 para o íon protonado do clembuterol está inserido na figura. Energia de colisão = 15 eV. C_{CLEM} = 1000 ng mL^{-1}. 134
Figura 2.16 – Proposta de padrão de fragmentação via CID-MS^2 proposto do íon clembuterol protonado (*m/z* 277) no modo íon positivo. A fragmentação apresenta os principais íons fragmentos em *m/z* 277, 259 e 203. 135
Figura 2.17 – Espectro de massas no modo íon negativo registrado para furosemida (MM 331) preparado em MeOH:H_2O (1:1) utilizando papel hidrofóbico tratado com TCTFPS por 120 min. Espectro de CID-MS^2 para o íon desprotonado da furosemida está inserido na figura. Energia de colisão = 16 eV. C_{FUR} = 25 µg mL^{-1}. 136
Figura 2.18 – Proposta de padrão de fragmentação via CID-MS^2 proposto do íon furosemida desprotonado (*m/z* 329) no modo íon negativo. A fragmentação apresenta os principais íons fragmentos em *m/z* 285, 249 e 205. 137
Figura 2.19 – Espectro de massas no modo íon negativo registrado para hidroclorotiazida (MM 298) preparado em MeOH:H_2O (1:1) utilizando papel hidrofóbico tratado com TCTFPS por 120 min. Espectro de CID-MS^2 para o íon desprotonado da hidroclorotiazida está inserido na figura. Energia de colisão = 20 eV. C_{HCT} = 25 µg mL^{-1}. 138
Figura 2.20 – Proposta de padrão de fragmentação via CID-MS^2 proposto do íon hidroclorotiazida desprotonado (*m/z* 296) no modo íon negativo. A fragmentação apresenta os principais íons fragmentos em *m/z* 269, 232 e 205. 139
Figura 2.21 – Curva de nível da superfície de resposta do planejamento composto central obtido para a intensidade absoluta (IA) em função da voltagem do *tube lens* e da temperatura do capilar para o íon molecular desprotonado da furosemida ($[M-H]^-$ em *m/z* 329), utilizando PS-MS em modo íon negativo. 141
Figura 2.22 – Curva de nível da superfície de resposta do planejamento composto central obtido para a intensidade absoluta (IA) em função da voltagem do *tube lens* e da temperatura do capilar para o íon produto da fragmentação na fonte da furosemida ($[M-CO_2-H]^-$ em *m/z* 285), utilizando PS-MS em modo íon negativo. 142
Figura 2.23 – Curva de nível da superfície de resposta do planejamento composto central obtido para a intensidade absoluta (IA) em função da voltagem do *tube lens* e da temperatura do capilar para o íon molecular desprotonado da hidroclorotiazida ($[M-H]^-$ em *m/z* 296), utilizando PS-MS em modo íon negativo. 142

Figura 2.24 – Curva de nível da superfície de resposta do planejamento composto central obtido para a intensidade absoluta (IA) em função da voltagem do *tube lens* e da temperatura do capilar para o aduto formado entre a hidroclorotiazida e o íon cloreto ($[M+Cl]^-$ em *m/z* 332), utilizando PS-MS em modo íon negativo. 143
Figura 2.25 – Curva de nível da superfície de resposta do planejamento composto central obtido para a intensidade absoluta (IA) em função da voltagem do *tube lens* e da temperatura do capilar para o íon produto via CID-MS^2 da trembolona (*m/z* 271 → 253), utilizando PS-MS em modo íon positivo. 145
Figura 2.26 – Curva de nível da superfície de resposta do planejamento composto central obtido para a intensidade absoluta (IA) em função da voltagem do *tube lens* e da temperatura do capilar para o íon produto via CID-MS^2 do clembuterol (*m/z* 277 → 259), utilizando PS-MS em modo íon positivo. 145
Figura 2.27 – Otimização do solvente do *spray* utilizado durante o PS-MS. Intensidade absoluta de soluções de 12,5 µg mL^{-1} de furosemida (cinza claro) e 1000 ng mL^{-1} de trembolona (vermelho). Fragmentos característicos da trembolona protonada (*m/z* 271 → 253) e da furosemida desprotonada (*m/z* 329 → 285) foram utilizadas para a análise. 147
Figura 2.28 – Efeito da voltagem da fonte na intensidade do sinal. Trembolona (círculos pretos – 500 ng mL^{-1}) foi monitorado através de experimentos CID-MS^2 utilizando o íon produto mais abundante, *m/z* 253, no modo íon positivo, e a furosemida (círculos brancos – 12,5 µg mL^{-1}) foi monitorado através de experimentos CID-MS^2 utilizando o íon produto mais abundante, *m/z* 285, no modo íon negativo. As barras de erro representam o desvio padrão de três réplicas dos analitos realizadas em triângulos de papeis independentes. 149
Figura 2.29 – Modificação do papel através da silanização dos grupos hidroxil da sua superfície utilizando vapor de triclorosilano para criar uma camada hidrofóbica no papel. 150
Figura 2.30 – Otimização do reagente e tempo de tratamento do papel. Intensidade absoluta de soluções de (a) 500 ng mL^{-1} de trembolona e (b) 12,5 µg mL^{-1} furosemida. Fragmentos característicos da trembolona protonada (*m/z* 271 → 253) e furosemida desprotonada (*m/z* 329 → 285) foram utilizadas na análise. Os triângulos de papel foram tratados com TCMS (cinza claro) e TCTFPS (vermelho) por 15, 30, 60, 120 e 240 min. 152
Figura 2.31 – Fotografia mostrando a interação da solução aquosa de corante com o papel hidrofóbico tratado (esquerda) e com o papel hidrofílico não tratado (direita). 153
Figura 2.32 – Curva analítica para (a) trembolona (5 – 1000 ng mL^{-1}), (b) clembuterol (1 – 1000 ng mL^{-1}), (c) furosemida (50 - 25 x 10^3 ng mL^{-1}) e hidroclorotiazida (50 - 25 x 10^3 ng mL^{-1}). Quantificação do analito foi realizada pela análise do íon produto via *tandem* MS-CID: trembolona (*m/z* 271 → 227), clembuterol (*m/z* 277 → 203), furosemida (*m/z* 329 → 285) e hidroclorotiazida (*m/z* 296 → 269). A barra de erro representa o desvio padrão das análises de três réplicas em triângulos de papeis independentes..... 155
Figura 2.33 – Estabilidade da trembolona (1000 ng mL^{-1}) em amostra de urina depositada sobre o papel hidrofóbico tratado com TCMS (linhas azul e vermelha) e papel hidrofílico não-tratado (linhas azul escuro e laranja) estocados por 25 dias a temperatura ambiente (linhas vermelha e laranja) e a 4°C (linhas azul e azul escuro). A barra de erro representa o desvio padrão das análises de três réplicas em triângulos de papeis independentes. 158
Figura 2.34 – Estabilidade da clembuterol (1000 ng mL^{-1}) em amostra de urina depositada sobre o papel hidrofóbico tratado com TCMS (linhas azul e vermelha) e papel hidrofílico não-tratado (linhas azul escuro e laranja) estocados por 25 dias a temperatura ambiente (linhas vermelha e laranja) e a 4°C (linhas azul e azul escuro). A barra de erro representa o desvio padrão das análises de três réplicas em triângulos de papeis independentes. 158

Figura 2.35 – Estabilidade da furosemida (25 μg mL^{-1}) em amostra de urina depositada sobre o papel hidrofóbico tratado com TCMS (linhas azul e vermelha) e papel hidrofílico não-tratado (linhas azul escuro e laranja) estocados por 25 dias a temperatura ambiente (linhas vermelha e laranja) e a 4°C (linhas azul e azul escuro). A barra de erro representa o desvio padrão das análises de três réplicas em triângulos de papeis independentes. 159
Figura 2.36 – Estabilidade da hidroclorotiazida (25 μg mL^{-1}) em amostra de urina depositada sobre o papel hidrofóbico tratado com TCMS (linhas azul e vermelha) e papel hidrofílico não-tratado (linhas azul escuro e laranja) estocados por 25 dias a temperatura ambiente (linhas vermelha e laranja) e a 4°C (linhas azul e azul escuro). A barra de erro representa o desvio padrão das análises de três réplicas em triângulos de papeis independentes. 159

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Massa dos precursores tiramina e ácido cítrico monoidratado utilizados na otimização experimental da síntese dos CD..... 52
Tabela 1.2 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 e os resultados obtidos para cada experimento. C_{H2O2} = 50 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{Pox}= 30 U mL^{-1}, pH=6 e n=3. 60
Tabela 1.3 – Atribuição das bandas de absorção do FTIR para o ácido cítrico..... 69
Tabela 1.4 – Atribuição das bandas de absorção do FTIR para a tiramina..... 70
Tabela 1.5 – Atribuição das bandas de absorção do FTIR para o CD. 71
Tabela 1.6 – Imagem da fluorescência do papel em função do tempo de abertura do obturador. 78
Tabela 1.7 – Variação dos componentes de cor para o branco da reação e para uma amostra. C_{H2O2} = 10 x 10^{-6} mol L^{-1}, $C_{peroxidase}$ = 30 U mL^{-1}. 80
Tabela 1.8 – Determinação de glicose em amostras certificadas. 83
Tabela 1.9 – Aplicação do método proposto em amostras de saliva. 89
Tabela 1.10 – Determinação de glicose em amostras certificadas. 89
Tabela 1.11 – Aplicação do método proposto em amostras de saliva. 92
Tabela 1.12 – Determinação de lactato em amostras certificadas..... 93
Tabela 1.13 – Comparação de parâmetros do método proposto com metodologias descritas na literatura para a determinação de glicose..... 94
Tabela 1.14 – Comparação de parâmetros do método proposto com metodologias descritas na literatura para a determinação de lactato. 95
Tabela 2.1 – Tensão superficial de diferentes solventes e misturas de acetotinitrila e água com diferentes frações molares. 130
Tabela 2.2 – Matrizes dos planejamentos composto central para a furosemida e hidroclorotizida. Os níveis codificados dos fatores estão em frente aos valores reais utilizados para o planejamento..... 140
Tabela 2.3 – Matriz do planejamento composto central para a trembolona e clembuterol. Os níveis codificados dos fatores estão em frente aos valores reais utilizados para o planejamento. 144
Tabela 2.4 – Propriedades físico-químicas dos solventes. 148
Tabela 2.5 – Estimativa da energia de superfície dos papeis tratados por tempos diferentes utilizando TCMS e TCTFPS pelo método de *bracketing*. 154
Tabela 2.6 – Faixa linear, transição, equação da regressão linear e coeficiente de determinação para as curvas analíticas de TREM, CLEM, FUR e HCT. 155
Tabela 2.7 – Valores de LD, LQ, precisão inter-dia e recuperação para TREM, CLEM, FUR e HCT. 156
Tabela 2.8 – LD e LQ para TREM, CLEM, FUR e HCT em amostras de urina utilizando papel hidrofóbico tratado e papel hidrofílico não-tratado. 157
Tabela 2.9 – Comparação de parâmetros do presente método com metodologias descritas na literatura para a determinação de trembolona. 161
Tabela 2.10 – Comparação de parâmetros do presente método com metodologias descritas na literatura para a determinação de clembuterol. 161
Tabela 2.11 – Comparação de parâmetros do presente método com metodologias descritas na literatura para a determinação de furosemida. 162
Tabela 2.12 – Comparação de parâmetros do presente método com metodologias descritas na literatura para a determinação de hidroclorotiazida. 162

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ε	Absortividade molar;
∫	Integral do espectro de emissão;
η	Índice de refração;
Φ	Rendimento quântico;
µPAD	Dispositivo analítico microfluídico em papel, do inglês *microfluidic paper-based analytical device;*
σ	Deslocamento químico;
λ	Comprimento de onda;
A	Absorbância;
AC	Ácido cítrico;
ACN	Acetonitrila;
AI	Ionização ambiente, do inglês *ambient ionization*;
Am	Amostra;
APCI	Ionização química a pressão atmosférica, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*;
ASAP	*Atmospheric pressure solid analysis probe*;
AuNP	Nanopartículas de ouro;
b	Caminho ótico
B	Componente de cor azul;
B_0	Campo magnético externo;
C	Concentração;
CBS	*Coated blade spray*;
CD	Ponto quântico de carbono, do inglês *carbon dot*;
CI	Ionização química, do inglês *chemical ionization*;
CID	Dissociação induzida por colisão, do inglês *collision induced dissociation*;
CLEM	Clembuterol;
d	Dubleto;
DAPPI	*Desorption atmospheric pressure photoionization*;
DART	*Direct analysis in real-time*;
DC	Corrente contínua, do inglês *direct current*;
DESI	*Desorption electrospray ionization*;
EASI	*Easy ambient sonic-spray ionization*;
EI	Ionização por elétrons, do inglês *eléctron ionization*;
ESI	Ionização por *electrospray*, do inglês *electrospray ionization*;
F/F_0	Razão entre a intensidade de fluorescência da amostra e do branco (supressão);
FI	Força iônica;
FUR	Furosemida;
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier, do inglês *Fourier transform infrared*;
G	Componente de cor verde;
GC	Cromatografia gasosa, do inglês *gas chromatography*;
GOx	Glicose oxidase;
HCT	Hidroclorotiazida;
I	Intensidade da amostra;
I_0	Intensidade do branco;
IA	Intensidade absoluta;

IEM	Modelo da evaporação do íon, do inglês *ion evaporation model*;
IR	Infravermelho, do inglês, *infrared*;
IUPAC	*International Union of Pure and Applied Chemistry*;
LASER	*Light amplification by stimulated emission of radiation*;
LC	Cromatografia líquida, do inglês *liquid chromatography*;
LD	Limite de detecção;
LIT	*Linear ion trap*;
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês *liquid-liquid extraction;*
LOx	Lactato oxidase;
LTP	*Low temperature plasma*;
LTQ	*Linear quadrupole ion trap*;
LQ	Limite de Quantificação;
MALDI	*Matrix-assisted laser desorption-ionization*;
MCP	Placa de microcanais, do inglês *microchannel plate*;
MIP	Polímero molecularmente impresso, do inglês *molecular imprinted polymer*;
MMIPs-d	*Superparamagnetic molecularly imprinted polymers*;
MOF	Estrutura metalorgânicas, do inglês *metal-organic framework*;
MRPL	Nível mínimo de desempenho exigido, do inglês *minimum required performance levels*;
MS	Espectrometria de massas, do inglês *mass spectrometry*;
MS^n	Espectrometria de massas de múltiplos estágios;
m/z	Razão massa-carga;
nanoDESI	*Nanospray desorption electrospray ionization*;
nESI	*Nano electrospray ionization*;
NMR	Ressonância magnética nuclear, do inglês *nuclear magnetic resonance*;
NP	Nanopartícula;
OPP-API	*Open port probe-ambient pressure ionization*;
PNQC	Programa Nacional de Controle de Qualidade;
Pox	Peroxidase;
PS	*Paper-spray*;
PTFE	Politetrafluoroetileno;
PVC	Policloreto de vinila;
PVDF	Fluoreto de polivinilideno;
QD	Ponto quântico, do inglês, *quantum dot*;
R	Componente de cor vermelho;
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês *relative standard deviation*;
S_0	Estado eletrônico fundamental;
S_n	Estado eletrônico excitado singleto;
SPE	Extração em fase sólido, do inglês *solid phase extraction*;
SPME	Microextração em fase sólida, do inglês *solid phase microextraction*;
t	Tripleto;
TI	Ionização térmica, do inglês *termal ionization*;
T_n	Estado eletrônico excitado tripleto;
TC	Temperatura do capilar;
TCMS	Triclorometilsilano
TCTFPS	Tricloro(3, 3, 3-trifluoropropil)silano;
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão, do inglês *transmission electron microscopy*;
TIR	Tiramina;

TOF	*Time-of-flight*;
TREM	Trembolona;
SBAC	Sociedade Brasileira de Análises Clínicas;
SD	Desvio padrão, do inglês *standard deviation*;
UV-Vis	Ultravioleta-visível;
VSSA	Área de superfície específica do volume, do inglês *volume specific surface área*;
VTL	Voltagem do *tube lens*;
WADA	Agência Mundial Anit-*doping*, do inglês *World Anti-doping Agency*;
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês *World Health Organization*;
$\bar{x}$	Valor médio

SUMÁRIO

PREFÁCIO 24

Capítulo 1 25
1. **INTRODUÇÃO** 26
1.1. Nanotecnologia e nanomaterial 26
1.1.1. *Nanopartículas e pontos quânticos* 29
1.1.2. *Métodos para síntese de nanopartículas* 31
1.2. Caracterização das nanopartículas 34
1.2.1. *Espectroscopia de absorção no UV-Vis* 34
1.2.2. *Espectroscopia de fluorescência* 35
1.2.3. *Espectroscopia de absorção no infravermelho* 38
1.2.4. *Espectroscopia de ressonância magnética nuclear* 38
1.2.5. *Microscopia eletrônica de transmissão* 39
1.3. Microfluídica em papel 39
1.4. Detecção via imagem digital 43
1.4.1. *Métodos de calibração* 44
1.5. Análise de compostos de interesse clínico 45
1.5.1. *Glicose* 46
1.5.2. *Lactato* 46
2. **OBJETIVOS** 48
3. **PARTE EXPERIMENTAL** 49
3.1. Equipamentos 49
3.2. Reagentes 50
3.3. Soluções 51
3.3.1. *Soluções gerais* 51
3.3.2. *Soluções estoque dos analitos* 51
3.3.3. *Soluções para síntese dos CD* 51
3.3.4. *Dispersão estoque de CD* 52
3.3.5. *Soluções para a otimização da concentração do reagente* 52
3.3.6. *Reagente fluorescente para dispositivo de adição de padrão* 52
3.3.7. *Reagente fluorescente para dispositivo 3D-μPAD* 53
3.3.8. *Amostras certificadas* 53
4. **METODOLOGIAS** 54
4.1. Síntese dos CD 54
4.2. Otimização da síntese de CD 54
4.3. Calibração da potência do forno de micro-ondas 54
4.4. Caracterização do CD 55
4.5. Spot-test para adição de padrão 55
4.6. Dispositivo analítico microfluídico 3D em papel (3D-μPAD) 56
4.7. Detecção por imagens digitais 58
4.8. Coleta e filtragem de amostra de saliva 58
5. **RESULTADOS E DISCUSSÃO** 60
5.1. Planejamento fatorial para as condições da síntese 60
5.2. Otimização da síntese dos CD 61
5.3. Caracterização do CD 62
5.3.1. *Espectro de absorção* 62
5.3.2. *Espectro de emissão e excitação* 63
5.3.3. *Rendimento quântico* 66

5.3.4. *Efeito da variação de pH* 67
5.3.5. *Variação da força iônica do meio* 67
5.3.6. *Espectroscopia de absorção no infravermelho* 68
5.3.7. *Espectroscopia de ressonância magnética de ^{1}H* 72
5.3.8. *Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)* 75
5.3.9. *Supressores* 75
5.4. Calibração da detecção de fluorescência por imagem digital 77
5.4.1. *Fluorescência do papel* 77
5.4.2. *Detecção por imagem digital em fluorimetria* 78
5.5. Detecção por imagem digital – sensibilidade dos canais 80
5.6. Otimização da concentração da dispersão de trabalho de CD 80
5.7. Curvas de adição de padrão 82
5.7.1. *Construção das curvas de adição de padrão* 82
5.7.2. *Validação do método* 83
5.8. Dispositivo analítico microfluídico 3D em papel (3D-µPAD) 84
5.8.1. *Volume utilizado no 3D-µPAD* 84
5.9. Determinação de glicose 86
5.9.1. *Especificidade da reação* 86
5.9.2. *Curva analítica* 87
5.9.3. *Aplicação em amostra de saliva* 88
5.9.4. *Adição de padrão e recuperação* 89
5.9.5. *Aplicação em amostras certificadas de soro* 89
5.10. Determinação de lactato 90
5.10.1. *Especificidade da reação* 90
5.10.2. *Curva analítica* 91
5.10.3. *Aplicação em amostra de saliva* 92
5.10.4. *Adição de padrão e recuperação* 92
5.10.5. *Aplicação em amostras certificadas de soro* 92
5.11. Comparação de metodologias 93
6. **CONCLUSÕES** 97
7. **PERSPECTIVAS FUTURAS** 98
REFERÊNCIAS 99

Capítulo 2 106
1. **INTRODUÇÃO** 107
1.1. Espectrometria de massas 107
1.2. Métodos de ionização para espectrometria de massas 108
1.2.1. *Ionização ambiente em espectroscopia de massas* 110
1.2.2. *Paper-spray mass spectrometry* 110
1.3. Analisador de massas linear ion trap 113
1.4. Doping esportivo 115
1.4.1. *A lista proibida* 116
1.4.2. *Agentes anabólicos* 118
1.4.2.1. *Trembolona* 118
1.4.2.2. *Clembuterol* 119
1.4.3. *Diuréticos e agentes mascarantes* 120
1.4.3.1. *Furosemida* 121
1.4.3.2. *Hidroclorotiazida* 121
1.4.4. *A detecção do doping* 122
2. **OBJETIVOS** 124

3. **PARTE EXPERIMENTAL**.....125
3.1. Equipamentos.....125
3.2. Reagentes.....125
3.3. Solução.....126
3.3.1. *Solução padrão estoque de trembolona*.....126
3.3.2. *Amostras de urina*.....126
3.3.3. *Soluções para as curvas analíticas*.....126
4. **METODOLOGIAS**.....127
4.1. Produção dos triângulos de papel.....127
4.2. Silanização do papel.....127
4.3. Espectrometria de massas.....127
4.4. Experimento utilizando paper-spray ionization mass spectrometry.....129
4.5. Estimativa da energia de superfície utilizando método de bracketing 129
5. **RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....131
5.1. Silanização do papel.....131
5.2. Análise via PS-MS e caracterização estrutural dos analitos alvo.....132
5.2.1. *Trembolona utilizando PS-MS no modo íon positivo*.....132
5.2.2. *Clembuterol utilizando PS-MS no modo íon positivo*.....133
5.2.3. *Furosemida utilizando PS-MS no modo íon negativo*.....135
5.2.4. *Hidroclorotiazida utilizando PS-MS no modo íon negativo*.....137
5.3. Otimização das variáveis.....139
5.3.1. *Voltagem do tube lens e temperatura do capilar*.....139
5.3.2. *Solvente do spray*.....146
5.3.3. *Voltagem da fonte*.....149
5.3.4. *Tratamento do papel hidrofóbico*.....149
5.4. Análise direta de substâncias dopantes em amostras de urina.....154
5.5. Estabilidade utilizando plataformas de papel.....157
5.6. Comparação de metodologias.....160
6. **CONCLUSÕES**.....164
7. **PERSPECTIVAS FUTURAS**.....165
REFERÊNCIA.....166

PREFÁCIO

Esta tese foi dividida em dois capítulos. O capítulo 1 aborda a síntese de *carbon dot*s para a análise de compostos de interesse clínico utilizando dispositivos analíticos microfluídicos em papel e detecção fluorimétrica por imagem digital. O capítulo 2 abrange a modificação de plataformas de papel para a detecção direta de substâncias dopantes através da ionização por *paper-spray* e detecção por espectrometria de massas.

Capítulo 1

DESENVOLVIMENTO DE DISPOSITIVO ANALÍTICO MICROFLUÍDICO EM PAPEL PARA ANÁLISES DE INTERESSE CLÍNICO COM DETECÇÃO POR FLUORESCÊNCIA

1. INTRODUÇÃO

1.1. Nanotecnologia e nanomaterial

O conceito de nanotecnologia foi utilizado pela primeira vez em 1959 pelo físico americano Dr. Richard Feynman na palestra "*There's Plenty of Room at the Bottom*", proferida na conferência da *American Physical Society at the California Institute of Technology* em Pasadena, California (FEYNMAN, 1992), embora o termo nanotecnologia só tenha sido empregado pela primeira vez apenas em 1974 pelo Dr. Norio Taniguchi (CORBETT et al., 2000).

Atualmente sua definição mais utilizada é: ciência multidisciplinar que engloba atividades científicas e tecnológicas na escala nanométrica, ou seja, inclui materiais de comprimento entre 1 e 100 nm em pelo menos uma dimensão (NAGARAJAN, 2008). A Figura 1.1 ilustra a comparação entre diferentes estruturas a fim de facilitar a comparação entre suas dimensões.

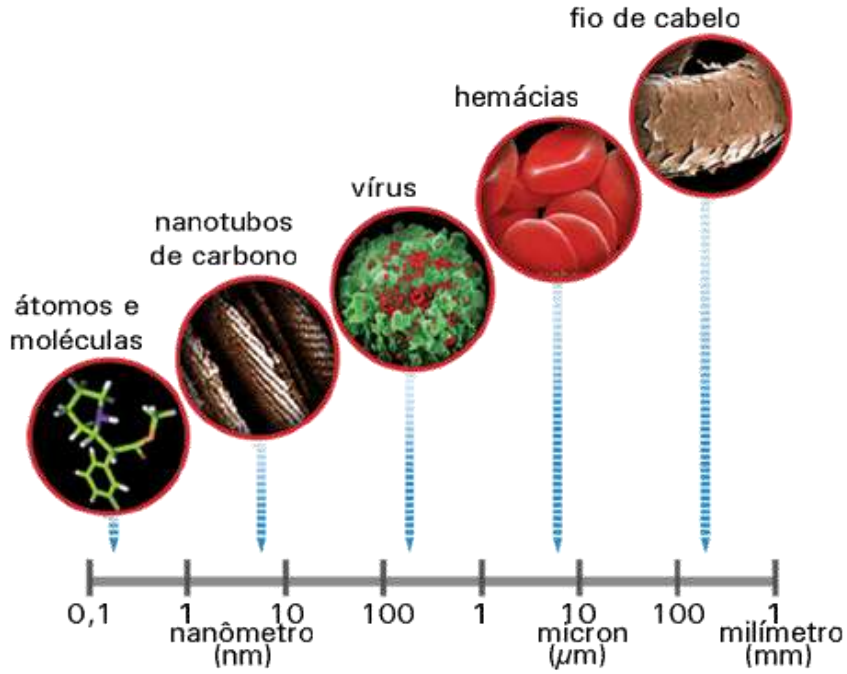

Figura 1.1 – Comparação das dimensões de diferentes estruturas.
Fonte: Disponível em https://nanomateriais.wordpress.com/nanomateriais/.

A Comissão Europeia define nanomaterial como material natural, acidental ou fabricado que contém partículas, em um estado não ligado, como um agregado ou como um aglomerado e em que, para 50% ou mais das partículas na distribuição de tamanho, uma ou mais dimensões externas está na faixa de tamanhos de 1 nm –

100 nm (EUROPEAN COMMISSION, 2011). Kreyling e coautores propuseram uma nova definição para nanomateriais: um material particulado é um nanomaterial se tiver uma área de superfície específica do volume (VSSA) igual ou superior a 60 m^2 cm^{-3} de volume do material (KREYLING; SEMMLER-BEHNKE; CHAUDHRY, 2010).

Há divergências no significado do que é um nanomaterial pois a definição não é direta, não há um embasamento científico sólido em uma dimensão de corte para a classificação de um material como nano ou não (KREYLING; SEMMLER-BEHNKE; CHAUDHRY, 2010; “Nanomaterials definition matters”, 2019). Essa dificuldade ocorre pois um nanomaterial é muito mais do que somente diminuir o tamanho de um material, para cada composto suas propriedades que distinguem uma amostra em nanoescala de seu correspondente não-nanométricos ocorrem em tamanhos diferentes; a transição raramente é abrupta e as propriedades evoluem do *bulk* para nanoescala de maneira contínua (“Nanomaterials definition matters”, 2019).

Devido ao seu tamanho reduzido, os nanomateriais apresentam características físico-químicas próprias, com propriedades eletrônicas, óticas, químicas e mecânicas diferentes dos materiais em *bulk* (LOPEZ-SERRANO et al., 2014). Com isso, abre-se a possibilidade de criar novos materiais, com novas propriedades e possibilidade de aplicação que podem ser sintetizados por meio do controle do tamanho e da forma das partículas desses materiais (ZARBIN, 2007).

As novas propriedades físico-químicas dos materiais nanométricos estão associadas aos efeitos de superfície e efeitos quânticos. Com a diminuição do tamanho de um material a fração de átomos que ficam na superfície do material aumenta, ou seja, a razão área superficial/volume aumenta. Esses átomos da superfície apresentam menos vizinhos do que átomos do *bulk*, por isso seus números de coordenação e ligações são menores, levando a uma menor estabilidade e diferentes propriedades quando comparados aos componentes do *bulk*. Em nanomateriais, como é o caso das nanopartículas, o número de átomos presentes na superfície é comparável com o número de átomos no *bulk*, tornando as propriedades da superfícies dominantes e alterando as propriedades do material (HENRY, 2007; RODUNER, 2006; ZARBIN, 2007)

As bases do confinamento quântico podem ser explicadas pelo modelo quântico da partícula na caixa. Esse efeito é observado quando o tamanho da partícula é pequeno o suficiente e comparável com o comprimento de onda de De Boglie.

Assim, os elétrons ou éxcitons (par elétron-buraco) são tratados quanticamente como partículas na caixa, onde o tamanho da caixa é dado pelas dimensões da partícula. Como consequência, para os nanomateriais seus níveis de energia vão ser estruturados em níveis discretos de energia, com o *band gap* crescendo de maneira proporcional ao decréscimo do tamanho da partícula, como ilustra a Figura 1.2. Os níveis eletrônicos de energia de um átomo são discretos e bem definidos, ao contrário dos níveis eletrônicos de um sólido cristalino que são bandas difusas de energia. Com a diminuição das dimensões dos sólidos, por exemplo, em um semicondutor, há um aumento entre os níveis de energia, sendo que para nanocristais, a densidade dos níveis eletrônicos de energia varia entre os estados atômico e de *bulk* (ALIVISATOS, 1997; RODUNER, 2006).

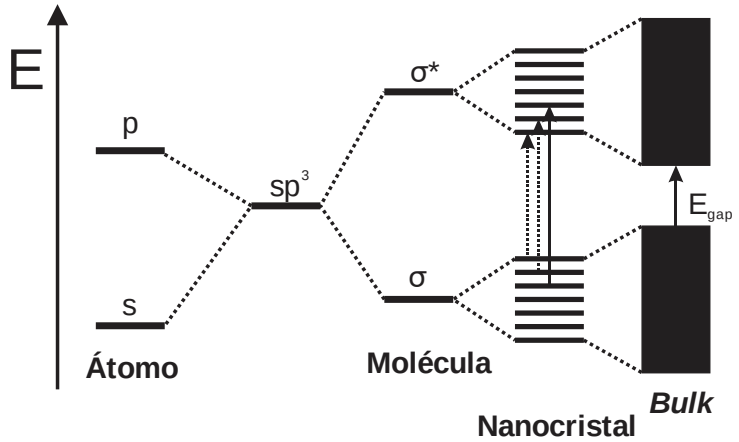

Figura 1.2 – Níveis de energia de um átomo até o *bulk* de um mesmo material.
Fonte: Adaptado de Alivisatos (ALIVISATOS, 1997).

Nesses pouco mais de meio século de estudo, a nanotecnologia tem crescido rapidamente, apresentando diversos avanços em diferentes áreas da ciência e da tecnologia. É um dos setores da tecnologia com maior crescimento e com elevado impacto econômico, visto que já está sendo utilizada em artigos esportivos, pneus, roupas resistentes a manchas, cosméticos, protetores solares (NEL et al., 2006), tintas, eletrônicos e revestimentos (LOPEZ-SERRANO et al., 2014). Outros produtos também estão em desenvolvimento para utilização em catálise (BELACHEW; MESHESHA; BASAVAIAH, 2019), sensores (TOKUYAMA; KITAMURA; SEIDA, 2020), células de combustível (KIRUBAHARAN et al., 2019), medicina (NGUYEN et al., 2019), *drug delivery* (IMPERIALE et al., 2019), e em análises clínicas (CAO et al., 2019) de alimentos (DONG, B. et al., 2019) e ambientais (MING et al., 2019).

1.1.1. Nanopartículas e pontos quânticos

As nanopartículas (NPs) são um importante componente da nanotecnologia e dos nanomateriais podendo ser classificadas em materiais à base de carbono (fulereno, nanotubo de carbono e grafeno), compostos inorgânicos (óxidos de zinco, ferro, cério, titânio, entre outros), metais (ouro, prata e ferro) e pontos quânticos inorgânicos (seleneto de cádmio e telureto de cádmio) e de carbono (CAYUELA et al., 2016; JU-NAM; LEAD, 2008).

Os pontos quânticos, QD, do inglês *quantum dots,* também conhecidos como semicondutores nanocristalinos, são aglomerados cristalinos monodispersos capazes de emitir radiação na região do visível quando excitados com radiação eletromagnética de maior energia que a emitida, e apresentam dimensões físicas menores do que o raio de Bohr do *bulk*-éxciton, ou seja, a distância de um par elétron-buraco (FRIGERIO et al., 2012). O termo *quantum dot* foi utilizado pela primeira vez em 1988 por Mark Reed e coautores para se referir à NP de semicondutores. Sua luminescência é causada pela excitação de um elétron com auxílio da radiação eletromagnética, formando um par elétron-buraco, ou éxciton, que é fortemente confinado devido ao diminuto tamanho do QD (MACHADO et al., 2015). As aplicações de QD vão desde células solares (XING et al., 2020) a aplicações em medicina (YU, G. et al., 2019) e análises ambientais (ZHANG et al., 2019).

Métodos luminescentes são utilizados para determinações quantitativas de espécies orgânicas e inorgânicas e são interessantes devido à sua detectabilidade, que frequentemente apresentam limites de detecção até três ordens de grandeza menores que obtidos por espectroscopia de absorção molecular. Ao mesmo tempo, medidas de luminescência são seletivas e apresentam grande faixa linear de concentração Por exemplo, detectores que utilizam a espectroscopia de absorção molecular podem apresentar limites de detecção de 10 pg e faixas lineares entre 3 e 4 décadas, enquanto que detectores por luminescência podem apresentar limites de detecção de 10 fg e faixas lineares de até 5 décadas (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Dessa forma, plataformas fluorescentes vêm ganhando importância devido a sua fácil utilização, alta seletividade e alta detectabilidade (LI, P. et al., 2014).

Os *quantum dots* mais comuns são sintetizados com compostos das famílias 12 e 16 (CdSe), 13 e 15 (InP) ou 14 e 16 (PbSe) (FRIGERIO et al., 2012). Porém, os

compostos com maior desempenho apresentam metais potencialmente tóxicos, como cádmio, em sua composição (DONG, Y. et al., 2012), o que limita suas aplicações principalmente para análises *in vivo* (FOWLEY et al., 2012), podendo conferir risco ao usuário, ao operador e ao meio ambiente, não estando de acordo com os princípios da Química Verde (ANASTAS, P. T.; WARNER, 1998). Dessa forma, a descoberta de nanopartículas fluorescentes derivadas de nanotubos de carbono por Xu e coautores em 2004 (Xu et al., (2004), apresentou uma nova classe de QDs, conhecida como pontos quânticos de carbono, ou do inglês *carbon dots* (CD) (MACHADO et al., 2015). Os CDs apresentam características semelhantes aos QDs inorgânicos tradicionais, tais como luminescência dependente do tamanho, resistência a fotodegradação e facilidade de bioconjugação, com a vantagem de não apresentarem toxicidade intrínseca de seus constituintes e não necessitarem de etapas de síntese laboriosas, tediosas, caras ou ineficientes (BAKER; BAKER, 2010). Também, devido aos grupos polares na superfície, como carboxila e hidroxila, por exemplo, possuem boa solubilidade em solventes polares (MIRTCHEV et al., 2012), o que torna os CDs aplicáveis em bioanálises. Essas vantagens dos CDs frente aos QDs fizeram com que um aumento no interesse nessa tecnologia ocorresse nos últimos anos. Um levantamento bibliográfico foi realizado dos dados sobre o uso de CDs em inúmeras aplicações para a produção de trabalhos científicos em revistas de maior circulação. A Figura 1.3 apresenta o número de trabalhos publicados com CDs em função do ano, considerando o período de 2004 a 2019.

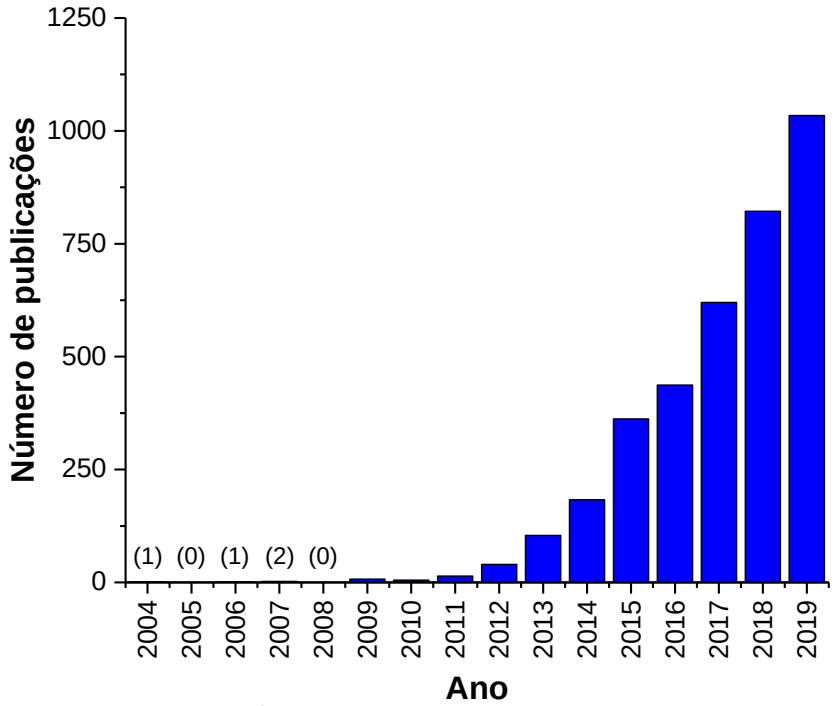

Figura 1.3 – Levantamento do número de publicações de trabalhos relativos à *carbon dot* em função do ano, no período de 2004 a 2019, feito utilizando a plataforma *Scifinder*® utilizando a palavra *carbon dot.*
Fonte: Elaborada pelo autor.

1.1.2. Métodos para síntese de nanopartículas

Existem diversos métodos para a síntese de nanopartículas, porém essas rotas sintéticas podem ser agrupadas em duas grandes abordagens: *top-down* e *bottom-up* (Figura 1.4). O método *top-down* baseia-se na produção de NPs a partir de compostos maiores em *bulk* por meio de métodos físicos ou químicos, tais como fotolitografia (GAO, 2004; JU-NAM; LEAD, 2008), descarga de arco voltaico, tratamento por plasma, ablação a laser, síntese hidrotérmica, oxidação química e síntese eletroquímica (LIU, M. L.; CHEN; LI, 2019; WU; LIU; HUAN, 2017) . Os materiais de partida mais comuns para a síntese de CD via métodos *top-down* são carbono em pó, nanotubos ou fibras de carbono, grafeno e colunas de carbono, ou seja, compostos maiores de carbono (WU; LIU; HUAN, 2017).

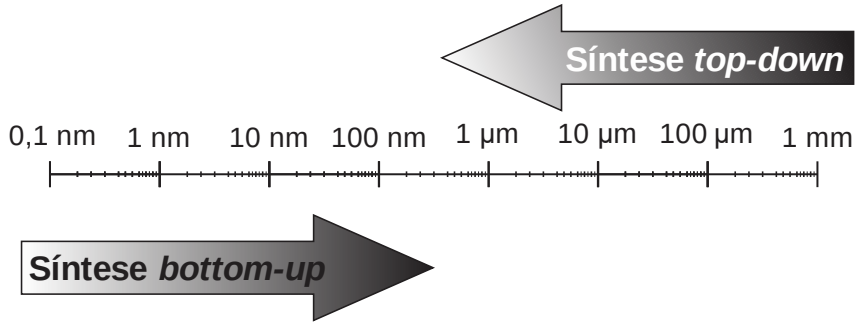

Figura 1.4 – Estratégias *top-down* e *bottom-up* para síntese de nanopartículas.
Fonte: Adaptada de Ju-Nam (JU-NAM; LEAD, 2008).

Para a síntese *bottom-up* compostos moleculares são utilizados como materiais de partida. Nesse caso, os precursores agem como “sementes” para que a formação dos CDs sob condições específicas, através da nucleação e crescimento (JU-NAM; LEAD, 2008; LIU, M. L.; CHEN; LI, 2019; WU; LIU; HUAN, 2017). Para que esses precursores moleculares formem os CDs é necessário fornecer energia para o sistema por meio de combustão, aquecimento hidrotérmico, pirólise térmica ou micro-ondas (WU; LIU; HUAN, 2017). A síntese de CDs utilizando os métodos *bottom-up* pode utilizar as mais diversas fontes de carbono, tais como substância orgânicas na sua forma pura, como ácido cítrico, sacarose, glicose, frutose e glicerina (COSTAS-MORA et al., 2015), e outras como folhas de bambu (LIU, Y.; ZHAO; ZHANG, 2014) e alho (CHEN, Y. et al., 2016). Além dos diferentes precursores, frequentemente são utilizados dopantes, tais como compostos que contenham nitrogênio e enxofre em sua composição, modificando as propriedades dos CDs, tornando as características mais interessantes e aumentando a emissão de radiação das nanopartículas (RECKMEIER et al., 2016).

A rota sintética *top-down* envolve um processo não seletivo que não permite controle preciso sobre o tamanho e a distribuição morfológica das nanopartículas. Porém, oferece uma oportunidade para a exploração da fotoluminescência dos CDs devido à diversificação de tamanho e estado da superfície (WU; LIU; HUAN, 2017) e formam CDs com excelentes propriedades fotofísicas (CHOI et al., 2018). Contudo, essas rotas envolvem maior gasto de energia, geram mais resíduos do que o método *bottom-up*, podem utilizar materiais de partida caros e frequentemente necessitam de uma etapa de passivação da superfície da NP para aumentar sua luminescência (CAYUELA et al., 2016). As técnicas de *bottom-up* são de mais simples implementação e utilização, pois empregam condições mais brandas de síntese

(CHOI et al., 2018), apresentam altos rendimentos e custos menores, evitam rotas complicadas e longas, formam diretamente CDs luminescentes devido a presença de grupos superficiais de emissão ativos (CAYUELA et al., 2016), são métodos de síntese ambientalmente mais amigáveis (LIU, M. L.; CHEN; LI, 2019) e uma larga gama de precursores estão disponíveis para serem utilizados (CHOI et al., 2018).

O desenvolvimento dos nanomateriais trouxe inúmeros benefícios para a área da ciência e da engenharia. Com a descoberta de novas tecnologias foi possível criar novos produtos e aprimorar ou criar novos procedimentos (LIU, M. L.; CHEN; LI, 2019). As rotas tradicionais de síntese de NPs, tais como os CDs, geralmente necessitam de rotas laboriosas com diversas etapas, consumindo grandes quantidades de energia, empregando altas temperaturas, consumindo muito tempo e utilizando reagentes químicos e solventes tóxicos, os quais além de aumentar o custo da produção, produzem grandes quantidades de resíduos que podem ser perigosos para o ambiente e ao operador (ANASTAS, P. T.; WARNER, 1998; ANASTAS, Paul T.; KIRCHHOFF, 2002; LIU, M. L.; CHEN; LI, 2019; SANGAM et al., 2018). Atualmente, rotas ambientalmente mais amigáveis que utilizam precursores seguros e renováveis estão ganhando a atenção dos pesquisadores (SANGAM et al., 2018). Com isso as rotas sintéticas *bottom-up* ganharam maior importância, pois podem utilizar precursores mais baratos e renováveis. Além disso, empregam condições reacionais mais brandas e ambientalmente mais amigáveis quando comparadas com as rotas *top-down* (CAYUELA et al., 2016; CHOI et al., 2018; LIU, M. L.; CHEN; LI, 2019), tais como reações auto-exotérmica (CHEN, B. Bin et al., 2017), catálise básica (LIU, M. L. et al., 2017), métodos redutores (LINEHAN; DOYLE, 2014) e aquecimento por micro-ondas (WANG, Hai-jiao et al., 2019).

Métodos de síntese *bottom-up* utilizando aquecimento por micro-ondas apresentam simultaneamente aquecimento eficiente e homogêneo, menor número de etapas, permitem altas taxas de reação e reduzem drasticamente o tempo de síntese para apenas alguns minutos, o que reduz reações secundárias e formação de subprodutos (DE MEDEIROS et al., 2019). Dessa maneira, é considerado a abordagem mais simples e rápida dentre todas as utilizadas para a síntese de CD e, portanto, tem sido amplamente empregadas para a preparação de CDs (LIU, M. L.; CHEN; LI, 2019).

1.2. Caracterização das nanopartículas

A seguir são descritas as técnicas utilizadas para a caracterização das nanopartículas de carbono sintetizadas no presente trabalho.

1.2.1. Espectroscopia de absorção no UV-Vis

A espectroscopia de absorção é uma técnica utilizada na química analítica para identificar ou quantificar substâncias por meio da interação da radiação eletromagnética na região do UV-Visível com a matéria. Ao incidir uma radiação UV-Vis em uma solução de determinada molécula, por exemplo, essa radiação fornece energia suficiente para que os elétrons mais externos dessa molécula sejam excitados de um nível eletrônico de mais baixa energia para níveis eletrônicos excitados de maior energia, essas transições ocorrem em comprimentos de onda da radiação com energia igual a diferença entre os níveis eletrônicos; além de transições eletrônicas, os elétrons podem apresentar transições vibracionais e rotacionais que formam o espectro de absorção (SKOOG; HOLLER; WEST, 2006).

Quando uma radiação na região do UV-Vis incide em uma determinada molécula que é capaz de absorver algumas frequências, há um decréscimo na intensidade da radiação incidente que pode ser descrito pela razão das potências da radiação transmitida e incidente, ou a transmitância da luz. Assim, a absorbância de determinada substância é relacionada com a concentração e as propriedades dessa substância por meio da Lei de Lambert-Beer (SKOOG; HOLLER; WEST, 2006), na qual A é a absorbância, ε a absortividade molar da substância, b o caminho ótico e C a concentração da solução:

$$A = \varepsilon b C \qquad \text{Equação 1.1}$$

Um espectrofotômetro básico para medidas no UV-Vis é constituído de uma fonte para fornecer a radiação incidente, monocromadores para selecionar comprimentos de onda de interesse, o compartimento de amostra e o detector para medir a radiação transmitida. A geometria utilizada em espectrofotômetros é linear, ou seja, entre a fonte, amostra e detector forma-se um ângulo de 180° (CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG, 2014b).

1.2.2. Espectroscopia de fluorescência

Luminescência é o fenômeno ótico que ocorre quando determinada substância (sólida, líquida ou gasosa) é excitada eletronicamente e no seu retorno para o estado fundamental libera energia na forma de fótons, emitindo radiação em determinado comprimento de onda (SKOOG; HOLLER; WEST, 2006). Quando essa excitação do elétron ocorre devido à absorção de energia proveniente de uma radiação eletromagnética, esse fenômeno é conhecido como fotoluminescência. Fotoluminescência é tradicionalmente dividida em duas categorias: a fluorescência e a fosforescência, diferindo na natureza do estados eletrônicos excitado (LAKOWICZ, 2006).

Para melhor compreender a fotoluminescência é preciso entender dois fenômenos físicos distintos: a absorção de energia pela matéria e a consequente relaxação. A molécula absorve energia através da radiação eletromagnética e é transformada de um estado fundamental (S_0) para um estado excitado (Sn ou Tn). Essa energia absorvida é quantizada e corresponde à diferença de energia entre esses dois estados, ou seja, a promoção do elétron não ocorre se a energia da radiação eletromagnética excitante for menor que a energia entre as diferenças dos estados eletrônicos fundamental e excitado. Também, podem ocorrer transições vibracionais dentro dos estados eletrônicos como resultado da absorção de energia (SZABO, 2000). No estado fundamental os elétrons se encontram emparelhados (estado fundamental singleto, S_0, Figura 1.5a), de acordo com o princípio da exclusão de Pauli, que diz que dois elétrons não podem apresentar os mesmos quatro números quânticos, ou seja, somente dois elétrons podem ocupar um orbital e devem ter spins contrários. Se no estado excitado o spin do elétron promovido ainda estiver pareado com o estado fundamental, mantendo sua orientação inicial, tem-se o estado excitado singleto, Sn (Figura 1.5b). Caso contrário, se a orientação do elétron que foi promovido ao estado excitado for invertida, tem-se o estado excitado tripleto, Tn (Figura 1.5c) (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

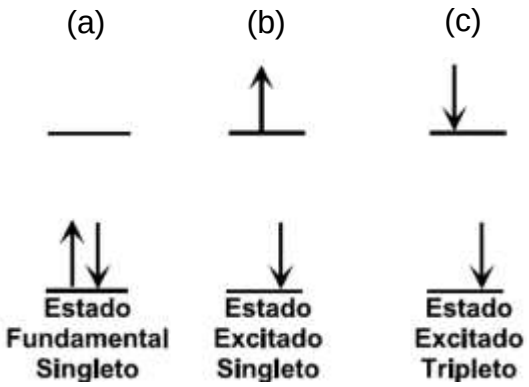

Figura 1.5 – Estados de spin dos elétrons das moléculas. Em (a) é representado o estado eletrônico fundamental singleto com os spins emparelhados. Em (b) e (c) são mostrados os estados eletrônicos excitados. Caso os spins estejam emparelhados no estado excitado, a molécula está no estado singleto (b). Se os spins estejam desemparelhados, a molécula está em um estado excitado tripleto (c).
Fonte: Adaptada de Skoog (SKOOG; HOLLER; WEST, 2006).

Uma molécula no estado excitado tende a relaxar para o estado fundamental que é configuração de menor energia e mais estável. A trajetória favorecida para o estado fundamental é aquela que minimiza o tempo de vida do estado excitado. Se o processo luminescente é mais rápido que os processos não radiativos, tal emissão será observada. Caso contrário, se a etapa não radiativa é mais rápida, a emissão será muito fraca ou não será observada. A Figura 1.6 representa o diagrama parcial de níveis para uma molécula hipotética e permite compreender quais são os processos relacionados à relaxação que ocorrem após a absorção de energia. A fluorescência ocorre quando a relaxação do sistema excitado singleto (S_1) relaxa de modo radioativo diretamente para o estado fundamental (S_0). A fosforescência acontece quando há o cruzamento de um sistema excitado singleto (S_1) para um sistema excitado tripleto (T_1) e a relaxação ocorre a partir desse sistema, esse cruzamento é conhecido como cruzamento intersistemas. O tempo de relaxação da fosforescência é maior que o tempo de relaxação da fluorescência, pois envolve uma mudança de spin para que haja o retorno ao estado fundamental.

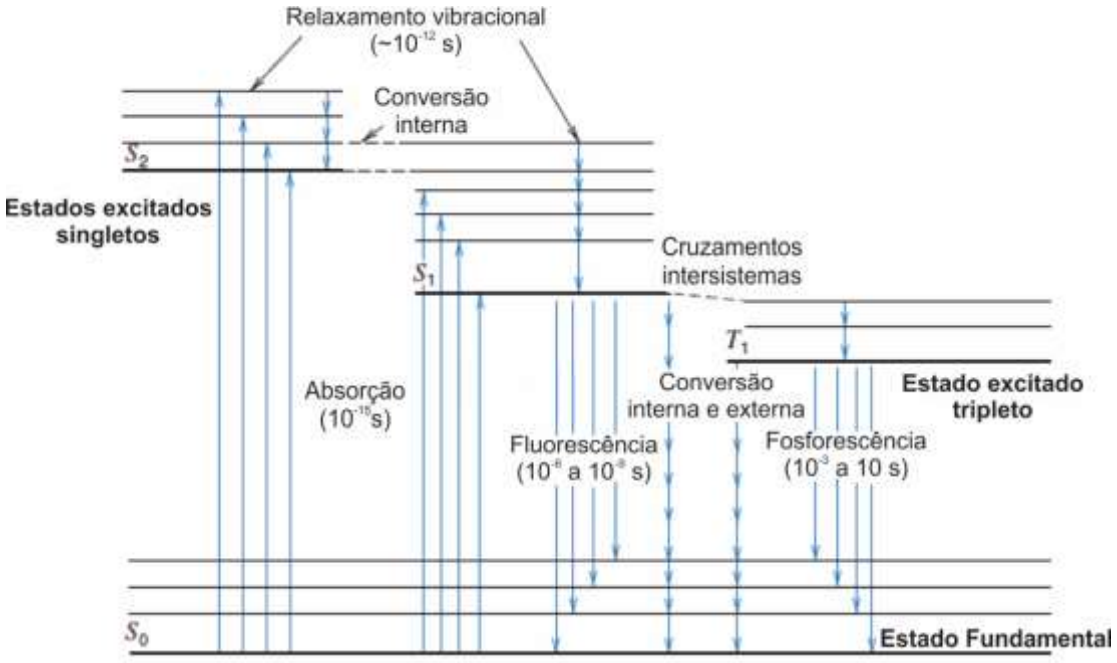

Figura 1.6 – Diagrama de níveis de energia, ou diagrama de Jablonski, de uma molécula hipotética.
Fonte: Adaptada de Christian (CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG, 2014a)

Ao ser excitado do nível fundamental, o elétron pode ocupar qualquer nível vibracional de diferentes estados eletrônicos excitados (S_1 e S_2, por exemplo), porém, de acordo com a lei de Kasha, a emissão de fluorescência mais intensa é esperada que ocorra a partir do estado eletrônico excitado mais baixo (S_1). Esse processo de relaxação até o nível de energia mais baixo, S_1, ocorre por meio de relaxação vibracional e conversão interna (Figura 1.6). Devido aos processos de relaxamento não-radioativos, como o relaxamento vibracional, conversão interna e cruzamento intersistemas, a energia emitida no processo de relaxamento radioativo, seja ele fluorescência ou fosforescência, é sempre menor que a energia absorvida no processo de excitação dos elétrons. Isso implica que a radiação eletromagnética emitida apresenta sempre comprimento de onda maior, ou menor energia, do que a radiação de excitação (MONDAL; DIASPRO, 2014).

Ao contrário do que ocorre com a espectroscopia de absorção, na espectroscopia de fluorescência as medidas são realizadas com um ângulo de 90° entre a fonte, o porta-amostra e o detector. Isso é necessário para que a radiação de excitação da fonte não interfira na detecção da radiação emitida. Isso é possível pois na fluorescência a radiação é emitida em todas as direções (CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG, 2014a).

1.2.3. Espectroscopia de absorção no infravermelho

Ao contrário da espectroscopia de absorção no UV-Vis e de fluorescência, na espectroscopia de absorção no infravermelho (IR) a energia envolvida não é suficientemente energética para promover a transição eletrônica, contudo, apresenta energia suficiente para promover transições vibracionais e rotacionais das ligações dos átomos de uma determinada molécula (SKOOG; HOLLER; WEST, 2006). Para a química, a região de interesse vai de 2,5 a 25 μm, ou 4000 a 400 cm^{-1}, que representa a região vibracional do infravermelho (PAVIA et al., 2010b).

Ao absorver a energia da radiação no infravermelho, a molécula é excitada para um estado vibracional de maior energia, aumentando a amplitude dos movimentos das ligações na molécula. No entanto apenas as ligações com momento de dipolo que altera em função do tempo são capazes de absorver radiação no infravermelho, dessa maneira, ligações simétricas não absorvem radiação na região do infravermelho (PAVIA et al., 2010b).

Como o processo de absorção é quantizado, as moléculas absorvem apenas as energias com frequências específicas equivalentes às frequências vibracionais naturais da molécula. Como essas energias são específicas para cada tipo de ligação, a espectroscopia no infravermelho é utilizada para obter informações estruturais das ligações presentes em uma determinada molécula (PAVIA et al., 2010b).

1.2.4. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Na espectroscopia de absorção no infravermelho são obtidas informações quanto os tipos de grupos funcionais que estão presentes em determinada molécula, já a NMR fornece informações acerca do número de átomos magneticamente distintos do isótopo estudado (PAVIA et al., 2010a).

A técnica de NMR utiliza as propriedades magnéticas dos núcleos dos átomos. Os núcleos atômicos apresentam uma propriedade chamada de *spin* e se possuírem número atômico ou massa atômica ímpar, o momento angular de *spin* e o momento magnético desses núcleos é diferente de zero, se alinhando na presença de um campo magnético externo (B_0). O fenômeno de ressonância magnética nuclear ocorre quando os núcleos alinhados por B_0 são induzidos a absorver energia e mudar a

orientação do spin em relação ao campo magnético aplicado. A energia absorvida é quantizada e corresponde à diferença de energia entre os dois estados de spin envolvidos. Núcleos ativos (^{1}H, ^{31}P, ^{15}N e ^{13}C) absorvem radiação eletromagnética em uma frequência característica de cada isótopo. A frequência de ressonância, a energia da absorção e a intensidade do sinal são proporcionais à força do campo magnético.

1.2.5. Microscopia eletrônica de transmissão

Microscópios eletrônicos são capazes de gerar imagens de materiais com resoluções e ampliações muito maiores do que microscópios óticos. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) é uma técnica muito útil para caracterização de materiais, revelando detalhes de morfologia, formato e dimensões. O arranjo ótico dos microscópios eletrônicos é similar ao dos microscópios óticos, porém, sua alta resolução é devido ao pequeno comprimento de onda dos elétrons utilizados como fonte de radiação, podendo alcançar resoluções de até 0,1 nm (LENG, 2013).

Para formar uma imagem por TEM, os elétrons emitidos pela fonte são focados por lentes formando um feixe de elétrons antes de atingirem a amostra. Dependendo da densidade da área a ser varrida, alguns elétrons podem ser espalhados, enquanto outros são transmitidos através da amostra. Apenas elétrons transmitidos ou minimamente espalhados chegam ao detector. Regiões escuras nas imagens são formadas pois menos elétrons chegam ao detector devido a espessura e densidade da amostra ou da área analisada. A imagem é então formada como uma função da voltagem de aceleração, espessura da amostra e do material estudado (REGE; MEDINTZ, 2009).

1.3. Microfluídica em papel

A utilização de papel na química não é nenhuma novidade. Além da filtração, o uso do papel na química iniciou-se com o papel de tornassol; datando do século XVIII, foi uma das primeiras formas de se utilizar o papel como uma plataforma para a realização de experimentos (DAVY, 1812). O primeiro teste popular empregando papel como plataforma originou-se na Inglaterra em 1883 para a análise de açúcar e albumina (VOSWINCKEL, 1994). A impregnação de papel com cera para a criação de

barreiras que impedissem reações cruzadas entre duas zonas foi proposto por Dieterich em 1902 (DIETERICH, 1902). Na década de 1920, o papel se difundiu como uma plataforma sólida utilizada por Fritz Feigl para a realização de reações de *spot-test* em determinações de substâncias orgânicas. Posteriormente, a primeira técnica de fabricação para a impregnação de parafina no papel com o propósito de criar zonas confinadas para reações de *spot-test* foi publicada em 1937 por Yagoda (YAGODA, 1937). Os indícios dos primeiros dispositivos microfluídicos em papel capazes de controlar o transporte de solução através de canais confinados apareceram em 1949 com o trabalho de Müller e co-autores em cromatografia de papel (MÜLLER; CLEGG, 1949). Ao mesmo tempo que ocorreram esses avanços, as tiras reagentes começaram a ser desenvolvidas na década de 1930, tornando-se comercialmente disponíveis em 1956 com o lançamento do Clinistix pela *Ames Company*, hoje *Bayer Diagnostics* (VOSWINCKEL, 1994). Apesar de todo o histórico do papel no campo da química, o surgimento e o crescimento do dispositivo analítico microfluídico em papel ocorreu em 2007 com o trabalho de Whitesides e colaboradores (MARTINEZ et al., 2007), como ilustra o levantamento bibliográfico realizado dos dados sobre o uso de µPAD em inúmeras aplicações para a produção de trabalhos científicos em revistas de maior circulação. A Figura 1.3 apresenta o número de trabalhos publicados com µPAD em função do ano, considerando o período de 2000 a 2019.

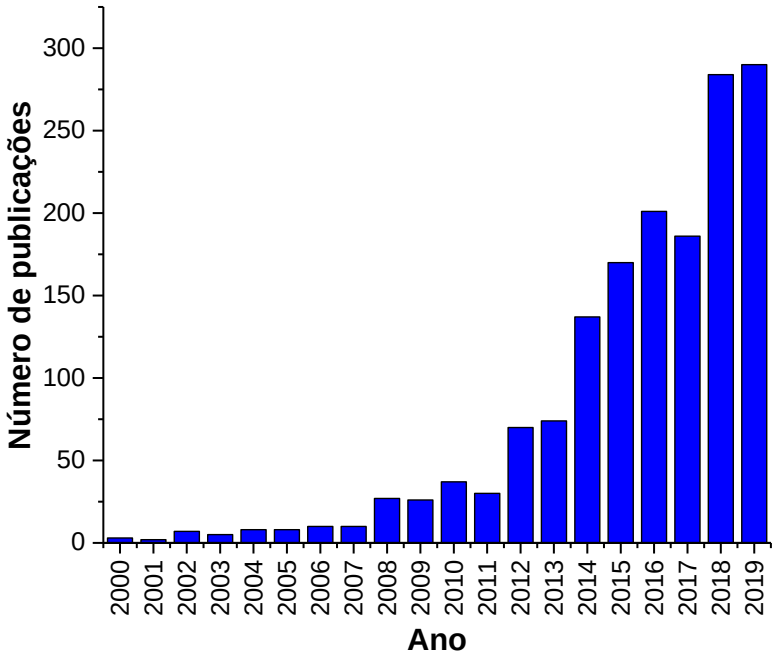

Figura 1.7 – Levantamento do número de publicações de trabalhos relativos à µPAD em função do ano, no período de 2000 a 2019, feito utilizando a plataforma *Scifinder*® utilizando a palavra *paper-based analytical device.*
Fonte: Elaborada pelo autor.

Microfluídica é a parte da ciência e da tecnologia de sistemas que manipula e processa volumes reduzidos de fluidos utilizando canais com dimensões entre 10 e 100 μm. A microfluídica se originou e teve sua primeira aplicação no desenvolvimento de métodos microanalíticos devido a características como: baixo custo, separações e detecções com alta resolução e sensibilidade, utilização de pequenas quantidades de amostra e reagentes, e curtos tempos de análise (WHITESIDES, 2006).

Quando um dispositivo microfluídico é confeccionado utilizando papel, conhecido como μPAD, combina-se a versatilidade da microfluídica com a simplicidade do papel (MARTINEZ et al., 2010). Resumidamente, o μPAD consiste na criação de barreiras hidrofóbicas que formam canais capazes de confinar os fluidos e controlar seu transporte para zonas desejadas. O μPAD apresenta baixo custo, compatibilidade com matrizes biológicas, baixo consumo de reagentes, é de fácil utilização, possibilita a integração de diferentes análises em um mesmo dispositivo e pode ser facilmente descartado por incineração, diminuindo o risco de contaminação biológico (YAMADA et al., 2017) (CATE et al., 2015). Além disso, o transporte de fluidos é controlado por capilaridade e evaporação e não necessita de uma fonte de energia externa (MARTINEZ et al., 2010).

Na literatura estão descritos diversos métodos para a fabricação de barreiras hidrofóbicas. Na Figura 1.8 estão descritos 12 modos para a confecção de μPAD, na qual os itens de A à C representam a fabricação manual por (A) desenho com cera, (B) desenho ou estampagem com polímero e (C) estampagem com cera; nos itens D à F utilizam-se máscaras para proteger a região hidrofílica e formar as barreiras hidrofóbicas, sendo utilizada (D) imersão em cera, (E) fotolitografia e (F) serigrafia com cera; nos itens G à J utilizam-se impressoras que adicionam tinta usando a impressão com (G) tinta sólida à base de cera, (H) gravação com jato de cera e (I) impressão com jato de tinta. Outro modo de fabricação é o corte ou modelagem, representado em L e K, na qual são formados canais com o auxílio de (L) cortadores manuais ou (K) cortador a laser (CATE et al., 2015).

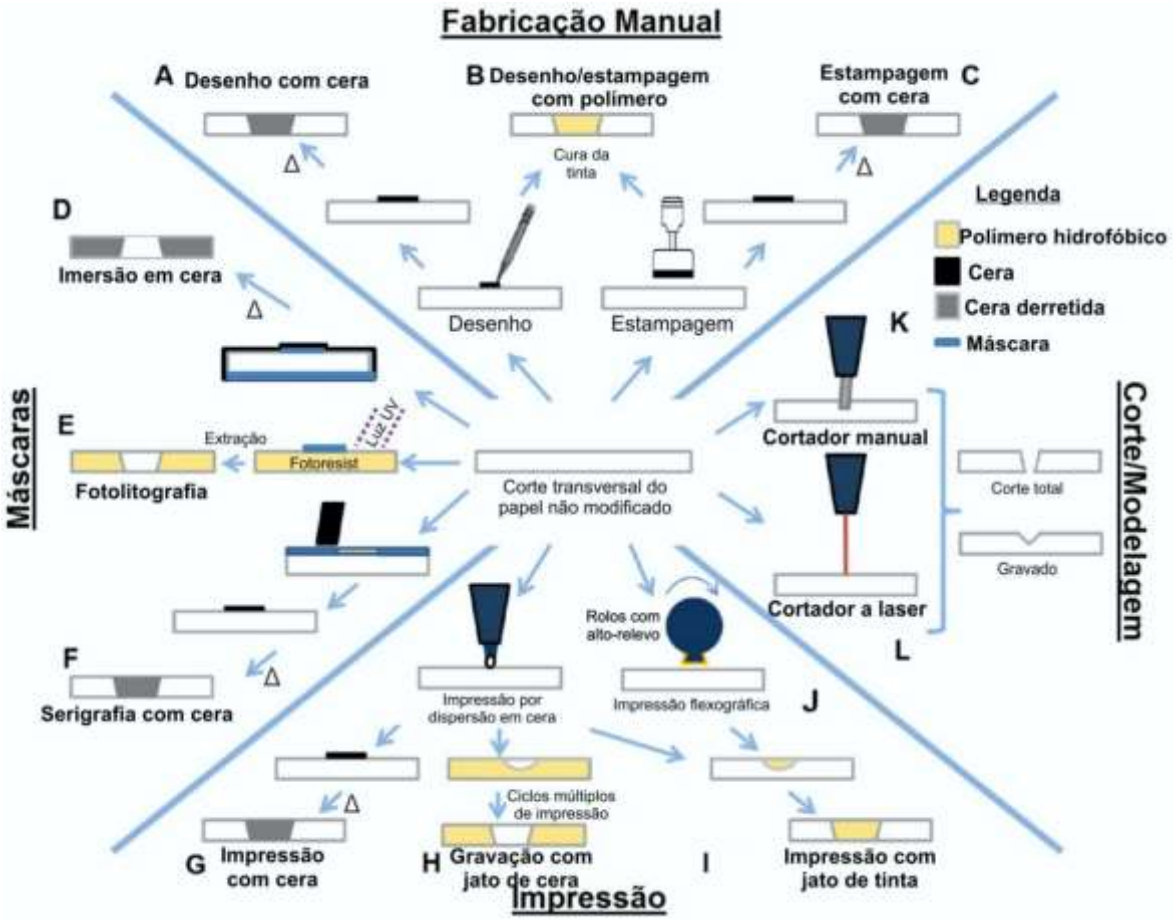

Figura 1.8 – Esquema dos diferentes modos para a confecção de barreiras hidrofóbicas.
Fonte: Adaptada de Cate (CATE et al., 2015).

A impressão com tinta sólida a base de cera (Figura 1.8 G) envolve duas etapas principais: primeiro o desenho desejado para o µPAD é impresso sobre a superfície do papel utilizando uma impressora com tinta à base de cera e, posteriormente, esse papel com cera depositada é aquecido para que haja o derretimento e permeação da cera pelas fibras do papel para formar as barreiras hidrofóbicas. Esse método apresenta uma série de vantagens em relação às outras metodologias de fabricação, tais como 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. Porém, também apresenta desvantagens como: o custo elevado da impressora e dos cartuchos de cera, a necessidade de uma etapa extra de aquecimento e perda de resolução das barreiras após o aquecimento (CARRILHO; MARTINEZ; WHITESIDES, 2009; CATE et al., 2015; LU et al., 2009).

A Figura 1.9 ilustra os componentes da impressora com tinta sólida a base de cera da marca Xerox® e o modo como uma folha é impressa.

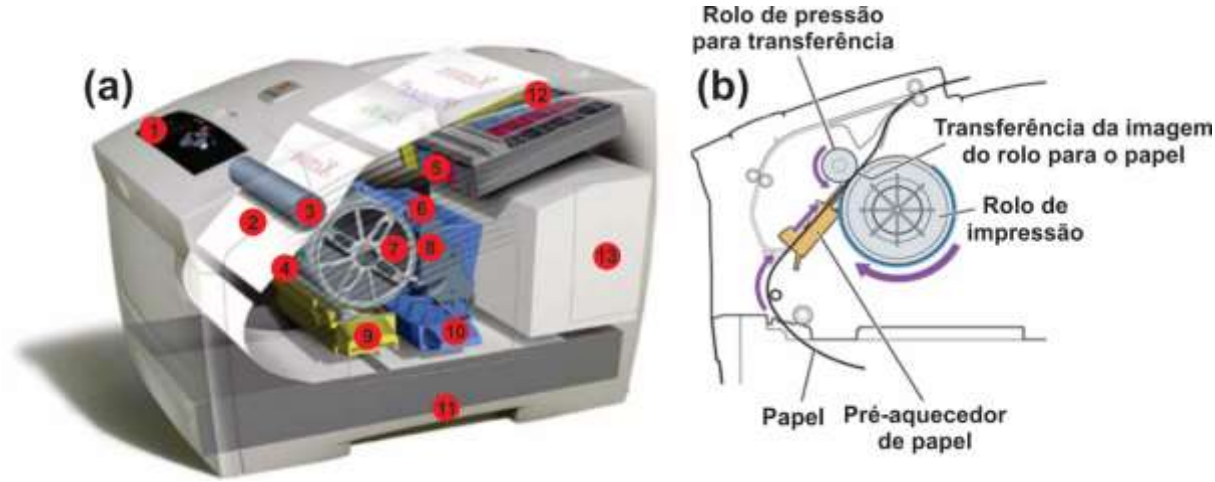

Figura 1.9 – (a) Detalhamento dos componentes de uma impressora com tinta à base de cera da marca Xerox®: 1) *Display* frontal, 2) Trajetória do papel, 3) Rolo de pressão para transferência, 4) Pré-aquecedor de papel, 5) Fusão da cera, 6) Reservatório de cera derretida, 7) Rolo de impressão, 8) Cabeça de impressão, 9) *Kit* de manutenção, 10) Reservatório de descarte, 11) Armazenamento de papel, 12) Armazenamento de cera sólida e 13) Conexões e saídas eletrônicas. (b) Esquema de como é feita a impressão utilizando a impressora com tinta à base de cera.
Fonte: Adaptada de Jaeger (JAEGER, 2000).

O processo de impressão de um desenho do computador usando cera pode ser resumido em três etapas: (i) O rolo do *kit* de manutenção limpa e aplica uma fina camada de silicone no rolo de impressão de alumínio anodizado, (ii) a cabeça de impressão aquecida (135°C) pulveriza gotas microscópicas de cera derretida no rolo de impressão rotativo com muita precisão. O rolo de impressão é mantido a uma temperatura intermediária (65°C) para manter a cera em um estado semissólido maleável. (iii) O papel a ser impresso é aquecido e passa sob pressão entre o rolo de pressão para transferência e o rolo de impressão. Sob calor e pressão, a imagem é transferida do rolo de impressão para o papel em uma única passagem. Quando o papel sai da impressora, a tinta está totalmente seca e a impressão está pronta para uso (JAEGER, 2000).

1.4. Detecção via imagem digital

Ser capaz de quantificar e/ou identificar o analito de interesse é uma das etapas mais importantes da análise (CATE et al., 2015). A imagem digital é amplamente utilizada para a detecção qualitativa, semi-quantitativa e quantitativa em µPAD devido a sua simplicidade e baixo custo (MORBIOLI; MAZZU-NASCIMENTO; STOCKTON; et al., 2017). Ainda, com o desenvolvimento de novas tecnologias foi possível obter

equipamentos óticos digitais cada vez melhores com menor custo e integradas à internet como os *smartphones*, possibilitando a rápida troca de informações e dados mesmo que o paciente esteja a centenas de quilômetros de distância do médico ou do dentro de diagnóstico, por exemplo (BYRNE et al., 2000; MARTINEZ et al., 2008)

A primeira descrição na literatura da utilização de imagem digital para detecção de analito foi realizada por Momeni em 1999 (MOMENI et al., 1999), na qual foi desenvolvido um sistema para detecção quimiluminescente da proteína ligada ao retinol. Porém, uma descrição mais aprofundada da utilização da imagem digital como detecção foi feita por Byrne em 2000 ((BYRNE et al., 2000).

A detecção por imagem digital é baseada no tratamento gráfico usando softwares como Photoshop®, ImageJ® ou Gimp®. Esses programas transformam a informação física das cores do papel em linguagem binária que é interpretada pelo software e, como resultado, fornecem intensidades das cores que é relacionada com concentração da substância de interesse para determinações analíticas (MARTINEZ et al., 2008; PACIORNIK et al., 2006).

1.4.1. Métodos de calibração

Em determinações quantitativas em plataformas de papel, seja ela utilizando técnicas colorimétricas, eletroquímicas ou fluorescentes, a calibração com padrão externo é o método de calibração mais utilizado. Uma curva analítica é construída a partir da concentração da substância de interesse em função do sinal analítico utilizando padrões externos, e a concentração de uma amostra desconhecida é obtida pela equação de curva de regressão. Em análises de rotina, o uso das curvas analíticas obtidas com calibração externa é altamente empregado devido à facilidade e rapidez de se realizar as análises (CUADROS-RODRÍGUEZ et al., 2007).

Calibração externa é conveniente e fornece resultados altamente confiáveis quando aplicados em amostras sem efeito matriz significativo (CUADROS-RODRÍGUEZ et al., 2007). Entretanto, quando há o efeito de matriz na análise, o sinal analítico pode ser afetado, introduzindo erros na análise e levando a resultados não confiáveis (KAPPI et al., 2017). Ainda, a calibração externa é sensível a erros de preparo de amostra (RIBANI et al., 2004). O uso de curvas de adição padrão em vez de curvas de calibração externas minimiza os efeitos da matriz. Neste tipo de

calibração, vários pontos de teste são feitos adicionando-se quantidades crescentes de padrão às alíquotas da amostra (CUADROS-RODRÍGUEZ et al., 2007); esse procedimento traz algumas vantagens para a análise e evita a necessidade de curva de calibração externa que deve ser testada para cada tipo de matriz a ser analisada. Uma análise completa de uma amostra pode ser realizada na mesma plataforma de papel, o que minimiza a variação das condições de luminosidade e posição do dispositivo quando a imagem é obtida para a detecção por imagem digital (CHAPLAN; MITCHELL; MARTINEZ, 2014; KAPPI et al., 2017). O método da adição de padrão é especialmente importante para amostras muito complexas e com efeitos de matriz significativos, porém, é mais trabalhoso e demorado, pois uma curva de adição de padrão deve ser construída para cada amostra analisada (JARDIM, 2004).

1.5. Análise de compostos de interesse clínico

A análise clínica é uma importante ferramenta da medicina que auxilia profissionais da saúde no diagnóstico e prevenção de patologias e condições fisiológicas do organismo através de análises de materiais biológicos, tais como urina, sangue, plasma, saliva, fezes e outros fluídos corporais (ANÁLISES CLÍNICAS, 2016). Dessa forma, o primeiro passo para a correta prevenção e tratamento de doenças é o diagnóstico correto e preciso (MARTINEZ et al., 2010). Devido a importância dos exames clínicos, a Organização Mundial da Saúde (WHO) listou sete diretrizes para o teste analítico ideal (ASSURED): acessível (*Affordable*), sensível (*Sensitive*), específico (*Specific*), de fácil utilização (simples de realizar com um mínimo de treinamento e em poucos passos) (*User-friendly*), robusto e rápido (resultado disponível em menos de 30 minutos) (*Robust and rapid*), sem utilização de equipamentos (*Equipment-free*) e disponível para aqueles que necessitam (*Deliverable to those who need them*) (PEELING et al., 2006).

Através da dosagem de diferentes substâncias presentes em fluidos biológicos é possível obter informações cruciais sobre as condições de saúde de um paciente para, posteriormente, tomar uma decisão no tratamento de diversas doenças e condições fisiológicas (LIN et al., 2011). Dentre as substâncias de interesse biológico destacam-se a glicose e o lactato como importantes marcadores para diversos tipos de doenças e condições dos organismos.

1.5.1. Glicose

Dentre todos os analitos de interesse em matrizes biológicas, glicose é uma das substâncias que há mais tempo são desenvolvidas metodologias de análise (VOSWINCKEL, 1994). A medição da concentração de glicose é um dos procedimentos realizados com maior frequência em hospitais e laboratórios de análises clínicas, pois é um carboidrato crucial para o desenvolvimento da vida. Seu metabolismo, armazenamento e concentração no corpo é regulado por uma interação complexa de múltiplas vias modulada por vários hormônios (BURTIS, 2001). Para adultos saudáveis em jejum, os níveis normais de glicose variam entre 74 – 100 mg dL^{-1} em soro sanguíneo, entre 1 – 15 mg dL^{-1} em urina e entre 21 – 38 x 10^{-6} mol L^{-1} em saliva (BURTIS, 2001; SENER et al., 2009).

Diabetes mellitus e hipoglicemia são condições clinicas associadas ao metabolismo anormal da glicose. Diabetes mellitus é um conjunto de desordens no metabolismo do carboidrato no qual a glicose é subutilizada, elevando sua concentração no sangue (hiperglicemia). Indivíduos com essa condição podem desenvolver complicações, tais como retinopatia, falha renal, neuropatia e aterosclerose e em situações extremas podendo resultar em AVC, gangrena, cetoacidose, coma hiperosmolar hiperglicêmico e doença da artéria coronária (BURTIS, 2001). Também, a dosagem de glicose na urina é uma importante ferramenta para o diagnóstico de colesterol alto, consumo de álcool e obesidade (YU, J. et al., 2011).

1.5.2. Lactato

O lactato é a forma desprotonada do ácido lático, um intermediário do metabolismo de carboidratos. Sob condições anaeróbicas, o piruvato gerado na glicólise é reduzido a lactato dando continuidade ao metabolismo de carboidratos para a geração de energia para o organismo. Isso ocorre durante a contração do músculo esquelético sob condições de baixa concentração de oxigênio (hipóxia) e em certos tipos de tecidos e células como a retina, pele, cérebro, medula renal e eritrócitos. A concentração de lactato presente no sangue depende da sua produção nesses tecidos e células, e seu metabolismo no fígado (ciclo de Cori) e nos rins (BURTIS, 2001;

NELSON; COX, 2008). Para adultos saudáveis em repouso, os níveis normais de lactato variam entre 3 – 12 mg dL^{-1} em sangue, entre 496 – 1982 mg dia^{-1} em urina e entre 1,0 – 7,5 x 10^{-4} mol L^{-1} em saliva (BURTIS, 2001; CLAVER; MIRÓN; CAPITÁN-VALLVEY, 2009; TÉKUS et al., 2012).

O aumento da concentração de lactato no sangue (acidose láctica) diminui o pH do sangue podendo danificar os músculos (CLAVER; MIRÓN; CAPITÁN-VALLVEY, 2009); concentrações de lactato acima de 5 x 10^{-3} mol L^{-1} e pH abaixo de 7,25 podem indicar acidose lática significativa (BURTIS, 2001). A dosagem de lactato também é uma forma menos invasiva de controlar pacientes com diabetes e de diagnosticar a doença de armazenamento de glicogênio tipo I, que diminui a capacidade do fígado produzir glicose-6-fosfato a partir da glicose (LIN et al., 2011).

Dada a importância dos analitos anteriormente mencionados, foram desenvolvidos métodos analíticos simples, rápidos e que contemplem os quesitos mencionados nas diretrizes da WHO utilizando *carbon dots* e plataformas de papel com detecção por imagem digital para determinação de glicose e lactato em matrizes biológicas.

2. OBJETIVOS

Geral:

No presente trabalho temos como objetivo principal a síntese de *carbon dots* para a quantificação de glicose e lactato utilizando dispositivos analíticos em papel e detecção por fluorimetria.

Específicos:

- Sintetizar CDs utilizando técnica ambientalmente amigável;
- Variação das condições reacionais para síntese do CDs de interesse;
- Obtenção de CD sensível ao H_2O_2;
- Caracterizar as nanopartículas fluorescentes sintetizadas por diferentes técnicas;
- Avaliar a potencialidade das imagens digitais associada a softwares gráficos como método de detecção fluorimétrica.
- Desenvolvimento de metodologias analíticas simples, rápidas, de baixo custo e ambientalmente mais amigáveis para os analitos alvo:
  - Utilização de plataforma de papel para análise;
  - Determinação indireta dos analitos de interesse através da detecção do H_2O_2 formado na reação enzimáticas dos analitos;
  - Otimização das condições experimentais;
  - Estudo de interferentes;
  - Validação da metodologia proposta;
  - Aplicação das metodologias desenvolvida em amostras;

3. PARTE EXPERIMENTAL

Em seguida serão descritas as principais características dos reagentes, soluções e equipamentos utilizados no presente estudo.

3.1. Equipamentos

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

- Balança analítica da marca Mettler Toledo, modelo AG204;
- Ultrassom da marca Thorton, modelo T14, com frequência de 40 kHz e potência ultrassônica de 60W;
- Espectrofotômetro com arranjo de fotodiodos HP 8453 com cubeta de quartzo com caminho ótico b=1cm;
- Espectrofluorímetro modelo RF-1501, marca Shimadzu, com cubeta de quartzo com quatro faces lisas e caminho ótico b=1cm;
- Espectrofotômetro FTIR modelo VERTEX 70, marca Bruker, com acessório ATR;
- NMR Heteronulclear Multidimensional, modelo Advance III, marca Bruker com frequência de 600 MHz para o núcleo de ^{1}H e opera com amostras no estado líquido, com tubos de NMR BORO ECO 4 pol., diâmetro de 3 mm;
- Microscópio eletrônico de transmissão modelo CM200, marca Philips, operando em 200kV com filamento de LaB_6;
- Papel qualitativo n°1, marca Whatman;
- Impressora da marca Xerox® modelo Phaser™ 8580;
- Estufa da marca Fanem, modelo 315 SE;
- Centrífuga refrigerada da marca Hettich, modelo Universal 320R;
- Micro-ondas doméstico modelo NN-S59BH, marca Panasonic;
- Filtro de seringa 0,45 µm PVDF, marca Millex®;
- Máquina fotográfica marca Canon, modelo Powershot SX170IS, com resolução de 16,0 MP, equipada com uma lente grande angular de 28 mm e com distância focal de 5 mm;
- Câmara de UV com interior preto (40 x 21 x 20 cm – comprimento, profundidade

e altura) equipada com uma fonte de luz ultravioleta de comprimento de onda máximo de emissão de 365 nm e potência de 8 W.

Todos os equipamentos encontram-se instalados em salas devidamente equipadas com energia estabilizada e ar condicionado.

3.2. Reagentes

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

- Ácido cítrico monoidratado – SIGMA ALDRICH;
- Ácido úrico – SIGMA ALDRICH – pureza 99 %;
- Ácido sulfúrico – SIGMA ALDRICH – pureza 95 a 98 %;
- Dihidrogênio fosfato de potássio – VETEC – pureza 99 %;
- Frutose – SYNTH;
- Glicose – SIGMA ALDRICH – pureza 99,5 %;
- Glicose oxidase de *Aspergillus niger* – SIGMA ALDRICH;
- Hidrogênio fosfato de potássio – VETEC – pureza 98 %;
- Lactato – SIGMA ALDRICH – pureza 98 %;
- Lactato oxidase de *Aerococcus viridans* – SIGMA ALDRICH;
- Lactose – SYNTH;
- Peroxidase de raiz forte – SIGMA ALDRICH;
- Peróxido de hidrogênio – ÊXODO CIENTÍFICA – 35%;
- Sacarose – MALLINCKRODT;
- Sulfato de quinino – FLUKA – pureza 99%;
- Ureia – SIGMA ALDRICH;
- Tiramina – SIGMA ALDRICH – pureza 99%;
- Água deionizada utilizada no preparo das soluções de reagentes, padrões e amostras – Millipore 0,22 μm – 18,2 MΩ.cm – 25º C;

3.3. Soluções

3.3.1. Soluções gerais

- Solução de NaOH 5 mol L^{-1};
- Solução de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1};
- Tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$, pH = 6, 0,5 mol L^{-1};
- Tampão $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$, pH = 6,5, 0,5 mol L^{-1};
- Solução de peroxidase (Pox) 30 U mL^{-1};
- Solução de glicose oxidase (GOx) 120 U mL^{-1} e peroxidase (Pox) 30 U mL^{-1}, em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH = 6);
- Solução de lactato oxidase (LOx) 50 U mL^{-1} e peroxidase (Pox) 30 U mL^{-1} em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH = 6,5);

3.3.2. Soluções estoque dos analitos

- Solução estoque de glicose 100 x 10^{-3} mol L^{-1};
- Solução estoque de lactato 100 x 10^{-3} mol L^{-1};
- Solução estoque de peróxido de hidrogênio 1 x 10^{-3} mol L^{-1}.

3.3.3. Soluções para síntese dos CD

Para a variação da razão molar de tiramina e ácido cítrico foram preparadas soluções com massas dos precursores de acordo com a Tabela 1.1. As massas foram quantitativamente transferidas para os respectivos balões volumétricos de 10,00 mL. Dissolveu-se os reagentes e completou-se o volume com água deionizada à temperatura ambiente.

Tabela 1.1 – Massa dos precursores tiramina e ácido cítrico monoidratado utilizados na otimização experimental da síntese dos CD.

Razão molar (TIR/AC)	Massa de tiramina (g)	Massa de ácido cítrico (g)
1/2	0,3024	0,9172
1/3	0,2198	1,0000
1/4	0,1726	1,0470
1/5	0,1421	1,0775
1/6	0,1208	1,0990
1/7	0,1050	1,1150

Fonte: Elaborada pelo autor[1].

3.3.4. Dispersão estoque de CD

Ao produto da síntese foram adicionados 10 mL de água deionizada no recipiente de teflon que contém o sólido resultante e agitado com auxílio de um ultrassom por 30 minutos. Após a sonicação a dispersão foi transferida para um balão de 25 mL e o volume completado até o menisco.

3.3.5. Soluções para a otimização da concentração do reagente

As soluções utilizadas de reagente foram preparadas diluindo-se a dispersão estoque de CD da seguinte maneira: em diferentes balões de 5,00 mL foram adicionados 1,00, 2,00, 3,00, 4,00 e 5,00 mL da dispersão estoque e adicionado tampão pH 6 (100×10^{-3} mol L^{-1}) e água deionizada.

3.3.6. Reagente fluorescente para dispositivo de adição de padrão

O reagente para determinação de glicose nos dispositivos de adição de padrão consistiu em uma mistura de GOx (120 U mL^{-1}), Pox (30 U mL^{-1}) e 2 mL de dispersão de CD em um balão volumétrico de 5 mL, preparado em meio de solução tampão fosfato 100×10^{-3} mol L^{-1} (pH 6).

[1] As tabelas de 1.1 a 2.12 foram elaboradas pelo autor.

3.3.7. Reagente fluorescente para dispositivo 3D-μPAD

O reagente fluorescente para o dispositivo 3D-μPAD consistiu em 2 mL de dispersão de CD em um balão volumétrico de 5 mL, preparado em meio de solução tampão fosfato 100 x 10^{-3} mol L^{-1} (pH 6 para determinação de glicose e pH 6,5 para determinação de lactato).

3.3.8. Amostras certificadas

Amostras foram fornecidas pelo Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNQC), uma instituição patrocinada pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC). Foram fornecidos dois tipos de amostras, urina e soro, em dois diferentes níveis de concentração (Urina I, Urina II, Soro I e Soro II).

Aos frascos contendo as amostras certificadas de urina e soro foram adicionados volumes de água deionizada conforme indicado no rótulo. As amostras estavam preparadas após 30 minutos com agitação ocasional do frasco. Para a análise de glicose em urina, 50 μL da amostra foi diluída em balão de 25 mL com água deionizada. Para a análise de glicose em soro, 100 μL da amostra foi diluída em balão de 25 mL com água deionizada. Já para as análises de lactato em soro, 75 μL da amostra foi diluída em balão de 10 mL com água deionizada.

4. METODOLOGIAS

4.1. Síntese dos CD

Resumidamente, 1,0470 g de ácido cítrico monoidratado e 0,1726 g de tiramina foram dissolvidos sob agitação vigorosa em 10 mL de água deionizada para formar uma solução transparente. A solução foi transferida para o recipiente de PTFE aberto, colocada em um forno de micro-ondas doméstico (800 W), e aquecida durante 2 minutos até obter um produto viscoso castanho. Ao produto da síntese foram adicionados 10 mL de água deionizada no recipiente de teflon que contém o sólido resultante e agitado com auxílio de um ultrassom por 30 minutos. Após a sonicação a dispersão foi transferida para um balão de 25 mL e o volume completado até o menisco. Posteriormente, a dispersão de CD foi centrifugada a 9000 rpm por 10 minutos a 4°C e filtrada em filtro de seringa 0,45 µm, para eliminar possíveis partículas maiores que se formaram. A dispersão de estoque de CD foi mantida em 4ºC até a utilização.

4.2. Otimização da síntese de CD

Os parâmetros para a síntese de CD foram avaliados usando uma metodologia de planejamento experimental. As variáveis selecionadas foram tempo de síntese (t = 120-140 s) e razão molar entre tiramina e ácido cítrico (TIR/AC = 1/2 - 1/3). Após a análise multivariada, uma análise univariada foi aplicada para otimizar a razão entre tiramina e ácido cítrico (TIR/AC = 1/2 - 1/7). Os resultados foram analisados através da supressão da fluorescência da dispersão CD sintetizada frente ao H_2O_2, com auxílio do espectrofluorímetro. As análises estatísticas utilizaram o software *Statistica*® 7.

4.3. Calibração da potência do forno de micro-ondas

Para garantir a reprodutibilidade da síntese, foi realizada a calibração do forno de micro-ondas utilizado com o intuito de medir a real potência do equipamento. Para isso, 1000 g de água foram adicionados em um béquer de vidro e aquecido no micro-

ondas por 90, 120 e 180 segundos. A temperatura da água foi medida antes e depois do aquecimento. A potência do micro-ondas foi calculada multiplicando-se a massa de água utilizada, em gramas, o calor específico da água (4,18 J g^{-1} °C^{-1}) e a variação de temperatura medida, em °C, dividindo-se pelo tempo de aquecimento, em segundos (KINGSTON, 1998).

4.4. Caracterização do CD

O CD sintetizado a partir do ácido cítrico e da tiramina foi caracterizado utilizando FTIR, microscopia eletrônica de transmissão (TEM), espectroscopia de fluorescência, espectroscopia UV-Vis e ressonância magnética nuclear de prótons (^{1}H-NMR). O rendimento quântico (η) foi determinado utilizando sulfato de quinino, em meio de H_2SO_4 0,1 moL^{-1}, como referência. A seletividade do CD foi examinada preparando uma dispersão de CD na presença de Al^{3+}, Ag^{+}, Cd^{2+}, Cr^{3+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{2+}, K^{+}, Li^{+}, Na^{+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}, ácido úrico, creatinina, glicose, lactato, ureia, peroxidase, H_2O_2 e H_2O_2 + peroxidase.

4.5. Spot-test para adição de padrão

Os spot-test em plataforma de papel foram projetados usando o *CorelDRAW*® X5 para gerar o layout do *spot-test* circular com diâmetro de 3,6 mm em um fundo preto, formando um dispositivo com seis colunas com três spot cada (Figura 1.10A). Os padrões foram impressos em um papel de filtro com auxílio de uma impressora com tinta sólida à base de cera (Figura 1.10B). Após a impressão, as folhas foram aquecidas a 120 °C durante 120 s para que a cera depositada fundisse, definindo as barreiras hidrofóbicas (Figura 1.10C). O lado inferior foi coberto com fita adesiva transparente de PVC para evitar vazamento de solução através do dispositivo (Figura 1.10D). Uma alíquota de 1,0 µL do reagente fluorescente (dispersão de CD) foi adicionada em cada spot do dispositivo (Figura 1.10E). Após a secagem completa do local (~ 30 min), 0,5 µl da solução da amostra foi adicionado em todos os pontos, exceto na primeira coluna que foi adicionado 1,0 µL de água deionizada, seguido pela adição de 0,5 µL das soluções padrão de glicose em concentração crescente em cada coluna (Figura 1.10F). Após a secagem completa do local (~ 30 min), o dispositivo foi

colocado na câmara UV e capturada uma imagem do dispositivo em papel (Figura 1.10G). A análise das imagens digitais foi feita utilizando o software ImageJ® para obter a intensidade do componente azul (formato RGB).

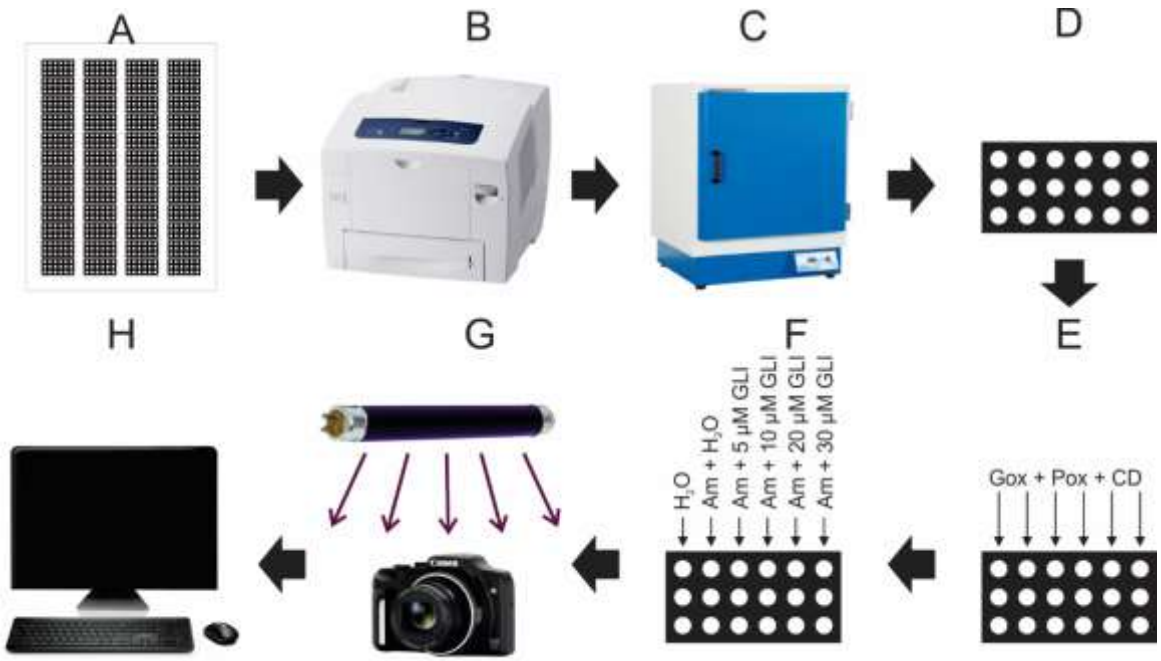

Figura 1.10 – Confecção e utilização das plataformas de papel para determinação por adição de padrão. A. *Layout* dos *spot-tests*; B. Impressão dos *spot-tests*; C. Aquecimento para formação das barreiras hidrofóbicas; D. *Spot-test* pronto, E. Adição da mistura de GOx, Pox e CD; F. Adição da amostra e padrões de glicose; G. Iluminação UV para detecção por fluorimetria utilizando imagem digital; H. Tratamento das imagens por software gráfico.
Fonte: Elaborada pelo autor[2].

4.6. Dispositivo analítico microfluídico 3D em papel (3D-µPAD)

O design do 3D-µPAD (Figura 1.11) utilizado nesse trabalho foi desenvolvido por Morbioli e colaboradores (MORBIOLI; MAZZU-NASCIMENTO; MILAN; et al., 2017).

[2] As figuras de 1.10 a 1.42 foram elaboradas pelo autor.

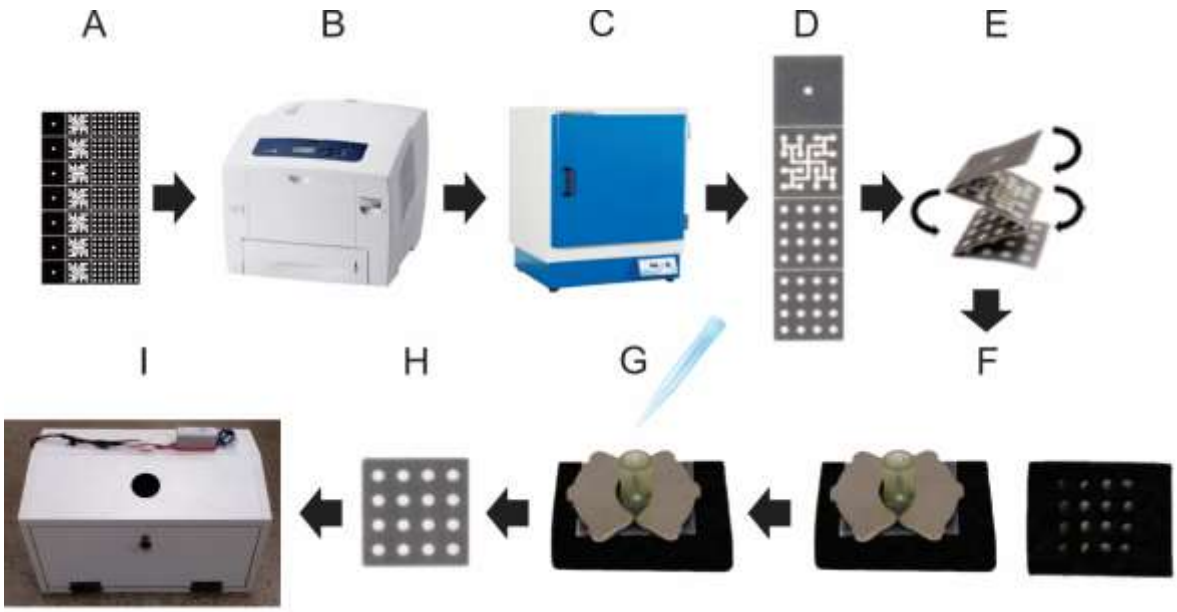

Figura 1.11 – Confecção e utilização do 3D-µPAD. A. Design dos 3D-µPADs; B. Impressão dos 3D-µPADs; C. Aquecimento para formação das barreiras hidrofóbicas; D. 3D-µPAD pronto; E. Dobradura do 3D-µPAD; F. 3D-µPAD no suporte metálico com imã para análise; G. Adição da amostra; H. Última camada retirada do 3D-µPAD; I. Câmara UV para detecção por fluorimetria utilizando imagem digital.

Para a confecção dos dispositivos 3D foi utilizado o design disponível no material suplementar do trabalho de Morbioli e colaboradores (MORBIOLI; MAZZU-NASCIMENTO; MILAN; et al., 2017) (Figura 1.11A). Os 3D-µPAD foram impressos em papel de filtro qualitativo Whatman® nº 1 com auxílio de uma impressora com tinta sólida à base de cera marca Xerox® modelo Colorqube 8580 DN (Figura 1.11B). Após a impressão, o papel foi aquecido em estufa a 120ºC por 2 minutos, para que a cera pudesse penetrar nos poros do papel, formando as barreiras hidrofóbicas (Figura 1.11C). Uma alíquota de 1 µL da dispersão de CD (reagente fluorescente) foi adicionada em cada uma das 16 zonas da última camada de papel; após a secagem, uma alíquota de 1 µL das enzimas necessárias para a reação foi colocada nas mesmas zonas e secas completamente por 30 minutos; foi adicionada à mistura de GOx+Pox ou LOx+Pox nas duas colunas de *spot* centrais e apenas Pox nas colunas de *spot* da esquerda e da direita. O dispositivo foi então dobrado conforme ilustrado na Figura 1.11E, e sobre o círculo da camada superior de amostragem foi colada uma base de uma ponteira para facilitar a deposição da alíquota da amostra (Figura 1.11F). O 3D-µPAD foi posicionado sobre uma chapa de metal com 16 furos que coincidem com as zonas de detecção da parte de baixo do dispositivo e fixado com auxílio de dois imãs de neodímio (Figura 1.11F). Uma alíquota de 45 µL da amostra foi

depositada na base da ponteira colada ao dispositivo (Figura 1.11G). Após 10 minutos, o 3D-µPAD foi retirado do suporte de metal e seco completamente por mais 20 minutos. A camada inferior com as 16 zonas contendo os reagentes foi recortada (H) e colocada na câmara de UV (máximo de emissão em 365 nm e potência de 8 W) (Figura 1.11I). Na abertura da câmara foi colocada uma câmera fotográfica para captura da imagem digital para posterior análise utilizando o software ImageJ® para obter a intensidade do componente azul (formato RGB).

4.7. Detecção por imagens digitais

As imagens captadas pela câmera fotográfica foram analisadas com auxílio do software gráfico ImageJ®. Nele foi obtido o histograma de determinada área pré-selecionada da imagem que fornece os valores de média, moda e desvio padrão da intensidade da cor de determinado componente R, G ou B. A média da intensidade fornecida pelo histograma, varia entre 0 e 255, sendo RGB (0, 0, 0) a cor preta e RGB (255, 255, 255) a cor branca. Foi calculada a supressão através da Equação 1.2:

$$\text{Supressão:} \frac{I}{I_0} \qquad \text{Equação 1.2}$$

Sedo que,

I = intensidade da amostra;

I_0 = intensidade do branco.

Dessa forma, pela imagem digital é possível determinar supressão da fluorescência. No Excel® calcularam-se os valores de supressão pelos valores de intensidade dos canais R, G e B de cada concentração de analito. No software Origin®, apenas por comodidade, são gerados os gráficos desejados.

4.8. Coleta e filtragem de amostra de saliva

Para a coleta da saliva, um pedaço de algodão foi introduzido na boca e, após estar completamente úmido foi colocado em uma seringa contendo 4 círculos de papel qualitativo em seu interior. O êmbolo foi introduzido e, com auxílio de uma leve pressão, a amostra de saliva foi filtrada nesse sistema de algodão-papel-seringa. Para a análise de glicose o filtrado foi aplicado diretamente nos 3D-µPAD e para a determinação de lactato, a amostra foi diluída com água deionizada antes de análise

no dispositivo. Foram coletadas amostras apenas do próprio autor do trabalho em jejum, assim, não foram necessárias autorizações do Comitê de Ética.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O CD foi preparado por um método simples de aquecimento por micro-ondas em uma única etapa. A potência calculada do forno micro-ondas utilizado foi de 404 ± 6 W. A solução aquosa precursora quando aquecida em um micro-ondas doméstico, perdeu água por evaporação, aumentando a temperatura do sistema e promovendo reações de polimerização e carbonização entre o ácido cítrico e a tiramina, formando as nanopartículas de carbono. A solução inicialmente amarelo-clara, após a síntese, transformou-se em um produto castanho de CD viscoso e em um sólido de CD castanho após o resfriamento.

5.1. Planejamento fatorial para as condições da síntese

Para a síntese via micro-ondas utilizando tiramina e ácido cítrico como precursores há dois fatores que podem variar: as concentrações dos reagentes e o tempo de síntese. Para avaliar a influência desses dois fatores na resposta analítica foi realizado um planejamento fatorial completo 2^2. Os fatores utilizados foram razão molar TIR/AC (avalia a concentração dos reagentes) e tempo de síntese. A soma das massas dos reagentes foi constante, variando apenas a proporção entre eles.

O tempo de síntese mínimo necessário para formar os CD foi de 120 s. Tempos inferiores a 120 s foram insuficientes para evaporar toda a água da solução; condição necessária para a polimerização dos reagentes e formação do produto castanho viscoso que continha os CD fluorescentes. Os níveis utilizados e os resultados da supressão (F/F_0) para cada um dos experimentos estão descritos na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 – Matriz do planejamento fatorial completo 2^2 e os resultados obtidos para cada experimento. C_{H2O2} = 50 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{Pox}= 30 U mL^{-1}, pH=6 e n=3.

Experimento	Tempo de síntese (s)	Razão molar (TIR/AC)	F/F_0
1	120	1/3	0,440 ± 0,034
2	120	1/2	0,755 ± 0,030
3	140	1/3	0,744 ± 0,037
4	140	1/2	0,802 ± 0,054

Pelo gráfico de efeitos principais, ilustrado na Figura 1.12 e os dados apresentados na Tabela 1.2, foi possível concluir que com o aumento do tempo de

síntese há uma diminuição na supressão da fluorescência (maior F/F_0), podendo indicar que maiores tempos de aquecimento no micro-ondas levam à degradação dos CDs. Um fator que pode corroborar com essa explicação foi a formação de fumaça com o aumento do tempo de síntese, indicando degradação do produto. A diminuição da proporção de tiramina na síntese (razão molar TIR/AC = 1/3) levou a uma maior supressão. Dessa maneira, segundo o planejamento fatorial, a melhor condição de síntese que levou a maior supressão (menor valor de F/F_0) foi o tempo de síntese de 120 s e razão molar TIR/AC de 1/3. O fator com maior inclinação no gráfico de efeitos principais é o que apresenta influência na síntese, nesse caso, a razão molar TIR/AC.

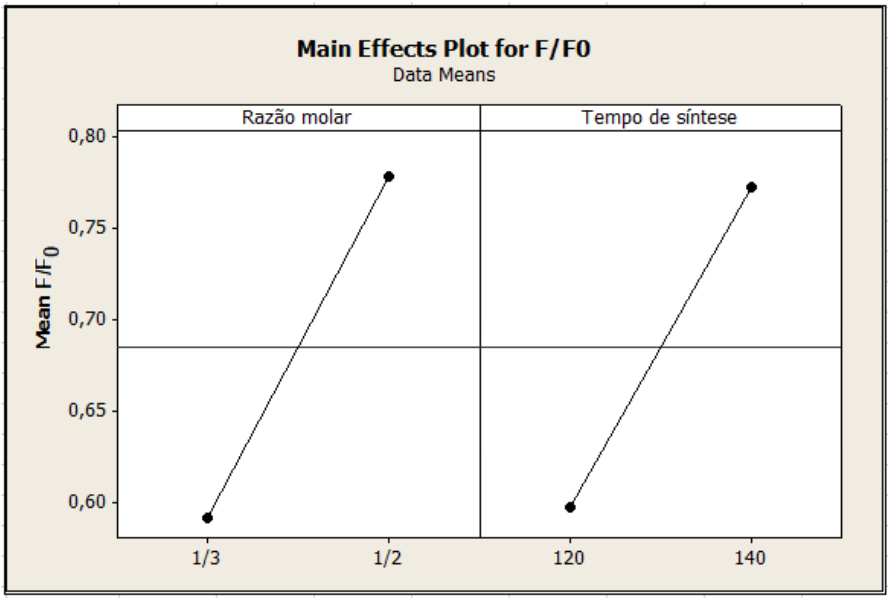

Figura 1.12 – Gráfico de efeitos principais da matriz da Tabela 1.2. C_{H2O2} = 50 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{Pox} = 30 U mL^{-1}, pH = 6 e n = 3.

5.2. Otimização da síntese dos CD

O resultado do planejamento fatorial mostrou que o fator de maior influência na reação foi a razão molar TIR/AC. Também, segundo o resultado, menores tempos de síntese no micro-ondas levam a melhores resultados, porém, não foi possível diminuir ainda mais o tempo, pois 120 s já foi o tempo mínimo para a formação dos CD. Dessa maneira, optou-se por trabalhar com a otimização de apenas um fator, a razão molar TIR/AC.

Variou-se a razão molar TIR/AC desde maiores proporções de tiramina (razão 1/2) até maiores proporções de ácido cítrico (razão 1/7). Também, foram sintetizados CD utilizando somente ácido cítrico como precursor e apenas tiramina como

precursor. A soma das massas dos reagentes foi constante, variando apenas a proporção entre elas.

Os resultados obtidos encontram descritos na Figura 1.13. A síntese utilizando somente ácido cítrico levou a CD com baixa fluorescência e não sensíveis ao peróxido de hidrogênio; a síntese utilizando somente tiramina não formou compostos fluorescentes, podendo então concluir que o ácido cítrico é necessário para a polimerização, formação dos CD e incorporação da tiramina que torna as nanopartículas sensíveis ao peróxido de hidrogênio.

Pelos resultados apresentados na Figura 1.13 é possível concluir que a razão molar TIR/AC que apresenta melhor resultado analítico, ou seja, maior supressão (menor F/F_0) foi a 1/4, sendo a utilizada para o desenvolvimento desse trabalho.

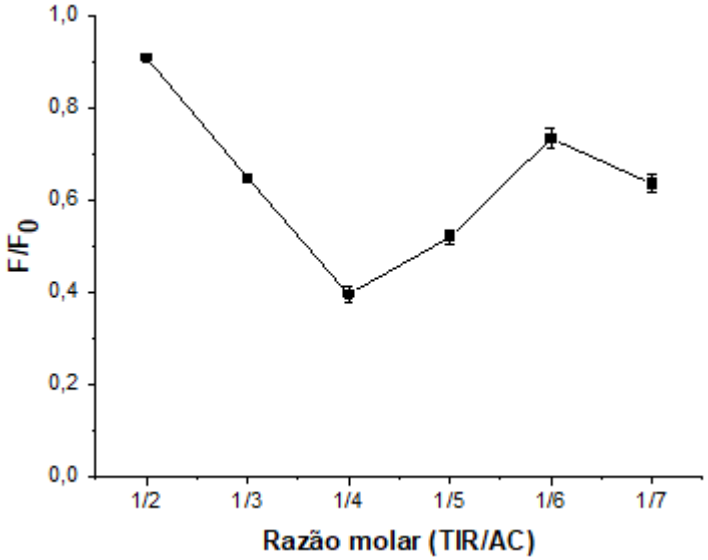

Figura 1.13 – Variação da razão molar TIR/AC para a síntese dos CD. Tempo de síntese = 120 s, C_{H2O2} = 75 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{Pox} = 30 U mL^{-1}, pH=6 e n=3.

5.3. Caracterização do CD

A seguir foram realizados os experimentos necessários para caracterizar o CD utilizando a tiramina e ácido cítrico como precursores. O CD utilizado foi sintetizado conforme o item 4.1 utilizando o tempo de síntese de 120 s e razão molar TIR/AC igual a 1/4.

5.3.1. Espectro de absorção

Na Figura 1.14 está ilustrado o espectro de absorção no UV-Vis do CD em meio

aquoso. A dispersão foi diluída 5 vezes em relação a estoque. A absorção se concentra na região do UV. Há apenas uma pequena absorção entre 400 e 450 nm, como pode ser observado pela coloração levemente amarelada da dispersão após a diluição. O espectro de absorção apresenta duas bandas de absorção, uma em comprimentos de onda abaixo de 300 nm e outra entre 300 e 400 nm. A primeira banda pode ser atribuída a transição $\pi \rightarrow \pi^*$ da ligação sp^2 do anel aromático da CD derivado da tiramina e as duplas ligações formadas no processo de polimerização. A banda de absorção entre 300 e 400 nm pode ser atribuída a transição $n \rightarrow \pi^*$ da ligação C=O (NIU; GAO, 2014).

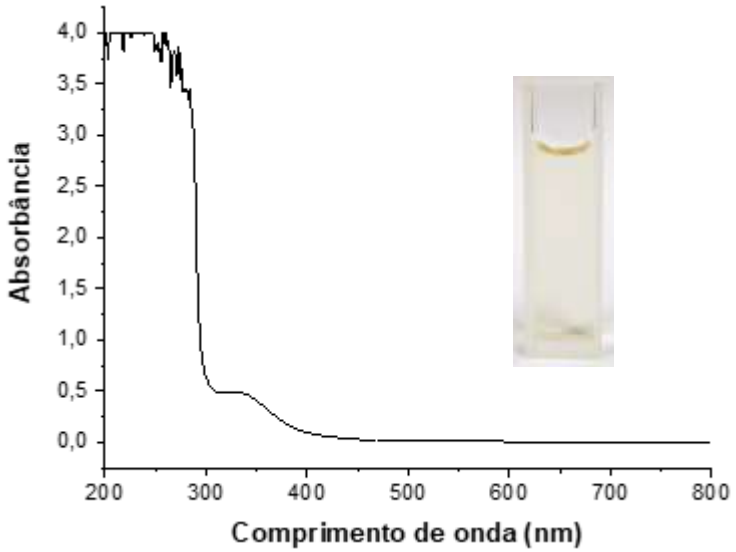

Figura 1.14 – Espectro de absorção e fotografia da cubeta da dispersão de CD diluída 5 vezes.

5.3.2. Espectro de emissão e excitação

Os espectros de excitação e emissão para o CD estão ilustrados na Figura 1.15. A banda de excitação está localizada no UV com máximo em 356 nm e a banda de emissão está localizada na faixa inicial do espectro do visível com máximo em 440 nm, o que condiz com a coloração azul observada quando os CD estão sob iluminação UV.

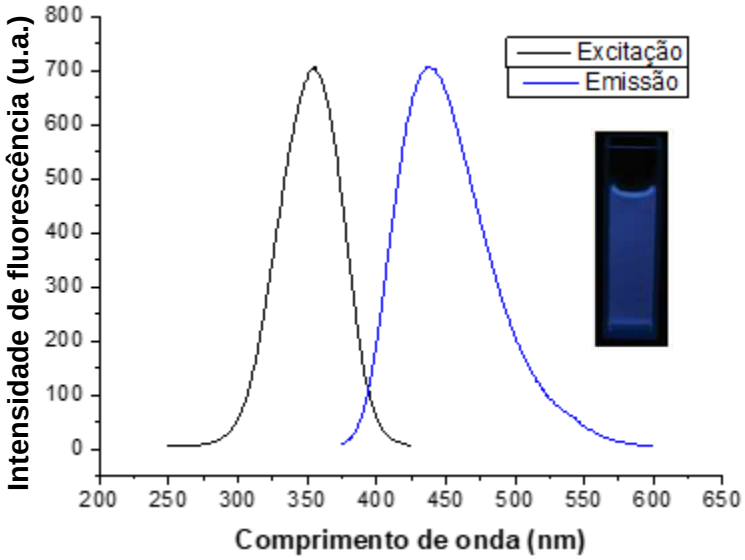

Figura 1.15 – Espectros de excitação e emissão de fluorescência para o CD. Fotografia da dispersão de CD sob luz UV (365 nm). pH=6.

Para melhor entender as propriedades fluorescentes dos CD, foram obtidos diferentes espectros de emissão utilizando diferentes comprimentos de onda de excitação. Variando o comprimento de onda de excitação não há variação do máximo de emissão, somente da intensidade de emissão, pois há diminuição na intensidade absorvida (Figura 1.16). Quando a luminescência do CD tem um comprimento de onda de emissão máximo que não varia e é independe do comprimento de onda de excitação, a fotoluminescência se origina devido ao efeito de confinamento quântico. Após a absorção de um fóton com energia superior à energia de *bandgap*, um elétron da banda de valência é promovido para a banda de condução deixando um buraco para trás. A recombinação elétron-buraco resulta na emissão de um fóton de luz que dá origem à luminescência. Esse tipo de fotoluminescência é comumente conhecido como transição HOMO-LUMO, *bandgap* intrínseca ou recombinação de elétron-buraco de banda-borda, e está associado a menos defeitos de superfície ou impurezas dos CDs. A largura da banda de emissão se deve à distribuição dos tamanhos de partícula (CAYUELA et al., 2016; WANG, Haiyan et al., 2016).

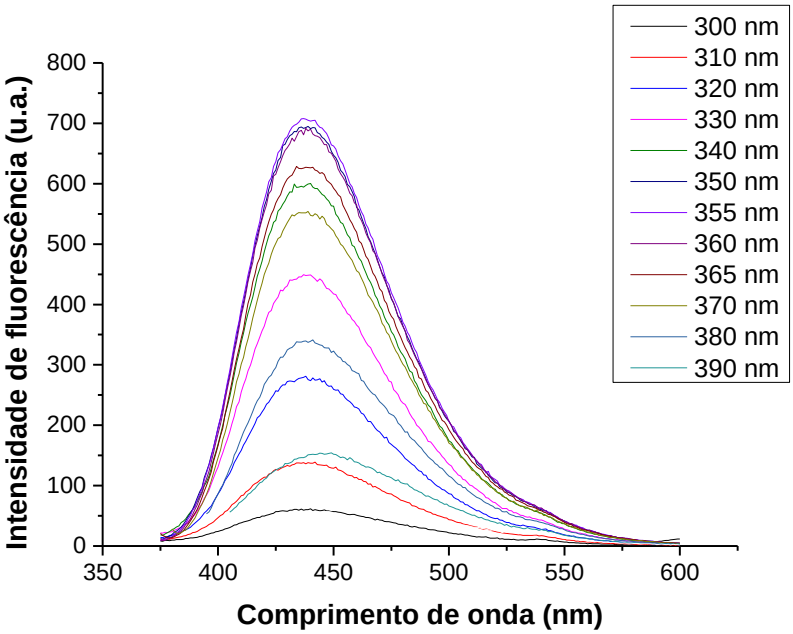

Figura 1.16 – Espectros de emissão variando a comprimento de onda de excitação. pH = 6.

Com o aumento da concentração dos CDs na dispersão a ser utilizada pode ocorrer a agregação das nanopartículas gerando uma diminuição da fluorescência não devido à interação com o analito de interesse, o que pode gerar resultados incorretos. A dispersão estoque de CD foi diluída utilizando de 10 a 2000 µL em balão de 5 mL. Na Figura 1.17 pode-se observar que as diferentes concentrações de CD apresentaram variação de ± 1 nm no comprimento de onda de máxima emissão, estando dentro do erro do equipamento, assim, pode-se considerar que não houve agregação das nanopartículas, pois uma agregação levaria ao deslocamento nesse comprimento de onda.

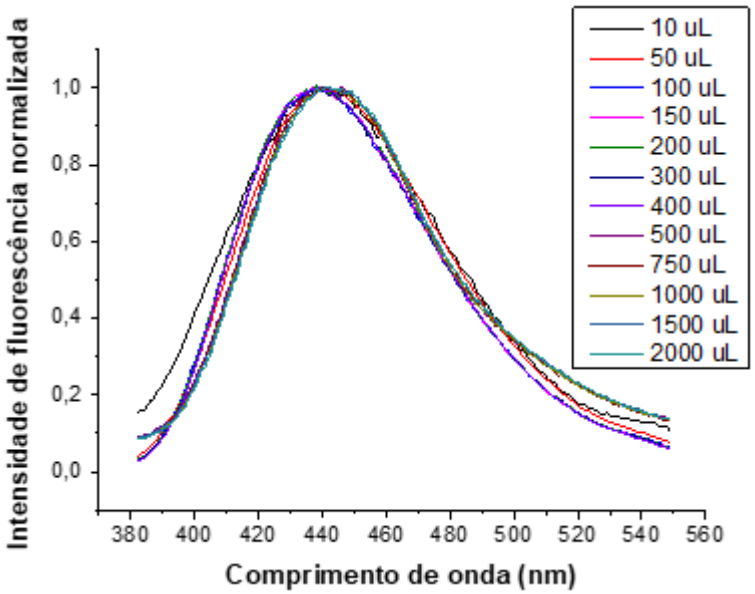

Figura 1.17 – Variação do máximo de emissão com o aumento na concentração de CD no reagente utilizado. pH = 6.

5.3.3. Rendimento quântico

O rendimento quântico (Φ) é a razão entre o número de fótons emitidos pelo número de fótons absorvidos. Experimentalmente, pode-se determinar o rendimento quântico de uma amostra desconhecida por meio da comparação com um padrão com rendimento quântico conhecido utilizando a Equação 1.3:

$$\Phi_{am} = \Phi_{ref} x \left(\frac{\int_{am}}{\int_{ref}}\right) x \left(\frac{A_{ref}}{A_{am}}\right) x \left(\frac{\eta_{am}^2}{\eta_{ref}^2}\right) \qquad \text{Equação 1.3}$$

Na qual, ∫, A e η representam, respectivamente, a integral do espectro de emissão, quando excitado em λ_{ref}, a absorbância da amostra no λ_{ref} determinado e o índice de refração da solução analisada. Foi utilizado o sulfato de quinino em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} como padrão de referência, que apresenta Φ = 0,53 (366 nm). Foi utilizado λ_{ref} = 366 nm para medição da absorbância da amostra e da referência, bem como comprimento de onda de excitação na fluorescência. O índice de refração da solução de referência e da dispersão da amostra foi de 1,33. Foram utilizadas soluções com absorbâncias menores que 0,050 em 366 nm para evitar o efeito de filtro interno (LAKOWICZ, 2006).

Os CD apresentaram rendimento quântico igual a 11,0 ±0,8 % (n = 3). Esse valor obtido está dentro do esperado para CD. Outros CD descritos na literatura apresentam maiores valores de rendimento quântico (30 – 94 %), porém, esse elevado rendimento quântico pode estar relacionado com a formação de fluoróforos

orgânicos quando a síntese é realizada a baixas temperaturas (≤ 200°C) e não ser majoritariamente devido à fluorescência do CD (SHI et al., 2016).

5.3.4. Efeito da variação de pH

Foi estudado o efeito da variação do pH na intensidade de fluorescência do CD. Como pode ser observado na Figura 1.18, em meio fortemente ácido a fluorescência é praticamente ausente; com o aumento do pH a partir de 4, a intensidade de fluorescência aumenta até o pH 10, no qual há um decaimento na fluorescência para maiores valores de pH. Em pH entre 6 e 10 há a maior intensidade de fluorescência, faixa a qual é utilizada para as reações enzimáticas das enzimas oxidase e peroxidase.

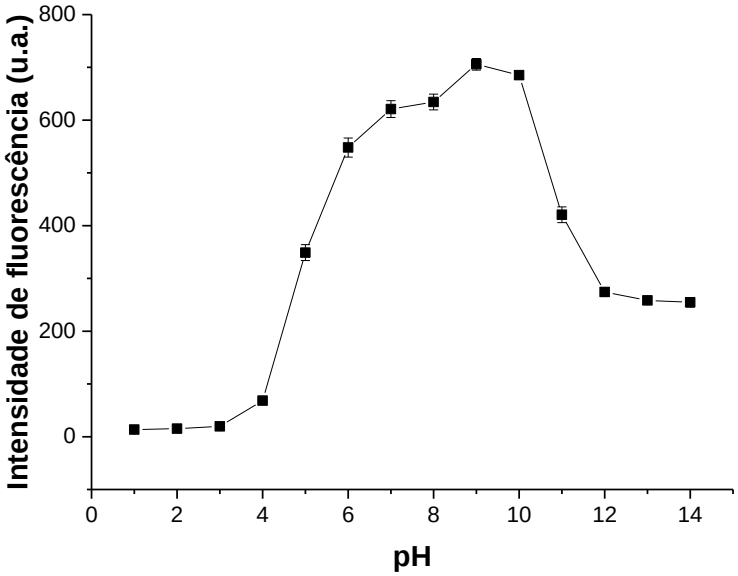

Figura 1.18 – Variação na intensidade de fluorescência dos CD com o pH.

5.3.5. Variação da força iônica do meio

Foi avaliada a influência da força iônica na fluorescência dos CD. Para isso, foram preparadas dispersões de CD em meio de NaCl com concentração entre 1 x 10^{-3} e 1 mol L^{-1} desse sal, o que corresponde às forças iônicas entre 1 x 10^{-3} e 1 mol L^{-1}. O resultado observado está ilustrado na Figura 1.19. O aumento da concentração de NaCl na dispersão de CD e, consequentemente, o aumento da força iônica do meio, diminuiu a fluorescência das nanopartículas. Com o aumento da força iônica do meio há a diminuição da dupla camada elétrica e da repulsão entre as NPs,

aumentando a interação dos CD e a supressão da fluorescência com o aumento da concentração de NaCl. Porém, como todos os experimentos foram realizados em meio de tampão de fosfato (pH = 6 e 6,5) com concentração constante (0,1 mol L^{-1}) e as amostras foram diluídas ou apresentam concentração de sais consideravelmente menores, a força iônica é praticamente constante e igual à do tampão (FI ≅ 0,068 mol L^{-1} para pH = 6 e FI ≅ 0,096 mol L^{-1} para pH = 6,5).

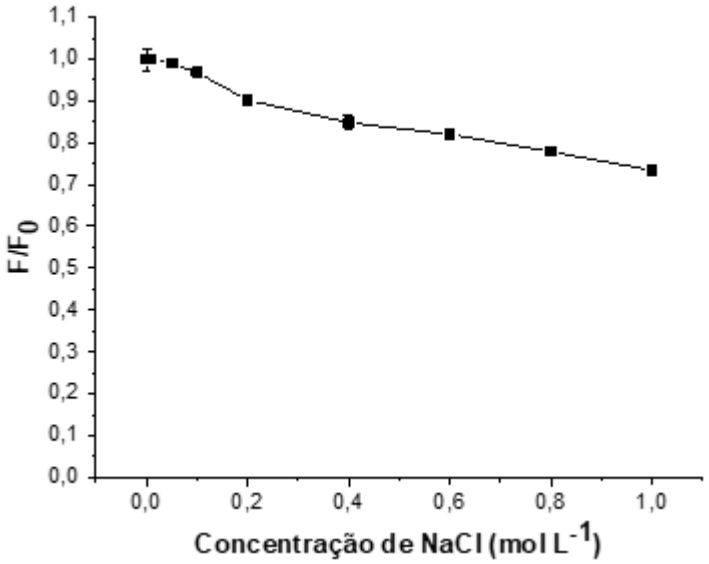

Figura 1.19 – Efeito da concentração de NaCl na fluorescência dos CD. pH=6 e n=3.

5.3.6. Espectroscopia de absorção no infravermelho

Os precursores e o CD foram analisados utilizando a espectroscopia de infravermelho. As Figura 1.20, Figura 1.21 e Figura 1.22 ilustram os espectros de FTIR do ácido cítrico diidratado, tiramina e CD, respectivamente. Nas Tabela 1.3, Tabela 1.4 e Tabela 1.5 estão descritas as atribuições das bandas dos espectros de FTIR do ácido cítrico diidratado, tiramina e CD, respectivamente.

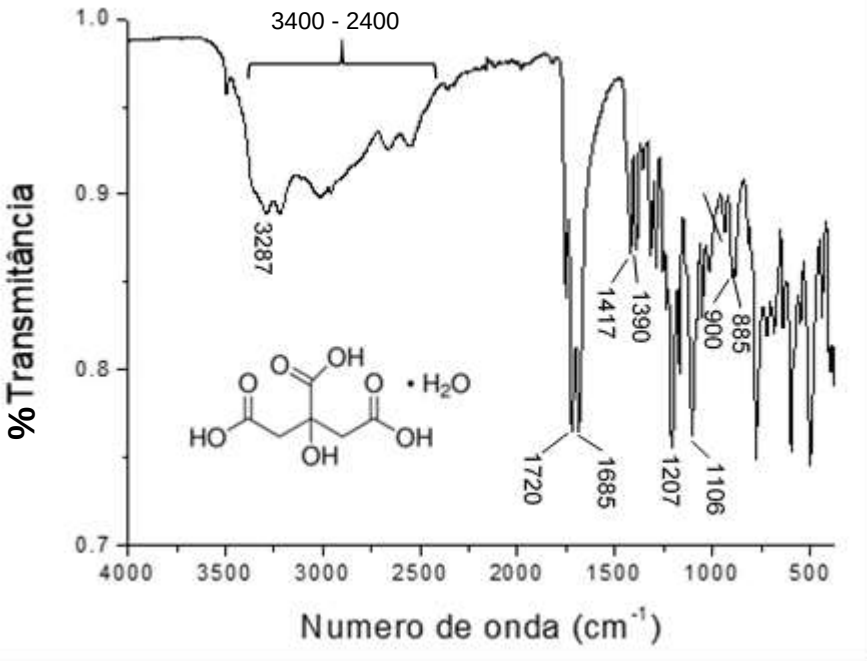

Figura 1.20 – Espectro de FTIR e estrutura do ácido cítrico.

Tabela 1.3 – Atribuição das bandas de absorção do FTIR para o ácido cítrico.

Número de onda (cm^{-1})	Vibração
3494	Deformação axial O-H (álcool)
3400-2400	Estiramento O-H
3287	Estiramento C-H
1720	Estiramento C=O
1685	Estiramento C=O
1417	Dobramento angular no plano CH_2
1390	Dobramento angular assimétrico C-O-H
1207	Estiramento C-O (ác. carboxílico)
1106	Estiramento C-O (álcool terciário)
900 e 885	Estiramento O-H fora do plano (ác. carboxílico)
934	Deformação angular fora do plano de O-H (álcool)

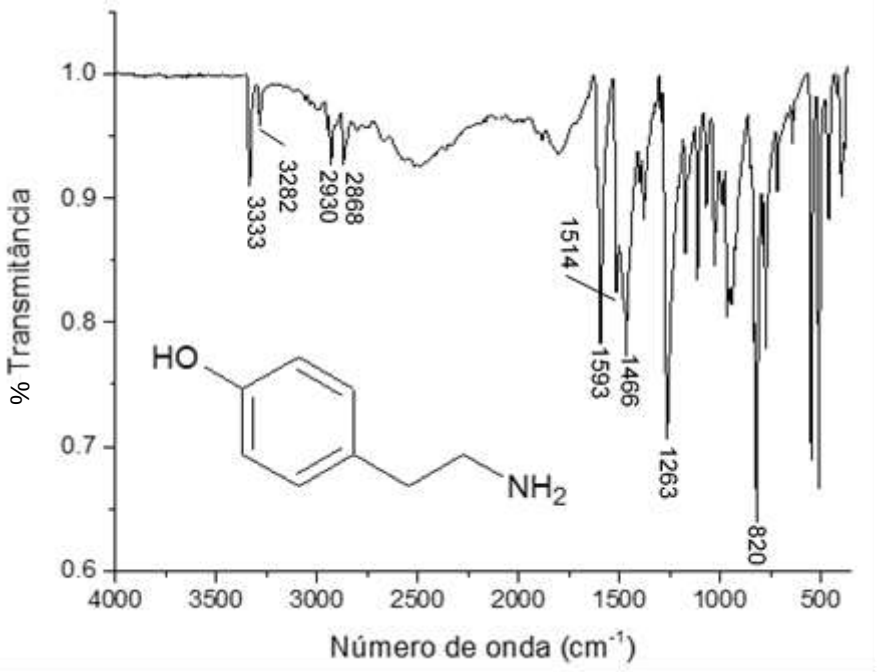

Figura 1.21 – Espectro de FTIR e estrutura da tiramina.

Tabela 1.4 – Atribuição das bandas de absorção do FTIR para a tiramina.

Número de onda (cm^{-1})	Vibração
3333	Estiramento N-H (amina primária)
3282	Estiramento N-H (amina primária)
2930	Estiramento C-H
2868	Estiramento C-H
1593	Dobramento NH_2 (amina primária)
1514	Dobramento anel aromático
1466	Dobramento anel aromático
1263	Dobramento C-O-H (Fenol)
820	Dobramento C-H fora do plano (aromático orto substituído)

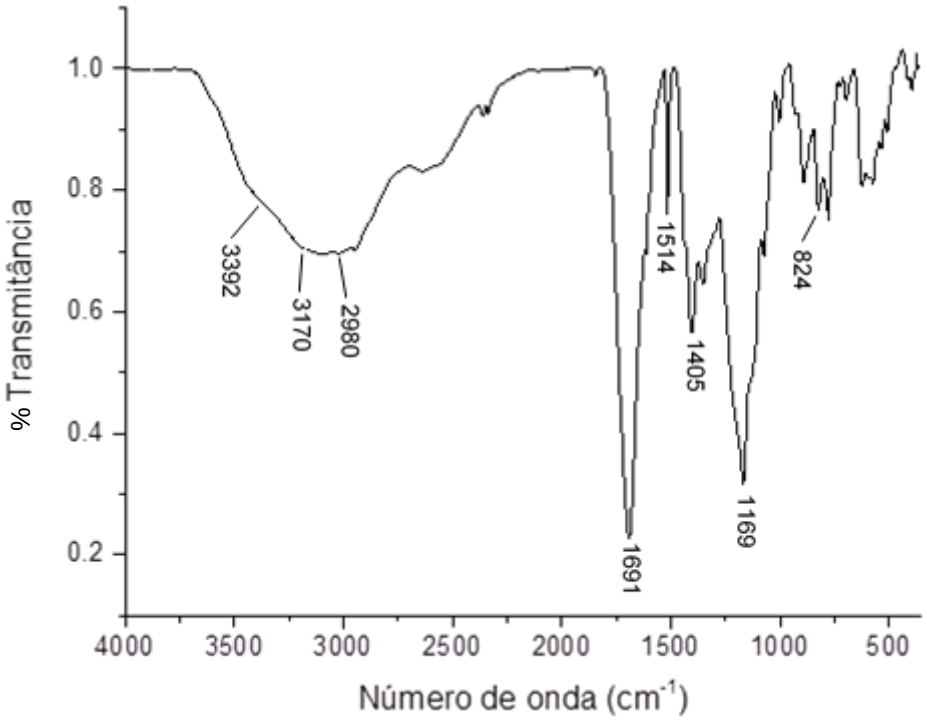

Figura 1.22 – Espectro de FTIR do CD.

Tabela 1.5 – Atribuição das bandas de absorção do FTIR para o CD.

Número de onda (cm^{-1})	Vibração
3392	Estiramento O-H
3170	Estiramento N-H (amida)
2980	Estiramento C-H
1691	Estiramento C=O (ác. carboxílico e/ou amida)
1514	Dobramento anel aromático ou estiramento C=C
1405	Estiramento C-N (amida)
1169	Estiramento C-O (éter)
824	Dobramento =C-H fora do plano (aromático orto substituído)

É possível observar que há diferenças entre os espectros dos precursores e do produto. O espectro do CD apresenta três bandas majoritárias em 3170, 1691 e 1405 cm^{-1}, que podem ser atribuídas ao estiramento das ligação N-H de amida, C=O de grupo carboxílico ou amida e C-N de amida, respectivamente, e estão ausentes nos espectros da tiramina e do ácido cítrico. Essas três bandas evidenciam que houve a reação de condensação entre o grupo carboxílico do ácido cítrico e o grupo amina da tiramina formando uma amida (Figura 1.23). A banda em 1169 cm^{-1} corresponde ao

estiramento C-O do éter formado durante a reação de polimerização do ácido cítrico. Também, as bandas em 1593 cm^{-1} no espectro da tiramina, atribuída ao dobramento da ligação N-H (NH_2) da amina primária, e 1720 e 1685 cm^{-1} no espectro do ácido cítrico, atribuído ao estiramento da ligação C=O, não aparecem no espectro do CD, indicando que os precursores foram consumidos na produção da nanopartícula, ou que as bandas do pouco que restou do ácido cítrico e da tiramina não reagidos foram encobertos pelas bandas do produto (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

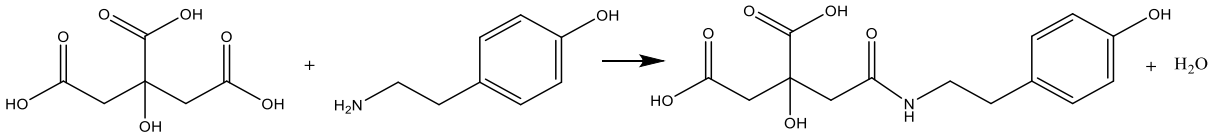

Figura 1.23 – Reação de condensação entre o ácido cítrico e a tiramina.

5.3.7. Espectroscopia de ressonância magnética de ^1H

Os precursores e o CD foram analisados utilizando ^{1}H-NMR. A Figura 1.24 ilustra o espectro de ^{1}H-NMR do ácido cítrico diidratado, a Figura 1.25 da tiramina e a Figura 1.26 do CD.

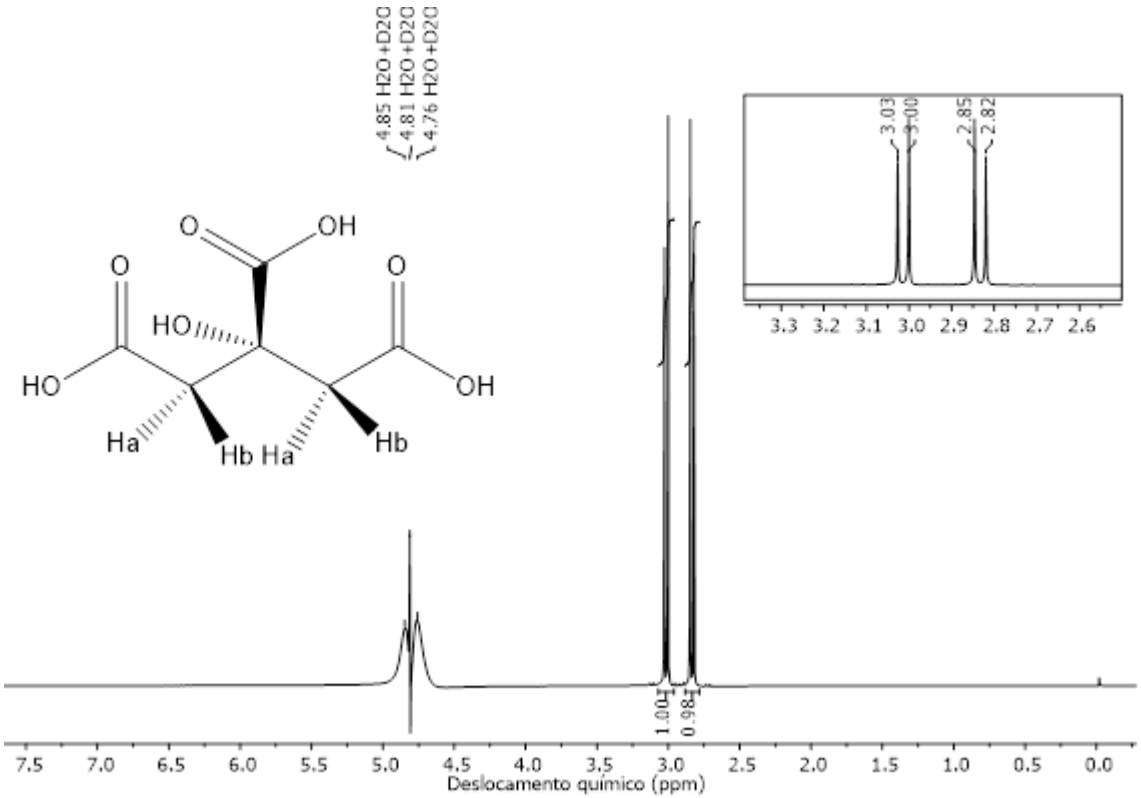

Figura 1.24 – Espectro de ^{1}H-NMR *presat* da solução de ácido cítrico (600MHz, D_2O).

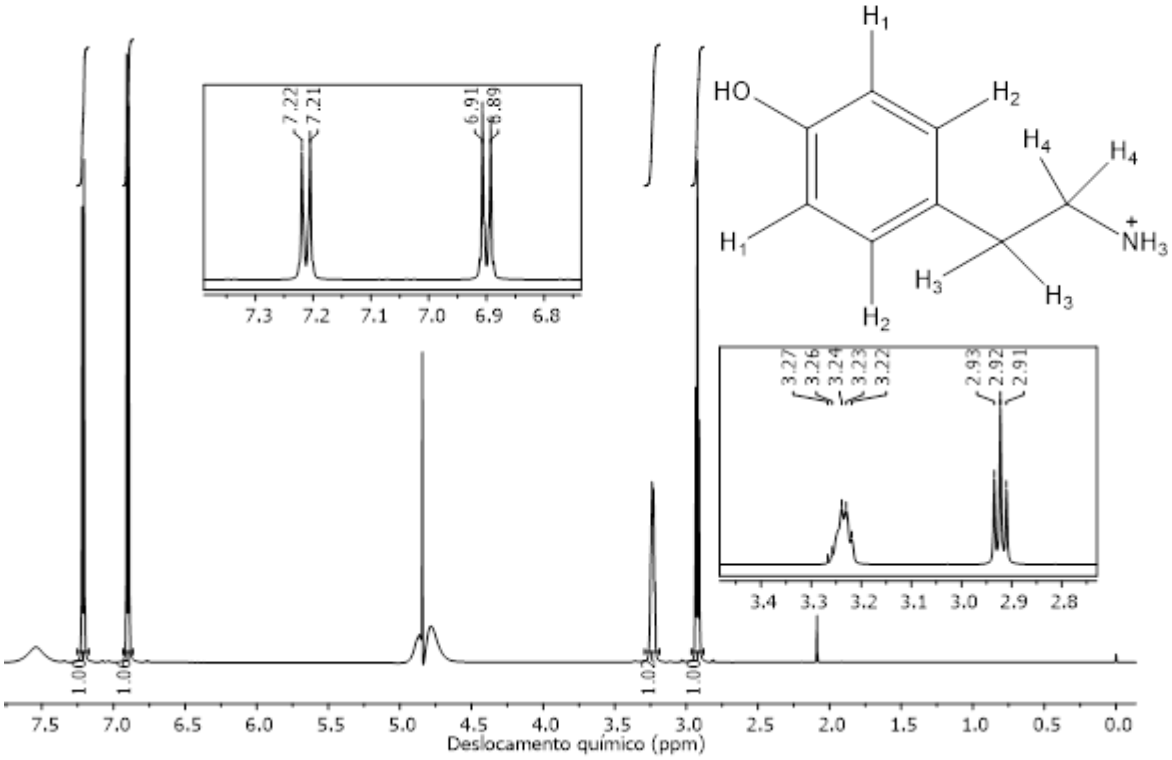

Figura 1.25 – Espectro de ¹H-NMR *presat* da solução de tiramina (600MHz, D_2O).

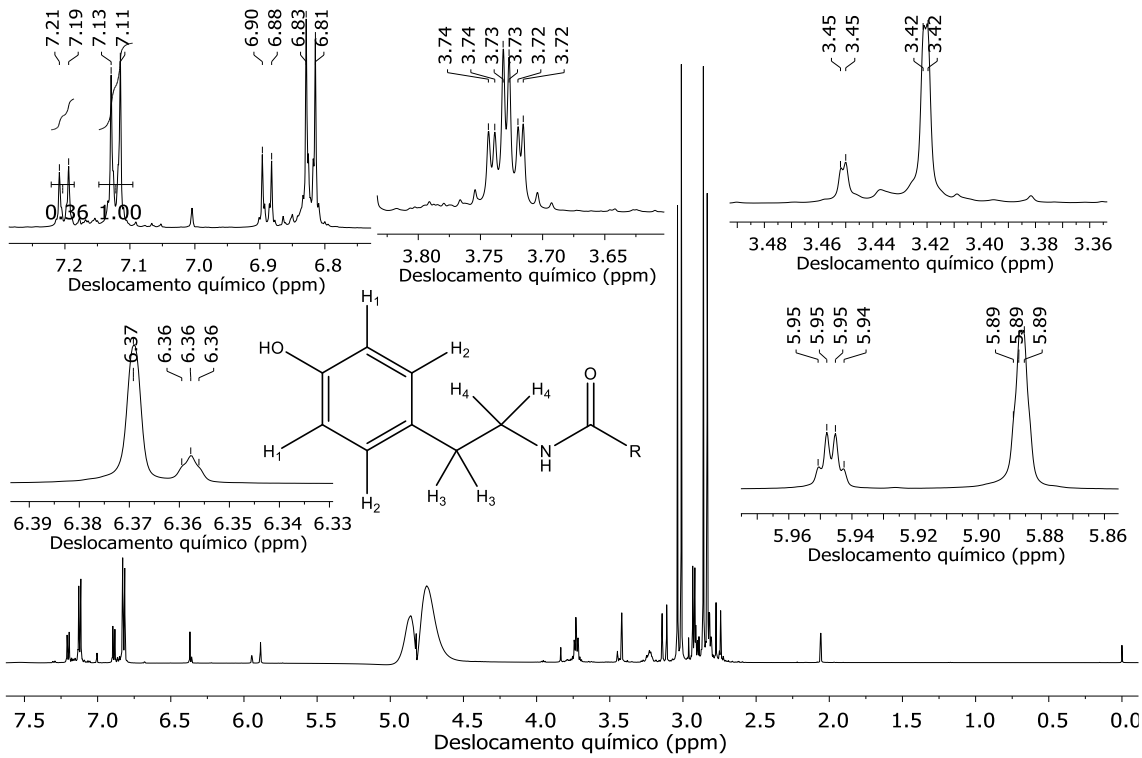

Figura 1.26 – Espectro de ¹H-NMR *presat* da dispersão de CD (600MHz, D_2O).

No espectro da Figura 1.24 há dois sinais referentes aos hidrogênios Ha e Hb

com deslocamentos químicos (δ) iguais a 3,00 (d) e 2,82 ppm (d). O ácido cítrico apresenta hidrogênios diastereotópicos, ou seja, hidrogênios ligados a um mesmo carbono, porém, com deslocamentos químicos diferentes. No caso do ácido cítrico, além de apresentar diferentes deslocamentos químicos, há acoplamento entre eles (J^1 = 15,6 Hz). Essa diferença ocorre devido à rotação restrita da molécula; os hidrogênios Ha estão localizados do mesmo lado da molécula que a hidroxila, enquanto que os hidrogênios Hb estão do lado oposto, um ambiente diferente dos Ha.

Em todos os espectros apresentados haverá os sinais com δ iguais a 4,76, 4,81 e 4,85 ppm que são referentes aos hidrogênios da água. Mesmo realizando a supressão da água durante os experimentos, ainda aparecem esses pequenos sinais.

Na Figura 1.25 há quatro sinais referentes aos hidrogênios da molécula. O sinal entre 2 e 2,5 ppm provavelmente é alguma impureza. Com δ iguais a 6,90 e 7,21 tem-se os dubletos referentes aos hidrogênios H_1 e H_2, respectivamente. Com δ igual a 2,92 ppm o tripleto referente aos hidrogênios H_3. Já com δ igual a 3,24 ppm o multipleto referente aos hidrogênios H_4 não tem sua multiplicidade bem definida devida devido ao acoplamento com os dois H_3 e os três hidrogênios da amina (meio ácido).

O espectro de NMR ^{1}H da dispersão de CD (Figura 1.26) evidencia a reação de condensação entre o ácido cítrico e a tiramina, formando uma amida, pelo aparecimento do sinal de deslocamento químico em 3,73 ppm (dt, 2H) correspondente ao hidrogênio H_4 que não está presente nos espectros dos precursores. Os sinais de deslocamento químico em 6,37 (s), 6,36 (t), 5,95 (q), 5,89 (t), 3,45 (d) e 3,42 ppm (d), correspondem aos hidrogênios das ligações duplas formadas durante a síntese, indicando a polimerização bem-sucedida do ácido cítrico. Os sinais em 7,20 (d, 2H) e 6,89 ppm (d, 2H) correspondentes ao hidrogénio H_2 e H_1, respectivamente, da tiramina não reagida e aos sinais em 7,12 (d, 2H) e 6,82 ppm (d, 2H) correspondentes a hidrogênio H_2 e H_1, respectivamente, da tiramina reagida presente no CD. É possível estimar o rendimento da incorporação de tiramina no CD pela razão entre a integral do sinal entre 7,11-7,13 ppm pela soma da integral entre 7,11-7,13 ppm mais entre 7,19-7,21 ppm. A estimativa foi de 1,00/(1,00 + 0,36) = 0,74 ou 74% da tiramina incorporada ao CD.

5.3.8. Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

A morfologia dos CD sintetizados foi avaliada utilizando a técnica de TEM. A imagem obtida (Figura 1.27) ilustra que as nanopartículas são aproximadamente esféricas, e dispersas sem agregação aparente. O histograma de tamanho de partícula foi construído a partir da imagem de TEM, apresentando tamanho médio de 17,5 nm, variando de 7,6 a 32,3 nm.

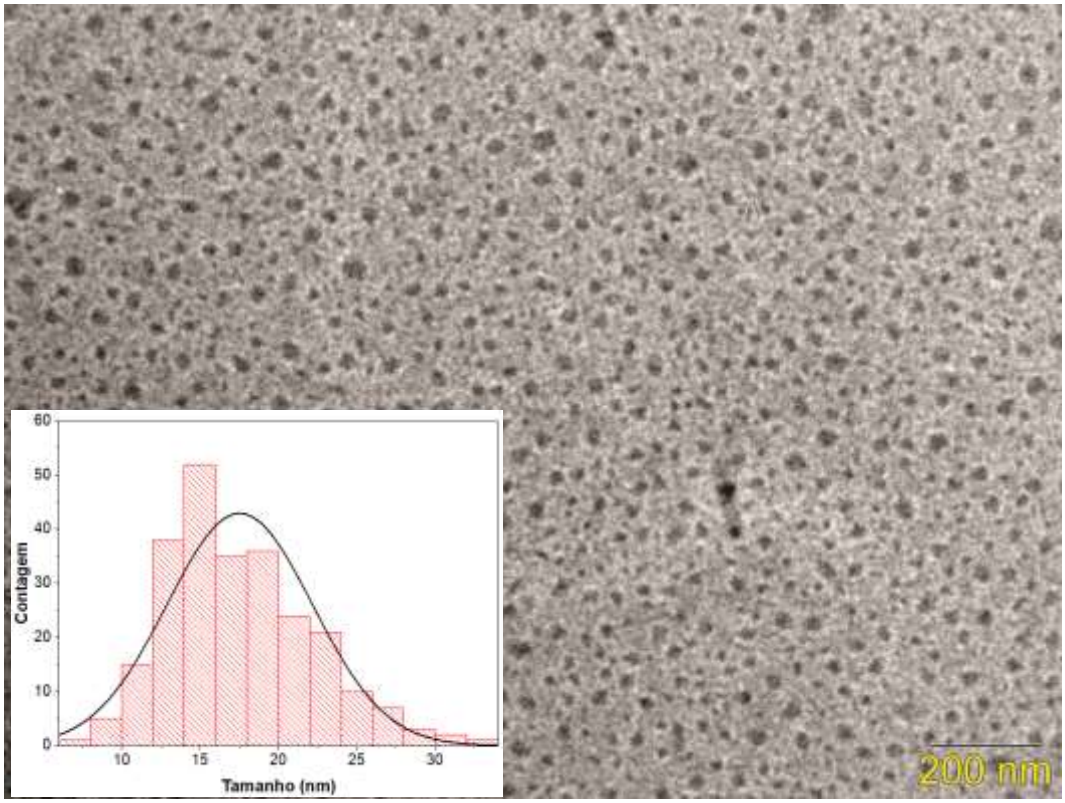

Figura 1.27 – Imagem de TEM do CD sintetizado. Distribuição do tamanho das nanopartículas.

5.3.9. Supressores

Foi analisada a resposta dos CD frente a uma série de compostos, conforme ilustra a Figura 1.28. Pode-se observar que a maioria dos compostos (Al^{3+}, Ag^{+}, Cd^{2+}, Cr^{3+}, Cu^{2+}, Fe^{3+}, Hg^{2+}, K^{+}, Li^{+}, Na^{+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}, ácido úrico, creatinina, glicose, lactato peroxidase, ureia e H_2O_2) não provocou supressão da fluorescência dos CD na concentração de 100 x 10^{-6} mol L^{-1} ($F/F_0 \geq 0,9$). Os íons Ag^{+} e Hg^{2+} apresentaram maior supressão (0,89 e 0,76, respectivamente), porém, esses íons não são encontrados nos fluidos biológicos, não podendo ser considerados interferentes nas

futuras análises. Ocorreu maior supressão na presença de H_2O_2+peroxidase. A redução do H_2O_2 catalisada pela peroxidase gera grupos hidroxil livres (•OH) que promovem a ligação cruzada entre os grupos fenólicos ou da tiramina com a formação de ligações C–C ou C–O–C, diminuindo a fluorescência dos CDs, provavelmente segundo o mecanismo da Figura 1.29 (LI, N. et al., 2016; PARK et al., 2010; SAKAI et al., 2010). Também, pode-se concluir que o CD não apresenta atividade de peroxidase, ou seja, não atua cataliticamente na reação de oxidação do substrato na presença de peróxido de hidrogênio, sendo necessária a utilização da enzima, pois houve supressão apenas na presença de H_2O_2.

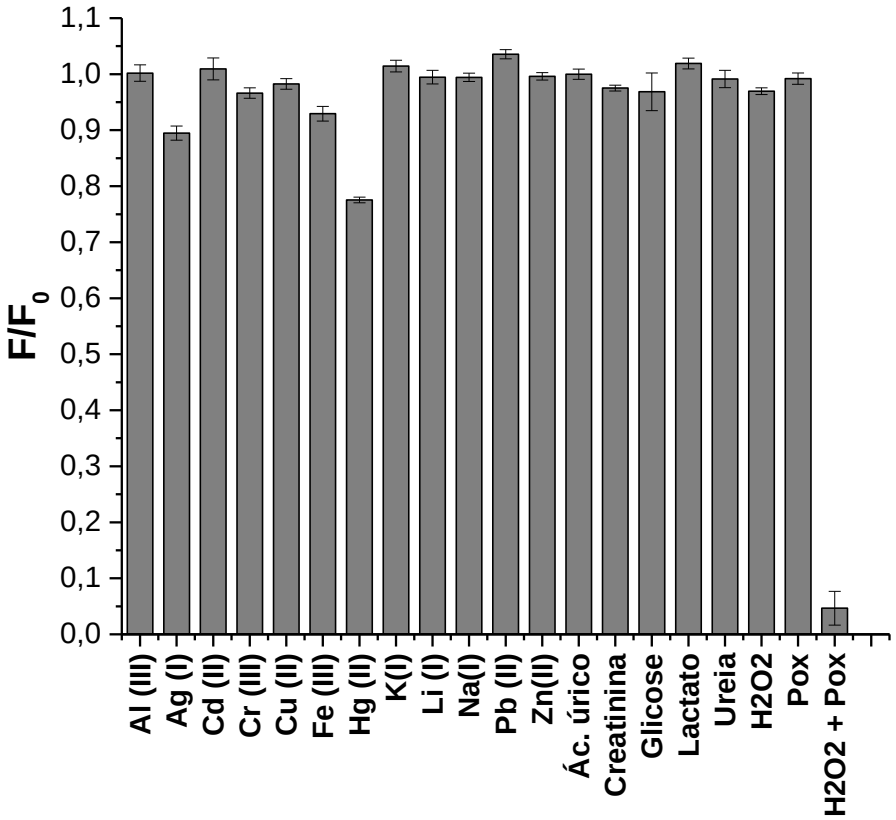

Figura 1.28 – Resposta dos CD frente aos compostos analisados. C = 100 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{H2O2} = 50 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{Pox} = 30 U mL^{-1} e n = 3.

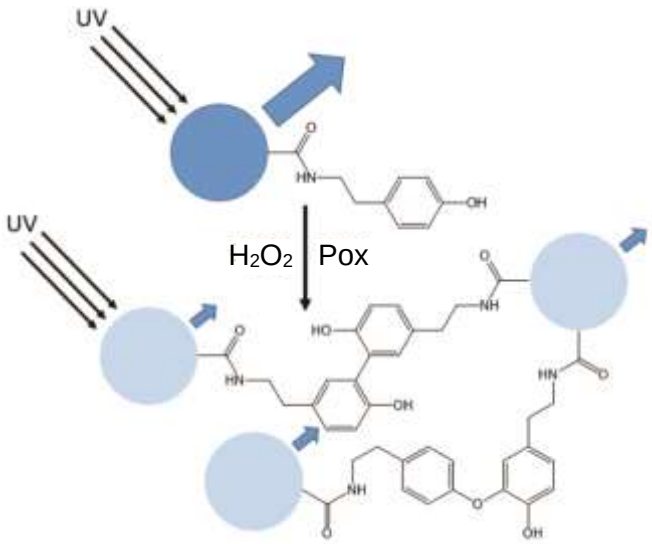

Figura 1.29 – Proposta de mecanismo para a supressão da fluorescência do CD em presença de H_2O_2 e Pox.

5.4. Calibração da detecção de fluorescência por imagem digital

5.4.1. Fluorescência do papel

O papel apresenta luminescência na região do azul quando iluminado com luz ultravioleta ($\lambda_{máx}$ = 365 nm) (PEDERSOLI JÚNIOR; LIGTERINK, 2001). Como os CDs utilizados nesse trabalho também emitem na região do azul, pode haver um problema de fluorescência de fundo que influenciaria nas medições. A solução utilizada para minimizar esse problema é fotografar os dispositivos analíticos em papel utilizando menores tempos de abertura do obturador da câmera fotográfica (ÁLVAREZ-DIDUK; OROZCO; MERKOÇI, 2017). O obturador é a parte da câmera fotográfica que abre e fecha permitindo a entrada de luz e, quanto menor o tempo de abertura, menos luz entra na câmera, formando uma imagem com menor luminosidade. A imagem formada utilizando menores tempos de abertura do obturador apresenta menor intensidade de fluorescência, devido à baixa exposição da fotografia (Tabela 1.6).

Tabela 1.6 – Imagem da fluorescência do papel em função do tempo de abertura do obturador.

Tempo de abertura do obturador (s)	1	0,8	0,6	1/2	1/3	1/4	1/5	1/6	1/8	1/10	1/13
Imagem											

Na Figura 1.30 é ilustrada a intensidade de fluorescência dos componentes R, G e B em função da velocidade do obturador (t = 1, 0,8, 0,6, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/8, 1/10 e 1/13 s). É possível observar que com a diminuição do tempo de abertura do obturador, houve diminuição na intensidade da fluorescência do papel. Tempos de abertura menores que 1/8 s apresentam intensidade de fluorescência do papel menores que 20 e a olho nu não é possível distinguir da porção que não apresenta fluorescência.

Dessa maneira, foi utilizado para os futuros experimentos a velocidade de obturação igual a 1/8 s. Também, como a câmera fotográfica foi utilizada no modo manual, os outros parâmetros foram previamente fixados em: ISO igual a 200 e abertura do diafragma igual a 4,5.

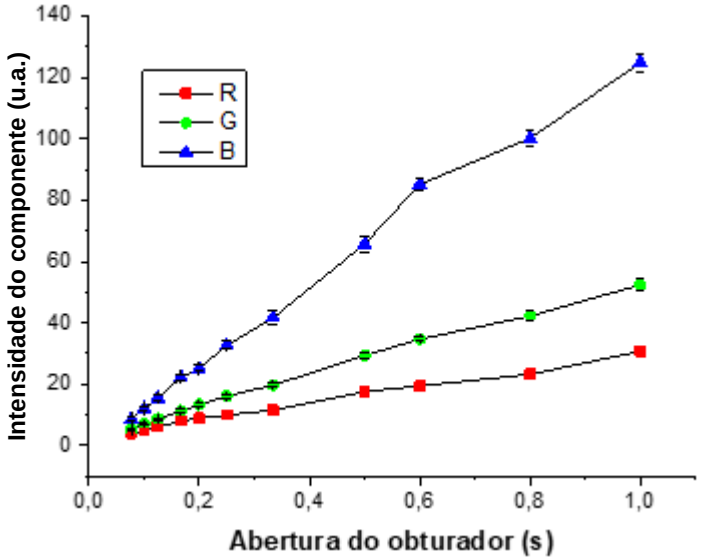

Figura 1.30 – Intensidade de fluorescência das componentes RGB em função da velocidade do obturador da câmera fotográfica. (t = 1, 0,8, 0,6, 1/2, 1/3, 1/4, 1/5, 1/6, 1/8, 1/10 e 1/13 s). n = 5.

5.4.2. Detecção por imagem digital em fluorimetria

A primeira descrição na literatura para a utilização de detecção utilizando

imagens digitais foi para aplicação envolvendo quimiluminescência de proteínas (MOMENI et al., 1999). Outros trabalhos quantitativos utilizando luminescência de CD e imagens digitais em plataforma de papel já foram descritos na literatura (ÁLVAREZ-DIDUK; OROZCO; MERKOÇI, 2017; LI, H. et al., 2016). Esses estudos demonstram a potencialidade da utilização de detecção de compostos luminescentes utilizando a imagem digital.

Para confirmar a possibilidade da utilização da detecção por imagens digitais utilizando a câmara de UV montada no laboratório, foi construída uma curva analítica para o padrão de sulfato de quinino em meio ácido (Figura 1.31). A faixa linear utilizada foi de 2,50 x 10^{-6} a 25,0 x 10^{-6} mol L^{-1}. Foram utilizados spot-test em papel de formato circular com 7 mm de diâmetro (Figura 1.32) com a aplicação de 4 µL de solução em cada spot para as análises.

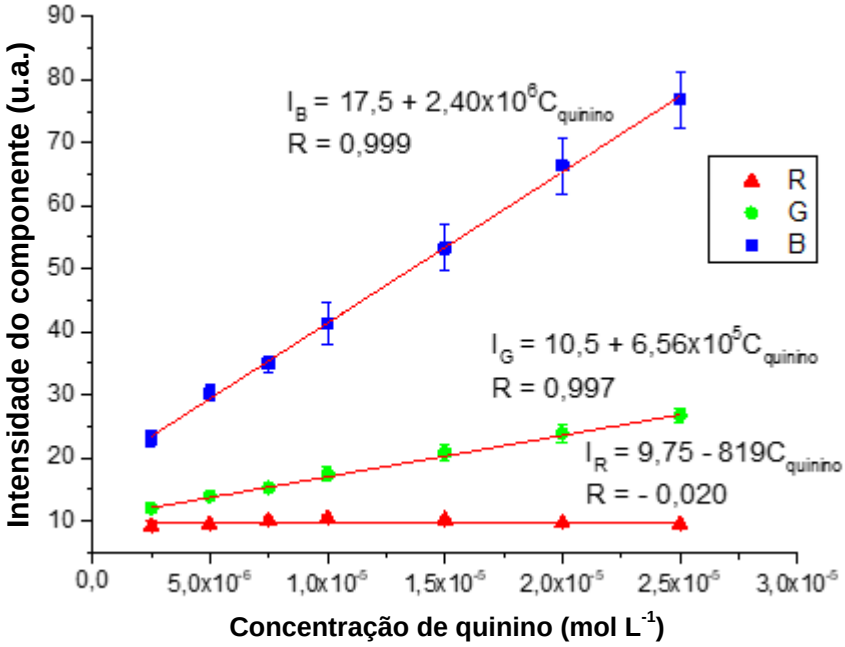

Figura 1.31 – Curva analítica de concentração de quinino em função da intensidade das componentes RGB.

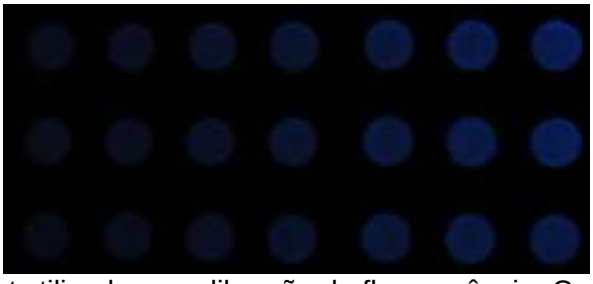

Figura 1.32 – *Spot-test* utilizado na calibração da fluorescência. Concentrações de sulfato de quinino em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} iguais a 2,50, 5,00, 7,50, 10,0 15,0, 20,0 e 25,0 x 10^{-6} mol L^{-1}.

A solução de quinino em meio de H_2SO_4 0,1 mol L^{-1} apresenta fluorescência na região do azul quando excitado em 365 nm, como pode se observar na Figura 1.32. Como era de se esperar, a componente de cor que apresentou maior sensibilidade foi o azul (B), pois na fluorescência é medida a emissão, ao contrário da absorbância que é observada a coloração complementar a cor absorvida.

5.5. Detecção por imagem digital – sensibilidade dos canais

A detecção da fluorescência dos CD foi realizada utilizando imagem digital. Para isso a coloração da imagem foi decomposta em três componentes: R (vermelha), G (verde) e B (azul). Para o CD sintetizado, o componente do canal que apresentou maior sensibilidade foi o azul (B), ou seja, para a componente azul, houve maior diferença entre a média do branco e da amostra (I_0-I) e maior supressão da fluorescência (I/I_0), como pode ser observado na Tabela 1.7. Isso já era esperado, pois o reagente apresenta máximo de emissão na região do azul. Dessa forma, a detecção por imagem digital utilizando o CD como reagente foi realizada utilizando a componente azul (B).

Tabela 1.7 – Variação dos componentes de cor para o branco da reação e para uma amostra. C_{H2O2} = 10 x 10^{-6} mol L^{-1}, $C_{peroxidase}$ = 30 U mL^{-1}.

Componente	I_0	I	I_0-I	I/I_0
R	10,053	9,937	0,116	0,988
G	39,238	23,182	16,056	0,591
B	123,613	53,099	70,514	0,430

5.6. Otimização da concentração da dispersão de trabalho de CD

Devido à baixa fluorescência apresentada pelo papel é necessário utilizar a máquina fotográfica em modo de baixa exposição para minimizar a possível interferência do próprio papel, como demonstrado no item 5.4. Com isso, é necessário utilizar o reagente fluorescente constituído de CD mais concentrado do que quando se utiliza o espectrofluorímetro.

Foi estudada qual a concentração de CD resulta na melhor resposta analítica. Para isso, foi utilizado como analito H_2O_2, que é o produto das reações enzimáticas

dos analitos de interesse. Os reagentes utilizados foram preparados diluindo-se a dispersão estoque de CD em balões de 5,00 mL, conforme descrito no item 3.3.5. Reagentes menos concentrados que os utilizados apresentavam intensidade de fluorescência muito baixa para serem utilizados. Os reagentes foram adicionados ao spot de papel juntamente com a solução de peroxidase e os resultados obtidos das análises podem ser encontrados na Figura 1.33.

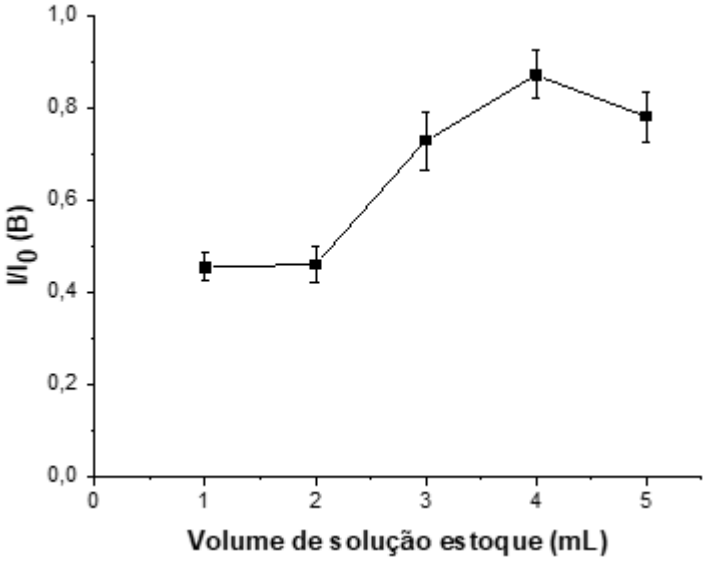

Figura 1.33 – Supressão da fluorescência com o aumento da concentração de CD no reagente. C_{H2O2} = 10 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{Pox} = 30 U mL^{-1}.

Com a diminuição da concentração do reagente houve um aumento na supressão, o que é desejado. Isso acontece pois, como a supressão do CD (Figura 1.29) ocorre através da interação das nanopartículas, reagentes com maior concentração apresentam maior número de nanopartículas, necessitando de uma quantidade maior de analito para apresentarem a mesma supressão quando comparados com reagentes de menor concentração. As soluções de reagente com 1,00 e 2,00 mL da dispersão estoque de CD apresentam os melhores resultados de supressão, porém, a dispersão menos concentrada apresenta menor intensidade de fluorescência, sendo que a concentração de 10 x 10^{-6} mol L^{-1} de H_2O_2 proporcionou uma supressão com intensidade de fluorescência próximo ao do papel, impossibilitando aumentar a faixa de trabalho. Dessa maneira, foi selecionado o reagente com volume de 2,00 mL da dispersão estoque de CD diluído em balão de 5,00 mL para ser utilizada no decorrer do estudo, uma vez que apresenta boa sensibilidade e possibilita trabalhar com faixas de concentração maiores que a do reagente menos concentrado.

5.7. Curvas de adição de padrão

5.7.1. Construção das curvas de adição de padrão

O uso de curvas de adição de padrão ao invés de calibração com padrão externo traz algumas vantagens para a análise (CHAPLAN; MITCHELL; MARTINEZ, 2014),(KAPPI et al., 2017). Quando há significativo efeito de matriz na amostra, ela pode influenciar o sinal analítico, levando a resultados não confiáveis e introduzir erros. Com a utilização de método da adição de padrão, o efeito matriz da amostra será constante em toda a análise, independente qual sua influência na resposta analítica. Variações de iluminação e a posição do papel no momento da aquisição da imagem podem afetar os resultados obtidos pela detecção por imagem digital. No dispositivo de papel proposto, os ensaios com branco, amostra e amostra com concentrações crescentes de glicose são realizados no mesmo dispositivo, desde a aplicação até a captura da imagem todos estão nas mesmas condições, consequentemente, torna a metodologia mais confiável.

A determinação de glicose é baseada na reação enzimática utilizando glicose oxidase e peroxidase. Em pH 6 e presença de O_2, a GOx reage com a glicose produzindo ácido glucônico e H_2O_2 (Figura 1.34).

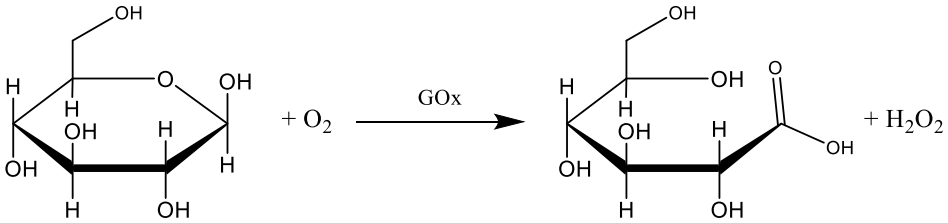

Figura 1.34 – Reação de oxidação da glicose utilizando a enzima glicose oxidase em meio contendo oxigênio formando ácido glucônico e peróxido de hidrogênio.

Reações envolvendo enzimas oxidase que necessitam de O_2 para acontecerem são favorecidas quando conduzidas em plataformas de papel. Sua grande área de contato com a atmosfera, e consequentemente, com o oxigênio presente no ar necessário para a reação, a disponibilidade de O_2 não se torna o fator limitante da reação. Após a oxidação da glicose, o H_2O_2 produzido na presença de Pox promove a supressão da fluorescência dos CD como descrito na Figura 1.29.

A supressão da fluorescência (I/I_0) da componente azul (B) foi traçada em função da concentração de glicose adicionada, em mol L^{-1}. A concentração de glicose

na amostra (C_{GLI}) foi obtida através da equação de regressão linear, quando $I/I_0 = 1$ (Figura 1.35).

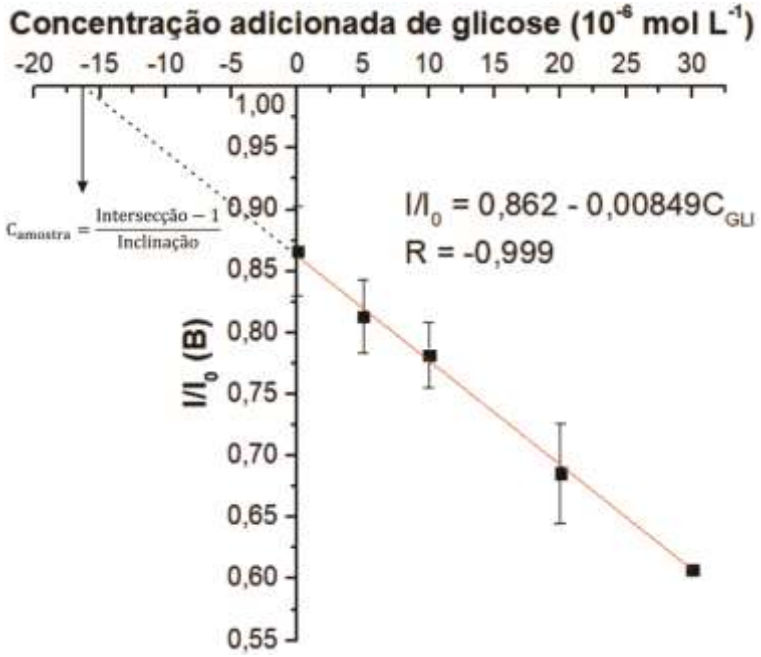

Figura 1.35 – Curva de adição de padrão e a obtenção da concentração de glicose na amostra. n = 3.

5.7.2. Validação do método

O método proposto foi utilizado para determinar a concentração de glicose em amostras certificados para aplicações clínicas (Urina I, Urina II, Soro I e Soro II). As amostras foram previamente preparadas como recomendada no rótulo e diluídas com água deionizada, conforme o item 3.3.8. As concentrações de glicose determinadas nas amostras estão descritas na Tabela 1.8.

Tabela 1.8 – Determinação de glicose em amostras certificadas.

Amostra	C_{GLI} (mg dL^{-1})[a] Proposto	C_{GLI} (mg dL^{-1}) Amostra Certificada	t calculado[b]
Urina I	11,3 ± 1,1	11,3 ± 0,7	0,040
Urina II	72,6 ± 9,0	76,5 ± 5,7	1,197
Soro I	86 ± 6	91 ± 8	1,060
Soro II	165 ± 12	164 ± 9	0,149

[a]Média de três determinações.
[b]O valor crítico para 95% de intervalo de confiança e com dois graus de liberdade é 4,303.

As concentrações de glicose para as amostras obtidas pelo método proposto apresentaram erros entre 0,15 e 5,63%. Os resultados obtidos foram comparados estatisticamente com os valores certificados pelo PNQC e os valores de t de *Student* calculados não excederam o valor crítico (4,303) para 95% de intervalo de confiança e dois graus de liberdade, mostrando que não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos para o material certificado pela plataforma proposta e o presente no rótulo, confirmando a exatidão do método proposto.

5.8. Dispositivo analítico microfluídico 3D em papel (3D-µPAD)

Para o desenvolvimento desse trabalho foram utilizados os dispositivos analíticos 3D, os quais além da solução percorrer os canais hidrofílicos em uma camada de papel (2D), são percorridas diversas camadas de papel, sendo considerado um dispositivo 3D ou origami, devido à dobradura no papel necessária para a análise. Esse tipo de dispositivo apresenta a vantagem de aumentar a capacidade de múltiplas análises de dispositivos de uma camada e diminui uma das principais desvantagens dos µPAD que é a perda de solução por evaporação, pois ao trabalhar com camadas de papel sobrepostas, a área de contato com o ambiente diminui, diminuindo a perda por evaporação. O 3D-µPAD utilizado nesse trabalho foi desenvolvido por Morbioli e colaboradores (MORBIOLI; MAZZU-NASCIMENTO; MILAN; et al., 2017). Nesse trabalho, os autores propuseram um design para o dispositivo 3D, no qual, há uma melhor homogeneidade na distribuição da amostra e, consequentemente, os *spots* da última camada de papel, onde ocorre a detecção, também se tornam mais homogêneos. Para isso foram desenhados canais hidrofílicos, os quais a solução de amostra percorre, de forma que independentemente da zona final alcançada pela solução há a mesma resistência hidrodinâmica a ser vencida, levando a uma maior homogeneidade.

5.8.1. Volume utilizado no 3D-µPAD

A solução de corante amaranto foi utilizada para avaliar qual o volume necessário para preencher todo o dispositivo analítico. Na Figura 1.36 está ilustrado volumes crescentes de corante adicionados ao dispositivo. 35 µL foram suficientes

para preencher todos os canais hidrofílicos e permear todos os *spots* da última camada.

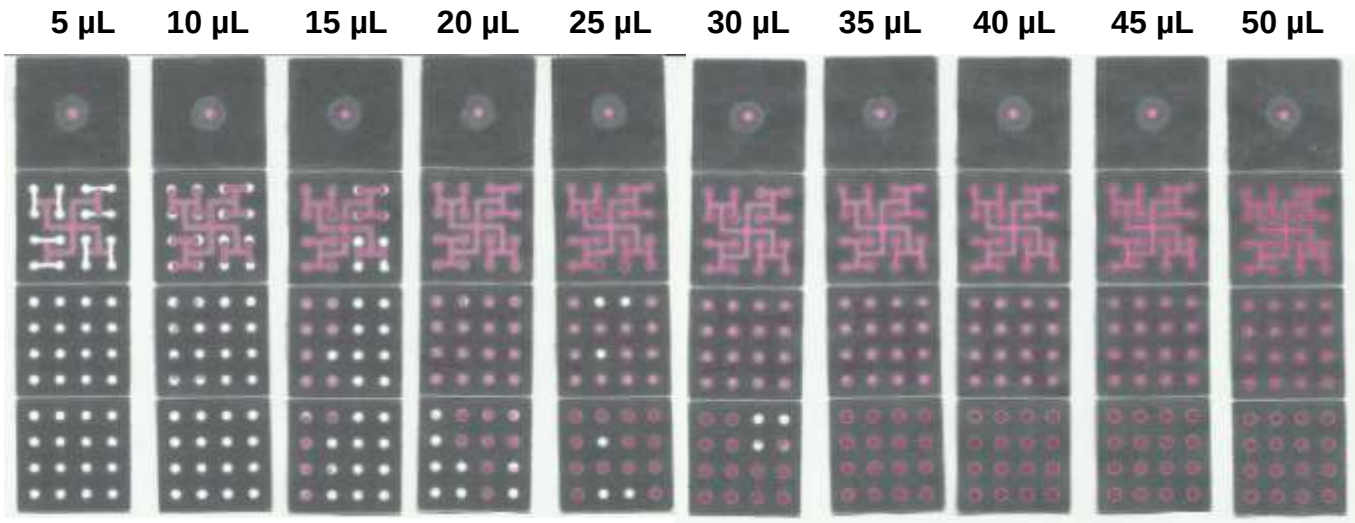

Figura 1.36 – Diferentes volumes de solução de corante amaranto adicionados ao µPAD. Da esquerda para a direita os volumes utilizados foram de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 µL de solução de corante amaranto.

A partir de 35 µL de amostra todos os volumes são capazes de completar o dispositivo analítico. Além disso, com a evaporação do solvente na última camada que está exposta ao ar, o excesso de amostra proporciona um efeito de pré-concentração. Porém, com o excesso de solvente, o reagente fluorescente, que é depositado na última camada, foi eluído para as demais camadas, diminuindo a intensidade da fluorescência detectada e perdendo informações analíticas. Pode-se observar na Figura 1.37 que a partir de 50 µL de amostra há diminuição na intensidade de fluorescência do reagente fluorescente. Dessa forma, optou-se por utilizar o volume de amostra de 45 µL, pois preencheu totalmente o dispositivo, não houve diminuição significativa da fluorescência ocasionada por eluição e houve efeito de pré-concentração devido à evaporação do solvente da amostra na última camada.

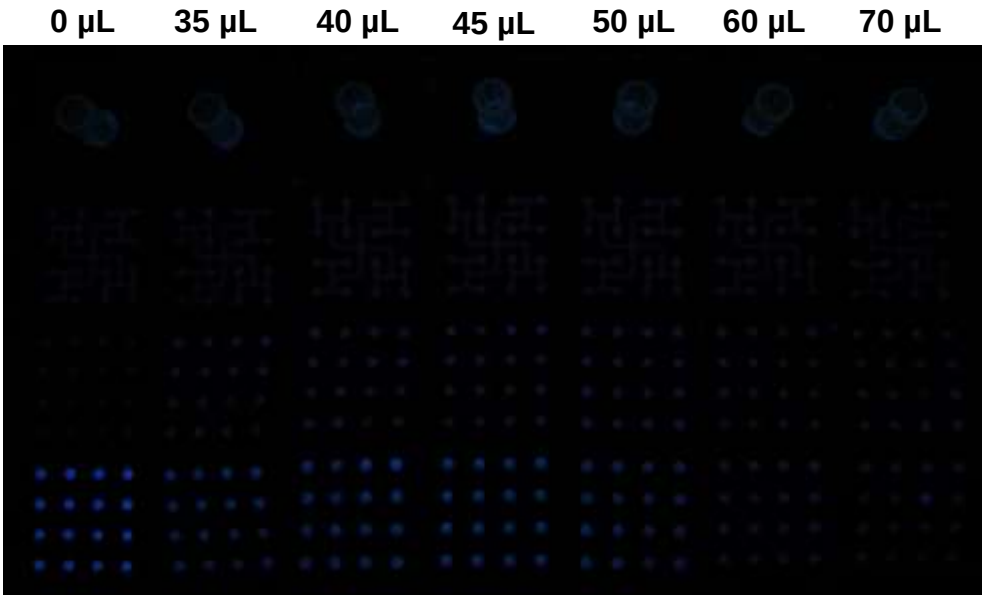

Figura 1.37 – Diferentes volumes de água deionizada adicionados ao µPAD. Da esquerda para a direita os volumes utilizados foram de 0, 35, 40, 45, 55, 65, 75 e 80 µL de água deionizada.

5.9. Determinação de glicose

5.9.1. Especificidade da reação

A determinação da glicose foi realizada pela supressão da fluorescência do CD causada pela produção de H_2O_2 na reação de oxidação da glicose na presença de glicose oxidase (Figura 1.34).

As reações enzimáticas são conhecidas por serem especificas para o substrato alvo. Para comprovar essa afirmação, os 3D-µPAD contendo os reagentes glicose oxidase e peroxidase foram utilizados para analisar soluções de diferentes açúcares, de ácido úrico e de lactato.

Como é possível observar na Figura 1.38, houve supressão dos CD apenas na presença de glicose, sendo que não houve alteração significativa na presença de outros açúcares, ácido úrico ou lactato. Pode-se então confirmar que o reagente e, consequentemente, a reação são específicos para a glicose.

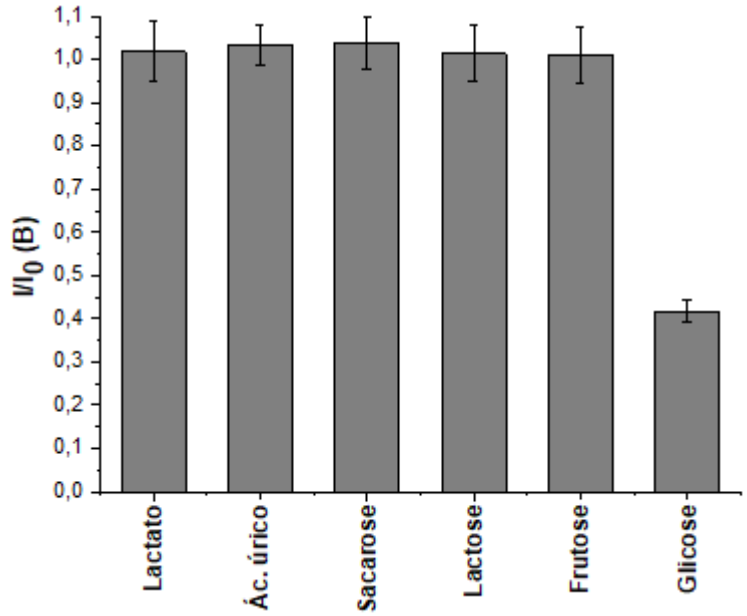

Figura 1.38 – Resposta dos CD frente aos compostos analisados na presença de GOX e Pox. C = 50,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{GOx} = 120 U mL^{-1} e C_{Pox} = 30 U mL^{-1}.

5.9.2. Curva analítica

Foi construída uma curva analítica de concentração de glicose, variando de 5,00 a 50,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, em função da supressão, utilizando a componente azul (B). A reta de regressão linear é descrita pela equação $I/I_0 = 0,947 – 6,90 \times 10^3 C_{GLI}$, com coeficiente de correlação igual a -0,997, indicando boa correlação linear (Figura 1.39).

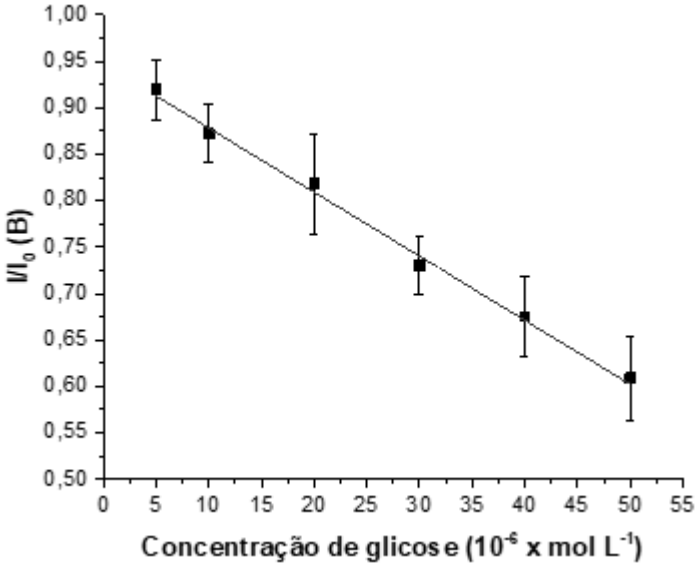

Figura 1.39 – Curva analítica de supressão em função da concentração de glicose. C_{GLI} = 5,00 a 50,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{GOx} = 120 U mL^{-1} e C_{Pox} = 30 U mL^{-1}. Componente de cor = azul (B).

O limite de detecção, LD, foi calculado como definido pela IUPAC (LONG; WINEFORDNER, 1983) de acordo com Equação 1.4. Dessa forma, o valor de LD para o método proposto foi de 2,60 x 10^{-6} mol L^{-1}.

$$\mathrm{LD} = \frac{3 \text{ x } \mathrm{SD}_{\mathrm{branco}}}{\text{inclinação da curva analítica}} \qquad \text{Equação 1.4}$$

A repetibilidade da curva analítica foi expressa pela porcentagem do desvio padrão relativo (%RSD) (TAVERNIERS, 2004) e é definida pela Equação 1.5:

$$\%\mathrm{RSD} = \frac{100 \text{ x } \mathrm{SD}}{\bar{x}} \qquad \text{Equação 1.5}$$

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 a repetibilidades intra-dia nas concentrações de 10 x 10^{-6} e 40 x 10^{-6} mol L^{-1} foram de 3,82 % e 5,78 %, respectivamente, enquanto que para a repetibilidade inter-dias foram de 5,08 % e 6,61 %, respectivamente.

5.9.3. Aplicação em amostra de saliva

A metodologia desenvolvida foi aplicada em quatro amostras de saliva coletadas e filtradas como descrito no item 4.8. O preparo da amostra se fez necessário, pois se a amostra de saliva fosse colocada diretamente no dispositivo, ou fosse apenas diluída, a sua viscosidade não permitia que ela fosse distribuída pelos canais hidrofílicos do dispositivo por capilaridade. Porém, a coleta e preparo de amostra propostos são simples e rápidos, envolvendo apenas a coleta da saliva com um algodão hidrófilo e filtragem utilizando papel de filtro e uma seringa. Utilizando esse procedimento a viscosidade da amostra diminuiu e foi possível analisar as amostras de saliva sem nenhum pré-tratamento ou *clean-up* moroso e complicado.

Na Tabela 1.9 estão descritos os resultados obtidos pelo método desenvolvido. As concentrações de glicose encontradas nas amostras de saliva estão em concordância com as descritas na literatura para indivíduos saudáveis em jejum (21 – 38 x 10^{-6} mol L^{-1}) (SENER et al., 2009).

Tabela 1.9 – Aplicação do método proposto em amostras de saliva.

Amostra	C_{GLI} (10^{-6} mol L^{-1})	C_{GLI} (mg dL^{-1})
Saliva 1	25 ± 1	0,45 ± 0,02
Saliva 2	31 ± 2	0,56 ± 0,04
Saliva 3	35 ± 3	0,62 ± 0,06
Saliva 4	22,3 ± 0,6	0,40 ± 0,01

5.9.4. Adição de padrão e recuperação

A exatidão do método foi avaliada pelo ensaio de adição de padrão e recuperação. A amostra de saliva foi fortificada com três níveis de concentrações de glicose iguais a 10,0 x 10^{-6}, 20,0 x 10^{-6} e 30,0 x 10^{-6} mol L^{-1}. A recuperação foi obtida pela razão da diferença das concentrações da amostra fortificada e não fortificada pela concentração adicionada, em porcentagem. Os valores de recuperação obtidos foram de 93, 108 e 104%, respectivamente para as três concentrações, demonstrando a exatidão da metodologia.

5.9.5. Aplicação em amostras certificadas de soro

O método proposto foi utilizado para determinar a concentração de glicose em amostras certificados para aplicações clínicas. O método proposto foi utilizado para determinar a concentração de glicose em amostras certificadas para aplicações clínicas (Soro I e Soro II). As amostras foram previamente preparadas como recomendada no rótulo e diluídas com água deionizada, conforme o item 3.3.8. As concentrações de glicose determinadas nas amostras estão descritas na Tabela 1.10.

Tabela 1.10 – Determinação de glicose em amostras certificadas.

Amostra	C_{GLI} (mg dL^{-1}) Proposto	C_{GLI} (mg dL^{-1}) Amostra Certificada	t calculado[a]
Soro I	82 ± 3	80 ± 3	1,481
Soro II	196 ± 11	193 ± 15	0,401

[a]O valor crítico para 95% de intervalo de confiança e com dois graus de liberdade é 4,303.

Os resultados foram comparados estatisticamente com os valores certificados pelo PNQC. Os valores de t de *Student* calculados não excederam o valor crítico

(4,303) para 95 % de intervalo de confiança e dois graus de liberdade, mostrando que não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos pela metodologia proposta e o material certificado, confirmando a exatidão do método proposto.

5.10. Determinação de lactato

5.10.1. Especificidade da reação

A determinação do lactato também foi realizada pela supressão da fluorescência do CD causada pela produção de H_2O_2 na reação de oxidação do lactato na presença de lactato oxidase (Figura 1.40).

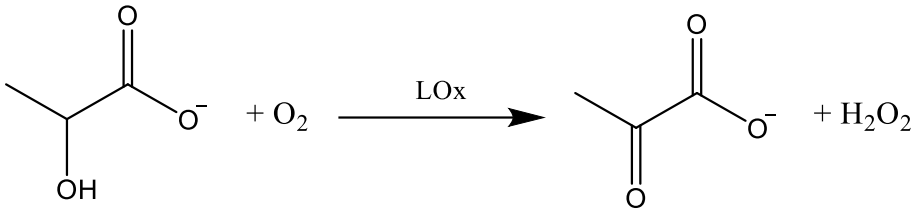

Figura 1.40 – Reação de oxidação do lactato utilizando a enzima lactato oxidase em meio contendo oxigênio formando piruvato e peróxido de hidrogênio.

Como é possível observar na Figura 1.41 houve supressão dos CD apenas na presença de lactato, sendo que não houve alteração significativa na presença de glicose, ácido úrico, piruvato e ácido ascórbico. Pode-se então confirmar que o reagente e, consequentemente, a reação são seletivos para o lactato.

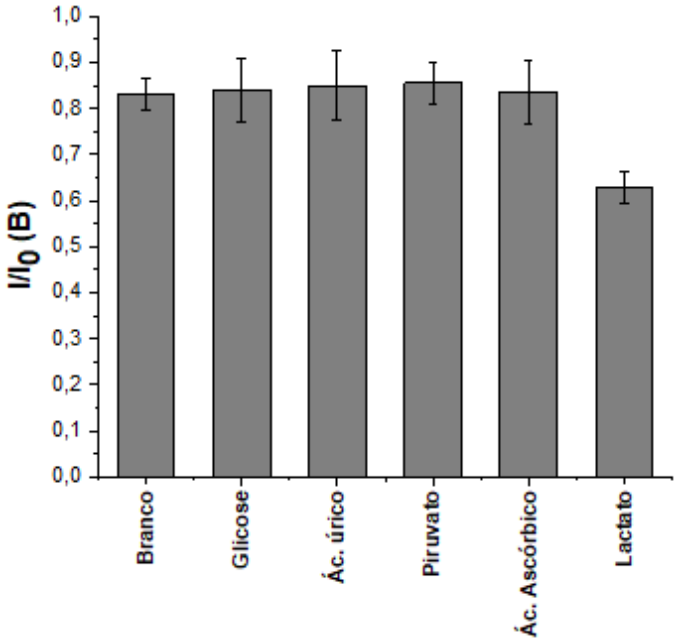

Figura 1.41 – Resposta dos CD frente aos compostos analisados. C = 20,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{LOx} = 50 U mL^{-1} e C_{Pox} = 30 U mL^{-1}.

5.10.2. Curva analítica

Foi construída uma curva analítica de concentração de lactato, variando de 2,50 a 20,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, em função da supressão, utilizando a componente azul. A reta de regressão linear é descrita pela equação I/I_0 = 0,830 – 10,3 x $10^3 C_{LAC}$, com coeficiente de correlação igual a -0,998, indicando boa correlação linear (Figura 1.42). Foi possível observar que o coeficiente linear da reta foi menor que 1. Isso ocorreu, pois, a análise apenas na ausência do analito, mas na presença de LOx, apresentou menor intensidade de fluorescência que o branco da reação (apenas ausência de LOx). Assim, provavelmente o LOx provocou certa supressão na fluorescência do CD, o que não influenciou na análise do lactato, pois a concentração de LOx era constante em todas as análises.

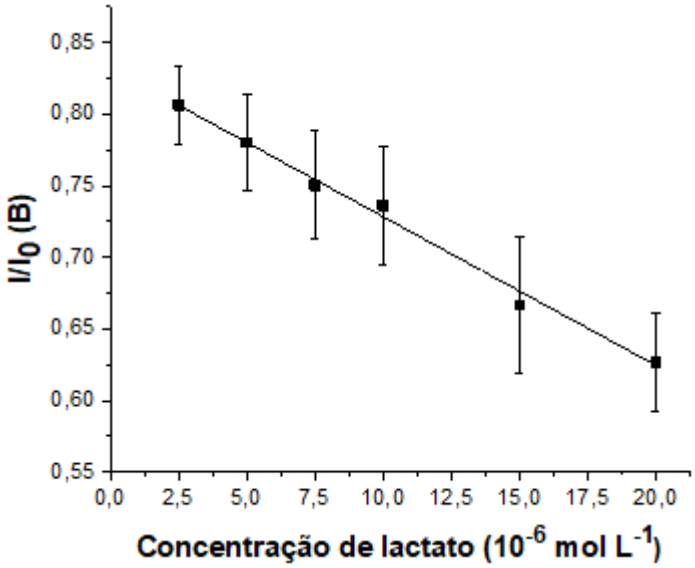

Figura 1.42 – Curva analítica de supressão em função da concentração de lactato. C_{LAC} = 2,50 a 20,0 x 10^{-6} mol L^{-1}, C_{LOx} = 50 U mL^{-1} e C_{Pox} = 30 U mL^{-1}. Componente de cor utilizada = azul (B).

O limite de detecção, LD, foi calculado como definidos pela IUPAC (LONG; WINEFORDNER, 1983) seguindo a Equação 1.4. O valor de LD para o método proposto foi de 8,13 x 10^{-7} mol L^{-1}.

A repetibilidade da curva analítica foi expressa pela porcentagem do desvio padrão relativo (%RSD) (Equação 1.5) (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004). 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; GMBH,

1999). Os valores obtidos de %RSD para a repetibilidades intra-dia nas concentrações de 5,0 x 10^{-6} e 15,0 x 10^{-6} mol L^{-1} foram de 5,43 % e 4,84 %, respectivamente, enquanto que para a repetibilidade inter-dias foram de 5,88 % e 5,85 %, respectivamente.

5.10.3. Aplicação em amostra de saliva

O método desenvolvido foi aplicado em quatro amostras de saliva coletadas e filtradas como descrito no item 3.7. Na Tabela 1.11 estão descritos os resultados obtidos pelo método desenvolvido. As concentrações de lactato encontradas nas amostras de saliva estão em concordância com as descritas na literatura para indivíduos saudáveis (1,0 – 7,5 x 10^{-4} mol L^{-1}) (CLAVER; MIRÓN; CAPITÁN-VALLVEY, 2009; TÉKUS et al., 2012)

Tabela 1.11 – Aplicação do método proposto em amostras de saliva.

Amostra	C_{LAC} (10^{-4} mol L^{-1})
Saliva 1	4,0 ± 0,3
Saliva 2	5,4 ± 0,4
Saliva 3	4,4 ± 0,4
Saliva 4	4,7 ± 0,2

5.10.4. Adição de padrão e recuperação

A exatidão do método foi avaliada pelo ensaio de adição de padrão e recuperação. A amostra de saliva foi fortificada com três níveis de concentrações de lactato iguais a 5,0 x 10^{-6}, 10,0 x 10^{-6} e 15,0 x 10^{-6}. A recuperação foi obtida pela razão da diferença das concentrações da amostra fortificada e não fortificada pela concentração adicionada, em porcentagem. Os valores de recuperação obtidos foram de 89, 92 e 94 %, respectivamente para as três concentrações, demonstrando a exatidão do método.

5.10.5. Aplicação em amostras certificadas de soro

O método proposto foi utilizado para determinar a concentração de lactato em

amostras certificadas para aplicações clínicas. O método proposto foi utilizado para determinar a concentração de lactato em amostras certificadas para aplicações clínicas (Soro I e Soro II). As amostras foram previamente preparadas como recomendada no rótulo e diluídas com água deionizada, conforme o item 3.3.8. As concentrações de glicose determinadas nas amostras estão descritas na Tabela 1.12.

Tabela 1.12 – Determinação de lactato em amostras certificadas.

Amostra	C_{LAC} (mg dL^{-1}) Proposto	C_{LAC} (mg dL^{-1}) Amostra Certificada	t calculado[a]
Soro I	6,5 ± 0,3	6,8 ± 0,6	1,710
Soro II	19,3 ± 1,3	19,0 ± 2,1	0,397

[a]O valor crítico para 95% de intervalo de confiança e com dois graus de liberdade é 4,303.

Os resultados foram comparados estatisticamente com os valores certificados pelo PNQC. Os valores de t de *Student* calculados não excederam o valor crítico (4,303) para 95 % de intervalo de confiança e dois graus de liberdade, mostrando que não houve diferenças significativas entre os resultados obtidos pelo método proposto e o material certificado, confirmando sua exatidão.

5.11. Comparação de metodologias

As informações contidas nas Tabela 1.13 e Tabela 1.14 descrevem o LD, LQ e observações das metodologias para quantificar glicose e lactato, respectivamente, em amostras biológicas.

Tabela 1.13 – Comparação de parâmetros do método proposto com metodologias descritas na literatura para a determinação de glicose.

Método	Observações	Matriz	LD ($\mu mol\ L^{-1}$)	LQ ($\mu mol\ L^{-1}$)	Referência
µPAD - colorimetria	Papel modificado com quitosana	Lágrima e soro	23	-	(GABRIEL et al., 2016)
µPAD - colorimetria	Papel modificado com quitosana	Lágrima e soro	14	-	(WANG, X. et al., 2018)
µPAD – colorimetria	Papel modificado com MOF, apenas 1 análise por µPAD	Soro e urina	2,5	10,6	(ORTIZ-GÓMEZ et al., 2018)
µPAD – colorimetria	Papel modificado com quitosana e relação linear em escala logarítmica	Soro	3	-	(LI, F.; WANG; et al., 2019)
µPAD – voltametria	Permite análise multiplexada	Urina	30	-	(FAVA et al., 2019)
µPAD – Fluorimetria	Utiliza quimiluminescência de alta resolução	Soro	8	-	(LI, F.; LIU; et al., 2019)
Eletroquímico	Utiliza MIP e diferentes métodos eletroquímicos para detecção	Sangue e saliva	3,27	10,5	(DIOUF; BOUCHIKHI; EL BARI, 2019)
Colorimetria	Preparação de amostra utiliza ácido e centrifugação. CD e AuNP são utilizados na determinação	Soro	3,0	-	(ZHONG et al., 2019)
Fluorescência – CD	Amostras foram centrifugadas, diluídas e incubadas; realizada utilizando espectrofluorímetro em solução	Urine	1,8	-	(LIANG et al., 2017)
Fluorescência – CD	Realizada utilizando espectrofluorímetro em solução	Sangue	0,0072	-	(LI, N. et al., 2016)
3D-µPAD – fluorescência	Filtração apenas para amostra de saliva	Saliva e soro	2,60	-	Presente trabalho

Tabela 1.14 – Comparação de parâmetros do método proposto com metodologias descritas na literatura para a determinação de lactato.

Método	Observações	Matriz	LD (µmol L^{-1})	LQ (µmol L^{-1})	Referência
µPAD – colorimetria	Papel modificado com quitosana e relação linear em escala logarítmica	Soro	30	-	(LI, F.; WANG; et al., 2019)
µPAD – colorimetria	Calibração no dispositivo	Soro	266	-	(KIM, S.; KIM; KIM, 2019)
µPAD – colorimetria	Utiliza bicamadas de polieletrólitos	Saliva	100	-	(CALABRIA et al., 2017)
µPAD – Fluorimetria	Utiliza quimiluminescência de alta resolução	Soro	15	-	(LI, F.; LIU; et al., 2019)
µPAD - Cronoamperometria	Análise simultânea de 3 analitos	Soro	360	1190	(DUNGCHAI; CHAILAPAKUL; HENRY, 2009)
Potenciometria	Utiliza sensor descartável	Suor e saliva	500	1000	(ONOR et al., 2017)
Fluorimetria	Centrifugação	Plasma	193	642	(PEREIRA, S. A. P. et al., 2019)
Fluorimetria – CD	Realizada utilizando espectrofluorímetro em solução	Sangue	0,047	-	(LI, N. et al., 2016)
3D-µPAD – fluorescência	Filtração apenas para amostra de saliva	Saliva e soro	0,813	-	Presente trabalho

Existem diversas metodologias descritas na literatura que empregam dispositivos de papel para a detecção e quantificação de glicose e lactato utilizando para isso colorimetria, luminescência e métodos eletroquímicos. A maioria dos métodos que estão descritos nas Tabela 1.13 e Tabela 1.14 utiliza do mesmo princípio descrito nesse trabalho; o H_2O_2 é produzido a partir da reação da glicose e do lactato com as enzimas oxidase, e posteriormente, o H_2O_2 produzido oxida um indicador colorimétrico ou um reagente luminescente ou é detectado eletroquimicamente.

Além dos métodos utilizando plataformas de papel, outros empregando detecção fluorimétrica com reagentes compostos por CD, colorimetria e métodos eletroquímicos podem ser facilmente encontrados. Esses métodos apresentam baixos limites de detecção, especialmente para a quantificação de glicose, porém, para o lactato, os métodos eletroquímicos e fluorimétricos que não utilizam CD apresentam LD três ordens de magnitude acima do obtido para o método proposto. Algumas dessas metodologias necessitam de tratamento e *clean-up* da amostra e utilizam para

isso ácidos fortes, centrifugação e incubação, aumentando o tempo necessário para análise e utilizando reagentes potencialmente tóxicos ao operador. Além disso, para alguns são necessários equipamentos de bancada, mais caros que os utilizados na imagem digital, e necessitam de especialistas para sua utilização e não são portáteis, não permitindo análises *in-situ*.

Ao longo dos anos os pesquisadores vêm tentando modificar os dispositivos com papel para atingir LD cada vez menores. A utilização de quitosana para imobilização de enzimas e reagentes (GABRIEL et al., 2016; WANG, X. et al., 2018) ajudou a melhorar um problema do papel, a falta de homogeneidade na zona de detecção, fazendo com que fossem alcançados LDs na faixa de dezenas de μmol L^{-1}. Outras modificações, como a utilização de MOFs (*metal-organic frameworks*) (ORTIZ-GÓMEZ et al., 2018) e 3D-μPAD com imobilização das enzimas com quitosana (LI, F.; WANG; et al., 2019) tornaram as determinações ainda mais sensíveis, chegando a LD na faixa de unidades de μmol L^{-1}. Porém, o dispositivo que utiliza MOFs foi construído com um único canal, não permitindo reações multiplexadas ou replicatas e no dispositivo 3D-μPAD com quitosana a relação linear ocorre com o logaritmo da concentração do analito, o que possibilita a utilização de faixa linear maior, contudo a diferenciação entre concentrações próximas é prejudicada.

A metodologia proposta empregando 3D-μPAD e *carbon dot* possibilita níveis de detecção para a glicose comparáveis com descritos na literatura e abaixo dos descritos na literatura para o lactato para dispositivos de papel, também, permite a análise de múltiplos analitos em um mesmo dispositivo e uma alta sensibilidade para determinação em amostras de saliva, soro e urina.

6. CONCLUSÕES

Esse trabalho descreveu uma rota simples, rápida, em uma única etapa, de baixo custo e utilizando aquecimento por micro-ondas para a síntese de *carbon dots*. As condições da síntese foram otimizadas utilizando planejamentos experimentais multivariado e univariado. As nanopartículas sintetizadas foram caracterizadas por espectroscopias de fluorescencência, UV/Vis, FTIR e ^{1}H-NMR e MET. Os CDs apresentaram luminescência no azul quando iluminados com luz UV (365nm). A fluorescência dos CDs foi suprimida na presença de H_2O_2 e peroxidase, o que permitiu o desenvolvimento de dispositivos para quantificar glicose e lactato através do H_2O_2 produzido nas reações enzimáticas em amostras biológicas.

Foram construídas plataformas de papel utilizando impressão à base de cera para definir as barreiras hidrofóbicas. A detecção por imagem digital foi avaliada e, posteriormente, utilizada no desenvolvimento das metodologias. Uma metodologia de adição de padrão para quantificação de glicose em urina e soro foi desenvolvida e validada utilizando padrões certificados. Este método de calibração tem a vantagem de poder ser executado em um único dispositivo, eliminando a necessidade de calibração externa e reduzindo os efeitos de matriz da amostra e/ou a falta de homogeneidade do papel.

Dispositivos 3D-µPAD foram utilizados para o desenvolvimento de métodos para determinação de glicose e lactato em amostras de saliva utilizando o reagente fluorescente composto pelo CD sintetizado e enzimas oxidase. Também, foi utilizado um tratamento de amostra muito simples e rápido que consiste apenas na filtração das amostras para diminuir sua viscosidade. A metodologia foi validada utilizando adição de padrão e recuperação em amostras de saliva e, também, amostras certificadas de soro e urina. Dessa maneira foram desenvolvidas metodologias de baixo custo, rápidas, simples, sensíveis, exatas, precisa e ambientalmente amigáveis.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O uso do reagente fluorescente constituído de CD é bastante promissor, sendo assim, há a possibilidade de aplicação para outros analitos. Uma vez que é possível realizar a quantificação indireta de substâncias por meio da supressão causada pelo H_2O_2 gerado, é possível utilizar o CD sintetizado para quantificar compostos como colesterol, ácido úrico, sarcosina e creatinina, juntamente com suas respectivas enzimas oxidase, em diferentes matrizes biológicas utilizando o µPAD com detecção por fluorimetria similar ao proposto.

Outra vertente para futuras aplicações é a utilização do método de preparo de amostra proposto. O uso da saliva é bastante interessante, pois a coleta de amostra é não-invasiva e de fácil obtenção, porém sua maior viscosidade dificulta seu manuseio e análise. O tratamento para amostras de saliva proposto constitui apenas na filtração para diminuição da viscosidade. Dessa maneira, pode-se vislumbrar a determinação de diferentes compostos em saliva utilizando outros métodos microfluídicos que apresentam canais de tamanho reduzido baseados em plataformas de papel, poliéster-toner, micro-chips, vidro e impressão 3D.

REFERÊNCIAS

ALIVISATOS, A. P. Nanocrystals: building blocks for modern materials design. **Endeavour**, v. 21, n. 2, p. 56–60, 1997.

ÁLVAREZ-DIDUK, R.; OROZCO, J.; MERKOÇI, A. Paper strip-embedded graphene quantum dots: A screening device with a smartphone readout. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–9, 2017.

ANÁLISES CLÍNICAS. **O que é análise clínica?** Disponível em: <http://analises-clinicas.info/o-que-e-analise-clinica.html>. Acesso em: 30 ago. 2016.

ANASTAS, P. T.; WARNER, J. C. **Green chemistry: theory and practice**. 1. ed. New York: Oxford University Press, 1998.

ANASTAS, Paul T.; KIRCHHOFF, M. M. Origins, current status, and future challenges of green chemistry. **Accounts of Chemical Research**, v. 35, n. 9, p. 686–694, 2002.

BAKER, S. N.; BAKER, G. A. Luminescent carbon nanodots: Emergent nanolights. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 38, p. 6726–6744, 2010.

BELACHEW, N.; MESHESHA, D. S.; BASAVAIAH, K. Green syntheses of silver nanoparticle decorated reduced graphene oxide using L -methionine as a reducing and stabilizing agent for enhanced. **RSC Advances**, v. 9, p. 39264–39271, 2019.

BURTIS, C. A. **Tietz fundamentals of clinical chemistry**. 5. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2001.

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.

CALABRIA, D. et al. Smartphone–based enzymatic biosensor for oral fluid L-lactate detection in one minute using confined multilayer paper reflectometry. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 94, n. March, p. 124–130, 2017.

CAO, J. et al. A novel nitrogen and sulfur co-doped carbon dots-H2O2 chemiluminescence system for carcinoembryonic antigen detection using functional HRP-Au Ag for signal amplification. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 219, p. 281–287, 2019.

CARRILHO, E.; MARTINEZ, A. W.; WHITESIDES, G. M. Understanding Wax Printing: A Simple Micropatterning Process for Paper-Based Microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 16, p. 7091–7095, 2009.

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

CAYUELA, A. et al. Semiconductor and carbon-based fluorescent nanodots: the need for consistency. **Chem. Commun.**, v. 52, n. 7, p. 1311–1326, 2016.

CHAPLAN, C. A.; MITCHELL, H. T.; MARTINEZ, A. W. Paper-based standard addition assays. **Analytical Methods**, v. 6, n. 5, p. 1296–1300, 2014.

CHEN, B. Bin et al. Self-exothermic reaction prompted synthesis of single-layered graphene quantum dots at room. **Chemical Communications**, v. 53, p. 4958–4961, 2017.

CHEN, Y. et al. Facile synthesis of nitrogen and sulfur co-doped carbon dots and application for Fe (III) ions detection and cell imaging. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 223, p. 689–696, 2016.

CHOI, Y. et al. Carbon Dots: bottom-up syntheses, properties, and light-harvesting applications. **Chemistry - An Asian Journal**, v. 13, n. 6, p. 586–598, 2018.

CHRISTIAN, G. D.; DASGUPTA, P. K.; SCHUG, K. A. Fluorometry. **Anal. Chem.** 7. ed. Hoboken: Wiley, 2014a. p. 530–537.

_____. Spectrometric instrumentation. **Anal. Chem.** 7. ed. Hoboken: Wiley, 2014b. p. 504–518.

CLAVER, J. B.; MIRÓN, V. M.; CAPITÁN-VALLVEY, L. F. Disposable electrochemiluminescent biosensor for lactate determination in saliva. **Analyst**, v. 134, n. 7, p. 1423–1432, 2009.

CORBETT, J. et al. Nanotechnology: international developments and emerging products. **CIRP Annals**, v. 49, n. 2, p. 523–545, 2000.

COSTAS-MORA, I. et al. In situ photochemical synthesis of fluorescent carbon dots for optical sensing of hydrogen peroxide and antioxidants. **Talanta**, v. 144, p. TALD1501720, 2015.

CUADROS-RODRÍGUEZ, L. et al. Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1–2, p. 33–46, 2007.

DAVY, J. On a gaseous compound of carbonic oxide and chlorine. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 102, n. January, p. 144–151, 1812.

DE MEDEIROS, T. V. et al. Microwave-assisted synthesis of carbon dots and their applications. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 7, n. 24, p. 7175–7195, 2019.

DIETERICH, K. **Testing-paper and method of making same**. United States of America: US691249A. 1902

DIOUF, A.; BOUCHIKHI, B.; EL BARI, N. A nonenzymatic electrochemical glucose sensor based on molecularly imprinted polymer and its application in measuring saliva glucose. **Materials Science and Engineering C**, v. 98, n. January, p. 1196–1209, 2019.

DONG, B. et al. Fluorescence immunoassay based on the inner- filter effect of carbon dots for highly sensitive amantadine detection in foodstuffs. **Food Chemistry**, v. 294, p. 347–354, 2019.

DONG, Y. et al. Polyamine-functionalized carbon quantum dots for chemical sensing. **Carbon**, v. 50, n. 8, p. 2810–2815, 2012.

DUNGCHAI, W.; CHAILAPAKUL, O.; HENRY, C. S. Electrochemical detection for paper-based microfluidics. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 14, p. 5821–5826, 2009.

EUROPEAN COMMISSION. **Definition of a nanomaterial**. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reco/2011/696/oj>. Acesso em: 3 dez. 2019.

FAVA, E. L. et al. Electrochemical paper-based microfluidic device for high throughput multiplexed analysis. **Talanta**, v. 203, n. May, p. 280–286, 2019.

FEYNMAN, R. P. There's plenty of room at the bottom for innovation. **Miniaturization**, v. 1, n. 1, p. 60–66, 1992.

FOWLEY, C. et al. Highly luminescent biocompatible carbon quantum dots by encapsulation with an amphiphilic polymer. **Chemical communications**, v. 48, n. 75, p. 9361–3, 2012.

FRIGERIO, C. et al. Application of quantum dots as analytical tools in automated chemical analysis: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 735, p. 9–22, 2012.

GABRIEL, E. F. M. et al. Highly sensitive colorimetric detection of glucose and uric acid in biological fluids using chitosan-modified paper microfluidic devices. **The Analyst**, v. 141, n. 15, p. 4749–4756, 2016.

GAO, G. Synthesis, properties & applications. **Nanostructure abd Nanomater.** Londres: Imperial College Press, 2004.

HENRY, C. Size effect on structure and morphology of free or supported nanoparticles. In: BRÉCHIGNAC, C.; HOUDY, P.; LAHMANI, M. (Org.). **Nanomater. nanochemistry**. 1. ed. Berlim: Springer, 2007. p. 3–34.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. Espectrometria de luminescência molecular. **Princípios análise Instrum.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 414–440.

HUBER, L.; GMBH, H.-P. Validation of analytical methods : review and strategy. **LC / GC magazine**, p. 1–17, 1999.

IMPERIALE, J. C. et al. Oral pharmacokinetics of a chitosan-based nano-drug delivery system of interferon alpha. **Polymers**, v. 11, n. 1862, p. 1–13, 2019.

JAEGER, C. W. **How does a solid ink printer work?** Disponível em: <https://www.imaging.org/site/IST/Resources/Imaging_Tutorials/Color_Solid_Ink_Printing/IST/Resources/Tutorials/Solid_Ink.aspx?hkey=51a9403c-0474-49d9-a5cd-22cd5abface6>. Acesso em: 13 dez. 2019.

JU-NAM, Y.; LEAD, J. R. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. **Science of the Total Environment**, v. 400, n. 1–3, p. 396–414, 2008.

KAPPI, F. A. et al. Calibrant-loaded paper-based analytical devices for standard addition quantitative assays. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 253, p. 860–867, 2017.

KIM, S.; KIM, D.; KIM, S. Simultaneous quantification of multiple biomarkers on a self-calibrating microfluidic paper-based analytic device. **Analytica Chimica Acta**, n. xxxx, 2019.

KINGSTON, H. M. **Introduction to microwave sample preparation:** theory and practice. 1 ed. Washington DC: Americam Chemical Society, 1988. 263 p.

KIRUBAHARAN, C. J. et al. Facile fabrication of Au@polyaniline core-shell nanocomposite as efficient anodic catalyst for microbial fuel cells. **Electrochimica Acta**, v. 328, p. 135136, 2019.

KREYLING, W. G.; SEMMLER-BEHNKE, M.; CHAUDHRY, Q. A complementary definition of nanomaterial. **Nano Today**, v. 5, n. 3, p. 165–168, 2010.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3. ed. New York: Springer, 2006.

LENG, Y. Transmission electron microscopy. **Mater. Charact. Introd. to Microsc. Spectrosc. methods**. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2013. p. 83–126.

LI, F.; WANG, X.; et al. Double-layered microfluidic paper-based device with multiple colorimetric indicators for multiplexed detection of biomolecules. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 288, p. 266–273, 2019.

LI, F.; LIU, J.; et al. High-resolution temporally resolved chemiluminescence based on double-layered 3D microfluidic paper-based device for multiplexed analysis. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 141, p. 111472, 2019.

LI, H. et al. Paper-based fluorescence resonance energy transfer assay for directly detecting nucleic acids and proteins. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 80, p. 79–83, 2016.

LI, N. et al. Ultrasensitive profiling of metabolites using tyramine-functionalized graphene quantum dots. **ACS Nano**, v. 10, n. 3, p. 3622–3629, 2016.

LI, P. et al. Development of fluorescent film sensors based on electropolymerization for iron(III) ion detection. **Chemistry - A european Journal**, p. 5741–5745, 2014.

LIANG, M. et al. One-step synthesis of nitrogen, boron co-doped fluorescent carbon nanoparticles for glucose detection. **Luminescence**, v. 32, n. 6, p. 1031–1038, 2017.

LIN, C. C. et al. Urine analysis in microfluidic devices. **Analyst**, v. 136, n. 13, p. 2669–2688, 2011.

LINEHAN, K.; DOYLE, H. Efficient one-pot synthesis of highly monodisperse carbon quantum dots. **RSC Advances**, v. 4, p. 18–21, 2014.

LIU, M. L. et al. Large-scale simultaneous synthesis of highly photoluminescent green amorphous carbon nanodots and yellow crystalline graphene. **Green Chemistry**, v. 19, p. 3611–3617, 2017.

LIU, M. L.; CHEN, B.; LI, M. Carbon dots: synthesis, formation mechanism, fluorescence origin and sensing applications. **Green Chemistry**, v. 21, p. 449–471, 2019.

LIU, Y.; ZHAO, Y.; ZHANG, Y. One-step green synthesized fluorescent carbon nanodots from bamboo leaves for copper(II) ion detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 196, p. 647–652, 2014.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. A712–A724, 1983.

LOPEZ-SERRANO, A. et al. Nanoparticles: a global vision. characterization, separation, and quantification methods. potential environmental and health impact. **Analytical Methods**, v. 6, p. 38–56, 2014.

LU, R. et al. Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay. **Electrophoresis**, v. 30, n. 9, p. 1497–1500, 2009.

MACHADO, C. E. et al. Carbon quantum dots: chemical synthesis, properties and applications. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 4, p. 1306–1346, 2015.

MARTINEZ, A. W. et al. Diagnostics for the developing world: Microfluidic paper-based analytical devices. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 1, p. 3–10, 2010.

_____. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1318–1320, 2007.

_____. Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 10, p. 3699–3707, 2008.

MING, F. et al. One-step synthesized fluorescent nitrogen doped carbon dots from thymidine for Cr (VI) detection in water. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 222, p. 117165, 2019.

MIRTCHEV, P. et al. Solution phase synthesis of carbon quantum dots as sensitizers for nanocrystalline TiO2 solar cells. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 4, p. 1265, 2012.

MOMENI, N. et al. CCD-camera based capillary chemiluminescent detection of retinol binding protein. **Analytica Chimica Acta**, v. 387, n. 1, p. 21–27, 1999.

MONDAL, P. P.; DIASPRO, A. **Fundamentals of fluorescence microscopy: exploring life with light**. 1. ed. Dordrecht: Springer, 2014.

MORBIOLI, G. G.; MAZZU-NASCIMENTO, T.; MILAN, L. A.; et al. Improving sample distribution homogeneity in three-dimensional microfluidic paper-based analytical devices by rational device design. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 9, p. 4786–4792, 2017.

MORBIOLI, G. G.; MAZZU-NASCIMENTO, T.; STOCKTON, A. M.; et al. Technical aspects and challenges of colorimetric detection with microfluidic paper-based analytical devices (μPADs) - A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 970, p. 1–22, 2017.

MÜLLER, R. H.; CLEGG, D. L. Automatic paper chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 21, n. 9, p. 1123–1125, 1949.

NAGARAJAN, R. Nanoparticles: building blocks for nanotechnology. In: NAGARAJAN, R.; HATTON, T. (Org.). **Nanoparticles Synth. Stab. Passiv. Funct.** 1. ed. Washington: American Chemical Society, 2008. p. 2–14.

Nanomaterials definition matters. **Nature Nanotechnology**, v. 14, n. 3, p. 193–193, 5 mar. 2019.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, p. 622–627, 2006.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger: principles of biochemistry**. 5. ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2008.

NGUYEN, T. D. et al. In vivo study of the antibacterial chitosan/polyvinyl alcohol loaded with silver nanoparticle hydrogel for wound healing applications. **International Journal of Polymer Science**, v. 2019, p. 1–10, 2019.

NIU, J.; GAO, H. Synthesis and drug detection performance of nitrogen-doped carbon dots. **Journal of Luminescence**, v. 149, p. 159–162, 2014.

ONOR, M. et al. Potentiometric sensor for non invasive lactate determination in human sweat. **Analytica Chimica Acta**, v. 989, p. 80–87, 2017.

ORTIZ-GÓMEZ, I. et al. Microfluidic paper-based device for colorimetric determination of glucose based on a metal-organic framework acting as peroxidase mimetic. **Microchimica Acta**, v. 185, n. 1, 2018.

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

2006.

PARK, K. M. et al. In situ forming hydrogels based on tyramine conjugated 4-Arm-PPO-PEO via enzymatic oxidative reaction. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 3, p. 706–712, 2010.

PAVIA, D. L. et al. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010a. p. 101–168.

_____. Espectroscopia no infravermelho. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010b. p. 15–99.

PEDERSOLI JÚNIOR, J. L.; LIGTERINK, F. J. Spectroscopic Characterization of the Fluorescence of Paper at the Wet-Dry Interface. **Restaurator**, v. 22, p. 133–145, 2001.

PEELING, R. W. et al. Rapid tests for sexually transmitted infections (STIs): the way forward. **Sexually transmitted infections**, v. 82 Suppl 5, p. v1–v6, 2006.

PEREIRA, S. A. P. et al. Automatic fluorometric lactate determination in human plasma samples. **New Journal of Chemistry**, 2019.

RECKMEIER, C. J. et al. Luminescent colloidal carbon dots: optical properties and effects of doping. **Optics Express**, v. 24, n. 2, p. A312–A340, 2016.

REGE, K.; MEDINTZ, I. L. Techniques for the characterization of nanoparticle-bioconjugates. In: REGE, K.; MEDINTZ, I. L. (Org.). **Methods Bioeng. nanoscale Bioeng. nanomedicine**. 1. ed. [S.l.]: Artech House, 2009. p. 293–332.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, out. 2004.

RODUNER, E. Size matters: why nanomaterials are different. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 7, p. 583–592, 2006.

SAKAI, S. et al. In situ simultaneous protein-polysaccharide bioconjugation and hydrogelation using horseradish peroxidase. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1370–1375, 2010.

SANGAM, S. et al. Sustainable synthesis of single crystalline sulphur-doped graphene quantum dots for bioimaging and beyond. **Green Chemistry**, v. 20, p. 4245–4259, 2018.

SENER, A. et al. Salivary glucose concentration and excretion in normal and diabetic subjects. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2009, p. 1–6, 2009.

SHI, L. et al. Carbon dots with high fluorescence quantum yield: the fluorescence originates from organic fluorophores. **Nanoscale**, v. 8, n. 30, p. 14374–14378, 2016.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; WEST, D. M. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. New York: Thomson, 2006.

SZABO, A. G. Fluorescence principles and measurement. In: GORE, M. G. (Org.). **Spectrophotometry Spectrofluorim. a Prat. approach**. New York: Oxford University Press, 2000. p. 33–68.

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

TÉKUS, É. et al. Comparison of blood and saliva lactate level after maximum

intensity exercise. **Acta Biologica Hungarica**, v. 63, n. Supplement 1, p. 89–98, 2012.

TOKUYAMA, H.; KITAMURA, E.; SEIDA, Y. Development of zirconia nanoparticle-loaded hydrogel for arsenic adsorption and sensing. **Reactive and Functional Polymers**, v. 146, p. 104427-, 2020.

VOSWINCKEL, P. A marvel of colors and ingredients. The story of urine test strips. **Kidney International Supplement**, v. 47, p. S3–S7, 1994.

WANG, Hai-jiao et al. Facile microwave synthesis of carbon dots powder with enhanced solid-state fluorescence and its applications in rapid fingerprints detection and white- light-emitting diodes. **Dyes and Pigments**, v. 170, p. 107623, 2019.

WANG, Haiyan et al. High fluorescence S, N co-doped carbon dots as an ultra-sensitive fluorescent probe for the determination of uric acid. **Talanta**, v. 155, p. 62–69, 2016.

WANG, X. et al. Sensitive colorimetric assay for uric acid and glucose detection based on multilayer-modified paper with smartphone as signal readout. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 410, n. 10, p. 2647–2655, 2018.

WHITESIDES, G. M. The origins and the future of microfluidics. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 368–73, 2006.

WU, Z. L.; LIU, X.; HUAN, Y. Carbon dots: materials, synthesis, properties and approaches to long-wavelength and multicolor emission. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, p. 3794–3809, 2017.

XING, M. et al. Temperature dependent photovoltaic performance of TiO2/PbS heterojunction quantum dot solar cells. **Solar Energy**, v. 195, p. 1–5, 2020.

XU, X. et al. Electrophoretic analysis and purification of fluorescent single-walled carbon nanotube fragments. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 40, p. 12736–12737, 2004.

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

YAMADA, K. et al. Toward practical application of paper-based microfluidics for medical diagnostics: state-of-the-art and challenges. **Lab Chip**, p. 1206–1249, 2017.

YU, G. et al. Molecular targeting nanoprobes with non-overlap emission in the second near-infrared window for in vivo two-color colocalization of immune cells. **ACS Nano**, v. 13, p. 12830–12839, 2019.

YU, J. et al. Microfluidic paper-based chemiluminescence biosensor for simultaneous determination of glucose and uric acid. **Lab on a chip**, v. 11, n. 207890, p. 1286–1291, 2011.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469–1479, 2007.

ZHANG, F. et al. A Mn-doped ZnS quantum dots-based ratiometric fluorescence probe for lead ion detection and “off-on” strategy for methyl parathion detection. **Talanta**, v. 204, p. 13–19, 2019.

ZHONG, Q. et al. Colorimetric enzymatic determination of glucose based on etching of gold nanorods by iodine and using carbon quantum dots as peroxidase mimics. **Microchimica Acta**, v. 186, n. 3, 2019.

Capítulo 2

PAPER-SPRAY IONIZATION COMO UMA FERRAMENTA PARA DETECÇÃO DIRETA DE DOPING UTILIZANDO ESPECTROMETRIA DE MASSAS

1. INTRODUÇÃO

1.1. Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica analítica muita utilizada em diversas áreas da ciência, capaz de fornecer informações importantes quanto a elucidação estrutural de substâncias, análise isotópica, caracterizações de novos produtos, análise de diferentes substâncias, controle de qualidade, entre outras aplicações (GROSS, 2017). Atualmente, a MS é considerada uma técnica essencial na química analítica, pois combina alta sensibilidade, seletividade e rapidez (ALBERICI et al., 2010). A MS se baseia na geração de íons a partir de compostos orgânicos ou inorgânicos por meio de um método conveniente, separação desses íons gerados pelas suas razões massa/carga (*m/z*) e detecção pela suas respectivas *m/z* e abundâncias, fornecendo dados qualitativos e quantitativos dessas substâncias (GROSS, 2017).

O equipamento utilizado na MS é o espectrômetro de massas, que pode ser representado conforme ilustrado na Figura 2.1.

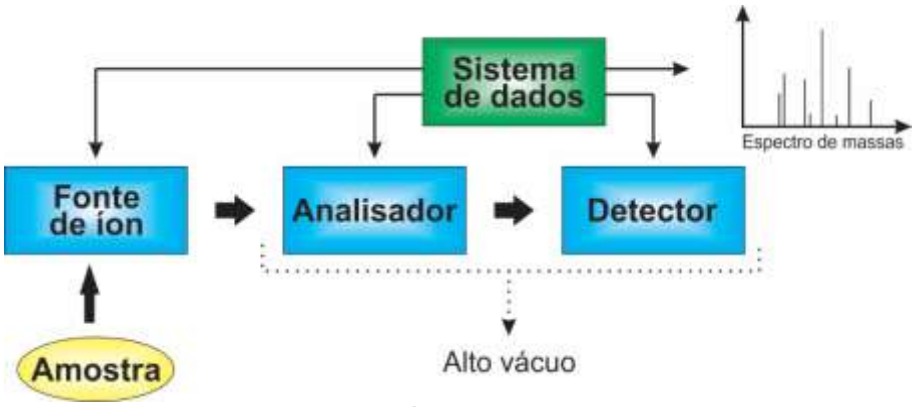

Figura 2.1 – Os componentes básicos de um espectrômetro de massas.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Um espectrômetro de massas é composto basicamente por três elementos: (i) fonte de íons, (ii) analisador e (iii) detector. Usualmente, a amostra é introduzida no sistema através de uma bomba de infusão direta ou como a saída de uma etapa anterior de separação, tais como cromatografia e eletroforese. Na fonte de íons são gerados os íons utilizando a ionização mais adequada para a substância de interesse, tais como *electrospray* (ESI), ionização por elétrons (EI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e ionização térmica (TI). Esses íons são então transferidos para o

analisador via focalizador de íons que mantém o feixe de íons em uma trajetória estável. O analisador de massas ordena e separa os íons de acordo com a razão massa/carga, como exemplos de analisadores têm-se o *time-of-flight* (TOF), *linear quadrupole ion trap* (LIT ou LTQ), *orbitrap* e triplo quadrupolo linear. Os íons separados continuam para o detector, no qual a quantidade de íons que chega é medida em função da *m/z*; como exemplos de detectores pode-se citar o copo de Faraday, multiplicador de elétrons e placa de microcanais (MCP). Os resultados são processados pelo sistema de dados que produz um espectro de massas (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012). Em MS os íons formados se encontram na fase gasosa e, dessa maneira, são muito reativos e apresentam curtos tempos de vida, necessitando serem manipulados e analisados em alto vácuo.

1.2. Métodos de ionização para espectrometria de massas

A fonte de íon do espectrômetro de massas é um dos três componentes principais do instrumento. A ionização é a primeira etapa de qualquer experimento envolvendo MS e determina qual o tipo de amostra pode ser introduzida e analisada (BADU-TAWIAH, A. K. et al., 2013). Inicialmente em MS a ionização por elétrons (EI) era o método de ionização disponível. A EI consiste em bombardear as espécies neutras de interesse em fase gasosa com elétrons energéticos e é considerada uma técnica de ionização forte conseguindo ionizar a maioria das moléculas, porém, a EI causa extensiva fragmentação e podem ser perdidas importantes informações como massa molar do analito. Esse problema pode ser parcialmente superado com o desenvolvimento da ionização química (CI) em 1966 por Munson e Field (MUNSON; FIELD, 1966), no qual um gás reagente é introduzido na câmara de ionização para promover a ionização das substâncias de interesse. Contudo, do mesmo modo que a EI, a CI é limitada a compostos voláteis, não podendo ser analisadas moléculas polares, não voláteis e termolábeis (BADU-TAWIAH, A. K. et al., 2013; BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; GROSS, 2017).

A necessidade de uma fonte de ionização para análise de biomoléculas grandes como proteínas, polímeros, compostos polares e compostos não voláteis levou ao desenvolvimento da fonte de *electrospray* por Fenn em 1989 (FENN et al., 1989) e de *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI) por Tanaka (TANAKA

et al., 1988) e Hillenkamp (KARAS, Michael; HILLENKAMP, 1988) em 1988. No MALDI, os íons moleculares intactos são formados pela irradiação com um *laser* pulsado curto nas moléculas incorporadas em uma matriz composta de pequenas moléculas orgânicas de alta absorção (KARAS, M.; BAHR, 1997). O processo de ionização via ESI pode ser explicado pelas seguintes etapas: uma voltagem é aplicada ao capilar de metal contendo a solução da amostra posicionado em frente à entrada do espectrômetro de massas (*inlet*) mantido em uma voltagem diferente (aterrado). O cone de Taylor é formado devido às forças eletrostáticas que repelem a solução em direção a entrada do espectrômetro de massas e a tensão superficial que segura a solução no lugar. Um jato de líquido é emitido da ponta do cone de Taylor, produzindo gotas carregadas que são direcionadas à entrada do espectrômetro de massa. As gotículas carregadas, expostas ao ar ambiente, sofrem evaporação até que a densidade de carga nas gotículas atinja o limite de Rayleigh e ocorra uma fissão coulômbica, produzindo muitas gotículas carregadas menores. Esse processo é repetido até que restem íons em fase gasosa que viajam para a entrada do espectrômetro de massas (Figura 2.2) (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; GROSS, 2017).

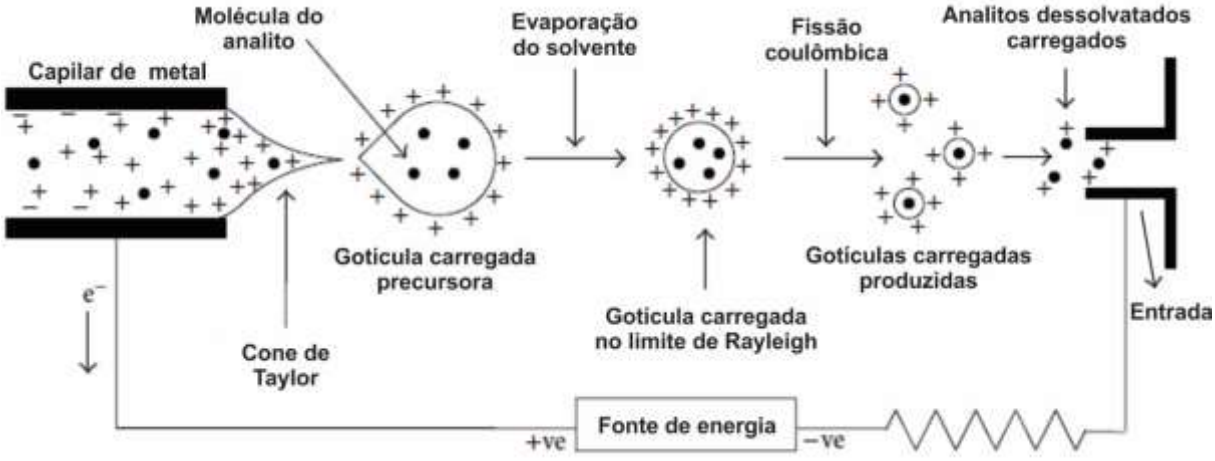

Figura 2.2 – Representação esquemática do processo de ionização por electrospray.
Fonte: Adaptada de Banerjee (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012).

Essas evoluções das fontes de íons resolveram os problemas da introdução de amostras no espectrômetro de massas e do tipo de composto analisado, permitindo a análise de compostos em soluções e matrizes sólidas com até 100.000 Da, através de múltiplas cargas nos compostos, e ampliando a utilização de MS em diferentes análises. Contudo, muitas amostras de interesse analítico são misturas complexas

fazendo com que o pré-tratamento da amostra seja necessário e a combinação de MS com técnicas cromatográficas uma escolha usual, pois a análise direta dessas amostras traz riscos para o equipamento e problemas na ionização devido a efeitos de matriz e supressão (BADU-TAWIAH, A. K. et al., 2013).

1.2.1. Ionização ambiente em espectroscopia de massas

A ionização ambiente (AI) foi proposta pelo grupo do Dr. Cooks em 2004 por meio da introdução da *desorption electrospray ionization* (DESI) (TAKÁTS et al., 2004), no qual um fino *spray* de gotículas carregadas atinge a superfície de interesse, extraindo e ionizando *in-situ* o analito diretamente da superfície (BADU-TAWIAH, A.; COOKS, 2010; COOKS et al., 2006). AI é uma forma de ionização realizada diretamente nas amostras não-modificadas em um sistema aberto ao ambiente, minimizando o tratamento de amostra e sendo capaz de fornecer dados das amostras em tempo real. AI vem ganhando atenção devido a possibilidade de análise direta da amostra, diminuindo tempo e custo de análise, simplificando os procedimentos analíticos, aumentando a taxa de amostragem e possibilitando análise *in-situ* (HARRIS; GALHENA; FERNÁNDEZ, 2011; HUANG et al., 2010; WESTON, 2010). Dessa maneira, a ionização ambiente adicionou uma nova característica a espectrometria de massas: simplicidade (ALBERICI et al., 2010).

Algumas das técnicas de AI mais usuais são *desorption electrospray ionization* (DESI), *direct analysis in real-time* (DART), *nanospray desorption electrospray ionization* (nanoDESI), *easy ambient sonic-spray ionization* (EASI), *low temperature plasma* (LTP), *desorption atmospheric pressure photoionization* (DAPPI), *coated blade spray* (CBS), *atmospheric pressure solid analysis probe* (ASAP) *e paper-spray* (PS) (MONGE et al., 2013). Dentre todas as técnicas de AI, o *paper-spray* apresenta um grande potencial e ganhou especial atenção devido a sua simplicidade, versatilidade e disponibilidade.

1.2.2. Paper-spray mass spectrometry

A fonte de íon *paper-spray* (PS) é uma técnica de ionização ambiente introduzido por Wang e colaboradores em 2010 (WANG, He et al., 2010). Em PS-MS,

a amostra é depositada no triângulo de papel e absorvida por capilaridade, espalhando-se por todo o papel; assim, não há pré-tratamento da amostra, apenas sua deposição na superfície do papel. Após a adição do solvente, ou mistura de solventes, os íons são formados na fase gasosa por meio da aplicação de uma alta tensão DC (~1-5 kV) ao meio úmido com auxílio de uma garra de cobre, permitindo a análise por MS (Figura 2.3) (LIU, Jiangjiang et al., 2010; WANG, He et al., 2010).

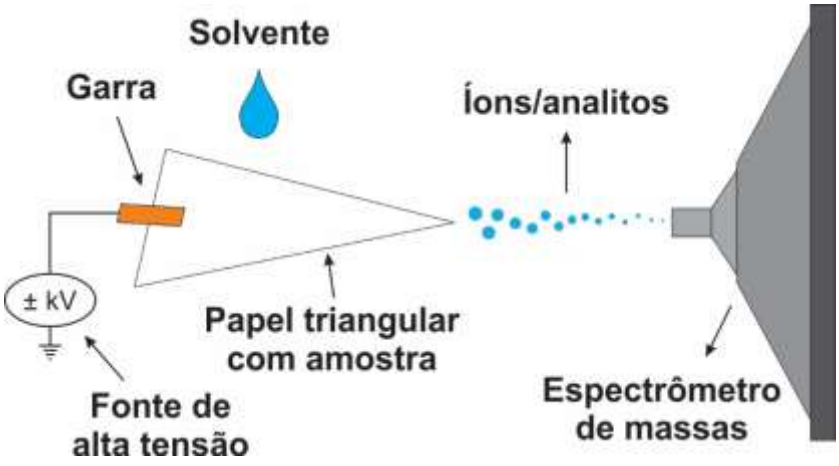

Figura 2.3 – Ilustração de um sistema de PS-MS.
Fonte: Elaborada pelo autor.

O mecanismo de ionização em PS é comparável com nanoelectrospray (nESI) e ESI (ESPY et al., 2012; WANG, He et al., 2010). Possivelmente, a alta voltagem aplicada entre o papel úmido e a entrada do espectrômetro de massas gera um campo elétrico que induz o acúmulo de cargas na ponta do papel mais próxima do espectrômetro. Um *spray* de gotículas carregadas é formado via cone de Taylor devido ao acúmulo de cargas e à tensão superficial do solvente. A presença de múltiplas fibras microscópicas na ponta do papel favorece a formação do *spray*, pois quanto menor o diâmetro do capilar pelo qual o solvente é conduzido, menor é a voltagem necessária para formação do *spray* (TSAI; TIPPLE; YOST, 2017). Essas gotículas reduzem seu tamanho devido à evaporação do solvente e sofrem fissão coulômbica, formando gotículas menores. Esse processo continua até que a dessolvatação e evaporação gere íons na fase gasosa (ESPY et al., 2012; LIU, Jiangjiang et al., 2010). Para moléculas orgânicas pequenas, como é o caso das estudadas nesse trabalho, os íons na fase gasosa são formados predominantemente via modelo da evaporação do íon (IEM). IEM é baseado no fato que o campo elétrico de gotículas nanométricas ($R \leq 10$ nm) carregadas no limite de Rayleigh é grande o

suficientemente para causar a ejeção de pequenos íons solvatados da superfície da gotícula ao invés de fissão coulômbica (BANERJEE; MAZUMDAR, 2012; IRIBARNE; THOMSON, 1976; KONERMANN et al., 2013).

De acordo com o trabalho de Espy e coautores, a formação das gotículas e a ionização dos analitos ocorre em dois modos distintos. O modo 1 ocorre no início da análise quando o fluxo de solvente é maior, produzindo um *spray* estável com valores de corrente baixos, entre 0,1 a 0,4 μA, e gotículas com diâmetro médio entre 1 a 2 μm e velocidade média em torno de 3 m s^{-1}. No modo 1, íons formados via transferência de prótons são dominantes no espectro. O modo 2 ocorre após significativa diminuição no fluxo do solvente e as gotículas formadas apresentam diâmetro menor que 1 μm. A corrente medida atinge valores acima de 0,8 μA e, consequentemente, espécies ionizadas por meio de transferência de elétrons são observadas, possivelmente devido a descarga corona, se assemelhando a ionização química a pressão atmosférica (APCI) (ESPY et al., 2012).

Paper-spray permite a análise de amostras em suas formas nativas diretamente no ambiente sem que seja necessário pré-tratamento ou pré-concentração da amostra, o que possibilita a análise *in-situ*. PS-MS apresenta diversas vantagens: o solvente e a amostra são transportados por capilaridade, dessa forma, não é necessária uma força motriz externa; não é necessário gás nebulizador, reduzindo o arranjo experimental necessário para a análise; pequenos volumes de amostra e solventes são requeridos, sendo uma técnica ambientalmente mais amigável; e o papel é de baixo custo e pode ser descartado por incineração, aumentando a segurança do operador. A utilização da plataforma de papel possibilita a coleta de amostra através do contato com a superfície de interesse. O sucesso do PS-MS ocorreu pois o papel integra três fases cruciais da análise por MS em uma única etapa: a coleta de amostra, separação e ionização (FREY; DAMON; BADU-TAWIAH, 2019; LIU, Jiangjiang et al., 2010; MCBRIDE et al., 2019; WANG, He et al., 2010).

PS-MS foi aplicado com sucesso na determinação de diferentes compostos presentes em diferentes tipos de matrizes, tais como metabolitos (WAN et al., 2019; WANG, He et al., 2013), drogas (BORGES et al., 2019; DAMON et al., 2016; LIU, Jingjing et al., 2017), proteínas (RIBONI et al., 2019) e antígenos para o diagnóstico de doenças (CHEN, Suming; WAN; BADU-TAWIAH, 2016) em matrizes biológicas; contaminantes (CHEN, Shuo et al., 2017; LI, A. et al., 2013), herbicidas (REEBER et

al., 2015) e antibióticos (SURARITDECHACHAI et al., 2019) em matrizes alimentícias; falsificações (DA SILVA FERREIRA et al., 2015; PEREIRA, H. V. et al., 2016; TEODORO et al., 2017) em matrizes de interesse forense; e contaminantes em matrizes ambientais (JJUNJU et al., 2016; MAHER et al., 2016). Além dessas aplicações muitas outras foram desenvolvidas como ilustra o levantamento bibliográfico realizado dos dados sobre o uso de PS-MS em inúmeras aplicações para a produção de trabalhos científicos em revistas de maior circulação. Na Figura 2.4 está representado o número de trabalhos publicados com PS-MS em função do ano, considerando o período de 2010 a 2019.

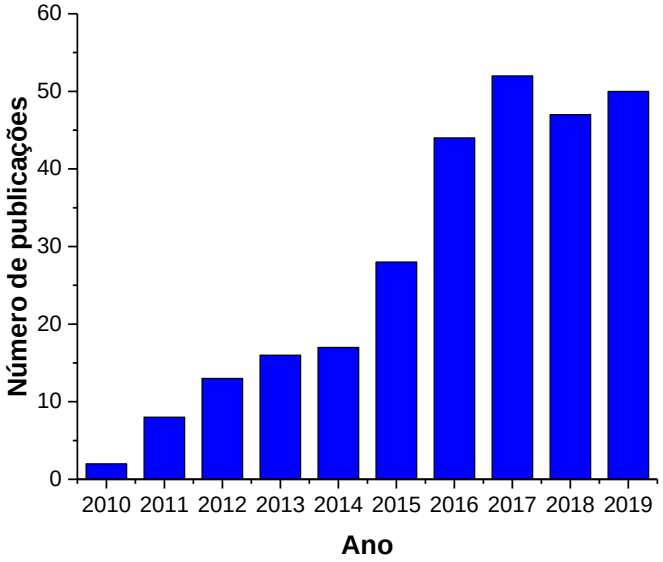

Figura 2.4 – Levantamento do número de publicações de trabalhos relativos ao uso de PS-MS em função do ano, no período de 2010 a 2019, feito utilizando a plataforma *Scifinder*® utilizando as palavras *paper-spray mass spectrometry*.
Fonte: Elaborada pelo autor.

1.3. Analisador de massas *linear ion trap*

O espectrômetro de massas que utiliza o analisador do tipo *ion trap linear* (LIT ou LTQ) apresenta os componentes ilustrados na Figura 2.5. Os íons gerados na fonte de íons são conduzidos até a entrada (*inlet*) do cone de amostragem devido ao campo elétrico formado pela diferença de potencial da fonte e a diferença de pressão existente entre o exterior e o interior do cone de amostragem (GROSS, 2017). Na interface da fonte e nos guias de íons, os íons são dessolvatados, focalizados e selecionados de acordo com os parâmetros ajustados pelo operador no *software* do equipamento (GROSS, 2017; THERMO SCIENTIFIC, 2012).

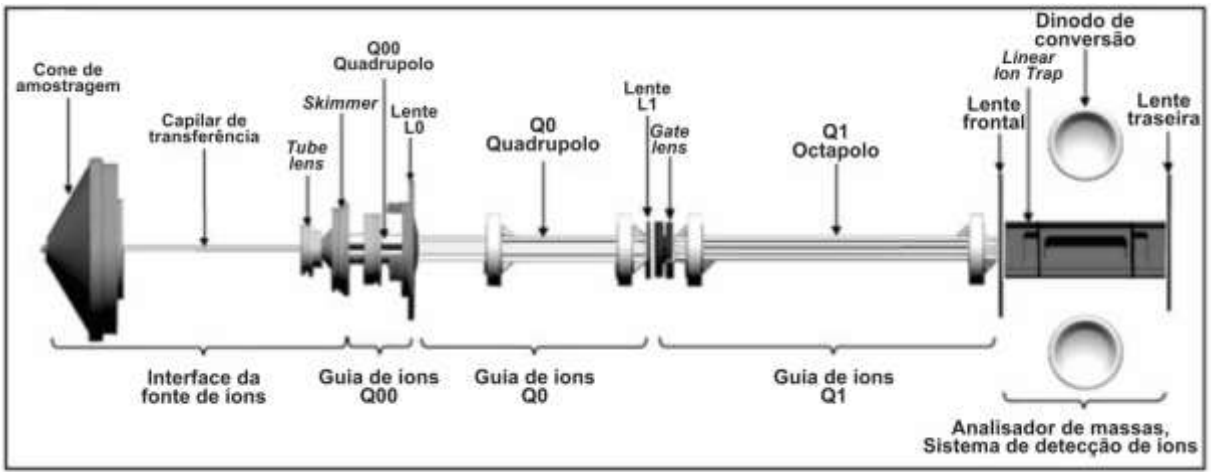

Figura 2.5 – Esquema da parte interna de um espectrômetro de massas *Finnigan LTQ Linear Ion Trap*, *Thermo Scientific* ®.
Fonte: Adaptada de Thermo Scientific ® (THERMO SCIENTIFIC, 2012)

O analisador de massas do tipo LTQ consiste em uma lente frontal, *ion trap linear* e lente traseira. As lentes frontal e traseira são placas de metal com um orifício circular no centro através do qual o feixe de íons passa. As lentes frontal e traseira servem para controlar a entrada, acumulação, estocagem e ejeção dos íons de interesse aplicando uma voltagem de sinal contrário, igual ou zero por um determinado período de tempo (THERMO SCIENTIFIC, 2012). Um *linear ion trap* é semelhante a um quadrupolo, no qual quatro eletrodos de metal (hastes) são dispostos em paralelos formando um quadrado no plano x-y. As hastes opostas são tratadas como um par e cada par tem uma corrente alternada e contínua aplicada. As lentes frontal e traseira permitem a entrada dos íons de interesse por um período de tempo pré-definido; os íons são resfriados por um gás inerte, diminuindo sua energia cinética, fazendo que os íons sejam estocados e se movimentem no eixo z com mesma energia e de forma estável (GROSS, 2017). A fragmentação desses íons pode ser realizada por meio da colisão com um gás neutro de energia elevada, chamada dissociação induzida por colisão (CID). A fragmentação fornece um mecanismo de identificação adicional para íons. Os íons podem ser ejetados do *linear ion trap* com base em seus *m/z* e, assim, a detecção pode ocorrer (SCHWARTZ; SENKO; SYKA, 2002; THERMO SCIENTIFIC, 2012).

Quando a frequência da corrente alternada aplicada às hastes é igual à frequência do movimento do íon aprisionado (que depende de sua massa), o íon ganha energia cinética. Se a magnitude da tensão aplicada for grande o suficiente ou se for dado tempo suficiente ao íon, o íon será ejetado do analisador de massa na

direção do sistema de detecção de íons. À medida que a tensão aumenta, os íons com valores cada vez maiores de *m/z* tornam-se instáveis e ejetam através das aberturas nas hastes de saída (Figura 2.6) (DOUGLAS; FRANK; MAO, 2005; THERMO SCIENTIFIC, 2012).

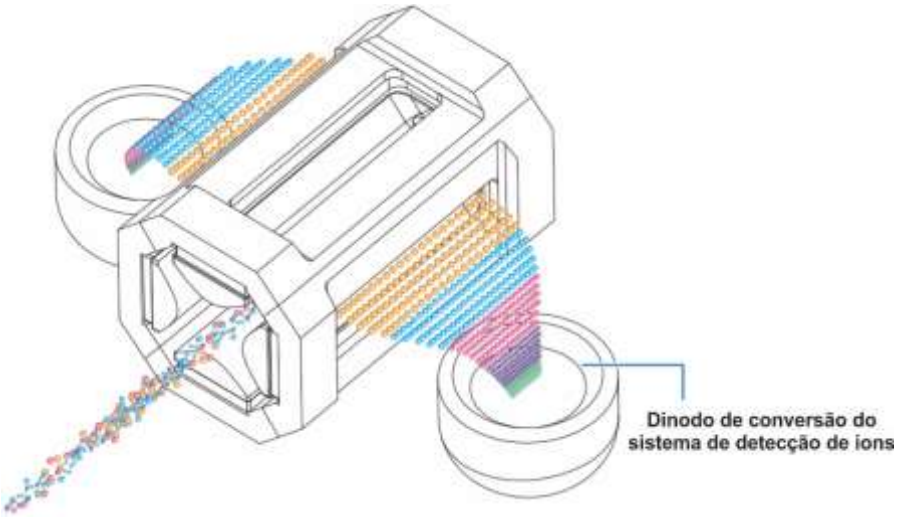

Figura 2.6 – Ilustração do funcionamento da ejeção de íons pelo LQT de acordo com a razão *m/z* do íon.
Fonte: Adaptada de Thermo Scientific ® (THERMO SCIENTIFIC, 2012)

Os equipamentos de *ion trap linear* apresentam vantagens quanto à redução do efeito espaço-carga (*space charge effect*), devido ao aumento do volume para armazenamento dos íons, aumento da sensibilidade, devido à maior eficiência de captura, altas taxas de varredura e simplicidade na construção. Porém, esse tipo de equipamento não possui alta resolução, o que dificulta a diferenciação de isóbaros (SCHWARTZ; SENKO; SYKA, 2002).

1.4. Doping esportivo

O Código Mundial Anti-*doping* é o documento fundamental e universal no qual o Programa Mundial Anti-*doping* no esporte é baseado. Foi criado com o propósito de proteger os direitos fundamentais dos atletas de participar de competições livres de *doping*, promovendo saúde, justiça e igualdade e coordenar a detecção, e prevenção de *doping* mundialmente (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2019d). O Código é revisado e publicado anualmente pela Agência Mundial Anti-*doping* (WADA).

Doping é definido no Código Mundial Anti-*doping* como a ocorrência de uma ou mais violações nas regras anti-*doping*. São exemplos de violações as regras: a

presença de substância proibida, seus metabólitos ou marcadores em amostras de atletas; uso ou tentativa de uso por atleta de uma substância proibida ou de um método proibido; evitar, recusar ou deixar de enviar amostras para coleta; posse de substância proibida ou método proibido; administração, tentativa de administração em qualquer atleta de qualquer substância proibida ou método proibido e cumplicidade envolvendo violações das regras anti-*doping* (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2019d).

A WADA foi criada em 1999 como uma agência internacional independente composta e financiada igualmente pelo movimento esportivo e pelos governos do mundo. Suas principais atividades incluem pesquisa científica, educação, desenvolvimento de capacidades antidopagem, monitoramento do Código Mundial Anti-*doping* e publicação/revisão da lista proibida. (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2019c).

1.4.1. A lista proibida

A lista proibida é publicada e revisada anualmente pela WADA e inclui todas as substâncias dopantes e métodos proibidos. A lista é dividida em três partes: substância e métodos proibidos (i) dentro e fora de competições, (ii) dentro de competições e (iii) em determinados esportes (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2019b).

Substâncias (S) e métodos (M) proibidos dentro e fora de competições:

- S0 – Substâncias não aprovadas: qualquer substância farmacológica que não é referida por nenhuma das classes citadas na lista proibida e sem aprovação por nenhuma autoridade de regulação governamental;
- S1 – Agentes anabólicos: esteroides anabolizantes androgênicos exógenos e endógenos e outros agentes anabolizantes, tais como estanozolol, trembolona, nandrolona, testosterona, clembuterol e tibolona;
- S2 – Hormônios peptídicos, fatores de crescimento, substâncias relacionadas e miméticos, tais como eritropoietina, gonadotrofina e hormônio de crescimento;
- S3 – Agonistas adrenérgicos Beta-2, tais como salbutamol e terbutalina;
- S4 – Moduladores hormonais e metabólicos, tais como androstanol, meldonium

e clomifeno;

- S5 – Diuréticos e agentes mascarantes: furosemida, hidroclorotiazida, bumetanida e clorotiazida;
- M1 – Manipulação do sangue e de seus componentes: administração ou reintrodução de qualquer quantidade de autólogo, alogênico (homólogo) ou heterólogo de sangue ou glóbulos vermelhos, aumento artificial da captação, transporte ou entrega de oxigênio e qualquer forma de manipulação intravascular do sangue ou de seus componentes por meios físicos ou químicos;
- M2 – Manipulação química e física: adulteração ou tentativa de adulteração para alterar a integridade e validade das amostras coletadas durante o controle de *doping*, infusões intravenosas e/ou injeções de mais de um total de 100 mL por período de 12 horas, exceto em procedimentos hospitalares ou clínicos.

Substâncias proibidas dentro de competições:

- S6 – Estimulantes: não-específicos e específicos, tais como anfetamina, cocaína, efedrina, sibutramina e metilfenidato;
- S7 – Narcóticos, tais como morfina, oxicodona e metadona;
- S8 – Canabinóides, tais como maconha, haxixe e Δ9-tetraidrocanabinol;
- S9 – Glucocorticóides, tais como prednisona, cortisona e hidrocortisona.

Substâncias proibidas em determinados esportes:

- P1 – Beta-bloqueadores: proibidos em arquearia, automobilismo, golfe e tiro, tais como propranolol, metoprolol e atenolol.

De forma a garantir que todos os laboratórios possam informar a presença de substâncias dopantes, seus metabólitos e marcadores de maneira uniforme, um limite de detecção e identificação mínimo foi estabelecido. O nível mínimo de desempenho exigido (MRPL) é a menor concentração de uma substância proibida, metabólito de substância proibida, marcador de substância proibida ou método proibido que os laboratórios devem ser capazes de detectar e identificar nas operações diárias. O MRPL é um parâmetro analítico obrigatório de desempenho técnico estabelecido pela WADA que os laboratórios devem cumprir em seus testes. O MRPL não é uma

concentração limite a partir da qual determinado composto é considerado proibido, amostras contendo concentrações abaixo do MRPL devem ser relatadas também. Os valores para MRPL variam de composto para composto e são estabelecidos levando em conta metabolismo, estabilidade, farmacocinética e farmacodinâmica das substâncias proibidas. Dessa maneira, substâncias com longos períodos de efeito e proibidas em todos os casos (esteroides anabolizantes, por exemplo) apresentam MRPL mais baixos que substâncias que tem seu efeito imediato e são proibidas dentro de competição (estimulantes, por exemplo) (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2019a).

1.4.2. Agentes anabólicos

Agentes anabólicos são substâncias que promovem o crescimento e divisão celular e são capazes de aumentar a massa muscular, o desempenho e a resistência dos atletas, além de diminuir o tempo de recuperação entre os exercícios. Inicialmente os anabolizantes foram utilizados para fins terapêuticos, porém, devido a suas características de aumento no desempenho físico são os compostos com mais número de resultados analíticos adversos no últimos anos (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2018) e são proibidos dentro e fora de competições (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2019b).

O uso indiscriminado de agentes anabolizantes, principalmente esteroides anabolizantes androgênicos, pode provocar feminização do homem, esterilidade, atrofia dos testículos, ginecomastia, masculinização da mulher, alteração de voz, doenças coronárias, disfunções renais e hepáticas, distúrbios psiquiátricos, taquicardia e tremor muscular (CASAVANT et al., 2007; PARR; FLENKER; SCHÄNZER, 2010; PRATHER et al., 1995; ROCHA; ROQUE; OLIVEIRA, 2007).

1.4.2.1. Trembolona

Trembolona (Figura 2.7a) é substância da classe dos esteroides anabolizantes androgênicos que são hormônios derivados da testosterona, o hormônio sexual masculino, e apresentam em suas estruturas quatro anéis, três com seis carbonos e um com 5 carbonos conectados entre si (OLIVARES et al., 2014). Foi sintetizada por

Velluz em 1963 e é utilizado para fins veterinários para melhorar a massa muscular, eficiência alimentar e absorção de minerais em bovinos, principalmente nos EUA. Com o nome comercial de Trenabol® ou Finajet®, é comercializado e administrado na forma de acetato de trembolona, porém, rapidamente é hidrolisado para o composto ativo, a trembolona (SCHÄNZER, 1996; SONE et al., 2005).

Trembolona é um derivado da nandrolona e apresenta propriedades anabólicas e androgênicas. Atua como um potente agonista dos receptores andrógenos de mamíferos, com afinidade de ligação ao receptor andrógeno humano comparável com a di-hidrotestosterona. A trembolona é muito mais potente que a testosterona e pouco menos androgênica, porém, sua maior vantagem, que pode afetar a promoção do crescimento muscular, é que a trembolona não é convertida a estradiol, conhecido hormônio feminino, como a testosterona pode ser convertida (JOHNSON; REINHARDT, 2009; SONE et al., 2005).

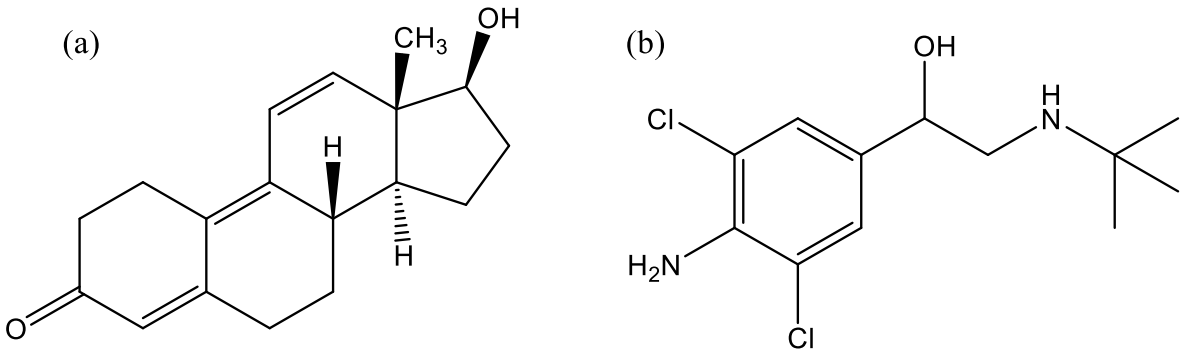

Figura 2.7 – Estruturas dos agentes anabólicos (a) trembolona e (b) clembuterol.
Fonte: elaborada pelo autor[3].

1.4.2.2. Clembuterol

Clembuterol (Figura 2.7b) é um potente receptor adrenérgico agonista Beta-2 utilizado no tratamento de asma em humanos em países europeus, porém, não é uma droga aprovada para utilização em humanos nos EUA, apenas como tratamento para o trato respiratório em cavalos. Apresenta estrutura similar a outros componentes da mesma classe, porém, possui maior seletividade, biodisponibilidade e maior tempo de meia-vida. Apesar desse potencial para utilização em tratamento de doenças, o clembuterol vem sendo utilizado como substância dopante por atletas por causa do seus efeitos anabólicos e lipolítico, sendo classificado pela WADA como agente

[3] As figuras de 2.7 a 2.36 foram elaboradas pelo autor.

anabolizante (WILSON, 2015; WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2019b).

Acredita-se que sua ativação dos receptores adrenérgicos beta-2 no músculo esquelético e no tecido adiposo seja responsável pelas propriedades anabólicas e lipolíticas do clembuterol, respectivamente. Contudo, não está totalmente claro como o clembuterol aumenta o tamanho do músculo esquelético (WILSON, 2015). Algumas evidências sugerem que essa droga aumenta a concentração intramuscular de inibidores específicos de proteases proteolíticas e o fluxo sanguíneo nos músculos (PRATHER et al., 1995).

Já foram observados alguns efeitos adversos na utilização de clembuterol, tais como dor de cabeça, tontura, náusea, taquicardia leve, palpitações, nervosismo, tremores, hipocalemia, hiperglicemia, tensão e alterações da pressão arterial (WILSON, 2015).

1.4.3. Diuréticos e agentes mascarantes

Diuréticos são agentes terapêuticos que atuam nos rins aumentando a excreção de sais e água (SELDIN; GIEBISCH, 1997). Diuréticos são utilizados para reduzir o volume sanguíneo e intestinal e são indicados em determinadas condições de saúde, tais como edemas, problemas renais, hipertensão, pedras nos rins, hipercalcemia e alguns casos de diabetes (MORGAN, 1978).

Além do uso terapêutico, diuréticos são proibidos dentro e fora de competições devido a duas razões principais. Por causa da eliminação de líquidos que os diuréticos causam, uma rápida perda de peso pode ser alcançada para que o competidor se enquadre numa determinada categoria de peso, abaixo da sua real categoria, em esportes como boxe, judô e levantamento de peso. Também, podem ser utilizados para mascarar uma outra substância proibida; o aumento no volume de urina dilui outras possíveis substâncias ilegais que podem estar presentes e que seriam detectadas em concentrações mais elevadas (CADWALLADER et al., 2010).

O uso incorreto de diuréticos pode acarretar desidratação, náusea, vómito, cãibra, tontura, hipotensão, hipocalcemia, hipomagnesemia, hiperuricemia, hiperglicemia e alcalose (CADWALLADER et al., 2010).

1.4.3.1. Furosemida

A furosemida (Figura 2.8a) é um diurético derivado do ácido antranílico e pertencente à classe dos diuréticos de alça, a classe com maior poder diurético. Sua ação ocorre na alça de Henle presente nos rins, se ligando aos pontos de ligação de Cl^- do transportador de $Na^+/K^+/2Cl^-$, inibindo o transportador desses íons. Como consequência há uma significativa redução na habilidade dos rins de concentrar urina e, dessa maneira, há um aumento na excreção urinária de Na^+, Cl^-, K^+, Ca^{2+} e Mg^{2+} (CADWALLADER et al., 2010; SELDIN; GIEBISCH, 1997). Diuréticos de alça podem aumentar em até 30 vezes o fluxo de urina comparada com a excreção normal de urina (BARROSO; ALONSO; JIMÉNEZ, 1995).

Desde de sua aprovação pelo FDA, a furosemida vem sendo amplamente utilizada devida a sua efetividade, baixo custo e poucos efeitos adversos (BUITRAGO et al., 2010). Apresenta meia-vida no plasma em torno de 1 a 2 h e é excretada majoritariamente na urina na sua forma nativa (LUIZ; PEZZA; PEZZA, 2013). É indicada no tratamento de edema pulmonar agudo, hipertensão, insuficiência cardíaca congestiva, doenças renais e ascite de cirrose hepática (CADWALLADER et al., 2010).

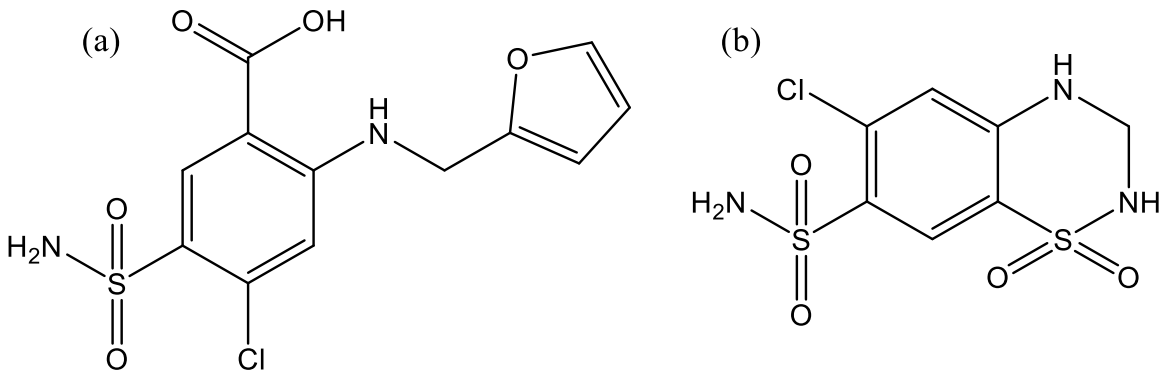

Figura 2.8 – Estruturas dos diuréticos (a) furosemida e (b) hidroclorotiazida.

1.4.3.2. Hidroclorotiazida

A hidroclorotiazida (Figura 2.8b) é um diurético derivado da sulfonamida e pertencente à classe dos diuréticos tiazídicos. Essa classe de fármacos atua nos túbulos contorcidos distal e proximal reduzindo a reabsorção de Na^+ pela inibição do co-transportador de Na^+/Cl^-, aumentando o transporte osmótico de água e a excreção de Na^+, Cl^- e, consequentemente, do fluxo urinário (CADWALLADER et al., 2010;

SELDIN; GIEBISCH, 1997).

Os diuréticos tiazídicos são os diuréticos mais utilizados e foram empregados como o primeiro tratamento para hipertensão devido a redução do volume sanguíneo que esses fármacos causam (ARABI; GHAEDI; OSTOVAN, 2017). Também, são utilizados para edemas associados a doenças renais, cardíacas e no fígado. São frequentemente utilizados devido ao seu baixo custo, alta tolerância, boa adesão (administração única diária), poucas contraindicações, eficácia comparável a outras classes de agentes anti-hipertensivos e benefícios comprovados na redução da mortalidade cardiovascular (CADWALLADER et al., 2010).

1.4.4. A detecção do doping

Dentre os diferentes métodos descritos na literatura, a espectrometria de massas é considerada um padrão de excelência para a detecção e análise de substâncias dopantes em amostras biológicas (KRONE et al., 2010; OZGUR et al., 2019). Métodos envolvendo MS além de apresentarem baixos limites de detecção e quantificação inerentes à técnica, têm alta seletividade, pois utilizando *tandem* MS^n, que é capaz de filtrar os compostos indesejáveis, eliminando possíveis interferentes. Também, a fragmentação do analito de interesse (MS^n) gera um padrão de fragmentação que é capaz de fornecer informações estruturais, tornando a metodologia mais confiável (KULYK; MILLER; BADU-TAWIAH, 2015; MCLAFFERTY, 1981). Contudo, usualmente a MS é utilizada como o método de detecção de uma etapa anterior de separação, frequentemente, cromatografia líquida (LC-MS) ou cromatografia gasosa (GC-MS). Essas metodologias são muito seletivas, sensíveis e apresentam baixos limites de detecção, entretanto, a análise direta da amostra utilizando métodos cromatográficos não é possível; procedimentos de preparo e *clean-up* da amostra que envolvem extração, pré-concentração e derivatização são necessários antes da análise. Esses procedimentos são as etapas mais laboriosas, demandam mais tempo e produzem grandes volumes de descarte, além de serem a maior fonte de erros dos procedimentos.

A determinação de compostos dopantes é uma análise de alta demanda. O último relatório anti-*doping* publicado pela WADA mostrou mais de 320.000 amostras analisadas em 2017, um aumento de 7,1% comparado a 2016, apresentando 4.596

resultados analíticos adversos relatados pelos laboratórios acreditados (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2018). Essa alta demanda de testes anti-*doping* vem motivando pesquisadores para desenvolver metodologias simples e rápidas, porém, seletivas e sensíveis que minimizem a preparação de amostra, consumo de reagentes e solventes, produção de resíduos e o tempo necessário para sua realização.

2. OBJETIVOS

Geral:

No presente trabalho temos como objetivo principal desenvolver e validar um método para a análise direta de trembolona, clembuterol, furosemida e hidroclorotiazida em amostras de urina utilizando *paper-spray mass spectrometry*.

Específicos:

- Avaliar o potencial de PS-MS para detectar substâncias dopantes;
- Caracterizar os compostos de interesse utilizando *tandem* MS^n;
- Estudar a influência da modificação do papel na detectabilidade dos analitos;
- Caracterizar o papel modificado;
- Otimizar as condições experimentais;
- Determinar as figuras de mérito do método proposto;
- Validar o método proposto;
- Aplicar o método desenvolvido em amostras de urina.

3. PARTE EXPERIMENTAL

Em seguida serão descritas as principais características dos reagentes, soluções e equipamentos utilizados no presente estudo.

3.1. Equipamentos

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

- Balança analítica da marca Mettler Toledo, modelo XSR;
- Bomba de vácuo;
- Dessecador de plástico;
- Espectrômetro de massas da marca Thermo Fisher Scientific, modelo Finnigan LTQ, equipado com um analisador *linear ion trap*;
- Papel qualitativo n°1, marca Whatman (24 cm);

Todos os equipamentos encontram-se instalados em salas devidamente equipadas com energia estabilizada e ar condicionado.

3.2. Reagentes

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

- Cloridrato de clembuterol – SIGMA ALDRICH – pureza 95 %;
- Furosemida – SIGMA ALDRICH;
- Hidroclorotiazida – SIGMA ALDRICH;
- Tricloro(3, 3, 3-trifluoropropil)silano – SIGMA ALDRICH – pureza 97 %;
- Triclorometilsilano – FISHER SCIENTIFIC;
- Acetonitrila – SIGMA ALDRICH – pureza 99,9 %;
- Metanol – SIGMA ALDRICH – pureza 99,9 %;
- Acetato de etila anidro– SIGMA ALDRICH – pureza 99,8 %;
- Etilenoglicol – SIGMA ALDRICH;
- Dimetilsulfóxido – SIGMA ALDRICH;
- Quinolina – SIGMA ALDRICH;

- Ciclohexanol – SIGMA ALDRICH – pureza 99 %;
- Água deionizada utilizada no preparo das soluções de reagentes, padrões e amostras – Millipore 0,22 µm – 18,2 MΩ.cm – 25º C;

3.3. Solução

A seguir está descrita a solução de padrão estoque utilizada para o preparo das soluções de trabalho e as amostras utilizadas no desenvolver do projeto.

3.3.1. Solução padrão estoque de trembolona

- Solução padrão estoque de trembolona (1 mg mL^{-1} em acetonitrila) – CERILLIANT.

3.3.2. Amostras de urina

Amostras de urina foram coletadas apenas do próprio autor desse trabalho para garantir que eram livres dos analitos de interesse, além de não necessitar de autorizações do Comitê de Ética. As amostras de urina foram fortificadas com solução em solvente orgânico dos analitos alvo. Foi garantido que menos de 1% do volume total de amostra fosse solvente orgânico para não influenciar na análise ou alterar as propriedades dos componentes e da amostra em si. Sempre foram utilizadas amostras de urina recém coletadas.

3.3.3. Soluções para as curvas analíticas

Para construção das curvas analíticas, as amostras de urina foram fortificadas com TREM, CLEM, FUR e HCT separadamente com as seguintes concentrações: 5 – 1000 ng mL^{-1} para TREM, 1 – 1000 ng mL^{-1} para CLEM, 50 – 25 x 10^3 ng mL^{-1} para FUR e HCT.

4. METODOLOGIAS

4.1. Produção dos triângulos de papel

Os círculos de papel qualitativo n°1 com 24 cm de diâmetro foram cortados em triângulos isósceles com comprimento da base de 9,5 cm e altura igual a 16,5 cm, com área de aproximadamente 80 mm^2. Os triângulos foram cortados com auxílio de uma cortadora de papel do tipo guilhotina.

4.2. Silanização do papel

O tratamento do papel com o derivado de triclorosilano foi realizado por meio da deposição em fase de vapor. Resumidamente, uma alíquota de 0,5 mL do derivado de triclorosilano foi colocado em um recipiente e acondicionado no fundo do dessecador, enquanto que os triângulos de papel foram posicionados no disco de plástico do dessecador. Com auxílio de uma bomba de vácuo a pressão interna do dessecador foi reduzida (20 torr) (Figura 2.9). Após determinado período de tempo, a reação foi interrompida pela restauração da pressão atmosférica e retirada dos papeis do dessecador. Em todos os experimentos os papéis foram cortados antes da silanização.

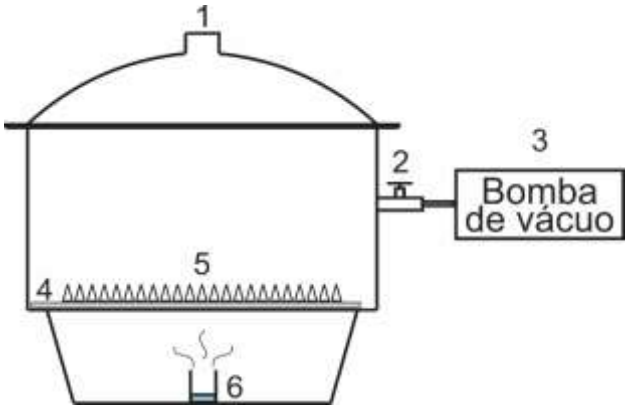

Figura 2.9 – Esquema da configuração utilizada na silanização em fase de vapor. 1. Dessecador; 2. Válvula; 3. Sistema de bomba de vácuo; 4. Disco de plástico do dessecador; 5. Triângulos de papel; 6. Organosilano.

4.3. Espectrometria de massas

Para realizar os experimentos envolvendo espectrometria de massas, o

triângulo de papel foi posicionado com sua ponta paralela a entrada do espectrômetro (*inlet*) utilizando um garra de cobre, do tipo jacaré, conectado ao fio de alta voltagem da fonte de ESI (Figura 2.10). Os parâmetros utilizados nos experimentos foram os seguintes:

- Voltagem do capilar de transferência = ± 30 V;
- Voltagem da fonte = ± 2 kV;
- 3 microscans;
- Tempo de injeção dos íons = 100 ms;
- Distância do papel a entrada do espectrômetro de massas = 3 mm;
- Temperatura do capilar de transferência = 240 °C para o modo positivo e 250 °C para o modo negativo;
- Voltagem das lentes = 100 V para o modo positivo e -120 V para o modo negativo;

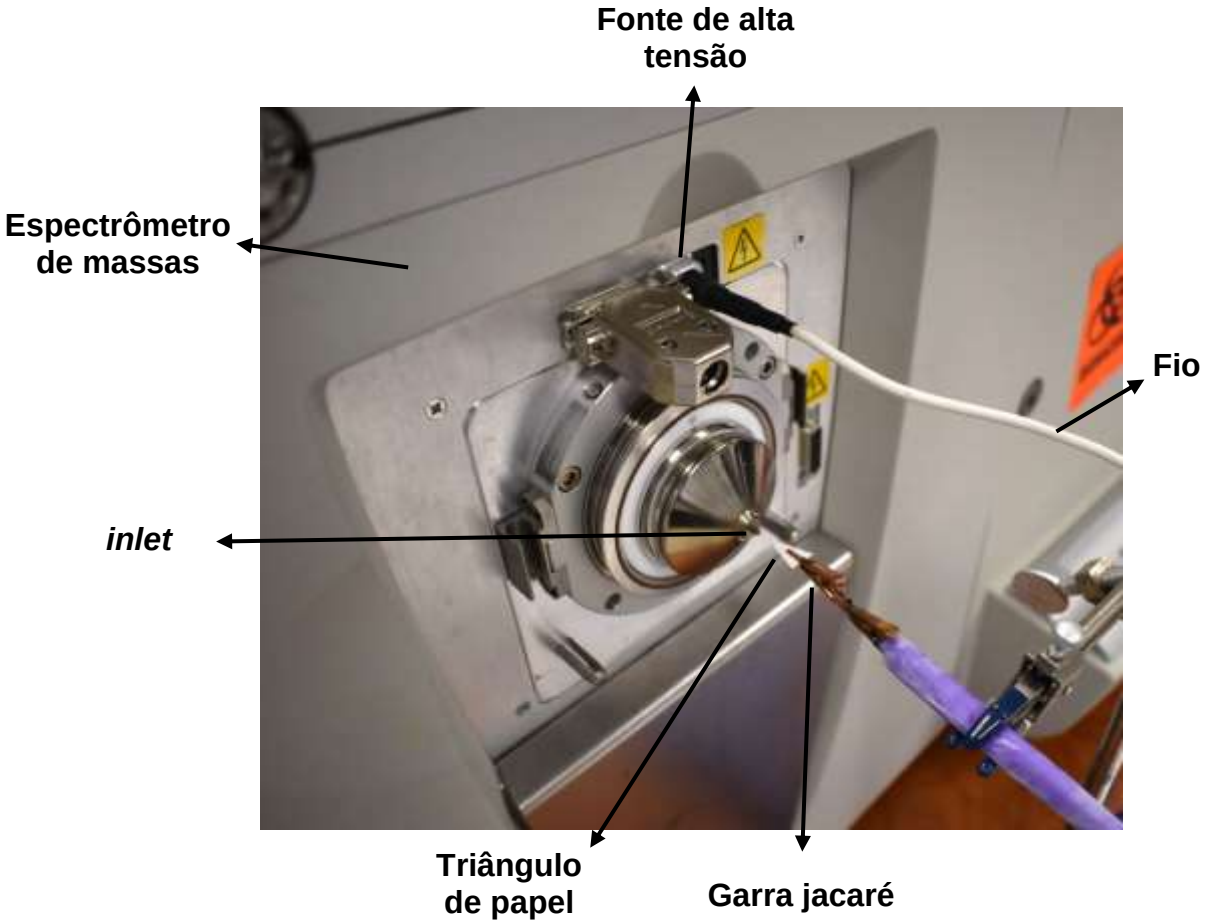

Figura 2.10 – Configuração do espectrômetro de massas utilizado para realização dos experimentos com PSI.

Os dados produzidos durante os experimentos foram coletados e processados utilizando *Thermo Fisher Scientific Xcalibur 2.2 SP1 software*. Espectrometria de massas sequencial (*tandem* MS) por meio de dissociação induzida por colisão (CID) foi utilizada para identificação dos analitos e foi otimizada para cada composto.

4.4. Experimento utilizando *paper-spray ionization mass spectrometry*

Uma alíquota de 6 µL das amostras de urina fortificada com os analitos foi depositada sobre o triângulo de papel próximo a ponta. Após a secagem da amostra a temperatura ambiente, foram adicionados 20 µL de solvente orgânico para proceder com o experimento de PS-MS (Figura 2.11).

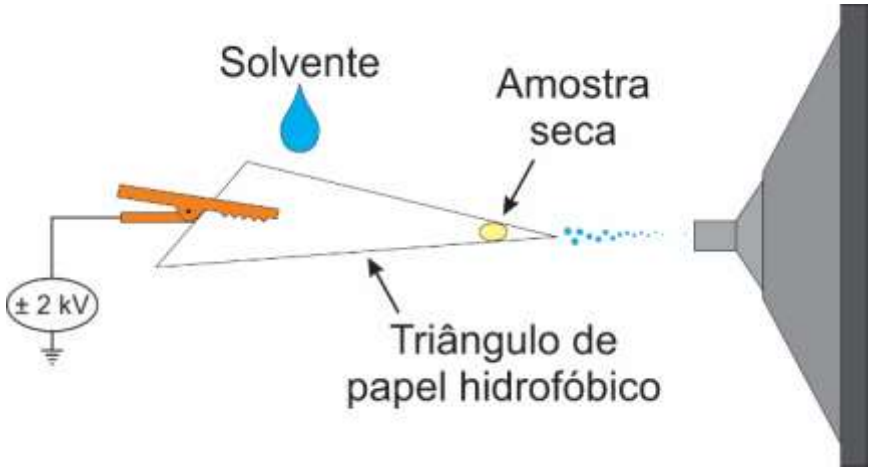

Figura 2.11 – Representação esquemática da configuração utilizada na análise de compostos em urina utilizando PS-MS.

4.5. Estimativa da energia de superfície utilizando método de *bracketing*

A energia de superfície do papel tratado com TCMS e TCTFPS foi estimado utilizando o método de *bracketing*. Na Tabela 2.1 estão descritos os diferentes solventes puros e misturas de água e acetonitrila empregados e suas tensões superficiais. Para estimar a energia de superfície dos papéis hidrofóbicos, uma gota de 10 µL do solvente foi colocada sobre a superfície do papel, iniciando do solvente com maior para o solvente com menor tensão superficial. Esse procedimento foi repetido para os papéis tratados com diferentes tempos e com diferentes reagentes.

Tabela 2.1 – Tensão superficial de diferentes solventes e misturas de acetotinitrila e água com diferentes frações molares.

Solventes[a]	**Tensão superficial (mN m^{-1})** (RAFATI; BAGHERI; NAJAFI, 2010)	**Razão molar x_{ACN}**	**Razão molar x_{H2O}**
1	62,36	0,0149	0,9851
2	55,92	0,0298	0,9702
3	49,39	0,0576	0,9484
Etilenoglicol	47,3	-	-
Dimetilsulfóxido	43,54	-	-
Quinolina	43,12	-	-
4	40,54	0,095	0,905
5	37,97	0,1227	0,8773
Ciclohexanol	34,4	-	-
6	32.92	0.2541	0.7459
7	31.68	0.3959	0.6041
8	31.45	0.4851	0.5149
9	30,95	0,5913	0,4087
Acetonitrila	28,66	1	0

[a]Os solventes de 1 a 9 representam misturas de acetonitrila e água nas razões molares (x_{ACN} e x_{H2O}) descritas nesta Tabela.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram escolhidos trembolona, clembuterol, furosemida e hidroclorotiazida para o desenvolvimento do trabalho, pois essas substâncias pertencem as duas classes de substâncias proibidas com maior número de ocorrências no último relatório enviado pela WADA (59 % de todas as ocorrências): agentes anabolizantes e diuréticos e agentes mascarantes. Os quatro analitos juntos representam 18 % de todos os resultados analíticos adversos e são as substâncias mais relatadas em suas classes (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2018), sendo importantes alvos nos testes anti-*doping*. Ainda, diuréticos podem ser adquiridos sem a necessidade de prescrição médica e são amplamente disponíveis para a população que pode utilizá-los como mascarantes de outras substâncias proibidas. A matriz escolhida para realizar as análises foi a urina. Amostras de urina são ainda muito utilizadas para análises anti-*doping*, representando aproximadamente 91 % de todas as amostras analisadas em 2017 (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2018), além disso, amostras de urina são mais vantajosas que amostras de sangue, pois são coletadas mais convenientemente e de forma não invasiva, e estão disponíveis em quantidade relativamente grande (LIN et al., 2011; PROTTI; MANDRIOLI; MERCOLINI, 2019).

5.1. Silanização do papel

Os triângulos de papel de filtro qualitativo foram tratados com TCMS ou TCTFPS via deposição em fase de vapor em um dessecador, como descrito no item 4.2. Sob pressão reduzida (20 torr), a pressão parcial de vapor do derivado de triclorosilano enriquece a fase gasosa com o vapor do composto. A umidade presente no papel e no dessecador catalisa a polimerização entre o derivado de triclorosilano, na forma de organosilanol ($RSi(OH)_3$), e os grupos hidroxil presentes na superfície do papel, liberando ácido clorídrico mais água, a qual continua reagindo para polimerizar o organosilano (DAMON et al., 2016), como ilustrado na Figura 2.12. Após a reação o papel que era hidrofílico devido aos seus grupos hidroxil na superfície, passou a ter características hidrofóbicas do derivado de organosilano utilizado na silanização do papel.

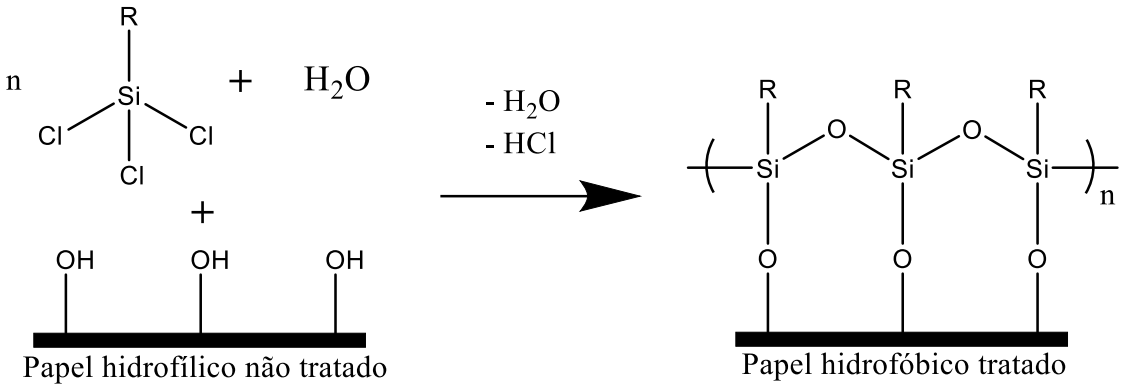

Figura 2.12 – Modificação do papel através da silanização dos grupos hidroxil presente na superfície do papel utilizando vapor de triclorosilano para criação uma camada hidrofóbica.

5.2. Análise via PS-MS e caracterização estrutural dos analitos alvo

5.2.1. Trembolona utilizando PS-MS no modo íon positivo

Uma alíquota de 6 µL de solução de trembolona (MeOH:H_2O – 1:1) depositada no papel hidrofóbico foi analisada utilizando PS-MS após a aplicação de 20 µL de metanol, utilizado como solvente de *spray* nos experimentos preliminares. O espectro de massas resultante está ilustrado na Figura 2.13.

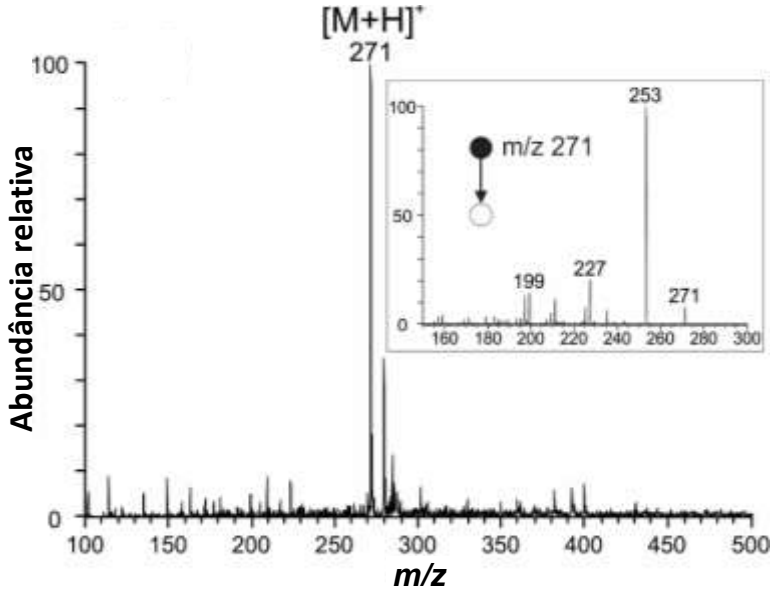

Figura 2.13 – Espectro de massas obtido por meio de PS-MS em modo íon positivo para solução de trembolona (MM 270) preparada em MeOH:H_2O (1:1) utilizando papel hidrofóbico tratado com TCTFPS por 120 min. Espectro de CID-MS^2 para o íon protonado da trembolona está inserido na figura. Energia de colisão = 23 eV. C_{TREM} = 1000 ng mL^{-1}.

O íon molecular protonado $[M+H]^+$ com *m/z* 271 domina o espectro, indicando mínima ou ausência de fragmentação. A estrutura da trembolona foi confirmada por

tandem MS via CID (Figura 2.13). O íon precursor fragmentou primariamente através da perda neutra de uma molécula de H_2O para formar o pico base em *m/z* 253. O íon precursor (*m/z* 271) pode também eliminar uma molécula de etanal (44 Da) seguido de migração do grupo metil para formar um íon mais estável (*m/z* 227) devido a maior ressonância e, subsequentemente, perder uma molécula de etileno (28 Da) para formar o íon produto em *m/z* 199 (THEVIS; GUDDAT; SCHÄNZER, 2009). O padrão de fragmentação via CID do íon molecular protonado da trembolona no modo íon positivo está ilustrado na Figura 2.14.

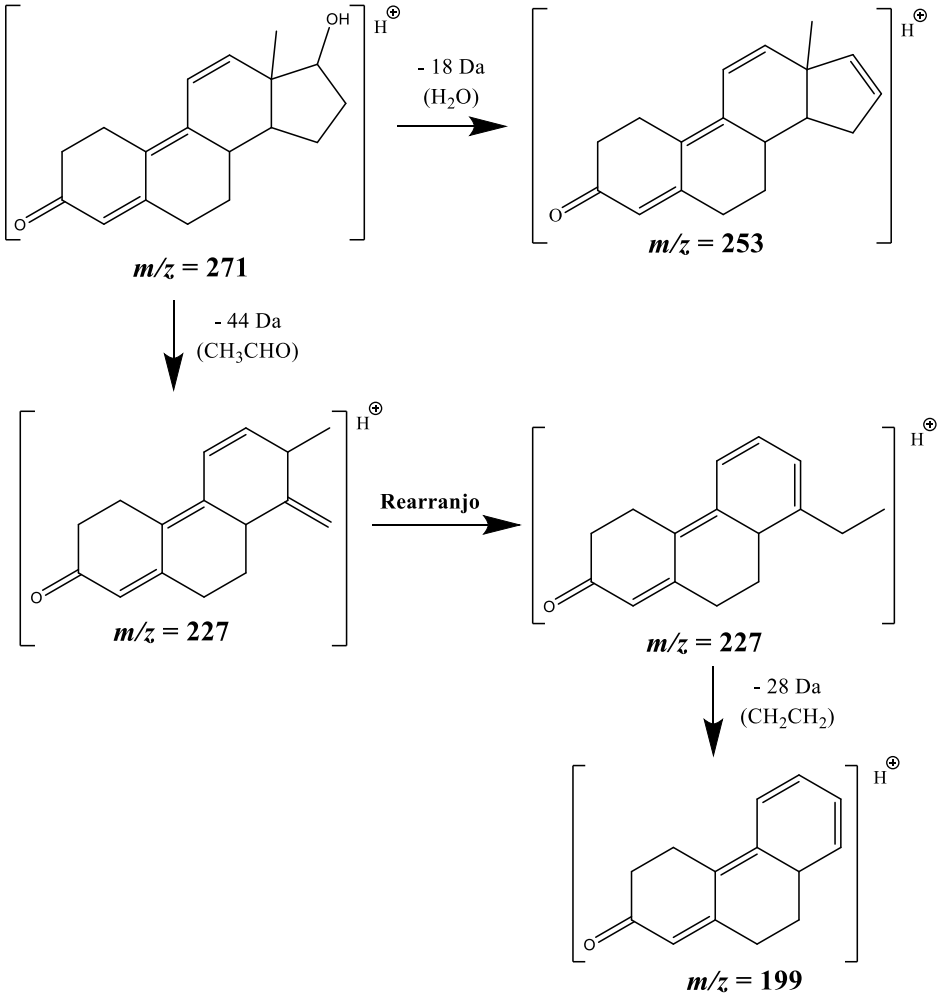

Figura 2.14 – Proposta de padrão de fragmentação via CID-MS^2 proposto do íon trembolona protonado (*m/z* 271) no modo íon positivo. A fragmentação apresenta os principais íons fragmentos em *m/z* 253, 227 e 199.

5.2.2. Clembuterol utilizando PS-MS no modo íon positivo

Uma alíquota de 6 µL de solução de clembuterol (MeOH:H_2O – 1:1) depositada no papel hidrofóbico foi analisado utilizando PS-MS após a aplicação de 20 µL de metanol, utilizado como solvente de *spray* nos experimentos preliminares. O espectro

de massas resultante está ilustrado na Figura 2.15.

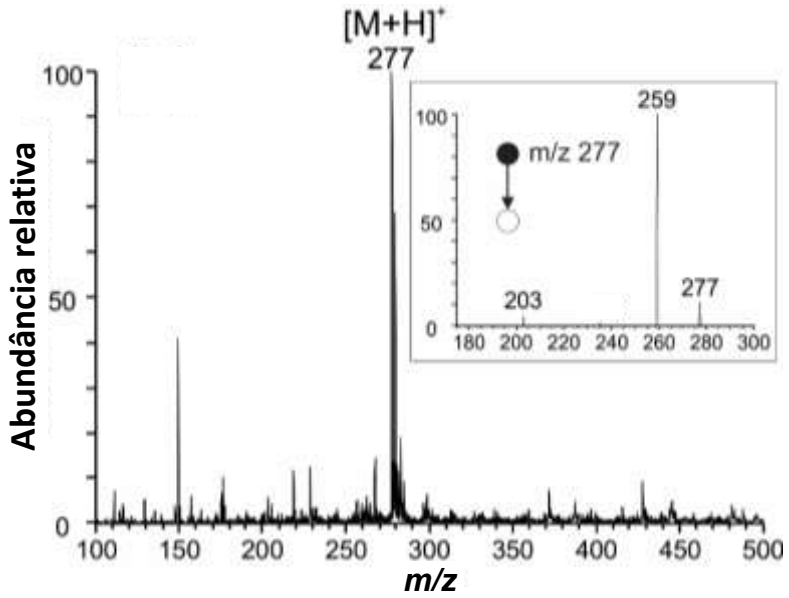

Figura 2.15 – Espectro de massas obtido por meio de PS-MS em modo íon positivo para solução de clembuterol (MM 277) preparada em MeOH:H_2O (1:1) utilizando papel hidrofóbico tratado com TCTFPS por 120 min. Espectro de CID-MS^2 para o íon protonado do clembuterol está inserido na figura. Energia de colisão = 15 eV. C_{CLEM} = 1000 ng mL^{-1}.

O íon molecular protonado do clembuterol $[M+H]^+$ com *m/z* 277 domina o espectro, indicando mínima ou ausência de fragmentação. Sua estrutura foi confirmada por *tandem* MS via CID (Figura 2.15). O íon precursor fragmentou primariamente pela perda neutra de uma molécula de H_2O para formar o pico base em *m/z* 259, seguido da perda de uma molécula de isobutileno (56 Da) para formar o íon produto em *m/z* 203. O padrão de fragmentação via CID do íon molecular protonado do clembuterol no modo íon positivo está ilustrado na Figura 2.16.

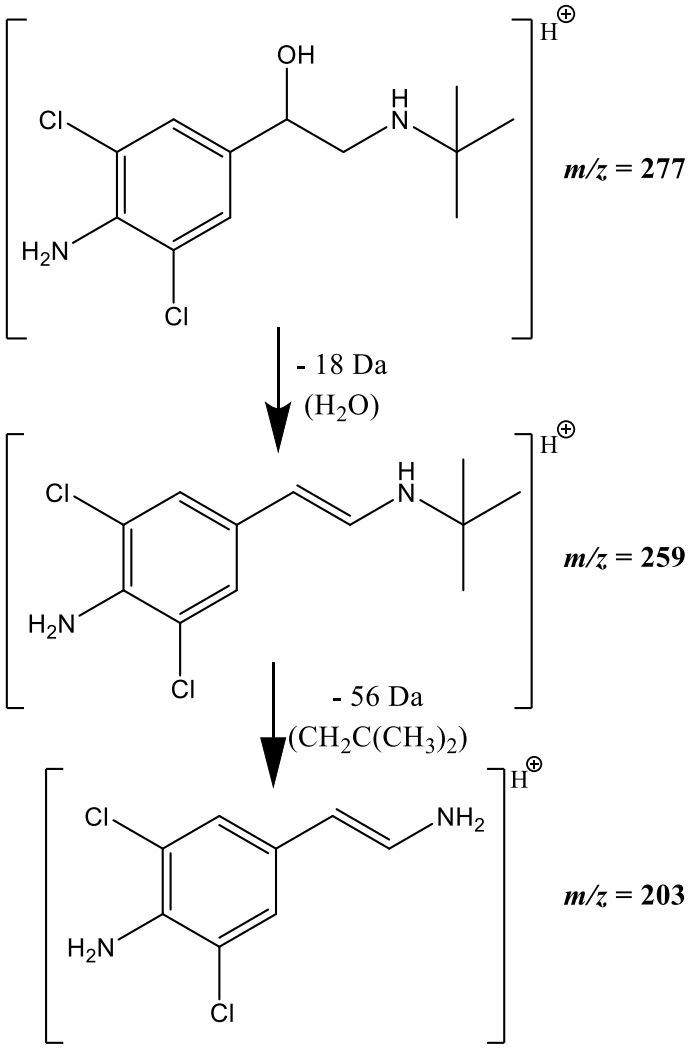

Figura 2.16 – Proposta de padrão de fragmentação via CID-MS^2 proposto do íon clembuterol protonado (*m/z* 277) no modo íon positivo. A fragmentação apresenta os principais íons fragmentos em *m/z* 277, 259 e 203.

5.2.3. Furosemida utilizando PS-MS no modo íon negativo

O espectro de massas da análise de 6 µL de solução de furosemida (MeOH:H_2O – 1:1) depositada sobre o papel hidrofóbico utilizando PS-MS no modo íon negativo é ilustrado na Figura 2.17. O pico mais intenso é o íon molecular desprotonado $[M-H]^-$ da furosemida em *m/z* 329. A estrutura da furosemida foi confirmada por *tandem* MS via CID (inserido na Figura 2.17).

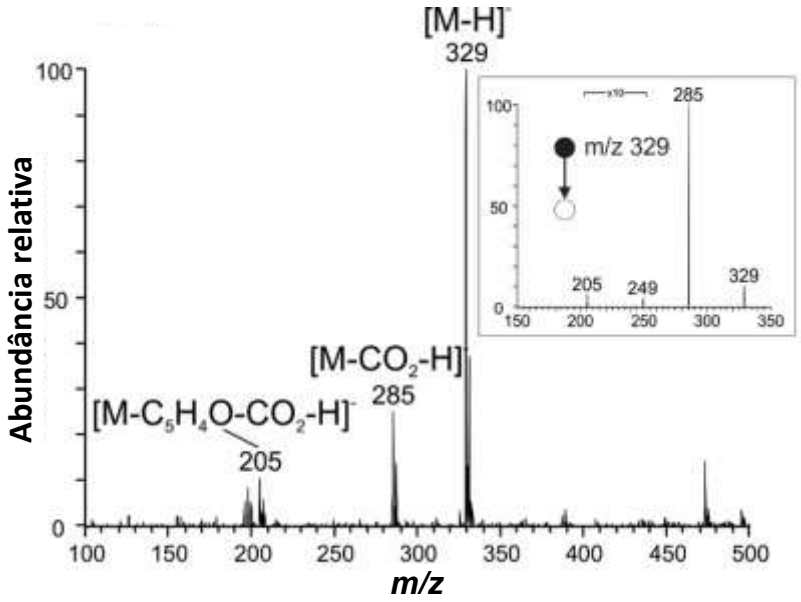

Figura 2.17 – Espectro de massas no modo íon negativo registrado para furosemida (MM 331) preparado em MeOH:H_2O (1:1) utilizando papel hidrofóbico tratado com TCTFPS por 120 min. Espectro de CID-MS^2 para o íon desprotonado da furosemida está inserido na figura. Energia de colisão = 16 eV. C_{FUR} = 25 µg mL^{-1}.

O íon precursor (*m/z* 329) fragmentou preferencialmente pela perda neutra de uma molécula de CO_2 (44 Da) para formar o íon do pico base em *m/z* 285, seguido da perda d C_5H_4O (80 Da) para formar o íon produto em *m/z* 205. O íon em *m/z* 205 pode também ter sido formado pela perda de uma molécula de C_5H_4O (80 Da) para posteriormente eliminar uma molécula de CO_2 (44 Da). O padrão de fragmentação via CID-MS^2 do íon desprotonado da furosemida no modo íon negativo é ilustrado na Figura 2.18. Comparando o espectro de CID-MS^2 (inserido na Figura 2.17) com o espectro da Figura 2.17, é possível observar que os picos em *m/z* 285 e 205, correspondente aos íons produto, estão presentes em ambos os espectros. Isso indica que pode ter ocorrido fragmentação na fonte. A abundância e estabilidade desses dois íons produto permitiram experimentos de *tandem* MS^n via CID para confirmar essa hipótese. O espectro de CID-MS^2 para ambos os íons fragmento (*m/z* 285 e 205) e precursor foram similares aos espectros de CID-MS^3 do íon precursor em *m/z* 329, podendo concluir que os picos em *m/z* 285 e 205 são decorrentes de fragmentação na fonte.

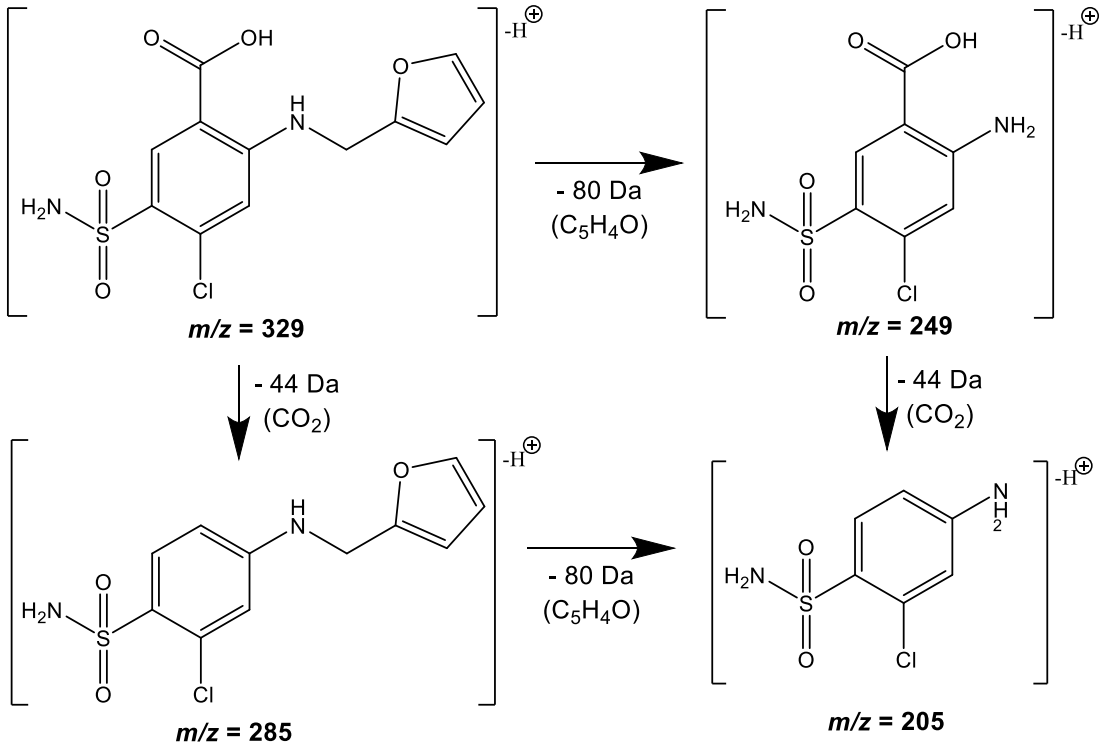

Figura 2.18 – Proposta de padrão de fragmentação via CID-MS^2 proposto do íon furosemida desprotonado (*m/z* 329) no modo íon negativo. A fragmentação apresenta os principais íons fragmentos em *m/z* 285, 249 e 205.

5.2.4. Hidroclorotiazida utilizando PS-MS no modo íon negativo

O mesmo experimento utilizando PS-MS foi realizado para 6 µL de solução de hidroclorotiazida (MeOH:H_2O – 1:1) no modo íon negativo. O pico mais intenso do espectro de massas é o íon molecular desprotonado $[M-H]^-$ da hidroclorotiazida em *m/z* 296, como apresentado na Figura 2.19. A estrutura da hidroclorotiazida foi confirmada por *tandem* MS^2 via CID (inserido na Figura 2.19).

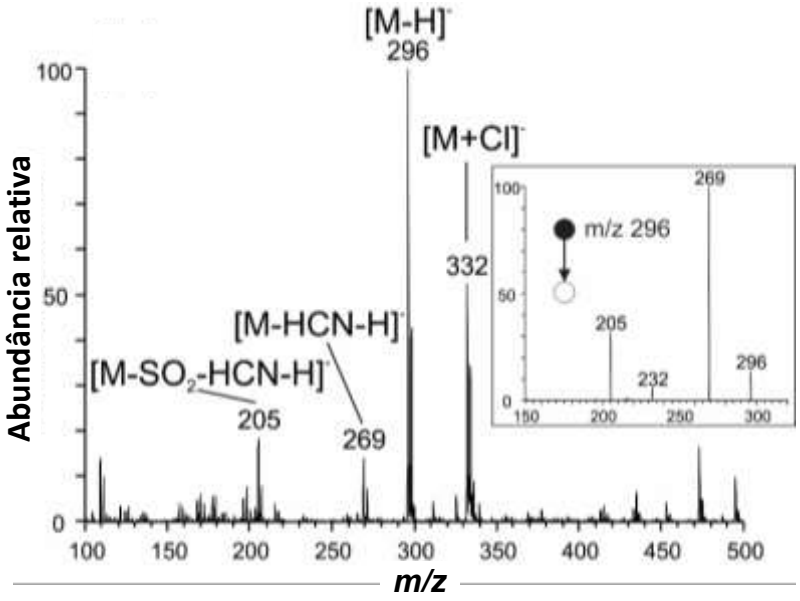

Figura 2.19 – Espectro de massas no modo íon negativo registrado para hidroclorotiazida (MM 298) preparado em MeOH:H_2O (1:1) utilizando papel hidrofóbico tratado com TCTFPS por 120 min. Espectro de CID-MS^2 para o íon desprotonado da hidroclorotiazida está inserido na figura. Energia de colisão = 20 eV. C_{HCT} = 25 µg mL^{-1}.

O íon precursor (*m/z* 296) fragmentou preferencialmente pela perda neutra de uma molécula de HCN (27 Da) para formar o íon do pico base em *m/z* 269, seguido da perda de SO_2 (64 Da) para formar o íon produto em *m/z* 205. O íon do pico em *m/z* 205 pode também ser formado inicialmente da perda de SO_2 (64 Da), e posterior eliminação de HCN (27 Da). O padrão de fragmentação via CID-MS^2 do íon desprotonado da hidroclorotiazida no modo íon negativo é ilustrado na Figura 2.20. Comparando o espectro de CID-MS^2 (inserido na Figura 2.19) com o espectro da Figura 2.19, é possível observar que os picos em *m/z* 285 e 205, correspondente aos íons produto, estão presentes em ambos os espectros, indicando que pode ter ocorrido fragmentação na fonte. Experimentos de *tandem* CID-MS^2 dos íons produto (*m/z* 269 e 205) e do íon precursor e *tandem* CID-MS^3 do íon precursor em *m/z* 296 confirmaram essa hipótese. Também, o pico em *m/z* 332, presente na Figura 2.19, é referente ao aduto formado entre a HCT com o íon cloreto, $[M+Cl]^-$. Pode-se confirmar a formação do aduto pela distribuição isotópica de 10:6:1 causada pela adição de um cloreto (35 Da) à massa da molécula de HCT que já apresenta um átomo de cloro em sua composição. A adição de um íon cloreto foi confirmada também por experimento de *tandem* CID-MS^2.

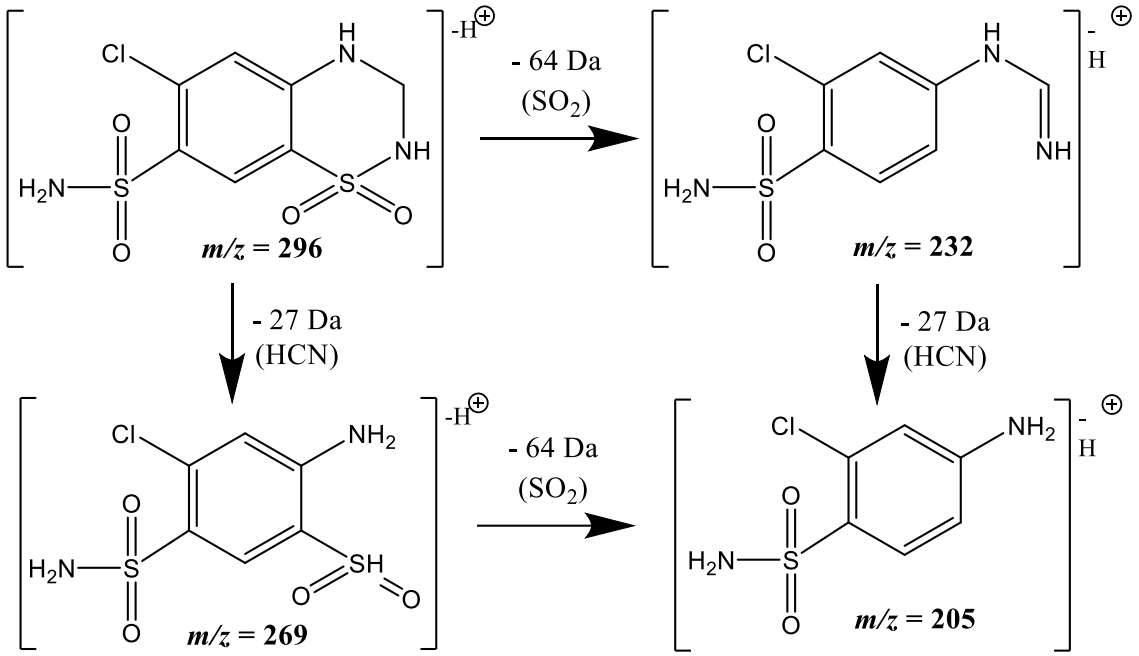

Figura 2.20 – Proposta de padrão de fragmentação via CID-MS^2 proposto do íon hidroclorotiazida desprotonado (*m/z* 296) no modo íon negativo. A fragmentação apresenta os principais íons fragmentos em *m/z* 269, 232 e 205.

5.3. Otimização das variáveis

5.3.1. Voltagem do tube lens e temperatura do capilar

Íons cloreto estão presentes em amostras de fluidos biológicos, tais como urina e sangue. Quando operando em modo íon negativo, esses ânions podem formar adutos com compostos orgânicos, como foi observado para a HCT ([M+Cl]$^-$ pico em *m/z* 332). A formação do aduto pode ajudar na ionização de moléculas orgânicas no modo íon negativo, entretanto, fragmentações em *tandem* MS^n reprodutíveis e corretas dificilmente são obtidos de um precursor na forma de íon aduto. Também, a presença de um aduto no espectro de massas diminui a intensidade do íon molecular desprotonado, afetando a sensibilidade do método analítico e a análise qualitativa e quantitativa da amostra (LIU, JINGJING et al., 2017). Da mesma forma, a fragmentação na fonte, que ocorreu com a FUR e a HCT, aumentou o número picos no espectro e o ruído, afetando a sensibilidade, detecção e a quantificação.

A influência da voltagem do *tube lens* e a temperatura do capilar de transferência na formação do aduto, na fragmentação na fonte e na intensidade do composto molecular ionizado foram investigados utilizando o planejamento composto central. As matrizes dos planejamentos para FUR e HCT estão descritos na Tabela

2.2. O tratamento dos dados obtidos foi realizado com auxílio do *software* estatístico *Statistica*® 7.

Tabela 2.2 – Matrizes dos planejamentos composto central para a furosemida e hidroclorotiazida. Os níveis codificados dos fatores estão em frente aos valores reais utilizados para o planejamento.

Experimento	Fator			
	Furosemida		Hidroclorotiazida	
	Temperatura do capilar (°C)	Voltagem do *tube lens* (V)	Temperatura do capilar (°C)	Voltagem do *tube lens* (V)
1	125 (-1)	-175 (-1)	150 (-1)	-175(-1)
2	125 (-1)	-100 (+1)	150 (-1)	-100 (+1)
3	250 (+1)	-175(-1)	275 (+1)	-175(-1)
4	250 (+1)	-100 (+1)	275 (+1)	-100 (+1)
5	100 (-√2)	-140 (0)	125 (-√2)	-140 (0)
6	275 (+√2)	-140 (0)	300 (+√2)	-140 (0)
7	190 (0)	-190 (+√2)	215 (0)	-190 (+√2)
8	190 (0)	-85 (-√2)	215 (0)	-85 (-√2)
9	190 (0)	-140 (0)	215 (0)	-140 (0)
10	190 (0)	-140 (0)	215 (0)	-140 (0)

Para a análise da FUR, os aspectos mais importantes foram evitar a fragmentação na fonte e aumentar a intensidade do íon molecular desprotonado $[M-H]^-$, pois a intensidade do aduto para a FUR, $[M+Cl]^-$, era 100 vezes menor quando a temperatura do capilar foi ajustada acima de 200°C. Para investigar a intensidade do íon produto devido à fragmentação na fonte foi utilizado o íon em *m/z* 285, ($[M-CO_2-H]^-$, pois é o mais intenso dentre todos os fragmentos. Para a HCT, as melhores condições experimentais foram obtidas para maior intensidade da HCT desprotonada, $[M-H]^-$, e menor intensidade do aduto, $[M+Cl]^-$, já que a fragmentação na fonte apresentou baixas intensidades abaixo de 275°C. Os resultados dos planejamentos forneceram os valores exatos para as condições experimentais ótimas para os experimentos de PS-MS dos analitos, porém, as regiões demarcadas com coloração vermelho escuro são áreas de respostas analíticas aproximadamente iguais aos do ponto ótimo. Dessa maneira, foram determinadas condições para máxima ionização dos íons das moléculas desprotonadas de FUR e HCT dentro dessas regiões de vermelho escuro (Figura 2.21 e Figura 2.23) que coincidiam com áreas fora da região de máximo para os fragmentos da FUR e para o aduto de HCT (Figura 2.22 e Figura

2.24). As condições experimentais otimizadas foram: temperatura do capilar de 250°C e voltagem do *tube lens* de -120 V, as quais apresentaram as maiores intensidades dos íons moleculares desprotonados para ambos os analitos e menores intensidades de fragmentação na fonte e aduto de cloreto para FUR e HCT, respectivamente, como ilustrado nas Figura 2.21, Figura 2.22, Figura 2.23 e Figura 2.24.

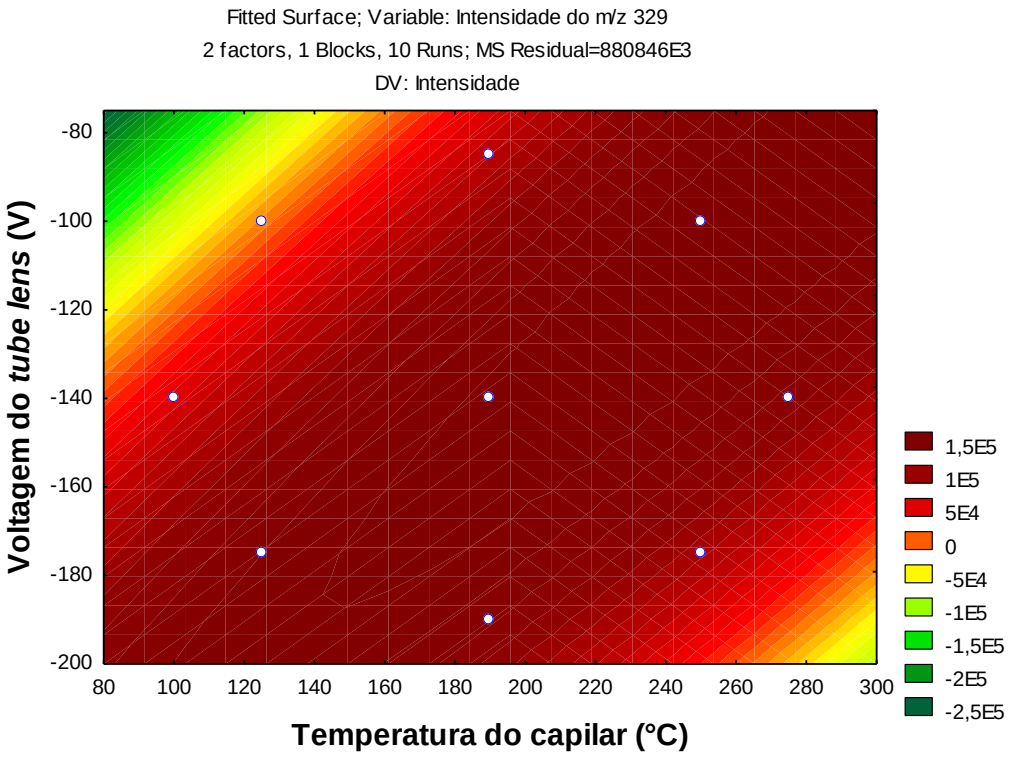

Figura 2.21 – Curva de nível da superfície de resposta do planejamento composto central obtido para a intensidade absoluta (IA) em função da voltagem do *tube lens* e da temperatura do capilar para o íon molecular desprotonado da furosemida ($[M-H]^-$ em *m/z* 329), utilizando PS-MS em modo íon negativo.

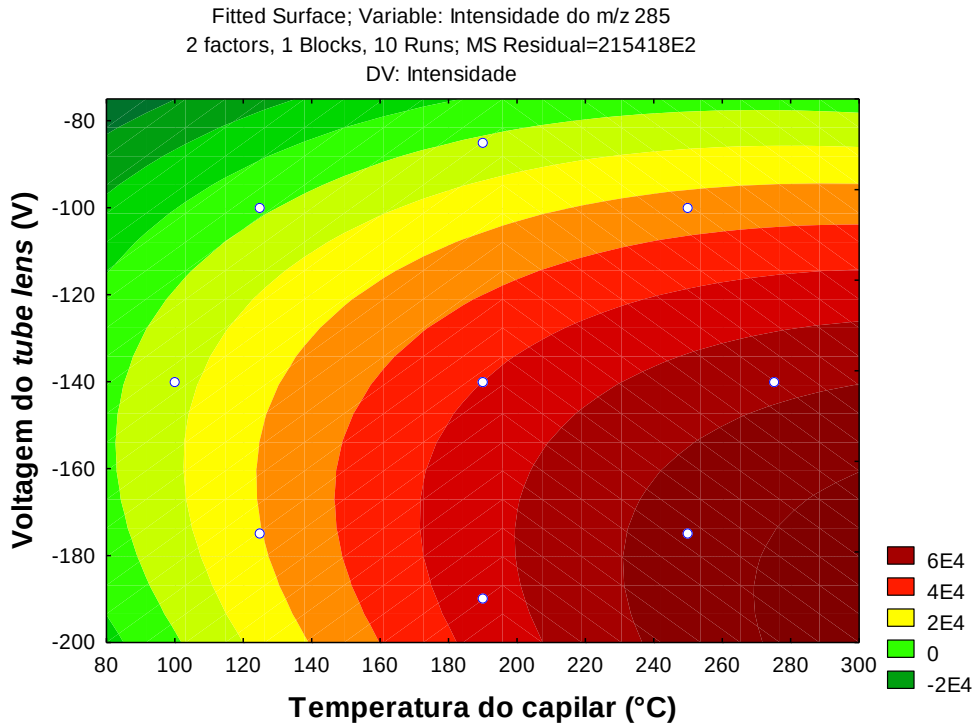

Figura 2.22 – Curva de nível da superfície de resposta do planejamento composto central obtido para a intensidade absoluta (IA) em função da voltagem do *tube lens* e da temperatura do capilar para o íon produto da fragmentação na fonte da furosemida ($[M\text{-}CO_2\text{-}H]^-$ em *m/z* 285), utilizando PS-MS em modo íon negativo.

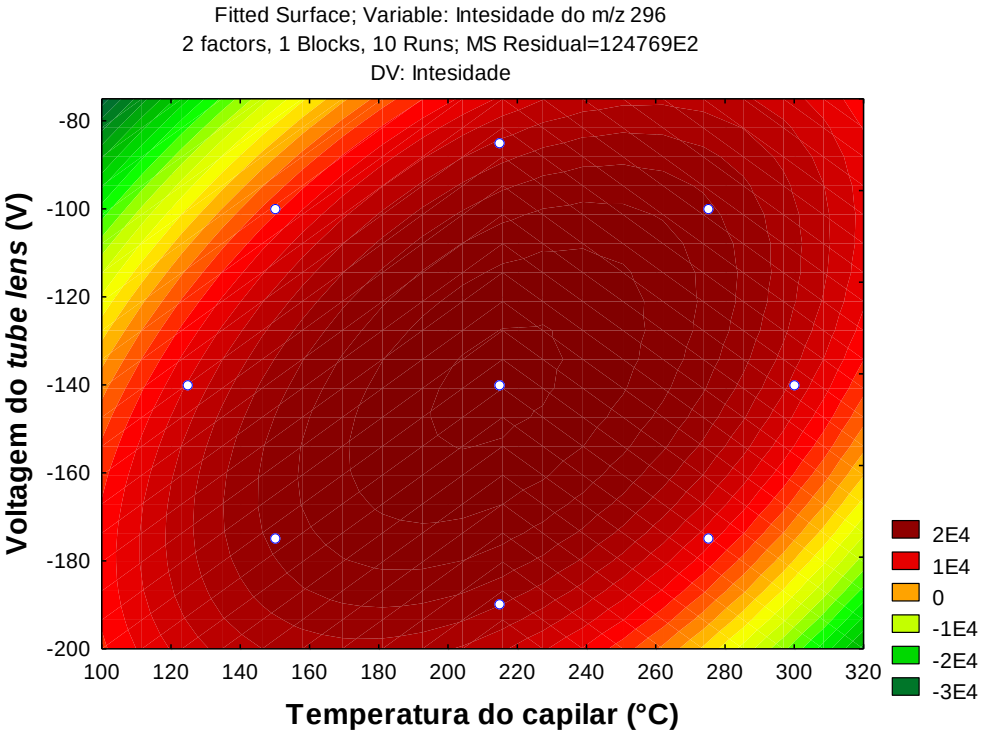

Figura 2.23 – Curva de nível da superfície de resposta do planejamento composto central obtido para a intensidade absoluta (IA) em função da voltagem do *tube lens* e da temperatura do capilar para o íon molecular desprotonado da hidroclorotiazida ($[M\text{-}H]^-$ em *m/z* 296), utilizando PS-MS em modo íon negativo.

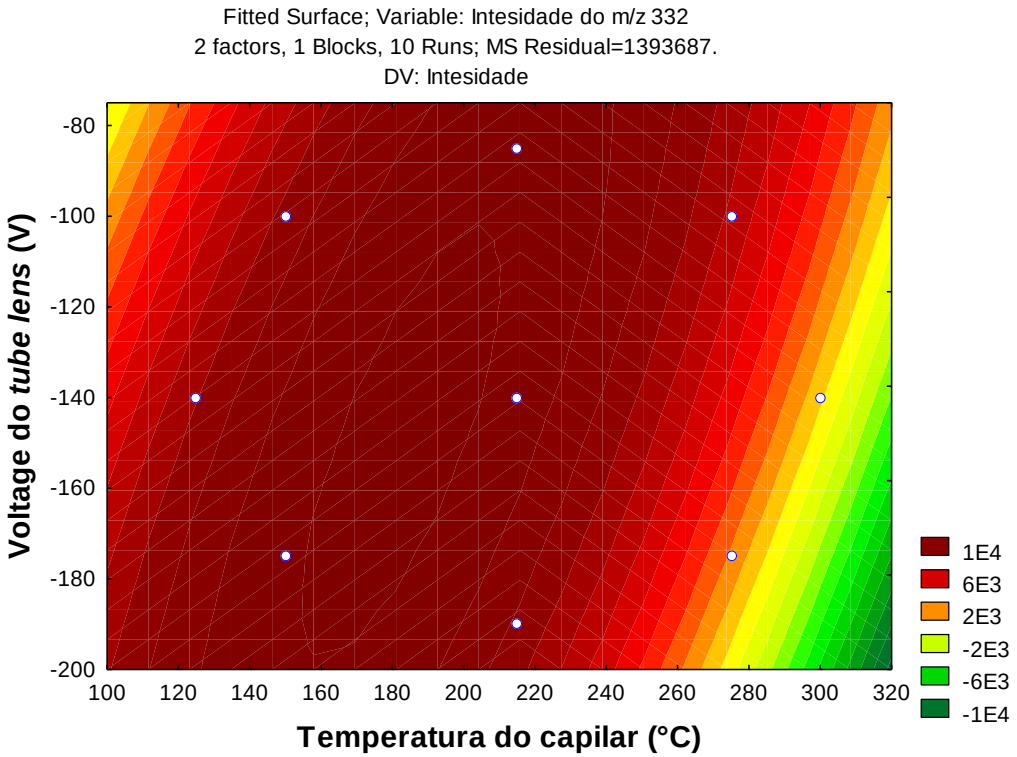

Figura 2.24 – Curva de nível da superfície de resposta do planejamento composto central obtido para a intensidade absoluta (IA) em função da voltagem do *tube lens* e da temperatura do capilar para o aduto formado entre a hidroclorotiazida e o íon cloreto ($[M+Cl]^-$ em *m/z* 332), utilizando PS-MS em modo íon negativo.

As equações para as superfícies de respostas das Figura 2.21, Figura 2.22, Figura 2.23 e Figura 2.24 utilizando PS-MS foram as seguintes, respectivamente:

$$\mathrm{AI} = -1202950 + 6584\mathrm{xTC} - 9374\mathrm{xVTL} + 23\mathrm{xTCxVTL} \quad \text{Equação 2.1}$$

$$\mathrm{AI} = -157880 - 1573\mathrm{xVTL} - 6\mathrm{xVTL}^2 \quad \text{Equação 2.2}$$

$$\mathrm{AI} = -250148 + 1378\mathrm{xTC} - 2\mathrm{xTC}^2 - 11828\mathrm{xVTL} - 4\mathrm{xVTL}^2 + 3\mathrm{xTCxVTL} \quad \text{Equação 2.3}$$

$$\mathrm{AI} = -46413 + 435{,}9\mathrm{xTC} - 0{,}9\mathrm{xTC}^2 + 0{,}8\mathrm{xTCxVTL} \quad \text{Equação 2.4}$$

As equações foram avaliadas estatisticamente e foram descritas apenas os termos estatisticamente influentes de cada equação.

A temperatura do capilar é o fator de maior influência na formação de adutos, porque o aumento da temperatura aumenta a energia interna dos adutos de cloreto, levando a dissociação e formação de $[M-H]^-$ + HCl (ZHU; COLE, 2000). A voltagem do *tube lens* é o fator mais importante para a fragmentação na fonte, pois diminuindo a voltagem do *tube lens*, em valores absolutos, os íons são acelerados em uma região na qual a pressão é na escala de milibar, permitindo que os íons colidam com as

moléculas de gás residual para obter energia suficiente para induzir a fragmentação (HOFFMAN; STROOBANT, 2007).

A intensidade do íon molecular protonado é dependente da temperatura do capilar e da voltagem do *tube lens*, como descrito anteriormente. Assim, esses dois fatores foram também otimizados para a trembolona e clembuterol no modo íon positivo. A matriz do planejamento do tipo composto central para TREM e CLEM está descrito na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Matriz do planejamento composto central para a trembolona e clembuterol. Os níveis codificados dos fatores estão em frente aos valores reais utilizados para o planejamento.

Experimento	**Fator**	
	Temperatura do capilar (°C)	**Voltagem do *tube lens* (V)**
1	200 (-1)	50 (-1)
2	200 (-1)	150 (+1)
3	300 (+1)	50 (-1)
4	300 (+1)	150 (+1)
5	180 (-√2)	100 (0)
6	320 (+√2)	100 (0)
7	250 (0)	30 (-√2)
8	250 (0)	170 (+√2)
9	250 (0)	100 (0)
10	250 (0)	100 (0)

As condições experimentais otimizadas foram: temperatura do capilar de 240°C e voltagem do *tube lens* de 100 V, as quais apresentaram as maiores intensidades dos íons produto via CID-MS^2 para TREM e CLEM nas regiões vermelho escuro das curvas de níveis das Figura 2.25 e Figura 2.26.

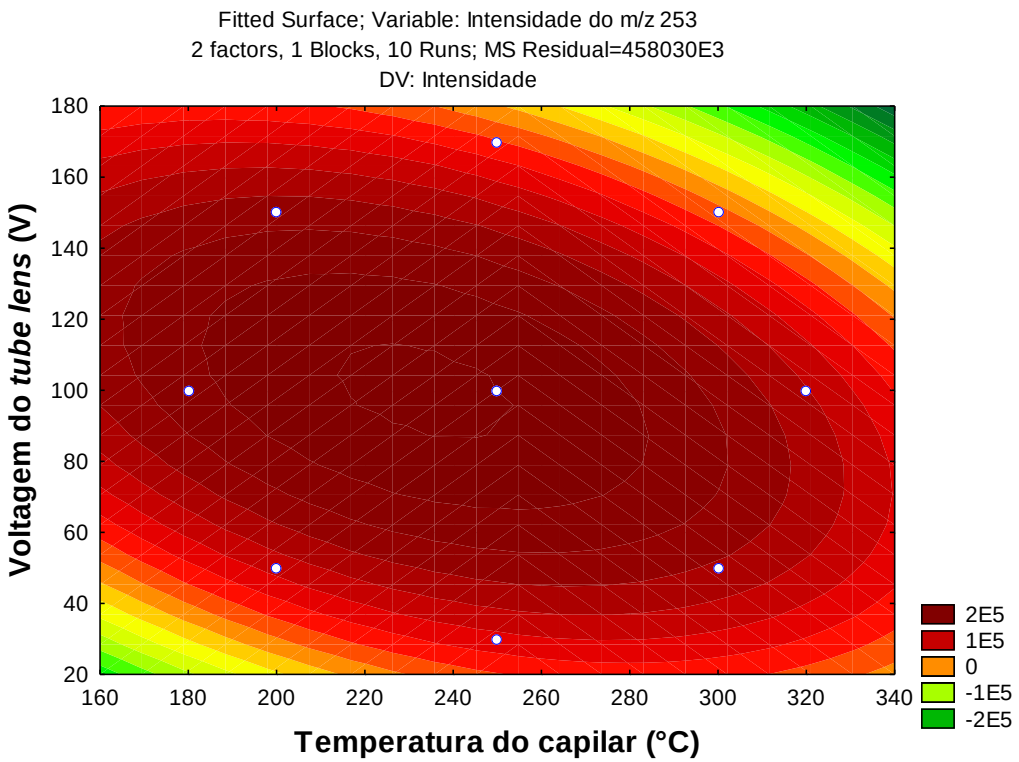

Figura 2.25 – Curva de nível da superfície de resposta do planejamento composto central obtido para a intensidade absoluta (IA) em função da voltagem do *tube lens* e da temperatura do capilar para o íon produto via CID-MS^2 da trembolona (*m/z* 271 → 253), utilizando PS-MS em modo íon positivo.

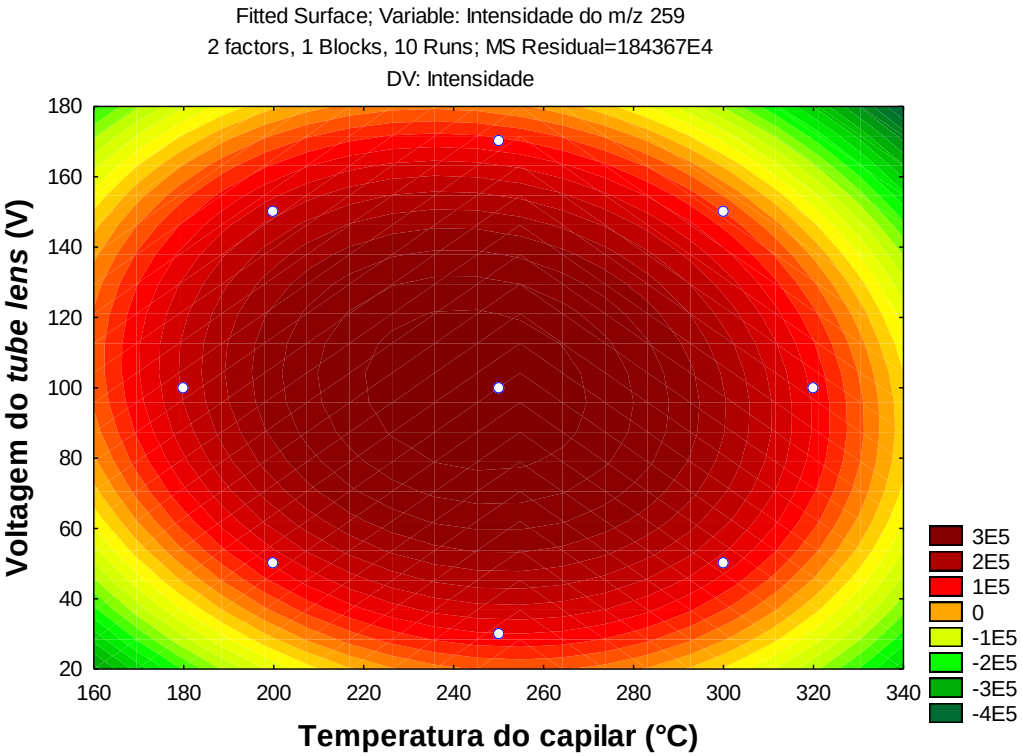

Figura 2.26 – Curva de nível da superfície de resposta do planejamento composto central obtido para a intensidade absoluta (IA) em função da voltagem do *tube lens* e da temperatura do capilar para o íon produto via CID-MS^2 do clembuterol (*m/z* 277 → 259), utilizando PS-MS em modo íon positivo.

As equações para as superfícies de respostas das Figura 2.25 e Figura 2.26 utilizando PS-MS foram as seguintes, respectivamente:

$$\mathrm{AI} = -1239002 + 8054\mathrm{xTC} - 14\mathrm{xCT}^2 + 10092\mathrm{xVTL} - 31\mathrm{xVTL}^2 - 16\mathrm{xTCxVTL}$$ Equação 2.5

$$\mathrm{AI} = -2833266 + 20966 - 41\mathrm{xCT}^2 + 11913\mathrm{xVTL} - 48\mathrm{xVTL}^2$$ Equação 2.6

As equações foram avaliadas estatisticamente e foram descritas apenas os termos estatisticamente influentes de cada equação.

5.3.2. Solvente do spray

A mistura binária de MeOH:H_2O é o solvente de *spray* mais empregado para bioanálises quando se utiliza PS-MS. Entretanto, diferente do que acontece em ESI, misturas binárias de solventes são compostas de solventes com diferentes pressões de vapor, causando diferentes razões de evaporação e, consequentemente, a composição do solvente durante a solubilização e ionização dos analitos muda ao passar do tempo, alterando suas propriedades e diminuindo a repetibilidade do método. Por isso solventes puros são mais vantajosos que misturas de solventes para PS-MS (TSAI; TIPPLE; YOST, 2017).

Uma diferença significativa entre os modos de operação íon positivo e íon negativo é a estabilidade do *spray*. No modo íon negativo, um *spray* estável é difícil de ser observado quando uma mistura de solventes contendo água é utilizada; a corrente elétrica é maior do que o modo íon positivo e uma descarga elétrica brilhante que diminui a intensidade do sinal do íon pode ser observado (WANG, He et al., 2010). Isso ocorre pois a voltagem necessária para que ocorra a descarga elétrica é menor do que a voltagem inicial para a ionização dos analitos no modo íon negativo (WANG, He et al., 2010; YAMASHITA; FENN, 1984). Diferentes estudos mostraram que superfícies hidrofóbicas são capazes de reduzir a descarga corona quando se usa o modo íon negativo (HIGASHIYAMA; YANASE; SUGIMOTO, 2002; LIU, Jingjing et al., 2017). Quando um solvente orgânico é empregado, tal qual o metanol, um cone de Taylor estável pode ser obtido. Portanto, o solvente do *spray* deve ser de preferência um solvente orgânico puro, para evitar descarga elétrica, e deve ter a seguintes

propriedades: (i) ser adequado para *eletrospray*, (ii) ter tensão superficial menor do que a energia de superfície do papel hidrofóbico para permitir sua molhabilidade, e (iii) ter alto poder de solubilização dos analitos alvo (DAMON et al., 2016). Acetona, acetonitrila, acetato de etila e metanol satisfazem esses critérios. Amostras de urina fortificadas com TREM e FUR foram escolhidas para realizar o estudo do melhor solvente do *spray*.

Na Figura 2.27 está ilustrado a intensidade absoluta para cada um dos solventes empregados para TREM e FUR. Acetato de etila apresentou o melhor aumento na ionização dos analitos, seguido por acetonitrila e acetona. A intensidade obtida quando acetato de etila foi utilizado foi sete vezes e cinco vezes maiores se comparado à acetonitrila, para TREM e FUR, respectivamente. Metanol apresentou a menor intensidade de todos os solventes. O desempenho de um solvente durante o PS é influenciado por suas diferentes propriedades, tais como tensão superficial, constante dielétrica (ou permissividade relativa), condutibilidade e propriedades químicas.

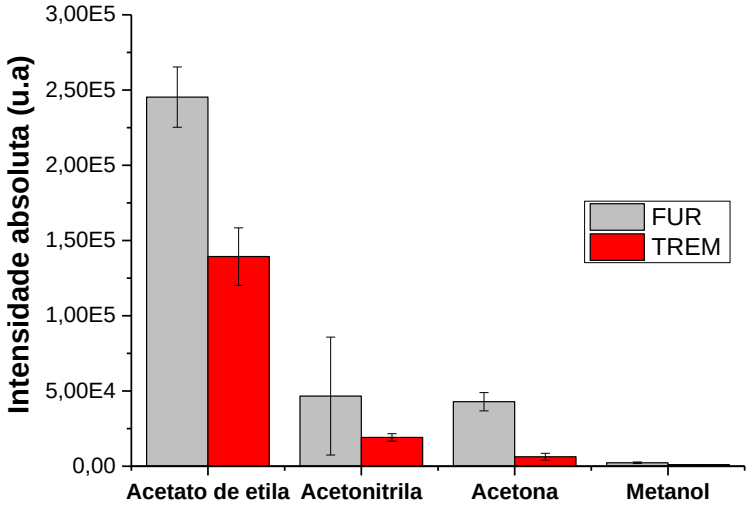

Figura 2.27 – Otimização do solvente do *spray* utilizado durante o PS-MS. Intensidade absoluta de soluções de 12,5 µg mL^{-1} de furosemida (cinza claro) e 1000 ng mL^{-1} de trembolona (vermelho). Fragmentos característicos da trembolona protonada (*m/z* 271 → 253) e da furosemida desprotonada (*m/z* 329 → 285) foram utilizadas para a análise.

Amostras biológicas apresentam alta concentração de íons inorgânicos (por exemplo, Na^+, K^+, Ca^{2+}, NH_4^+, Mg^{2+}, Cl^-, SO_4^{2-}, CO_3^{2-} e PO_4^{3-}) e contém diferentes compostos orgânicos (por exemplo, ureia, creatinina, ácido úrico, ácido cítrico e ácido lático). Como em PS-MS a amostra é adicionada diretamente na superfície do papel sem prévia preparação da amostra e o papel possui baixa capacidade de separação,

os sais inorgânicos podem induzir a supressão da ionização dos analitos e os compostos mais polares, também, podem prontamente suprimir a ionização de compostos menos polares (TREM, CLEM, FUR e HCT) (LIU, JINGJING et al., 2017). A espectrometria de massas apresenta uma seletividade inerente e uma alta detectabilidade quando utilizando *tandem* MS^n e é capaz de filtrar as massas indesejáveis (KULYK; MILLER; BADU-TAWIAH, 2015; MCLAFFERTY, 1981), mesmo assim a interferência da matriz pode afetar a detectabilidade, exatidão e precisão da análise (KULYK; MILLER; BADU-TAWIAH, 2015).

O poder de solubilidade de um solvente para solubilizar um sal é dependente da sua constante dielétrica. Solventes com constantes dielétricas maiores são capazes de separar cargas, ou íons, mais facilmente do que solventes com menores constantes dielétricas. Consequentemente, solventes com menores constantes dielétricas, ou menor permissividade relativa, solubilizam menos sais e, dessa forma, a intensidade da supressão da ionização induzida por sais dos analitos é reduzida (LIU, JINGJING et al., 2017; MUTASIM I. KHALIL, 2012; XIN et al., 2018). O acetato de etila apresentou os melhores resultados, porque tem a menor constante dielétrica (Tabela 2.4), diminuindo a supressão da ionização induzida por sais, e é um solvente menos polar que os outros solventes, diminuindo a supressão causada por outros compostos mais polares encontrados na urina. Acetonitrila deveria ser o pior solvente para ser utilizando em PS-MS, pois tem a maior constante dielétrica dentre os solventes utilizados, contudo, a sua polaridade é também uma importante propriedade na etapa de solubilização/ionização (XIN et al., 2018). O metanol é um solvente com a maior polaridade dentre todos os solventes utilizados, assim, apresentou o pior desempenho, pois é capaz de aumentar a composição de sais e compostos orgânicos do *spray*.

Tabela 2.4 – Propriedades físico-químicas dos solventes.

Solvente	**Tensão superficial a 25°C (mN m^{-1})** (RUMBLE, 2019)	**Constante dielétrica a 25°C** (RUMBLE, 2019)	**Polaridade relativa** (REICHARDT; WELTON, 2011)
Acetona	22,71	21,01	0,355
Acetonitrila	28,66	36,64	0,460
Acetato de etila	25,13	6,081	0,228
Metanol	23,47	33,0	0,762
Água	72,06	80,1	1,000

5.3.3. Voltagem da fonte

Para avaliação do efeito da voltagem da fonte na ionização das moléculas dos analitos foram utilizados trembolona e furosemida para o modo íon positivo e íon negativo, respectivamente. Os resultados obtidos para voltagens de ±1,5 a ±5,0 kV aplicadas nos triângulos de papel hidrofóbico estão ilustrados na Figura 2.28.

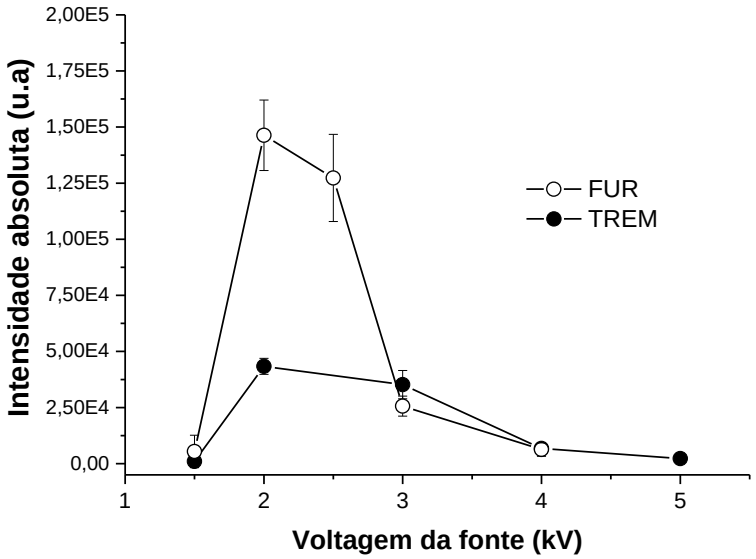

Figura 2.28 – Efeito da voltagem da fonte na intensidade do sinal. Trembolona (círculos pretos – 500 ng mL^{-1}) foi monitorado através de experimentos CID-MS^2 utilizando o íon produto mais abundante, *m/z* 253, no modo íon positivo, e a furosemida (círculos brancos – 12,5 µg mL^{-1}) foi monitorado através de experimentos CID-MS^2 utilizando o íon produto mais abundante, *m/z* 285, no modo íon negativo. As barras de erro representam o desvio padrão de três réplicas dos analitos realizadas em triângulos de papeis independentes.

A voltagem da fonte otimizada foi de 2 kV para o modo íon positivo e -2 kV para o modo íon negativo. Baixas intensidades de sinal foram observadas para voltagens abaixo de ± 2 kV e acima de ± 5 kV. Voltagens acima de 5 kV no modo íon negativo geraram descarga corona (KULYK; SAHRAEIAN; et al., 2019; KULYK; SWINER; et al., 2019), produzindo uma corrente instável alta (> 7 µA) e nenhum sinal foi observado para furosemida.

5.3.4. Tratamento do papel hidrofóbico

O desempenho do *paper-spray* é significativamente dependente das propriedades do papel utilizado como suporte sólido para a realização das análises. A superfície do papel hidrofílico nativo utilizado apresenta grupos hidroxil (OH) que

podem formar ligações intermoleculares com os compostos de interesse, diminuindo a transferência dos analitos do papel para a fase gasosa e, subsequentemente, para o espectrômetro de massas. Derivados de triclorosilano reagem com os grupos hidroxil (OH) presentes no papel formando monocamadas que recobrem a superfície do papel Figura 2.29. A modificação da superfície do papel por meio da silanização já foi comprovado por Damon e coautores (DAMON et al., 2016, 2018) e Swiner e coautores (SWINER et al., 2019). Essa modificação aumenta a detectabilidade e sensibilidade em PS-MS pela conversão dos grupos polares de suportes sólidos a base de celulose, no caso do presente trabalho o papel nativo, em grupos hidrofóbicos, diminuindo as interações papel-analito.

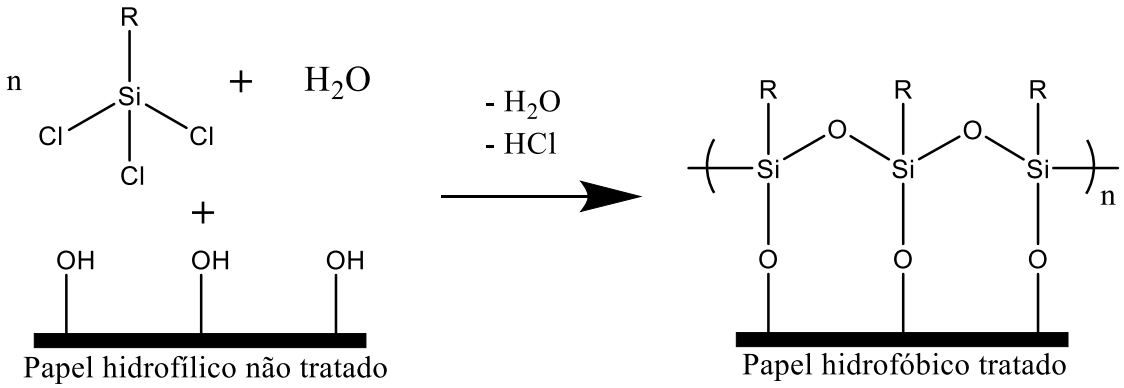

Figura 2.29 – Modificação do papel através da silanização dos grupos hidroxil da sua superfície utilizando vapor de triclorosilano para criar uma camada hidrofóbica no papel.

Usualmente para reação de silanização em fase líquida a superfície a ser silanizada é imersa em uma solução de hexano com o organosilano dissolvido com concentração entre 0,1 e 2 % (v/v). Após a reação, a superfície necessita ser lavada diversas vezes com diferentes solventes, tais como hexano e metanol, para remover o reagente que não reagiu (BAMBAUER et al., 2019; HE, Q. et al., 2013; WANG, J. et al., 2016). Reações em fase líquida podem formar aglomerados ao invés de monocamadas durante o processo de silanização, levando a uma cobertura não uniforme da superfície do sólido e a sua modificação irreprodutível (BUNKER et al., 2000). O tipo de organosilano disponível é limitado a sua compatibilidade com o solvente utilizado em cada etapa da fabricação (GLASS et al., 2011). A silanização em fase de vapor é usualmente realizada sob pressão reduzida em um sistema fechado. A redução da pressão aumenta a pressão parcial do triclorosilano, que reage com a papel dentro do dessecador, criando uma melhor superfície hidrofóbica (DAMON et al., 2016; GLASS et al., 2011; SWINER et al., 2019). A silanização em

fase de vapor apresenta diversas vantagens sobre a reação em fase líquida: (i) nenhum solvente orgânico é utilizado durante o processo de silanização; (ii) nenhum resíduo é gerado, significando que essa abordagem é mais segura para o operador e ao meio-ambiente; (iii) é simples, o processo é realizado em apenas uma etapa (GLAVAN et al., 2014); (iv) menos reagentes são utilizados no processo de deposição; (v) multicamadas são menos prováveis de serem formadas; (vi) as monocamadas formadas são altamente orientadas e apresentam normalmente alta ordem e qualidade (GLASS et al., 2011; ULMAN, 1996).

No presente trabalho, nós escolhemos utilizar a silanização da superfície do papel por meio da reação em fase de vapor devido as suas vantagens já descritas. Dois diferentes organosilanos foram utilizados; o reagente tricloro(3, 3, 3-trifluoropropil)silano, o qual foi selecionado baseado em estudos preliminares (DAMON et al., 2016), e triclorometilsilano, o qual apresenta um substituinte alquil hidrofóbico sem nenhum grupo funcional adicional; ambos são voláteis, permitindo que a silanização ocorra a temperatura ambiente sem que nenhum aquecimento externo seja necessário. A reação foi realizada a temperatura ambiente devido a dois motivos: em temperatura ambiente e curtos tempos de reação (< 4h), a reação de silanização foi limitada aos grupos hidroxil da superfície do papel e os grupos OH localizados dentro do *core* das fibras não foram silanizadas (DAMON et al., 2016), e a temperaturas mais brandas, a camada desenvolvida pela polimerização é formada de uma forma mais ordenada (ULMAN, 1996). O estudo envolveu o uso de triângulos de papel não-tratado e triângulos de papeis hidrofóbicos tratados com os dois diferentes organosilanos, TCTFPS e TCMS, por 15, 30, 60, 120 e 240 minutos. As amostras de urina fortificadas com os analitos foram analisadas utilizando acetato de etila como solvente de *spray*.

Na Figura 2.30 está ilustrada a intensidade absoluta do íon produto via *tandem* CID-MS para os dois diferentes organosilanos utilizados no tratamento do papel durante diferentes períodos de tempo. O tempo de silanização de 60 minutos com o TCMS produziu as respostas mais altas comparadas com os papeis tratados com TCTFPS e papel não-tratado. O desempenho superior do papel tratado foi atribuído à diminuição da afinidade e da capacidade de ligação com os analitos da superfície do papel, resultando em um maior número de moléculas livres do analito disponível para serem transferidos para a fase gasosa e posteriormente para o espectrômetro de

massas pelo solvente de *spray*. Além disso, a deposição da amostra aquosa em uma superfície hidrofóbica, como é o caso dos papeis silanizados, forma um esferoide devido a sua limitada molhabilidade, ao contrário de superfícies hidrofílicas, como o papel não-tratado, que absorvem e espalham a amostra por toda a superfície das fibras do papel. Isso permite uma deposição mais homogênea e controlada da amostra, pois ela é adicionada próxima a ponta do triângulo de papel, aumentando a concentração dos compostos de interesse próximo a ponta na qual há a transferência dos analitos (Figura 2.31) (BASURI; BAIDYA; PRADEEP, 2019; SWINER et al., 2019).

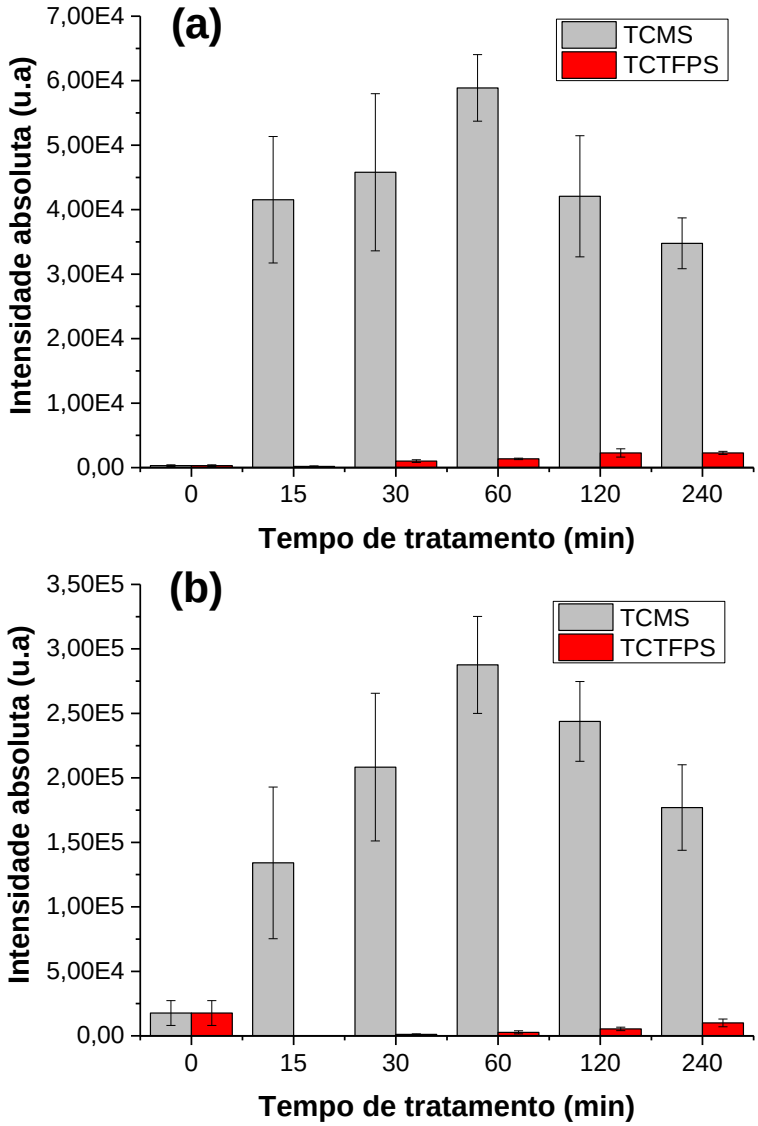

Figura 2.30 – Otimização do reagente e tempo de tratamento do papel. Intensidade absoluta de soluções de (a) 500 ng mL^{-1} de trembolona e (b) 12,5 µg mL^{-1} furosemida. Fragmentos característicos da trembolona protonada (*m/z* 271 → 253) e furosemida desprotonada (*m/z* 329 → 285) foram utilizadas na análise. Os triângulos de papel foram tratados com TCMS (cinza claro) e TCTFPS (vermelho) por 15, 30, 60, 120 e 240 min.

Figura 2.31 – Fotografia mostrando a interação da solução aquosa de corante com o papel hidrofóbico tratado (esquerda) e com o papel hidrofílico não tratado (direita).

A maior resposta do papel tratado com TCMS comparado com o tratado com TCTFPS pode ser atribuída ao reduzido tamanho das moléculas de TCMS. O grupo metil do TCMS apresenta um menor impedimento estérico do que o grupo trifluoropropil do TCTFPS, promovendo uma reação mais efetiva entre os grupos hidroxil da superfície do papel com o TCMS do que com o TCTFPS e criando uma monocamada mais densa e com menos defeitos na superfície (ULMAN, 1996). Para avaliar essa hipótese foi realizado um estudo para estimar a energia de superfície dos papeis hidrofóbicos utilizando o método de *bracketing* (item 4.5).

A total molhabilidade de uma superfície só ocorre quando a tensão superficial do líquido é menor do que a energia crítica da superfície. A ideia central no método de *bracketing* é que se uma gota de um líquido molha a superfície, a energia da superfície do substrato molhado é menor do que do substrato seco. Consequentemente, para estimar a energia de superfície do papel, se o papel for molhado por uma gota de um líquido específico, sua energia crítica de superfície é maior do que a tensão superficial do líquido; do contrário, se o papel não for molhado pela gota, então sua energia crítica de superfície é menor do que a tensão superficial desse líquido (SWINER et al., 2019).

Na Tabela 2.5 são descritos os resultados do estudo de molhabilidade. Papeis tratados de 15 a 240 minutos com TCMS apresentam energia de superfície entre 43,12-47,3 mN m^{-1}, enquanto que papeis tratados de 15 a 240 minutos com TCTFPS exibiram energia de superfície entre 43,54-49,39 mN m^{-1}. Como esperado, maiores tempos de silanização diminuíram a energia de superfície do papel, aumentando sua hidrofobicidade. Além disso, o papel modificado com TCMS possui menor energia de superfície, ou seja, é mais hidrofóbico do que o papel funcionalizado com TCTFMS

pelo mesmo tempo, corroborando com a hipótese inicial e apresentando energia de superfície tal que amostras aquosas não molhem o triângulo de papel, concentrando a amostra próximo a ponta e diminuindo a interação papel-analito, porém, seja molhado por solventes orgânicos necessários para a formação do *spray* e ionização dos analitos.

Tabela 2.5 – Estimativa da energia de superfície dos papeis tratados por tempos diferentes utilizando TCMS e TCTFPS pelo método de *bracketing*.

Tempo de tratamento (min)	Energia de superfície (mN m^{-1})	
	Papel tratado com TCMS	Papel tratado com TCTFPS
15	43,54 – 47,3	47,3 – 49,39
30	43,54 – 47,3	47,3 – 49,39
60	43,12 – 43,54	43,54 – 47,3
120	43,12 – 43,54	43,54 – 47,3
240	43,12 – 43,54	43,54 – 47,3

As menores intensidades obtidas quando o papel funcionalizado com TCTFPS foi utilizando quando comparado com o papel tratado com TCMS, ou mesmo com o papel não-tratado no modo íon negativo para a FUR, foram provavelmente causados pelo aumento na descarga corona que causou a depreciação da intensidade do sinal do íon.

5.4. Análise direta de substâncias dopantes em amostras de urina

Alíquotas de 6 µL das amostras fortificadas separadamente com TREM, CLEM, FUR e HCT foram depositadas na superfície do papel hidrofóbico tratado por 60 minutos com TCMS. Depois da secagem das amostras, uma alta tensão (± 2 kV) foi aplicada ao triângulo de papel e 20 µL de acetato de etila foram adicionados para a determinação por PS-MS, como ilustrado na Figura 2.11.

As curvas analíticas foram construídas utilizando a intensidade do pico do íon produto por meio de *tandem* MS via CID para cada analito (Figura 2.32). Na Tabela 2.6 estão descritas as faixas lineares de concentração utilizadas, as transições utilizadas via CID-MS^2 as equações de regressão linear obtidas e os valores dos coeficientes de determinação para as quatro curvas analíticas. Foram obtidas boas

correlações lineares, calculado através do R^2, para as quatro curvas analíticas.

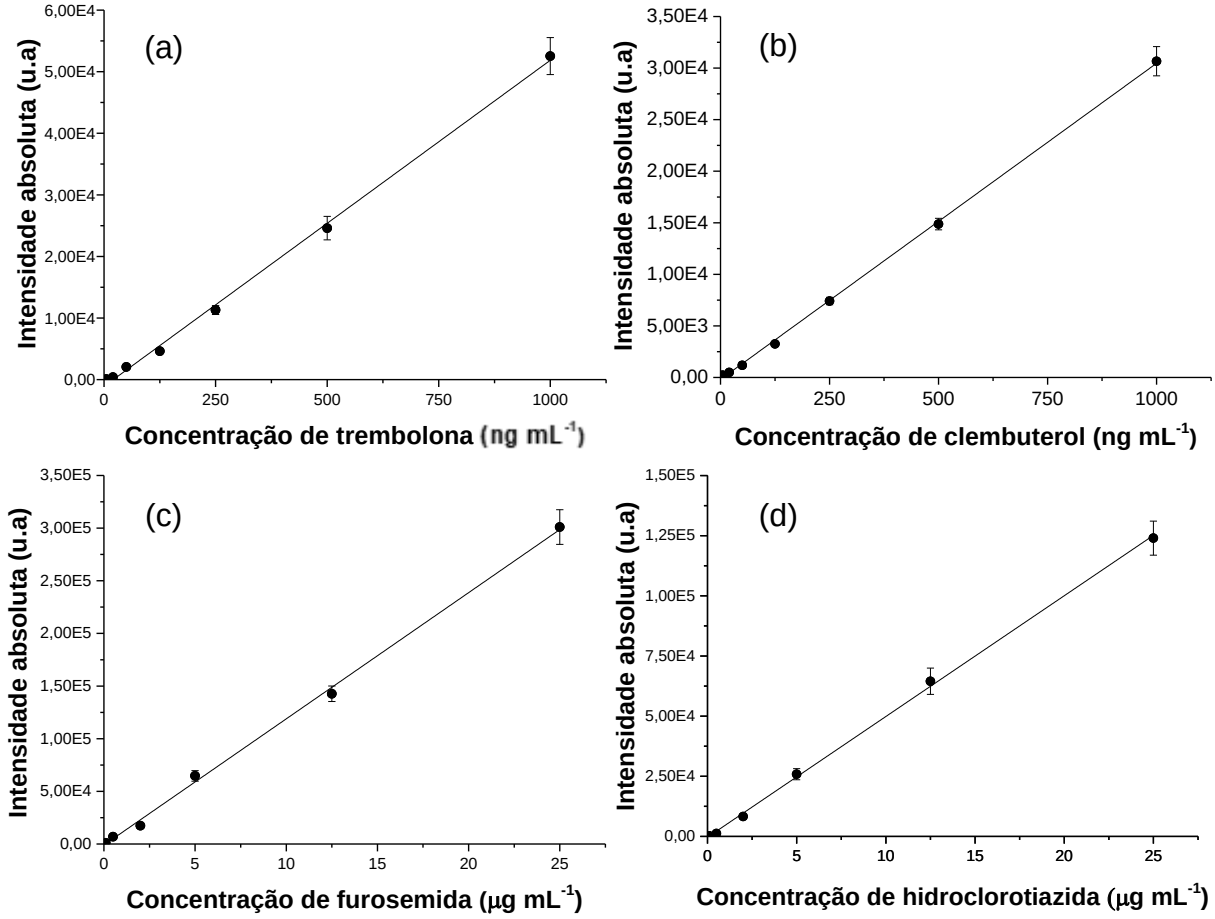

Figura 2.32 – Curva analítica para (a) trembolona (5 – 1000 ng mL^{-1}), (b) clembuterol (1 – 1000 ng mL^{-1}), (c) furosemida (50 - 25 x 10^3 ng mL^{-1}) e hidroclorotiazida (50 - 25 x 10^3 ng mL^{-1}). Quantificação do analito foi realizada pela análise do íon produto via *tandem* MS-CID: trembolona (*m/z* 271 → 227), clembuterol (*m/z* 277 → 203), furosemida (*m/z* 329 → 285) e hidroclorotiazida (*m/z* 296 → 269). A barra de erro representa o desvio padrão das análises de três réplicas em triângulos de papeis independentes.

Tabela 2.6 – Faixa linear, transição, equação da regressão linear e coeficiente de determinação para as curvas analíticas de TREM, CLEM, FUR e HCT.

Analito	Faixa linear (ng mL^{-1})	Transição utilizada via CID-MS^2	Equação da regressão linear	R^2
TREM	5 – 1000	*m/z* 271 → 227	$AI = 53{,}0C_{TREM} - 1093{,}8$	0,9991
CLEM	1 – 1000	*m/z* 277 → 203	$AI = 30{,}7C_{CLEM} - 193{,}4$	0,9997
FUR	50 – 25 x 10^3	*m/z* 329 → 285	$AI = 11985{,}4C_{FUR} - 984{,}1$	0,9982
HCT	50 – 25 x 10^3	*m/z* 296 → 269	$AI = 5019{,}6C_{HCT} - 346{,}7$	0,9991

O limite de detecção, LD, e de quantificação, LQ, foram calculados como (TAVERNIERS; DE LOOSE; VAN BOCKSTAELE, 2004) de acordo com as Equação 2.7 e Equação 2.8.

$$\mathrm{LD} = \frac{(\bar{X}_{branco} + 3 \times \mathrm{SD}_{branco})}{\text{inclinação da curva analítica}} \qquad \text{Equação 2.7}$$

$$\mathrm{LQ} = \frac{(\bar{X}_{branco} + 10 \times \mathrm{SD}_{branco})}{\text{inclinação da curva analítica}} \qquad \text{Equação 2.8}$$

Os valores obtidos para LD e LQ para todos os analitos estão descritos na Tabela 2.7. Todos os LDs e LQs obtidos estão abaixo do níveis de desempenho mínimo requeridos (MRPL) pela WADA (WORLD ANTI-DOPING AGENCY, 2019a). Foi possível detectar e quantificar níveis sub-ng mL^{-1} para todos os analitos, com exceção da furosemida, o qual foi possível apenas sua detecção em níveis abaixo de ng mL^{-1}. Levando em consideração o volume diminuto de amostra que foi utilizado para a análise (6 µL), foi possível detectar e quantificar os analitos em quantidade na ordem pico-gramas ou abaixo, demonstrando a alta capacidade de detecção da técnica de PS-MS.

Tabela 2.7 – Valores de LD, LQ, precisão inter-dia e recuperação para TREM, CLEM, FUR e HCT.

Analyte	LD ng mL^{-1} (pg)	LQ ng mL^{-1} (pg)	Concentração (ng mL^{-1})	Precisão inter-dia (%)	Recuperação (%)
Trembolona	0,16 (0,32)	0,98 (1,92)	50	3,8	100 ± 1
			500	6,3	97 ± 2
Clembuterol	0,038 (0,071)	0,23 (0,43)	50	4,4	100 ± 2
			500	3,9	98 ± 3
Furosemida	0,78 (1,58)	4,69 (9,48)	2000	4,5	97 ± 1
			12500	3,9	98 ± 3
Hidroclorotiazida	0,053 (0,11)	0,32 (0,65)	2000	7,0	95 ± 1
			12500	6,0	100 ± 3

A repetibilidade da curva analítica foi expressa pela porcentagem do desvio padrão relativo (%RSD) (TAVERNIERS, 2004) e é definida pela Equação 1.6. 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 a repetibilidade inter-dia em diferentes concentrações estão descritos na Tabela 2.7 e foram abaixo de 10 %, demostrando boa repetibilidade do método proposto.

Houve uma melhora significativa em sensibilidade e detectabilidade para os quatro compostos investigados quando o papel hidrofóbico tratado foi utilizado, ao

invés do papel hidrofílico não-tratado (Tabela 2.8). Os valores de LD e LQ obtidos para o papel hidrofóbico tratado foram duas ordens de magnitude menor para CLEN e HCT e três ordens de magnitude menor para TREM e FUR, quando comparados com o papel hidrofílico não-tratado, alcançando níveis de sub-ng mL^{-1}. Quando adicionado ao papel hidrofóbico, a amostra de urina forma um esferoide devido a diminuição da energia de superfície do papel após a silanização, limitando sua molhabilidade. Após a secagem, a amostra forma um pequeno *spot* (mancha) amarelada próxima a ponta do triângulo de papel permitindo que a amostra fosse concentrada próximo à área de transferência para o espectrômetro de massas e diminuindo a interação papel-analito. Isso ajuda a evitar a permeação da amostra pelo papel e facilita a transferência do analito para a fase gasosa. Quando a amostra de urina é adicionada ao papel hidrofílico é completamente absorvido pelas fibras do papel, aumentando a interação entre o analito e a celulose e diminuindo sua transferência para a fase gasosa (Figura 2.31).

Tabela 2.8 – LD e LQ para TREM, CLEM, FUR e HCT em amostras de urina utilizando papel hidrofóbico tratado e papel hidrofílico não-tratado.

Analito	MRPL (ng mL^{-1})	Sensibilidade (inclinação)		LDs (LQs) (ng mL^{-1})	
		Papel hidrofóbico	Papel hidrofílico	Papel hidrofóbico	Papel hidrofílico
TREM	5	53,0	0,344	0,16 (0,32)	226 (576)
CLEM	0,2	30,7	5,12	0,038 (0,071)	1,75 (4,24)
FUR	200	11985,4	468,6	0,78 (1,58)	126 (321)
HCT	200	5019,6	2134,8	0,053 (0,11)	1,37 (3,44)

5.5. Estabilidade utilizando plataformas de papel

Para investigar a estabilidade dos agentes dopantes nas amostras secas (*dried spot*), alíquotas de 6 µL da amostra de urina fortificada separadamente com TREM (1000 ng mL^{-1}), CLEM (1000 ng mL^{-1}), FUR (25 µg mL^{-1}) e HCT (25 µg mL^{-1}) foram adicionadas sobre o papel hidrofóbico tratado com TCMS e o papel hidrofílico não-tratado. Os triângulos de papel foram estocados por 25 dias em temperatura ambiente em uma gaveta e a 4°C na geladeira. Os resultados obtidos para o estudo da estabilidade estão resumidos nas Figura 2.33, Figura 2.34, Figura 2.35 e Figura 2.36.

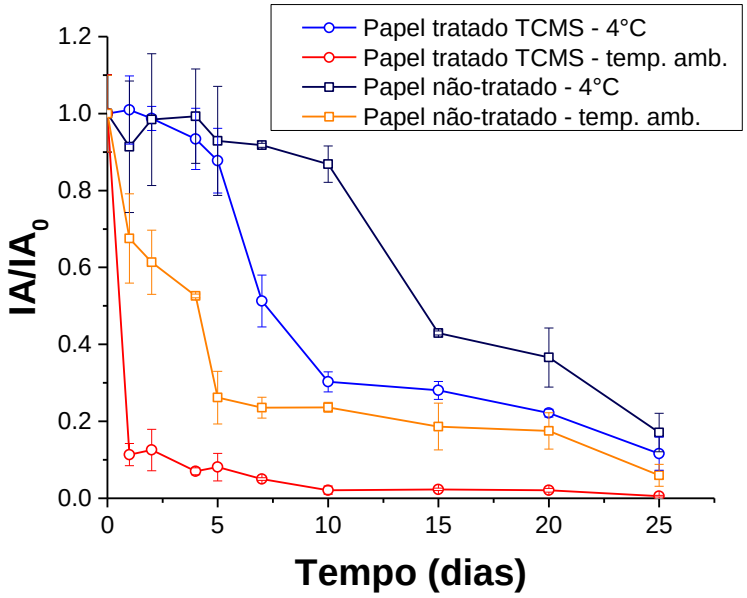

Figura 2.33 – Estabilidade da trembolona (1000 ng mL^{-1}) em amostra de urina depositada sobre o papel hidrofóbico tratado com TCMS (linhas azul e vermelha) e papel hidrofílico não-tratado (linhas azul escuro e laranja) estocados por 25 dias a temperatura ambiente (linhas vermelha e laranja) e a 4°C (linhas azul e azul escuro). A barra de erro representa o desvio padrão das análises de três réplicas em triângulos de papeis independentes.

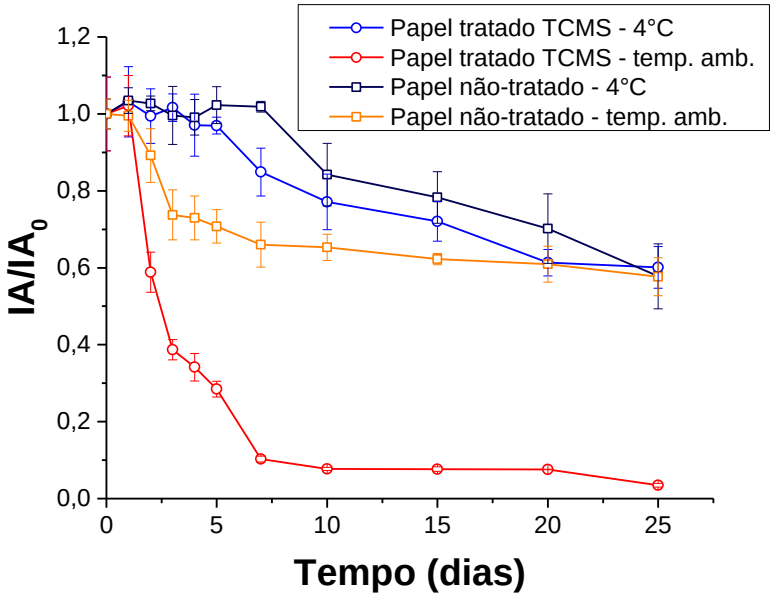

Figura 2.34 – Estabilidade da clembuterol (1000 ng mL^{-1}) em amostra de urina depositada sobre o papel hidrofóbico tratado com TCMS (linhas azul e vermelha) e papel hidrofílico não-tratado (linhas azul escuro e laranja) estocados por 25 dias a temperatura ambiente (linhas vermelha e laranja) e a 4°C (linhas azul e azul escuro). A barra de erro representa o desvio padrão das análises de três réplicas em triângulos de papeis independentes.

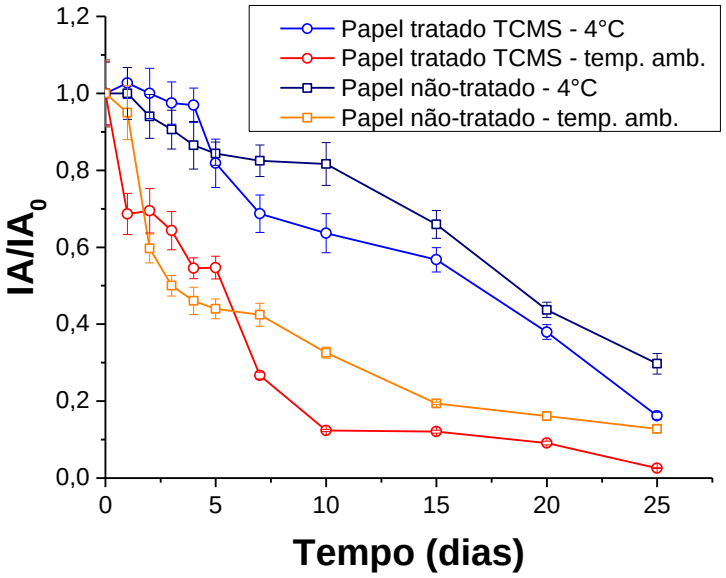

Figura 2.35 – Estabilidade da furosemida (25 µg mL^{-1}) em amostra de urina depositada sobre o papel hidrofóbico tratado com TCMS (linhas azul e vermelha) e papel hidrofílico não-tratado (linhas azul escuro e laranja) estocados por 25 dias a temperatura ambiente (linhas vermelha e laranja) e a 4°C (linhas azul e azul escuro). A barra de erro representa o desvio padrão das análises de três réplicas em triângulos de papeis independentes.

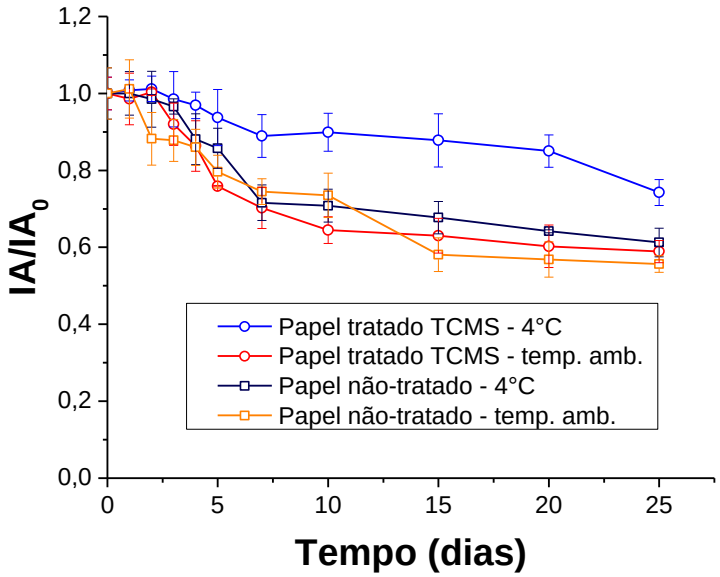

Figura 2.36 – Estabilidade da hidroclorotiazida (25 µg mL^{-1}) em amostra de urina depositada sobre o papel hidrofóbico tratado com TCMS (linhas azul e vermelha) e papel hidrofílico não-tratado (linhas azul escuro e laranja) estocados por 25 dias a temperatura ambiente (linhas vermelha e laranja) e a 4°C (linhas azul e azul escuro). A barra de erro representa o desvio padrão das análises de três réplicas em triângulos de papeis independentes.

A estocagem à temperatura ambiente apresentou maior degradação comparado as amostras mantidas a 4°C. Essa maior diminuição no sinal relativo dos íons a maiores temperaturas é esperada e ocorre devido a aceleração da degradação promovida pela temperatura mais elevada. O sinal relativo do íon dos agentes

dopantes estocados em papel hidrofóbico tratado foi menor quando comparado com o papel hidrofílico não-tratado, exceto no caso da hidroclorotiazida. A menor degradação para o papel não-tratado pode ser ter ocorrido como resultado da deposição da amostra no papel. Para o papel tratado, os compostos da urina são mais expostos ao ambiente, pois as amostras criaram uma pequena mancha na superfície do papel hidrofóbico, enquanto que para o papel não-tratado, as amostras penetraram nas fibras do papel. Provavelmente, as fibras do papel protegeram mais os compostos da urina da degradação do ar, promovendo uma maior estabilidade.

O papel tratado pode ser utilizado como plataforma de estocagem de agentes dopantes. Estocagens a 4°C por períodos de 5 dias há pouca degradação (< 15%) para os quatro compostos. Considerando a mesma taxa de degradação e preservação a 4°C, amostras com concentrações nos MRPL podem ser detectadas e quantificadas pelo método proposto mesmo depois de estocados por 25 dias em papel hidrofóbico. Para o papel não-tratado em concentrações iguais a da MRPL e considerando a mesma taxa de degradação, apenas amostras que contém hidroclorotiazidas podem ser detectadas após 25 dias, quando mantidas a 4°C.

5.6. Comparação de metodologias

As informações contidas nas Tabela 2.9, Tabela 2.10, Tabela 2.11 e Tabela 2.12 descrevem o LD, LQ e a etapa de preparo da amostra para quantificar trembolona, clembuterol, furosemida e hidroclorotiazida em amostras de urina.

Tabela 2.9 – Comparação de parâmetros do presente método com metodologias descritas na literatura para a determinação de trembolona.

Método	Preparo da amostra	LD (ng mL^{-1})	LQ (ng mL^{-1})	Referência
CBS-MS	Extração/lavagem automatizado utilizando placa de 96 poços	-	10	(KASPERKIEWICZ et al., 2019)
LC-MS	LLE	0,1	-	(HE, G.; WU; LU, 2018)
LC-MS	LLE	0,05	-	(ABUSHAREEDA; VONAPARTI; et al., 2018)
LC-MS	SPE e LLE	1	-	(CHA et al., 2016)
GC-MS	LLE e derivatização	1	-	(GANSBEKE et al., 2015)
LC-MS	LLE	10	-	(JEONG et al., 2015)
LC-MS	SPME automatizado	-	5	(BOYACI et al., 2014)
LC-MS	SPE e LLE	0,1	-	(KIM, S. H. et al., 2014)
PS-MS	-	0,16	0,32	Presente trabalho

Tabela 2.10 – Comparação de parâmetros do presente método com metodologias descritas na literatura para a determinação de clembuterol.

Método	Preparo da amostra	LD (ng mL^{-1})	LQ (ng mL^{-1})	Referência
CBS-MS	Extração/lavagem automatizado utilizando placa de 96 poços	-	2,5	(KASPERKIEWICZ et al., 2019)
LC-MS	SPE e LLE	0,1	-	(CHA et al., 2016)
GC-MS	LLE e derivatização	0,04	-	(GANSBEKE et al., 2015)
LC-MS	LLE	0,4	-	(JEONG et al., 2015)
LC-MS	SPME automatizado	-	15	(BOYACI et al., 2014)
LC-AD	Diluição	40	-	(LOMAE et al., 2019)
GC-MS	LLE e derivatização	0,05	-	(ABUSHAREEDA; TIENSTRA; et al., 2018)
GC-MS	LLE e derivatização	0,1	-	(ABUSHAREEDA et al., 2017)
OPP-API-MS	Bio-SPME	0,03	0,1	(GÓMEZ-RÍOS et al., 2017)
LC-MS	SPE	0,044	0,15	(DOMÍNGUEZ-ROMERO et al., 2015)
GC-MS	LLE e derivatização	0,03	-	(YANG et al., 2013)
PS-MS	-	0,038	0,071	Presente trabalho

Tabela 2.11 – Comparação de parâmetros do presente método com metodologias descritas na literatura para a determinação de furosemida.

Método	Preparo da amostra	LD ($ng\ mL^{-1}$)	LQ ($ng\ mL^{-1}$)	Referência
LC-MS	LLE	2	-	(ABUSHAREEDA; VONAPARTI; et al., 2018)
LC-MS	LLE	12,5	-	(JEONG et al., 2015)
LC-MS	SPME automatizado	-	10	(BOYACI et al., 2014)
LC-MS	SPE	0,85	2,8	(DOMÍNGUEZ-ROMERO et al., 2015)
LC-MS	SPE	25,0	-	(SARDELA et al., 2018)
LC-MS	SPE online	5	-	(DE WILDE et al., 2018)
Fluorescência	Centrifugação	6	-	(TSYRULNEVA; ZAPOROZHETS, 2013)
Espectrofotometria	LLE	110	280	(THARPA; BASAVAIAH; VINAY, 2010)
Espectroscopia de reflectância difusa	SPE	162×10^3	536×10^3	(LUIZ; PEZZA; PEZZA, 2013)
GC-MS	LLE e derivatização	50	-	(ZAPOROZHETS; TSYRULNEVA; ISCHENKO, 2012)
PS-MS	-	0,78	1,58	Presente trabalho

Tabela 2.12 – Comparação de parâmetros do presente método com metodologias descritas na literatura para a determinação de hidroclorotiazida.

Método	Preparo da amostra	LD ($ng\ mL^{-1}$)	LQ ($ng\ mL^{-1}$)	Referência
LC-MS	LLE	2	-	(ABUSHAREEDA; VONAPARTI; et al., 2018)
LC-MS	LLE	25	-	(JEONG et al., 2015)
LC-MS	SPE	0,24	0,80	(DOMÍNGUEZ-ROMERO et al., 2015)
LC-MS	SPE	50	-	(SARDELA et al., 2018)
LC-MS	SPE online	1	-	(DE WILDE et al., 2018)
GC-MS	LLE e derivatização	50	-	(ZAPOROZHETS; TSYRULNEVA; ISCHENKO, 2012)
LC-UV	MMIPs-d-SPE	0,75	2,2	(ARABI; GHAEDI; OSTOVAN, 2017)
Voltametria	Centrifugação e filtração	6	-	(BEITOLLAHI; HAMZAVI; TORKZADEH-MAHANI, 2014)
LC-UV	Diluição	4	12	(AYDOĞMUŞ, 2015)
PS-MS	-	0,053	0,11	Presente trabalho

Métodos eletroquímicos, espectrofotométricos, espectroscópicos e fluorimétricos podem ser empregados na determinação de agentes dopantes em amostras de urina, entretanto, essas metodologias não são capazes de detectar ou quantificar compostos pertencentes a diferentes classes de substâncias proibidas pela WADA. Frequentemente, apenas uma substância ou uma classe de substâncias é investigada. As metodologias analíticas mais comuns empregadas na análise de agentes dopantes são LC-MS e GC-MS. Eles são muito sensíveis, precisos e são capazes de obter baixos LD e LQ, entretanto requerem longos tempos de análise, consomem grandes volumes de solventes orgânicos tóxicos, produzem considerável quantidade de resíduos e necessitam de etapas de preparo e limpeza da amostra, tais como extração líquido-líquido e extração em fase sólida, que são laboriosos, susceptíveis a erros e podem expor o operador a amostras com risco biológico. Também, uma etapa de derivatização é necessária para compostos não-voláteis quando cromatografia gasosa é empregada, consumindo reagentes e aumentando ainda mais o tempo requerido para análise. Comparativamente, uma análise por LC-MS ou GC-MS pode demorar pelo menos duas horas para o preparo, derivatização e análise, utilizando mais de 10 mL de solventes orgânicos e aproximadamente 5 mL de amostra, enquanto que a análise por PS-MS é realizada em aproximadamente 2 minutos, utilizando para isso apenas 6 µL de amostra e 20 µL de solvente orgânico. Dessa maneira, como o tempo, volume de solvente utilizado e volume de amostra necessário são reduzidos drasticamente quando o método proposto é utilizado, o custo da análise via PS-MS é muito mais baixo se comparado aos métodos via LC-MS e GC-MS, isso sem levar em conta o custo de um cromatógrafo que não é necessário. Kasperkiewicz e co-autores (KASPERKIEWICZ et al., 2019) descreveram um método utilizando *coated blade spray*-MS, um tipo de ionização ambiente, para quantificação de trembolona e clembuterol em amostras de urina, porém, os valores de LQ encontrados são maiores que os MRPL e etapas adicionais de extração são necessárias para a análise. O método de PS-MS proposto simplifica a instrumentação requerida, pois não necessita gás de arraste ou preparo da amostra, e reduz o tempo de análise combinando coleta, separação e ionização em uma única etapa. Níveis de detecção abaixo de ng mL^{-1} compatíveis ou menores que métodos utilizando LC-MS e abaixo dos MRPL foram alcançados sem qualquer tipo de preparo de amostra.

6. CONCLUSÕES

Foi demonstrada a potencialidade de análise direta de agentes dopantes em amostras de urina utilizando papel quimicamente tratado. O papel hidrofóbico modificado com TCMS permitiu a quantificação direta e sensível de agentes anabólicos e diuréticos em amostra de urina. A metodologia de PS-MS proposta apresenta algumas vantagens sobre metodologias de LC-MS e GS-MS: integra a coleta, separação e ionização da amostra em uma única etapa, diminui o consumo de solventes orgânicos tóxicos, a produção de resíduos e tempo de análise e nenhum tipo de preparo de amostra além de sua deposição na superfície do papel foi necessário. A modificação da superfície do papel com TCMS reduziu a interação papel-analito e aumentou a transferência do analito para a fase gasosa e, consequentemente, para o espectrômetro de massas. Diferentes condições experimentais foram otimizadas utilizando planejamentos experimentais multivariados e univariados.

O emprego de papel hidrofóbico combinado com o uso de um solvente orgânico menos polar minimizou a descarga induzida por sais e o efeito de matriz, o que permite uma extração mais seletiva dos compostos alvo, resultando em limites de detecção na faixa de sub-ng mL^{-1}, significativamente menor do que os níveis de desempenho mínimos requeridos pela WADA. Os métodos propostos foram aplicados em amostras de urina fortificadas com os agentes dopantes e se mostraram rápidos, simples, sensíveis, exatos e precisos.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

A utilização de plataformas de papel com detecção por espectrometria de massas é bastante promissora com várias possibilidades de aplicação. Há quatro possíveis vertentes para a próximas etapas na utilização do PS-MS. A primeira é expandir o número de substâncias dopantes analisadas, englobando um maior número de compostos proibidos quantificados na análise anti-*doping*. Ainda, é possível automatizar as análises de modo a aumentar a frequência analítica e diminuindo o tempo de análise.

A segunda vertente é a utilização do PS-MS em análises clínicas. Importantes substâncias como hormônios e substâncias marcadoras de doenças, como é o caso da dosagem de alguns aminoácidos em urina para detecção de alguns tipos de câncer, são encontradas em baixa concentração em amostras biológicas, assim, devido à alta detectabilidade e à alta confiabilidade da técnica, o PS-MS pode ser uma alternativa às técnicas cromatográficas para análise dessas substâncias.

Ainda no contexto das bioanálises, a terceira vertente é a utilização da técnica de PS-MS para o diagnóstico de doenças tropicais negligenciáveis como malária, dengue, mal de Chagas, zika e chikungunya. Por meio da funcionalização do papel com anticorpos específicos para cada uma das doenças é possível realizar o diagnóstico rápido, específico, precoce e com um volume muito menor de amostra do que o necessário pelos métodos atuais.

A quarta vertente é o estudo mais aprofundado na modificação da superfície do papel. O estudo mais aprofundado dos mecanismos de ionização quando se utiliza superfícies hidrofóbicas pode levar a melhores explicações do aumento da ionização dos analitos. Além disso, a utilização de diferentes modificadores para a superfície do papel para analitos específicos pode melhorar a detecção de alguns analitos, possibilitando que a pré-concentração seja feita diretamente na superfície do papel.

REFERÊNCIA

ABUSHAREEDA, W.; TIENSTRA, M.; et al. Comparison of gas chromatography/quadrupole time-of-flight and quadrupole orbitrap mass spectrometry in anti-doping analysis: I. detection of anabolic-androgenic steroids. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 32, n. 23, p. 2055–2064, 2018.

ABUSHAREEDA, W. et al. Gas chromatographic quadrupole time-of-flight full scan high resolution mass spectrometric screening of human urine in antidoping analysis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1063, p. 74–83, 2017.

ABUSHAREEDA, W.; VONAPARTI, A.; et al. High resolution full scan liquid chromatography mass spectrometry comprehensive screening in sports antidoping urine analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 151, p. 10–24, 2018.

ALBERICI, R. M. et al. Ambient mass spectrometry: bringing MS into the “real world”. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 265–294, 2010.

ARABI, M.; GHAEDI, M.; OSTOVAN, A. Development of a lower toxic approach based on green synthesis of water-compatible molecularly imprinted nanoparticles for the extraction of hydrochlorothiazide from human urine. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 5, n. 5, p. 3775–3785, 2017.

AYDOĞMUŞ, Z. Simultaneous determination of aliskiren, amlodipine and hydrochlorothiazide in spiked human plasma and urine by high performance liquid chromatography. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 502–509, 2015.

BADU-TAWIAH, A.; COOKS, R. G. Enhanced ion signals in desorption electrospray ionization using surfactant spray solutions. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 21, n. 8, p. 1423–1431, 2010.

BADU-TAWIAH, A. K. et al. Chemical aspects of the extractive methods of ambient ionization mass spectrometry. **Annual Review of Physical Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 481–505, 2013

BAMBAUER, T. P. et al. Evaluation of novel organosilane modifications of paper spray mass spectrometry substrates for analyzing polar compounds. **Talanta**, v. 204, n. March, p. 677–684, 2019.

BANERJEE, S.; MAZUMDAR, S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. **International Journal of Analytical Chemistry**, v. 2012, p. 1–40, 2012.

BARROSO, M. B.; ALONSO, R. M.; JIMÉNEZ, R. M. Electrochemical determination of the loop diuretics piretanide and furosemide in pharmaceutical formulations and urine. **Analytica Chimica Acta**, v. 305, n. 1–3, p. 332–339, 1995.

BASURI, P.; BAIDYA, A.; PRADEEP, T. Sub-parts-per-trillion level detection of analytes by superhydrophobic preconcentration paper spray ionization mass spectrometry (SHPPSI MS). **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 11, p. 7118–7124, 2019.

BEITOLLAHI, H.; HAMZAVI, M.; TORKZADEH-MAHANI, M. Electrochemical determination of hydrochlorothiazide and folic acid in real samples using a modified graphene oxide sheet paste electrode. **Materials Science and Engineering C**, v. 52, p. 297–305, 2014.

BORGES, M. M. C. et al. The use of conductive polymers as a substrate for paper spray ionization mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 11, n. 27, p. 3388–3400, 2019.

BOYACI, E. et al. Introduction of solid-phase microextraction as a high-throughput sample preparation tool in laboratory analysis of prohibited substances. **Analytica Chimica Acta**, v. 809, p. 69–81, 2014.

BUITRAGO, A. et al. Desarrollo y validación de un método espectrofluorométrico para la determinación de furosemida en formas farmacéuticas sólidas. **Avances en Química**, v. 5, n. 1, p. 15–25, 2010.

BUNKER, B. C. et al. Impact of solution agglomeration on the deposition of self-assembled monolayers. **Langmuir**, v. 16, n. 20, p. 7742–7751, 2000.

CADWALLADER, A. B. et al. The abuse of diuretics as performance-enhancing drugs and masking agents in sport doping: pharmacology, toxicology and analysis. **British Journal of Pharmacology**, v. 161, n. 1, p. 1–16, 2010.

CASAVANT, M. J. et al. Consequences of use of anabolic androgenic steroids. **Pediatric Clinics of North America**, v. 54, n. 4, p. 677–690, 2007.

CHA, E. et al. Relationships between structure, ionization profile and sensitivity of exogenous anabolic steroids under electrospray ionization and analysis in human urine using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biomedical Chromatography**, v. 30, n. 4, p. 555–565, 2016.

CHEN, Shuo et al. Rapid analysis of bisphenol A and its analogues in food packaging products by paper spray ionization mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 23, p. 4859–4865, 2017.

CHEN, Suming; WAN, Q.; BADU-TAWIAH, A. K. Mass spectrometry for paper-based immunoassays: toward on-demand diagnosis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 138, n. 20, p. 6356–6359, 2016.

COOKS, R. G. et al. Ambient mass spectrometry. **Science**, v. 311, n. 5767, p. 1566–1570, 2006.

DA SILVA FERREIRA, P. et al. Forensic analysis of ballpoint pen inks using paper spray mass spectrometry. **Analyst**, v. 140, n. 3, p. 811–819, 2015.

DAMON, D. E. et al. Direct biofluid analysis using hydrophobic paper spray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 1878–1884, 2016.

_____. Dried blood spheroids for dry-state room temperature stabilization of microliter blood samples. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 15, p. 9353–9358, 2018.

DE WILDE, L. et al. Identification and confirmation of diuretics and masking agents in urine by turbulent flow online solid-phase extraction coupled with liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry for doping control. **Journal of Chromatography A**, v. 1579, p. 31–40, 2018.

DOMÍNGUEZ-ROMERO, J. C. et al. Screening and confirmation capabilities of liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry for the determination of 200 multiclass sport drugs in urine. **Talanta**, v. 134, p. 74–88, 2015.

DOUGLAS, D. J.; FRANK, A. J.; MAO, D. Linear ion traps in mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 24, n. 1, p. 1–29, 2005.

ESPY, R. D. et al. Spray mechanism in paper spray ionization. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 325–327, p. 167–171, 2012.

FENN, J. B. et al. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 6, p. 64–71, 1989.

FREY, B. S.; DAMON, D. E.; BADU-TAWIAH, A. K. Emerging trends in paper spray mass spectrometry: Microsampling, storage, direct analysis, and applications. **Mass Spectrometry Reviews**, n. i, p. 1–35, 2019.

GANSBEKE, W. Van et al. Improved sensitivity by use of gas chromatography-positive chemical ionization triple quadrupole mass spectrometry for the analysis of drug related substances. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1001, p. 221–240, 2015.

GLASS, N. R. et al. Organosilane deposition for microfluidic applications. **Biomicrofluidics**, v. 5, n. 3, 2011.

GLAVAN, A. C. et al. Omniphobic “RF paper” produced by silanization of paper with fluoroalkyltrichlorosilanes. **Advanced Functional Materials**, v. 24, n. 1, p. 60–70, 2014.

GÓMEZ-RÍOS, G. A. et al. Open port probe sampling interface for the direct coupling of biocompatible solid-phase microextraction to atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 7, p. 3805–3809, 2017.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. 3. ed. Cham: Springer, 2017.

HARRIS, G. A.; GALHENA, A. S.; FERNÁNDEZ, F. M. Ambient sampling/ionization mass spectrometry: applications and current trends. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 4508–4538, 2011.

HE, G.; WU, Y.; LU, J. Doping control analysis of 13 steroids and structural-like analytes in human urine using Quadrupole-Orbitrap LC–MS/MS with parallel reaction monitoring (PRM) mode. **Steroids**, v. 131, n. August 2017, p. 1–6, 2018.

HE, Q. et al. Method for fabrication of paper-based microfluidic devices by alkylsilane self-assembling and UV/O3-patterning. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 1327–1331, 2013.

HIGASHIYAMA, Y.; YANASE, S.; SUGIMOTO, T. DC corona discharge from water droplets on a hydrophobic surface. **Journal of Electrostatics**, v. 55, n. 3–4, p. 351–360, 2002.

HOFFMAN, E. de; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3rd. ed. Chichester: Wiley, 2007.

HUANG, M.-Z. et al. Ambient ionization mass spectrometry. **Annual Review of Analytical Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 43–65, 2010.

IRIBARNE, J. V.; THOMSON, B. A. On the evaporation of small ions from charged droplets. **The Journal of Chemical Physics**, v. 64, n. 6, p. 2287–2294, 1976.

JEONG, E. S. et al. Simultaneous analysis of 210 prohibited substances in human urine by ultrafast liquid chromatography/tandem mass spectrometry in doping control. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 29, n. 4, p. 367–384, 2015.

JJUNJU, F. P. M. et al. Screening and quantification of aliphatic primary alkyl corrosion inhibitor amines in water samples by paper spray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 2, p. 1391–1400, 2016.

JOHNSON, B. J.; REINHARDT, C. D. Growth promotants for beef production: anabolic steroids: performance responses and mode of action. **Food Aninal Pract.** 5. ed. St. Louis: Saunders, 2009. p. 643–651.

KARAS, M.; BAHR, U. Matrix-assisted laser desorption-ionization (MALDI) mass spectrometry: principles and applications. **Sel. Top. mass Spectrom. Biomol. Sci.** 1. ed. Dordrecht: Springer, 1997. p. 33–53.

KARAS, Michael; HILLENKAMP, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. **Analytical Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 2299–2301, 1988.

KASPERKIEWICZ, A. et al. Breaching the 10 second barrier of total analysis time for complex matrices via automated coated blade spray. **Analytical Chemistry**, v. 91, n. 20, p. 13039–13046, 2019.

KIM, S. H. et al. Simultaneous ionization and analysis of 84 anabolic androgenic steroids in human urine using liquid chromatography-silver ion coordination ionspray/triple-quadrupole mass spectrometry. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. 11–12, p. 1174–1185, 2014.

KONERMANN, L. et al. Unraveling the mechanism of electrospray ionization. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 1, p. 2–9, 2013.

KRONE, N. et al. Gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) remains a pre-eminent discovery tool in clinical steroid investigations even in the era of fast liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 121, n. 3–5, p. 496–504, 2010.

KULYK, D. S.; SWINER, D. J.; et al. Direct mass spectrometry analysis of complex mixtures by nanoelectrospray with simultaneous atmospheric pressure chemical ionization and electrophoretic separation capabilities. **Analytical Chemistry**, v. 91, p. 11562–11568, 2019.

KULYK, D. S.; SAHRAEIAN, T.; et al. Reactive olfaction ambient mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 91, p. 6790–6799, 2019.

KULYK, D. S.; MILLER, C. F.; BADU-TAWIAH, A. K. Reactive charged droplets for reduction of matrix effects in electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 21, p. 10988–10994, 2015.

LI, A. et al. Direct analysis of 4-methylimidazole in foods using paper spray mass spectrometry. **Analyst**, v. 138, n. 16, p. 4624–4630, 2013.

LIN, C. C. et al. Urine analysis in microfluidic devices. **Analyst**, v. 136, n. 13, p. 2669–2688, 2011.

LIU, Jiangjiang et al. Development, characterization, and application of paper spray ionization. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 6, p. 2463–2471, 15 mar. 2010.

LIU, Jingjing et al. New urea-modified paper substrate for enhanced analytical performance of negative ion mode paper spray mass spectrometry. **Talanta**, v. 166, n. October 2016, p. 306–314, 2017.

LOMAE, A. et al. Simultaneous determination of β-agonists by UHPLC coupled with electrochemical detection based on palladium nanoparticles modified BDD electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 840, p. 439–448, 2019.

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, 2013.

MAHER, S. et al. Direct analysis and quantification of metaldehyde in water using reactive paper spray mass spectrometry. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–10, 2016.

MCBRIDE, E. M. et al. Paper spray ionization: applications and perspectives. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 722–730, 2019.

MCLAFFERTY, F. W. Tandem mass spectrometry. **Science**, v. 214, n. October, p. 280–287, 1981.

MONGE, M. E. et al. Mass spectrometry: recent advances in direct open air surface sampling/ionization. **Chemical Reviews**, v. 113, n. 4, p. 2269–2308, 2013.

MORGAN, T. O. Diuretics: basic clinical pharmacology and therapeutic use. **Drugs**, v. 15, n. 2, p. 151–158, 1978.

MUNSON, M. S. B.; FIELD, F. H. Chemical ionization mass spectrometry. I. General introduction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 88, n. 12, p. 2621–2630, 1966.

MUTASIM I. KHALIL. The role of dielectric constant in sodium chloride solution chemistry: magnitude of super saturation. **International Journal of the Physical Sciences**, v. 7, n. 4, p. 578–583, 2012.

OLIVARES, E. L. et al. Administration of an anabolic steroid during the adolescent phase changes the behavior, cardiac autonomic balance and fluid intake in male adult rats. **Physiology and Behavior**, v. 126, p. 15–24, 2014.

OZGUR, E. et al. Ultrasensitive detection of human chorionic gonadotropin using frequency locked microtoroid optical resonators. **Analytical Chemistry**, 2019.

PARR, M. K.; FLENKER, U.; SCHÄNZER, W. Sports-related issues and biochemistry of natural and synthetic anabolic substances. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 39, n. 1, p. 45–57, 2010.

PEREIRA, H. V. et al. Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers. **Analytica Chimica Acta**, v. 940, p. 104–112, 2016.

PRATHER, I. D. et al. Clenbuterol: a substitute for anabolic steroids? **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 8, p. 1118–1121, 1995.

PROTTI, M.; MANDRIOLI, R.; MERCOLINI, L. Perspectives and strategies for anti-doping analysis. **Bioanalysis**, v. 11, n. 3, p. 149–152, 2019.

RAFATI, A. A.; BAGHERI, A.; NAJAFI, M. Experimental data and correlation of surface tensions of the binary and ternary systems of water + acetonitrile + 2-propanol at 298.15 K and atmospheric pressure. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 55, n. 9, p. 4039–4043, 2010.

REEBER, S. L. et al. Direct analysis of herbicides by paper spray ionization mass spectrometry. **Analytical Methods**, v. 7, n. 23, p. 9808–9816, 2015.

REICHARDT, C.; WELTON, T. **Solvents and solvent efects in organic chemistry**. 4th. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011.

RIBONI, N. et al. Solvent-assisted paper spray ionization mass spectrometry (SAPSI-MS) for the analysis of biomolecules and biofluids. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

ROCHA, F. L.; ROQUE, F. R.; OLIVEIRA, E. M. Esteróides anabolizantes: mecanismos de ação e efeitos sobre o sistema cardiovascular. **O Mundo da Saúde**, v. 31, n. 4, p. 470–477, 2007.

RUMBLE, J. R. (Org.). **CRC handbook of chemistry and physics**. 100. ed. Boca Raton: CRC Press, 2019.

SARDELA, V. F. et al. Comprehensive analysis by liquid chromatography Q-Orbitrap mass spectrometry: fast screening of peptides and organic molecules. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 53, n. 6, p. 476–503, 2018.

SCHÄNZER, W. Metabolism of anabolic androgenic steroids. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1001–1020, 1996.

SCHWARTZ, J. C.; SENKO, M. W.; SYKA, J. E. P. A two-dimensional quadrupole ion trap mass spectrometer. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 13, n. 6, p. 659–669, jun. 2002.

SELDIN, D.; GIEBISCH, G. (Org.). **Diuretic agents: clinical physiology and pharmacology**. 1. ed. San Diego: Academic Press, 1997.

SONE, K. et al. Effects of an androgenic growth promoter 17β-trenbolone on masculinization of Mosquitofish (Gambusia affinis affinis). **General and Comparative Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 151–160, 2005.

SURARITDECHACHAI, S. et al. Rapid detection of the antibiotic sulfamethazine in pig body fluids by paper spray mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 10, p. 3055–3061, 2019.

SWINER, D. J. et al. Microsampling with cotton thread: Storage and ultra-sensitive analysis by thread spray mass Spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1082, p. 98–105, 2019.

TAKÁTS, Z. et al. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization. **Science**, v. 306, n. 5695, p. 471–473, 2004.

TANAKA, K. et al. Protein and polymer analyses up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 2, n. 8, p. 151–153, 1988.

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

TEODORO, J. A. R. et al. Paper spray mass spectrometry and chemometric tools for a fast and reliable identification of counterfeit blended Scottish whiskies. **Food Chemistry**, v. 237, p. 1058–1064, 2017.

THARPA, K.; BASAVAIAH, K.; VINAY, K. B. Use of a diazocoupling reaction for sensitive and selective spectrophotometeric determination of furosemide in spiked human urine and pharmaceuticals. **Chemical Papers**, v. 64, n. 4, p. 415–423, 2010.

THERMO SCIENTIFIC. **Finnigan LTQ hardware manual**. [S.l.]: Thermo Fisher Scientific Inc., 2012.

THEVIS, M.; GUDDAT, S.; SCHÄNZER, W. Doping control analysis of trenbolone and related compounds using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Steroids**, v. 74, n. 3, p. 315–321, 2009.

TSAI, C. W.; TIPPLE, C. A.; YOST, R. A. Application of paper spray ionization for explosives analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 31, n. 19, p. 1565–1572, 2017.

TSYRULNEVA, I.; ZAPOROZHETS, O. Simple and rapid determination of diuretics by luminescent method. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 04, n. 07, p. 520–527, 2013.

ULMAN, A. Formation and structure of self-assembled monolayers. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 4, p. 1533–1554, 1996.

WAN, L. et al. In situ analysis of unsaturated fatty acids in human serum by negative-ion paper spray mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 1075, p. 120–127, 2019.

WANG, H. et al. Direct quantitative analysis of nicotine alkaloids from biofluid samples using paper spray mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 23, p. 11540–11544, 2013.

_____. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 49, n. 5, p. 877–880, 2010.

WANG, J. et al. Facile preparation of nanostructured, superhydrophobic filter paper for efficient water/oil separation. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–12, 2016.

WESTON, D. J. Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. **Analyst**, v. 135, n. 4, p. 661–668, 2010.

WILSON, C. Clenbuterol. **Ref. Modul. Biomed. Sci.** 1. ed. [S.l.]: ScienceDirect, 2015. p. 1–7.

WORLD ANTI-DOPING AGENCY. **2017 Anti-doping testing figures**. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/2017_anti-doping_testing_figures_en_0.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2019.

_____. **Minimum required performance levels for detection and identification of non-threshold substances**. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/td2019mrpl_eng.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2019a.

_____. **Prohibited list**. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/wada_2019_english_prohibited_list.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2019b.

_____. **Who we are**. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/en/who-we-are>. Acesso em: 30 ago. 2019c.

_____. **World Anti-Doping code**. Disponível em: <https://www.wada-ama.org/sites/default/files/resources/files/wada_anti-doping_code_2019_english_final_revised_v1_linked.pdf>. Acesso em: 30 ago. 2019d.

XIN, N. et al. Solubilities of six lithium salts in five non-aqueous solvents and in a few of their binary mixtures. **Fluid Phase Equilibria**, v. 461, p. 1–7, 2018.

YAMASHITA, M.; FENN, J. B. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. **Journal of Physical Chemistry**, v. 88, n. 20, p. 4451–4459, 1984.

YANG, S. et al. Detection of clenbuterol at trace levels in doping analysis using different gas chromatographic-mass spectrometric techniques. **Journal of Chromatographic Science**, v. 51, n. 5, p. 436–445, 2013.

ZAPOROZHETS, O.; TSYRULNEVA, I.; ISCHENKO, M. Determination of 8 diuretics and probenecid in human urine by gas chromatography-mass spectrometry: confirmation procedure. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 03, n. 04, p. 320–327, 2012.

ZHU, J.; COLE, R. B. Formation and decompositions of chloride adduct ions, [M+Cl]-, in negative ion electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 11, n. 11, p. 932–941, 2000.