RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 14/02/2022.

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

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 dots* 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.

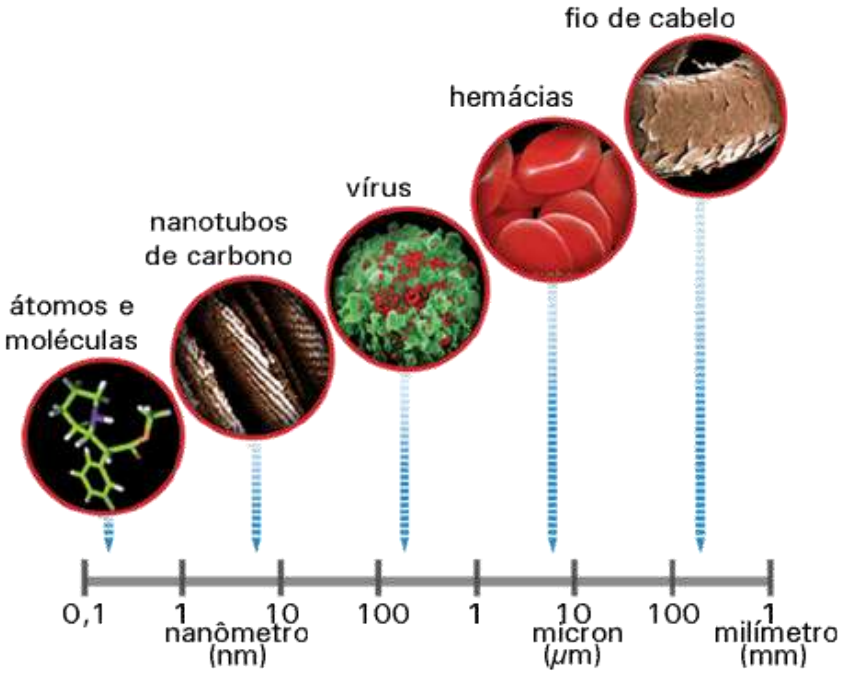

Figura 1.1 – Comparação das dimensões de diferentes estruturas.
Fonte: Disponível em https://nanomateriais.wordpress.com/nanomateriais/.

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).

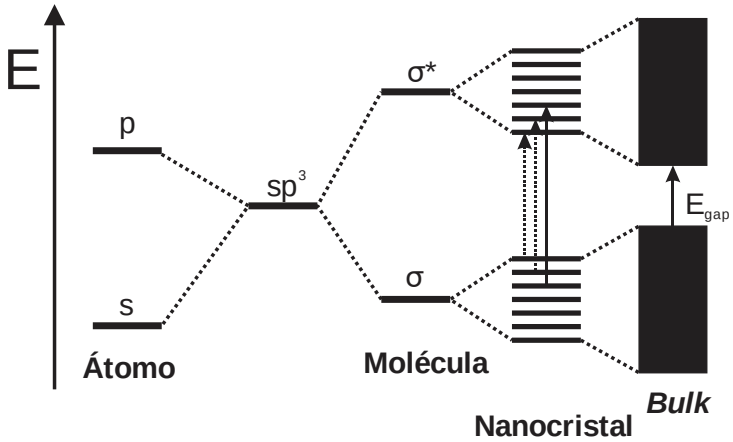

Figura 1.2 – Níveis de energia de um átomo até o *bulk* de um mesmo material.
Fonte: Adaptado de Alivisatos (ALIVISATOS, 1997).

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.

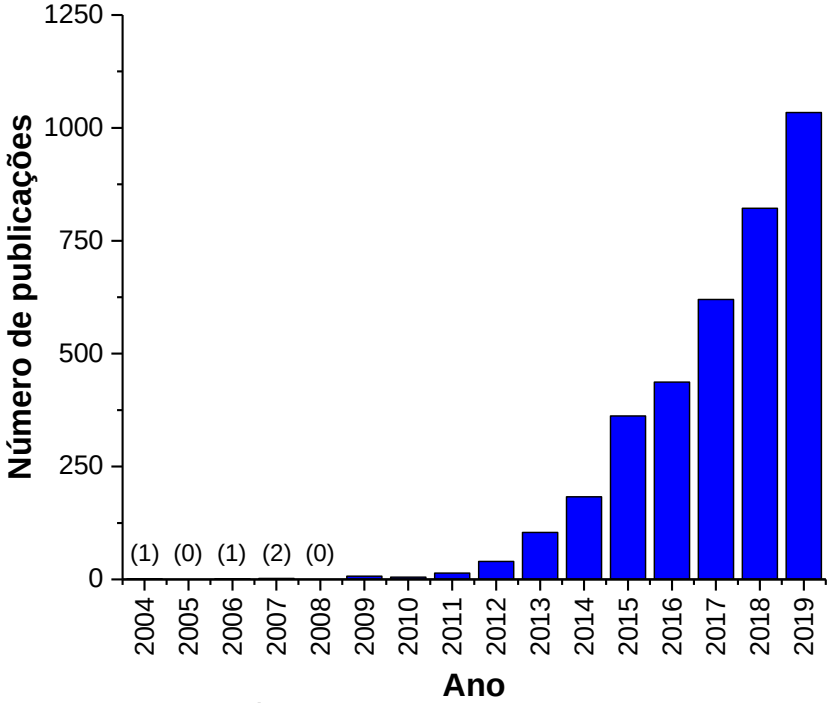

Figura 1.3 – Levantamento do número de publicações de trabalhos relativos à *carbon dot* em função do ano, no período de 2004 a 2019, feito utilizando a plataforma *Scifinder®* utilizando a palavra *carbon dot.*
Fonte: Elaborada pelo autor.

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).

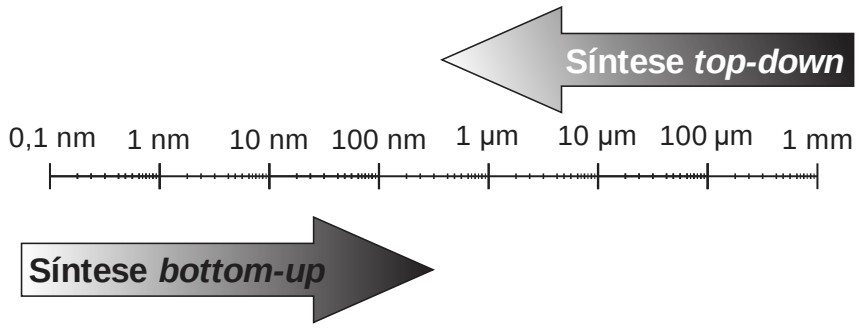

Figura 1.4 – Estratégias *top-down* e *bottom-up* para síntese de nanopartículas.
Fonte: Adaptada de Ju-Nam (JU-NAM; LEAD, 2008).

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:

$$\mathrm{A} = \varepsilon \mathrm{bC} \qquad \text{Equação 1.1}$$

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).

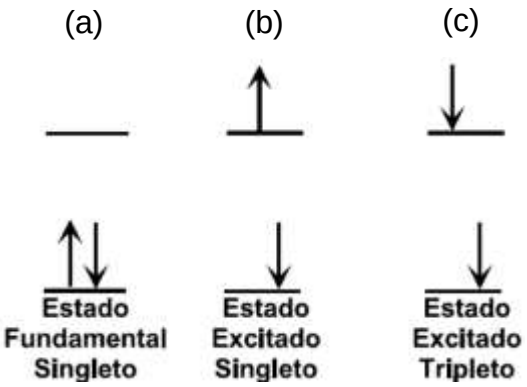

Figura 1.5 – Estados de spin dos elétrons das moléculas. Em (a) é representado o estado eletrônico fundamental singleto com os spins emparelhados. Em (b) e (c) são mostrados os estados eletrônicos excitados. Caso os spins estejam emparelhados no estado excitado, a molécula está no estado singleto (b). 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.

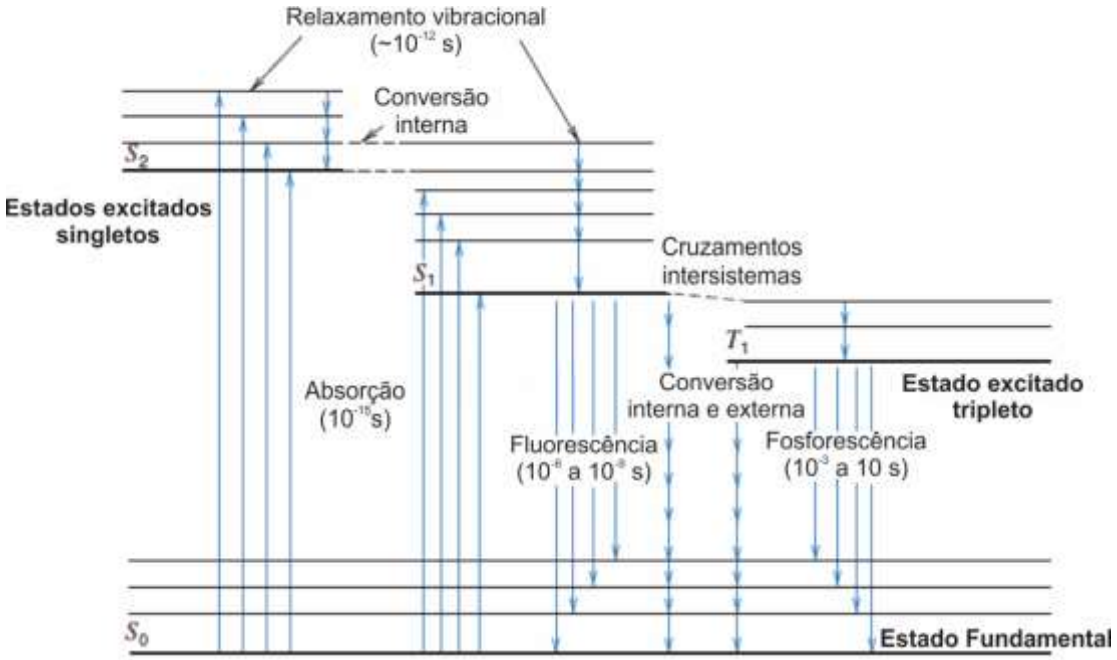

Figura 1.6 – Diagrama de níveis de energia, ou diagrama de Jablonski, de uma molécula hipotética.
Fonte: Adaptada de Christian (CHRISTIAN; DASGUPTA; SCHUG, 2014a)

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.

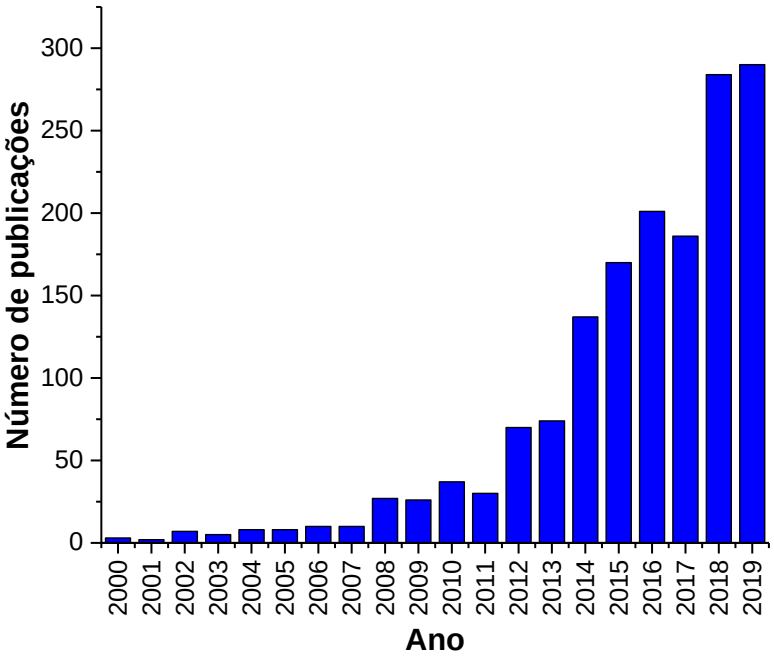

Figura 1.7 – Levantamento do número de publicações de trabalhos relativos à µPAD em função do ano, no período de 2000 a 2019, feito utilizando a plataforma *Scifinder*® utilizando a palavra *paper-based analytical device.*
Fonte: Elaborada pelo autor.

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).

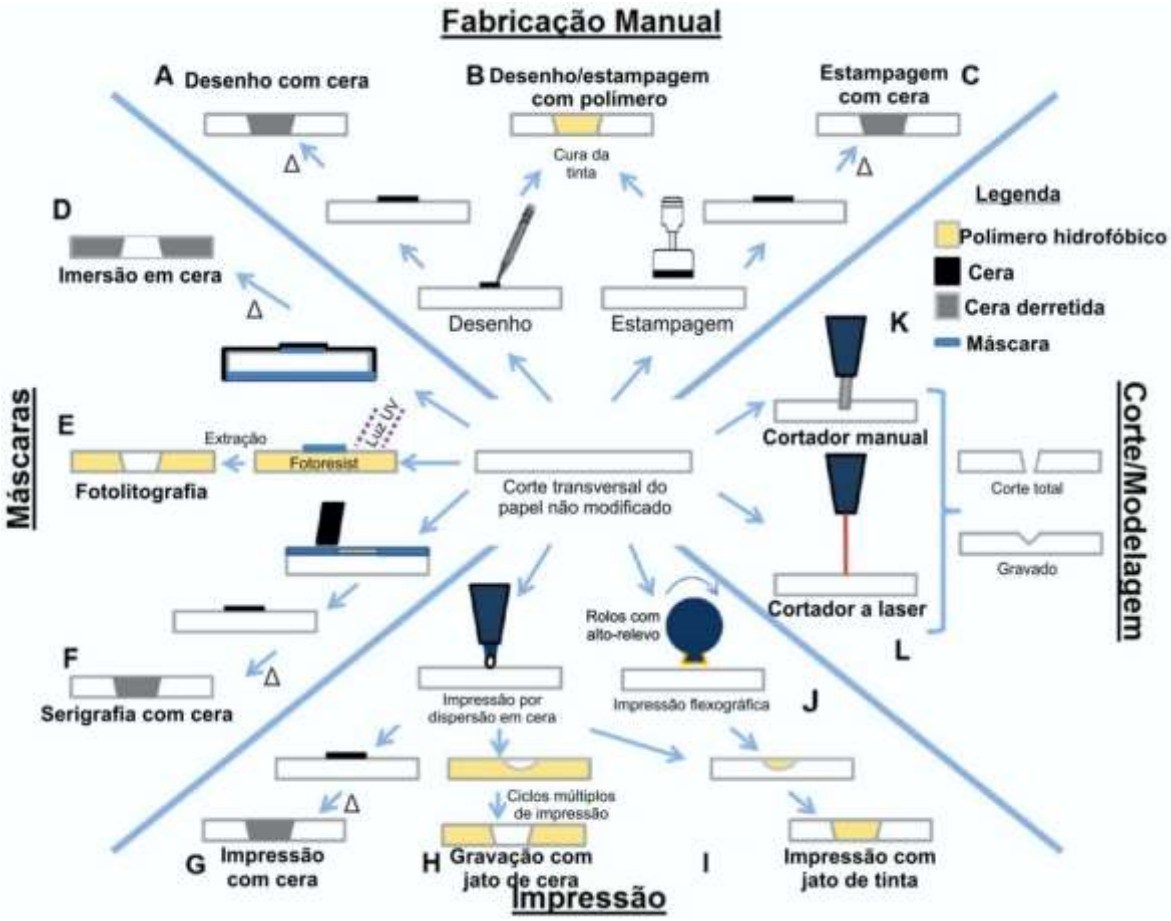

Figura 1.8 – Esquema dos diferentes modos para a confecção de barreiras hidrofóbicas.
Fonte: Adaptada de Cate (CATE et al., 2015).

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.

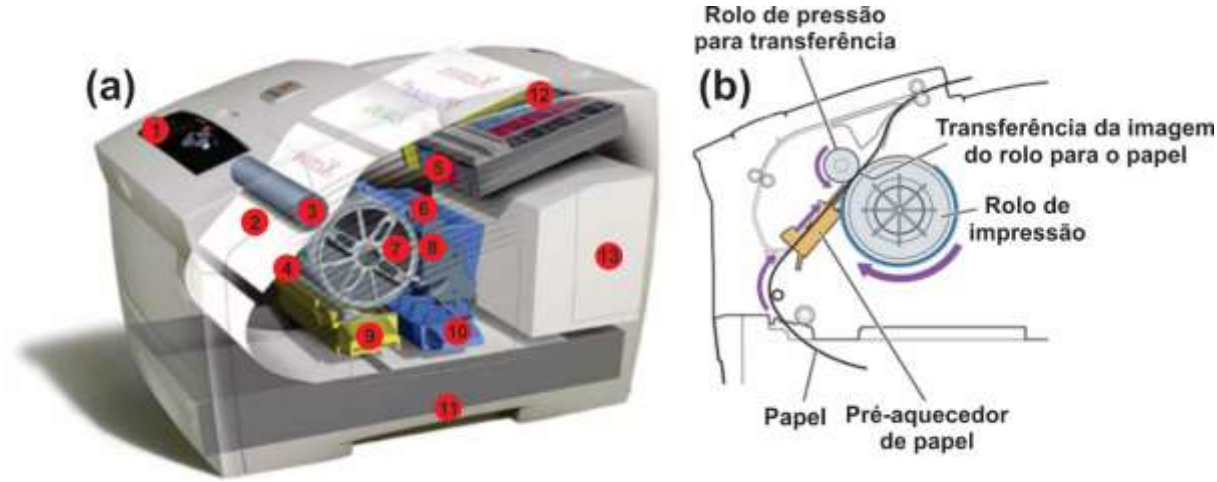

Figura 1.9 – (a) Detalhamento dos componentes de uma impressora com tinta à base de cera da marca Xerox®: 1) *Display* frontal, 2) Trajetória do papel, 3) Rolo de pressão para transferência, 4) Pré-aquecedor de papel, 5) Fusão da cera, 6) Reservatório de cera derretida, 7) Rolo de impressão, 8) Cabeça 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.

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.

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.