



UnB

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE QUÍMICA**

CAROLINA FELIX LAURINDO SILVA

**AVALIAÇÃO DE UM MICROSSISTEMA DE ANÁLISE EM
FLUXO PARA DETERMINAÇÃO DE VITAMINA B12 EM
MEDICAMENTOS COM DETECÇÃO POR
QUIMILUMINESCÊNCIA COM IMAGEM DIGITAL**

Brasília-DF

1/2021



UnB

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

CAROLINA FELIX LAURINDO SILVA

**AVALIAÇÃO DE UM MICROSSISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO PARA
DETERMINAÇÃO DE VITAMINA B12 EM MEDICAMENTOS COM
DETECÇÃO POR QUIMILUMINESCÊNCIA COM IMAGEM DIGITAL**

Trabalho de Conclusão do Curso em Bacharel em Química
apresentado ao Instituto de Química da Universidade de
Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de
Bacharel em Química

Orientador: Alexandre Fonseca

Brasília-DF

1/2021

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus e à Nossa Senhora que me deram força e saúde para concluir este trabalho.

Gostaria de agradecer também à minha família, Marcelo, Elenisa, Angélica, Bruno, Marcelo, aos meus familiares e aos meus amigos, pelo carinho, por me escutarem e pelo apoio, ânimo e incentivo durante todo o processo.

E agradeço aos professores Dr. Cyro e Dra. Talita, por aceitarem fazer parte da banca e especialmente ao meu orientador Dr. Alexandre Fonseca, que me orientou com paciência e dedicação, além de me dar todo suporte com seus incentivos, correções durante a produção deste trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1: Mecanismo da reação proposto por Albertin e seus associados. [Albertin, R. et al. 1998] [Ferreira, E.C.; Rossi, A.V. 2002] adaptado.

Figura 2: RGB *color space*. [Van den Broek, Egon L. 2005].

Figura 3: Estrutura da vitamina B12. [Clóvis Paniz et al. 2005].

Figura 4: Layout desenvolvido no *LightBurn* 8.01.

Figura 5: Placa de acrílico antes do polimento.

Figura 6: Placa de acrílico após polimento.

Figura 7: Morsa com as placas de acrílico entre placas de vidro para selagem. 1- Placa de acrílico vermelha; 2- Placa de acrílico transparente; 3- Placas de vidro; 4- Morsa.

Figura 8: Placa de acrílico antes da selagem.

Figura 9: Placas de acrílico após a selagem.

Figura 10: Detalhe de uma conexão com agulha e tubo *Tygon*® no dorso do microsistema.

Figura 11: Fotografia da estrutura com as suas respectivas dimensões.

Figura 12: Fotografia do compartimento inferior da estrutura. 1- Microbombas piezoelétricas; 2- Arduino nano; 3- fonte de alimentação do sistema (bateria 9V); 4- dispositivo para conexão *bluetooth* (HC-05).

Figura 13: Fotografia do compartimento superior da estrutura.

Figura 14: Fotografia da parte superior com a tampa.

Figura 15: Fotografia do celular com a capa para encaixe.

Figura 16: Fotografia do processo de quimiluminescência em execução no interior do microsistema sendo acompanhado pela câmera do *smartphone* acoplado.

Figura 17: Ícone do aplicativo.

Figura 18: Tela inicial para pareamento do aplicativo com equipamento.

Figura 19: Tela para ajustes antes da análise. 1 -Imagem da célula de detecção em tempo real; 2- Barra para controle de exposição; 3- Barra para controle de ISO; 4- Barra para controle de branco; 5- Barra para controlar o tamanho amostradores de RGB; 6- Amostradores RGB; 7- Barra para controle de foco; 8- Botão de *start*; 9- Botão de *reset*

Figura 20: Tela durante uma análise.

Figura 21: Imagem do antes e depois da abertura da amostra.

Figura 22: Configuração inicial do sistema para análise. (vazões indicadas sobre as bombas em $\mu\text{L s}^{-1}$)

Figura 23: Configuração final do sistema para análise.

Figura 24: Fiograma obtido a partir do sistema da Figura 22 e procedimento da Tabela 3 com tempo de injeção de 5s. Picos referentes a solução do branco e sete padrões de $[\text{Co}^{2+}]$. Concentrações indicadas em mg L^{-1} . Barras em cinza ocultam picos referentes às injeções de limpeza.

Figura 25: Fiograma obtido a partir do sistema da Figura 22 e procedimento da Tabela 3 com tempo de injeção de 7s. Picos referentes a solução do branco e cinco padrões de $[\text{Co}^{2+}]$. Concentrações indicadas em mg L^{-1} . Barras em cinza ocultam picos referentes às injeções de limpeza.

Figura 26: Fiograma obtido a partir do sistema da Figura 22 e procedimento da Tabela 3 com tempo de injeção de 10s. Picos referentes a solução do branco e sete padrões de $[\text{Co}^{2+}]$. Concentrações indicadas em mg L^{-1} . Barras em cinza ocultam picos referentes às injeções de limpeza.

Figura 27: Curva analítica obtida para determinação de $[\text{Co}^{2+}]$. Faixa de concentração de $0,02 - 0,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 28: Curva analítica obtida para determinação de $[\text{Co}^{2+}]$. Faixa de concentração de $0,02 - 0,3 \text{ mg L}^{-1}$.

Figura 29: Fiograma obtido a partir do sistema da Figura 23 e procedimento da Tabela 4 com tempo de injeção de 10s utilizando água destilada no preparo de solução padrão e como carregadora. Picos referentes a solução do branco e oito padrões de $[\text{Co}^{2+}]$. Concentrações indicadas em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 30: Fiograma obtido a partir do sistema da Figura 23 e procedimento da Tabela 4 com tempo de injeção de 10s utilizando água destilada no preparo de solução padrão e como carregadora. Picos referentes a solução do branco, uma solução padrão de $[\text{Co}^{2+}]$ e a amostra A. Concentrações indicadas em $\mu\text{g L}^{-1}$. Barras em cinza ocultam picos referentes às injeções de limpeza.

Figura 31: Fiograma obtido a partir do sistema da Figura 23 e procedimento da Tabela 4 com tempo de injeção de 5s utilizando solução tampão pH 5 no preparo de solução padrão e como carregadora. Picos referentes a solução do branco e seis soluções padrões de $[\text{Co}^{2+}]$. Concentrações indicadas em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 32: Fiograma obtido a partir do sistema da Figura 23 e procedimento da Tabela 4 com tempo de injeção de 5s utilizando solução tampão pH 5 no preparo de solução padrão e água destilada como carregadora. Picos referentes a solução do branco, cinco soluções padrões de $[\text{Co}^{2+}]$ e amostras A, C, D, E e F. Concentrações indicadas em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 33: Curva analítica obtida para determinação de $[\text{Co}^{2+}]$. Faixa de concentração de 1 – 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Coeficiente de correlação (R^2): 0,9851.

Figura 34: Curva analítica obtida para determinação de $[\text{Co}^{2+}]$. Faixa de concentração de 1 – 4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Coeficiente de correlação (R^2): 0,9990.

Figura 35: Fiograma obtido a partir do sistema da Figura 23 e procedimento da Tabela 4 com tempo de injeção de 10s utilizando solução tampão pH 5 no preparo de solução padrão e água destilada como carregadora. Picos referentes a solução do branco, cinco soluções padrões de $[\text{Co}^{2+}]$ e amostras A, B, C e D. Concentrações indicadas em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Figura 36: Curva analítica obtida para determinação de $[\text{Co}^{2+}]$. Faixa de concentração de 1 – 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Coeficiente de correlação (R^2): 0,9998.

Tabela 1: Quantidade de amostra coletada para ser tratada.

Tabela 2: Diluição das amostras para curva analítica

Tabela 3: Procedimento para configuração do sistema conforme Figura 22.

Tabela 4: Procedimento para configuração do sistema conforme Figura 23.

Tabela 5: Precisoões estimadas pelos coeficientes de variação dos 5 padrões utilizados.

Tabela 6: Resultados obtidos para a determinação de vitamina B12 em medicamentos pelo método proposto e concentrações de referência (determinadas por método espectrofotométrico ou citadas no rótulo)

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	8
2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	11
2.1 Microsistemas.....	11
2.2 Quimiluminescência.....	12
2.3 Imagens Digitais em Química Analítica.....	14
2.4 Vitamina B12.....	15
3-MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 Construção do microdispositivo.....	17
3.2 Estrutura de suporte.....	22
3.3 Aplicativo microFIA.....	25
3.4 Reagentes e soluções	29
3.4.1 Soluções de trabalho.....	29
3.4.2 Preparo da Amostra.....	30
3.5 Sistema e procedimento de análise.....	32
4-RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5-CONCLUSÃO.....	52
6-REFERÊNCIAS.....	53

1- INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a miniaturização de sistemas analíticos tem sido alvo de várias pesquisas ao redor do mundo, sendo este conceito baseado, até certo ponto, no sucesso alcançado pela indústria microeletrônica. Devido aos grandes avanços da tecnologia nessa área, muitos componentes eletrônicos como resistores, transistores e capacitores puderam ser armazenados em pequenos compartimentos, conhecidos como microchips, permitindo a realização de múltiplas tarefas. Esses microchips auxiliaram na redução de tamanho e no aumento da velocidade de processamento de diversos dispositivos eletrônicos, muito utilizados nos dias atuais, como celulares e computadores, o que permitiu o seu uso de forma portátil e com baixo consumo de energia

De forma semelhante, um dos objetivos da miniaturização em química analítica é permitir que os diferentes processos envolvidos em uma determinação, tais como o preparo da amostra e a detecção, possam ser realizados de maneira portátil em um dispositivo com tamanho diminuto, reduzindo assim o consumo de reagentes e a quantidade de resíduos gerados, sem comprometimento do desempenho analítico. De fato, no início dos anos 1990, Manz e colaboradores [A. Manz; N. Graber; H. M. Widmer, 1990], propuseram o conceito de *micro total analysis systems* (μ TAS), preconizando as características desejáveis para dispositivos miniaturizados capazes de atender estas demandas. Em um conceito mais amplo, que engloba não apenas os dispositivos para química analítica, mas também aqueles utilizados para outras áreas da ciência, surgiram os chamados *lab on a chip* (LOC), cuja ideia central é permitir a realização dos diferentes processos de laboratório em pequenos chips.

De maneira geral, um microssistema de análise deve apresentar um arranjo de minúsculos canais com dimensões menores que 1,0 mm, gravados sobre um substrato como vidro [Coltro, W. T. K. et al, 2007], quartzo [Coltro, W. T. K. et al, 2007], polímeros [Duffy David C. et al., 1998] [Wang J., et al. 2002] ou outros materiais [C. Terry, J. H. Jerman and J. B. Angell, 1979]. Através desses canais, as soluções de trabalho são impelidas por alguma força motriz, como bombeamento mecânico [S. Mohith, P. Navin Karanth, S.M. Kulkarn., 2019], fluxo eletrosmótico [Coltro, W. T. K. et al, 2007] ou capilaridade [Kar, Shantimoy. et al, 2020] para então sofrerem os processos necessários para a análise. Dentre esses processos destacam-se as misturas [Andrew G. Hadd, et al, 1997], separações [Fuquan

Dang et al, 2006], derivatizações [Wang, J et al. 2002] e estratégias de detecção [Klaus B. Mogensen, Henning Klank, Jörg P. Kutter. 2004], o que requer o desenvolvimento ou adaptação de técnicas para uso no universo miniaturizado.

Nos chamados microssistemas de análise por injeção em fluxo (μ FIA) [Andrea Rainelli, et al. 2003], classe que será avaliada nesse trabalho, as soluções são bombeadas, usualmente de forma mecânica, empregando-se bombas peristálticas [D J Laser, J G Santiago, 2004], de seringa [Yebá N. M. Fagundes et al. 2009] ou solenoides [D J Laser, J G Santiago, 2004], as quais costumam ter um tamanho incompatível com o chip micro fluídico, além de exigirem a alimentação elétrica com correntes relativamente elevadas, as quais dificultam a portabilidade do sistema como um todo. Assim, para os μ FIA, um dos primeiros desafios na miniaturização está no sistema de propulsão das soluções.

Outras dificuldades encontradas para a consolidação dos μ FIA como sistemas verdadeiramente miniaturizados e portáteis estão na implementação de estratégias de detecção óptica e no controle e automação dos processos. De fato, medidas fotométricas ou de luminescência podem exigir um aparato instrumental de tamanho incompatível com os sistemas miniaturizados, uma vez que fontes de radiação, monocromadores e detectores são muitas vezes necessários para a realização dessas medidas. Cabe destacar ainda a necessidade de uso de computadores para o controle das bombas e válvulas usadas no gerenciamento dos fluidos e também para a aquisição e manipulação dos dados gerados pelo sistema de detecção, o que restringe ainda mais a aplicação miniaturizada e portátil dos μ FIA.

Nesse contexto, o Laboratório de Instrumentação, Automação e Miniaturização Analítica do Instituto de Química da UnB (LIAMA-IQ-UnB) propôs recentemente, em um trabalho de conclusão de curso [Maria Luíza de Andrade Rodrigues, 2019], um μ FIA com sistema de detecção por quimiluminescência baseado em imagens digitais e na propulsão das soluções com minibombas piezoelétricas totalmente controlado por um smartphone. A principal contribuição deste trabalho foi demonstrar que o uso das minibombas e da detecção por imagem digital permitiram a obtenção de um sistema μ FIA completo que pode ser contido na palma da mão e transportado a qualquer lugar, indicando a possibilidade de realização de determinações quimiluminométricas *In Situ*. Contudo, foram observadas limitações no aplicativo desenvolvido para o controle e detecção por imagem digital e também no próprio dispositivo microfluídico de poliuretano utilizado [De Souza Ramos Pontes Moura, Hadassa.

Et al. 2018] que não permitiram a demonstração de sua aplicação em uma determinação quantitativa. Em outras palavras, não foi possível estabelecer um método analítico para uso com o sistema miniaturizado proposto e avaliar o seu desempenho em relação aos métodos já consagrados.

A determinação analítica modelo que será avaliada no presente TCC é a quantificação de vitamina B12 em medicamentos por quimiluminescência. A literatura mostra que a abertura da amostra pode ser realizada com uma mistura de ácido nítrico e peróxido de hidrogênio [José A. Murillo Pulgarín, Luisa F. García Bermejo & M. Nieves Sánchez García, 2011], resultando na liberação dos íons Co^{2+} da cianocobalamina (Vit. B12). Esses íons, participam então como um excelente catalisador para a reação entre o luminol e peróxido de hidrogênio, produzindo um sinal de luminescência proporcional à concentração de Co^{2+} e, conseqüentemente, de vitamina B12. De fato, a literatura mostra o sucesso desse método empregando-se estratégias de análises por injeção em fluxo (FIA) [Y.K. Zhou; H. Li e Y. Liu, 1997], mas o seu uso em μ FIA com detecção por imagem digital será inédito e deve proporcionar melhores resultados principalmente no que se refere ao menor consumo de reagentes de custo elevado, no aumento da portabilidade e na redução dos custos operacionais e de equipamentos.

Para que esse propósito seja alcançado com sucesso, são propostas a construção de um μ FIA em polimetilmetacrilato (PMMA) utilizando a técnica de ablação por laser, a readequação do aplicativo para controle do sistema e aquisição do sinal de luminescência por imagem digital e a avaliação sistemática do desempenho do dispositivo para a aplicação proposta.

2- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Microssistemas

Em Química Analítica, estudos para o desenvolvimento de sistemas miniaturizados vem sendo cada vez mais realizados, principalmente após o conceito de μ TAS ter sido implementado. Como dito anteriormente, um μ TAS exige que os componentes que permitem o seu funcionamento também sejam miniaturizados como o uso de micro propulsores para introdução de soluções, detectores para uma determinação de escala menor, além dos procedimentos para o preparo das amostras no interior dos dispositivos. [Coltro, W. T. K. et al, 2007]

Desta maneira, desde que aumentou o número de aplicação desse conceito, cada vez mais se tornou necessário equipamentos que possam realizar e comportar os requisitos para a demanda de μ TAS. Com isso, o interesse por instrumentações *lab-made*, que apresentam resultados compatíveis com os métodos tradicionais de análise para variadas determinações, cresceu.

Assim, combinar as vantagens proporcionadas pelos dispositivos miniaturizados com os benefícios da análise em fluxo resultam em aumento da portabilidade, redução de tempo para análise, um menor consumo de reagentes e, conseqüentemente, uma menor geração de resíduos. [Coltro, W. T. K. et al, 2007]

Nesse sentido, para o Químico Analítico, é interessante conciliar as vantagens proporcionadas pelos dispositivos miniaturizados com a praticidade e benefícios oferecidos pela análise em fluxo, configurando os dispositivos micro fluídicos de análise. Para tal, primeiramente, os dispositivos precisam que seus itens para introdução e processamento das amostras além do sistema de detecção sejam adaptados para essas dimensões [D. Agustini et al. 2017].

Os microssistemas podem ser construídos criando baixos relevos em um substrato seguido de uma selagem eficiente [H.Y Wang, et al. 1997] das estruturas para que sejam criados os canais por onde as soluções de trabalho irão percorrer. Várias técnicas e materiais podem ser utilizadas para gravação de micro canais, dentre elas, uma alternativa mais

econômica é obtida com a utilização de polímeros como o substrato [Wang, J et al, 2002], por serem de fácil manuseio e selagem, resistentes além de serem maleáveis. Nos casos de substratos poliméricos, a técnica chamada de ablação a laser é indicada para a confecção dos microssistemas, essa técnica parte de um pulso de laser UV incidido sobre o substrato, que irá causar uma termodegradação e uma fotodegradação da superfície. [Holger Becker; Claudia Gärtner. 2000]

Ao falar da adaptação dos sistemas para inserção das soluções e para detecção do sinal analítico, pode-se citar a utilização de micro bombas piezoelétricas e de micro válvulas solenóides [Helene Andersson et al. 2001] [Coltro, W. T. K. et al, 2007], que apresentam um consumo muito baixo de energia, são muito pequenas e podem ser acionadas via *bluetooth* permitindo o seu controle com *smartphones*. De fato, como será visto mais adiante, os smartphones também podem auxiliar no momento de detecção através da aquisição de imagens digitais e da interpretação das cores dessas imagens.

2.2 Quimiluminescência

A quimiluminescência é o resultado de uma reação química que provoca a emissão de radiação eletromagnética. A reação envolve a absorção por parte de reagentes que tenham energia suficiente para produzir um complexo ativado, podendo ocorrer a transferência de energia do estado excitado para uma molécula aceptora, produzindo de uma forma indireta a radiação, ou emissiva, quando a espécie produzir de forma direta a radiação. [Ferreira, E.C.; Rossi, A.V. 2002]

Diversos estudos com relação a quimiluminescência e o desenvolvimento de suas aplicações foram e continuam sendo realizados, envolvendo reagentes, produtos e intermediários, além de seus parâmetros e mecanismos para uma melhor eficiência na Química Analítica. Foi então observado que parâmetros como temperatura, concentração das espécies, pH e a mistura dos reagentes podem afetar drasticamente intensidade de emissão. [Ferreira, E.C.; Rossi, A.V. 2002]

A emissão se mostra dependente da velocidade da reação de tal forma que esse fato permite uma identificação de espécies a partir do tempo de reação. Como característica, as reações de quimiluminescência podem proporcionar limites de detecção muito baixos a partir de uma instrumentação muito simples e que consiste basicamente de um detector sem a necessidade de uma fonte de radiação para excitação, diminuindo, dessa forma, o espalhamento da luz ou ruídos. [Al Lawati, H.A.J. 2013]

Uma reação quimiluminescente bastante aplicada na Química Analítica envolve oxidação do luminol por H_2O_2 em meio alcalino [Al Mughairy, Baqia; Al-Lawati, Haider A.J. 2020]. Albertch, [Albrecht, H. O. Z. 1928] em 1928, foi pioneiro no estudo dessa reação usando íons de ferro como catalisador, mas foi Albertin e seus associados que propuseram um mecanismo para o processo (Figura 1). [Albertin, R. et al. 1998]

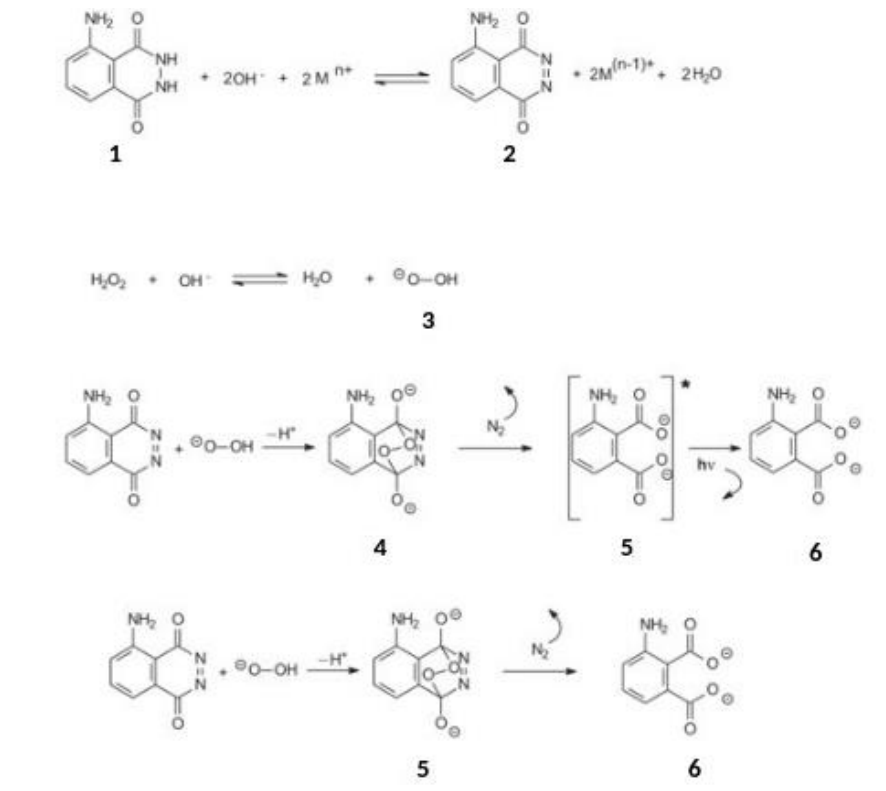


Figura 1: Mecanismo da reação proposto por Albertin e seus associados.

Fonte: [Albertin, R. et al. 1998] [Ferreira, E.C.; Rossi, A.V. 2002] adaptado

De acordo com o mecanismo, na primeira etapa o metal, que funciona como o catalisador, é oxidado ao entrar em contato com o peróxido de hidrogênio presente no início da reação, dessa forma o metal que era +2 se torna +3. Ele reage com o luminol que se oxida e o metal retorna ao estado +2. Ao ser oxidado, o luminol (1) perde os dois hidrogênios formando assim a diazoquinona (2). Em seguida, o H_2O_2 com o meio alcalino sofre uma oxirredução, o OH^- presente no meio oxida formando o ânion hidroperoxila (3). Na presença desse ânion, a diazoquinona sofre uma oxidação formando o endoperóxido (4) e a decomposição do mesmo produz o 3-amino-ftalato, responsável pela quimiluminescência emitida no comprimento de onda referente a cor azul, se o mesmo for produzido no estado excitado (5). Caso seja formado em seu estado fundamental (6), a quimiluminescência não será produzida. [Ferreira, E.C.; Rossi, A.V. 2002]

2.3 Imagens Digitais em Química Analítica

Para análises realizadas com base em quimiluminescência não são necessários instrumentos complexos para se realizar a detecção. Na maioria das vezes as medidas envolvem apenas um detector de fótons acoplado ao reator. Isso é dado, pois a radiação é obtida a partir da reação entre o reagente e a amostra, sem que sejam necessários equipamentos para eliminar ruídos ou para selecionar comprimentos de onda específicos. [Kate Grudpan et al. 2015]

Dessa maneira, com os avanços tecnológicos especialmente na parte digital, estudos utilizando imagens digitais como detector vem sendo cada vez mais implementados devido a sua sensibilidade, praticidade e economia, principalmente ao associar a operação das análises e leituras dos sinais processados pela imagem em um único dispositivo como *laptops*, celulares e *tablets*, fazendo desses dispositivos, instrumentos analíticos de enorme potencial. [Byrne, Liam et al. 2000]

A conversão da imagem em dados para serem analisados se dá através de vários métodos onde as cores detectadas nessas imagens podem ser quantificadas de maneira

específica a partir das três cores primárias. Segundo Helmholtz (1852), qualquer cor pode ser formada a partir de combinações das três cores primárias. Ou seja, uma cor específica pode ser formada ajustando-se as intensidades dessas três cores.

A forma para análises com esse método pode variar entre sistemas como HSV, CIE XYZ, CIELAB e RGB, sendo esta última comumente utilizada atualmente. [L.F. Capitán-Vallvey, et al. 2015]

O sistema RGB atribui um valor para cada uma das cores, vermelho, verde e azul, e usando esse sistema, cada cor é decomposta a partir dessas três cores e tem como resposta uma cor tricromática, que produz uma variedade de informação e pode assim ser utilizado com finalidade analítica. [L.F. Capitán-Vallvey, et al. 2015]

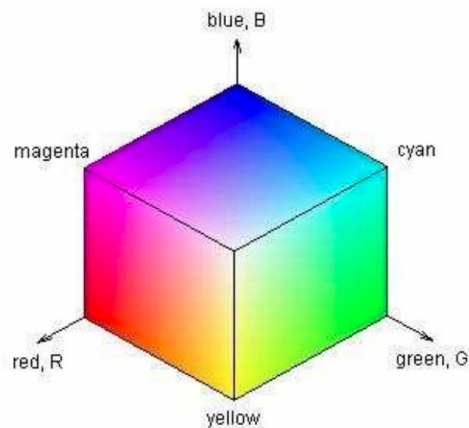


Figura 2: RGB *color space*

Fonte: [Van den Broek, Egon L. 2005]

2.4 Vitamina B12

As vitaminas são grupos orgânicos que são essenciais para a fisiologia dos seres humanos, muitas delas são sintetizadas no próprio corpo humano e outras não, sendo assim necessária uma dieta para que se tenha a presença no corpo. Basicamente, os seres humanos necessitam de treze vitaminas, sendo quatro lipossolúveis e nove hidrossolúveis.

Das vitaminas hidrossolúveis, oito dessas são vitaminas do complexo B, sendo elas B1 (tiamina), B2 (riboflavina), B3 (niacina), B5 (ácido pantotênico), B6 (piridoxina), B7 (biotina), B9 (ácido fólico), B12 (cobalamina), essas vitaminas não têm estruturas semelhantes, o que têm em comum é o fato de serem solúveis em água e atuarem como coenzimas no metabolismo celular. [David O. Kennedy B. 2016]

A maior parte das vitaminas do complexo B é sintetizada por plantas, mas a vitamina B12 é a única que é sintetizada por uma bactéria presente principalmente em alimentos de origem animal, por isso a fonte recomendada de vitamina B12 são carnes e ovos. Vale pontuar que sua deficiência no corpo humano pode gerar a degeneração de nervos levando a fraquezas, náuseas e perda de peso, pois essa vitamina é uma coenzima essencial para o desenvolvimento e crescimento de células. [Paul Lawrance. 2015]

A vitamina B12, conhecida por cobalamina, é formada por um anel tetrapirrólico em volta de um átomo central de cobalto, um grupo nucleotídico e uma ribose fosforilada esterificada com 1-amino, 2-propanol (estrutura). A estrutura pode possuir diversos nomes, os quais dependem do ligante presente, como cianocobalamina, metilcobalamina, 5-desoxiadenosilcobalamina, hidroxicobalamina. Dentre elas, a metilcobalamina e a 5-desoxiadenosilcobalamina são as formas ativas no metabolismo humano e a cianocobalamina e hidroxicobalamina mais usadas comercialmente. [Clóvis Paniz et al. 2005]

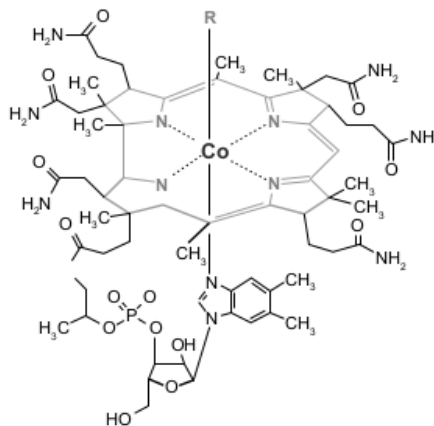


Figura 3: Estrutura da vitamina B12

Fonte: [Clóvis Paniz et al. 2005]

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Construção do microdispositivo

O microssistema fluídico utilizado no trabalho foi construído em uma placa de polimetilmetacrilato (PMMA) vermelha com 8,0 cm de comprimento, 5,0 cm de largura e 3,0 mm de espessura utilizando-se a ablação a laser para a gravação das estruturas por um processo que envolve três etapas descritas a seguir:

Etapa 1- Desenho e gravação dos canais no substrato

Inicialmente desenvolvemos o *layout* do microssistema no aplicativo *Autocad* e posteriormente transferiu-se o arquivo gerado para o *software LightBurn 8.01* que realiza a gravação a *laser*. (Figura 4). No *LightBurn 8.01*, o desenho a ser gravado é editado em camadas, que serão gravadas separadamente, sempre utilizando a potência máxima do laser na ablação. O controle da profundidade dos canais é determinado pela velocidade com que o laser se movimenta sobre o substrato. As cavidades circulares em vermelho na Figura 4 são realizadas no modo *scan* do software, que realiza a ablação do contorno e do interior da forma em uma velocidade de 300 mm/min. Essa velocidade é maior que a empregada para a gravação dos canais, em preto, na qual se utiliza o modo *cut* que realiza a ablação apenas do contorno com uma velocidade de 40 mm/min, permitindo um canal com formato e profundidade adequada para o sistema. O canal produzido tem o formato de um semicírculo cuja profundidade é da ordem de 0,3mm e a largura de 0,5mm.

É importante relatar que foi necessário otimizar as velocidades adequadas para o processo para que não houvesse uma perfuração do PMMA ou uma gravação demasiadamente rasa para os propósitos dos estudos. Além disso, como o sistema utiliza um laser de diodo de cor azul a gravação teve que ser realizada em uma placa de acrílico de cor vermelha ou laranja, de forma a proporcionar a absorção da radiação pelo material. Se não houvesse essa absorção, a ablação não seria possível.

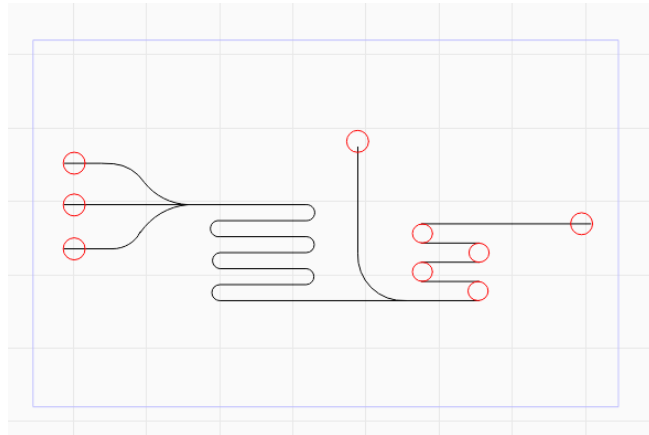


Figura 4: Layout desenvolvido no LightBurn 8.01

Etapa 2 – Polimento

Após realizar a ablação, devido ao aquecimento, é possível observar irregularidades superfícies da placa ao lado dos canais criando um relevo (Figura 5), que dificulta a posterior selagem da estrutura, sendo necessário uma etapa de polimento para se obter uma superfície mais plana (Figura 6). Primeiro utiliza-se uma lixa com grão de 280, em seguida uma de 400 e por fim uma de 600. Ao final, com o auxílio de um algodão, a superfície é polida com uma suspensão polidora de metais (Kaol®) resultando uma superfície semelhante à mostrada na *Figura* 6.



Figura 5: Placa de acrílico antes do polimento.

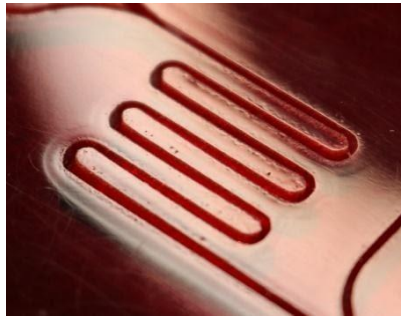


Figura 6: Placa de acrílico após o polimento.

Etapa 3 - Selagem e conexão com o mundo externo

Realizada as etapas 1 e 2, são feitos furos com 1,5 mm de diâmetro nas quatro cavidades utilizadas para entrada e saída das soluções no microsistema (Figura 8). Em seguida, submetemos a uma morsa a placa de acrílico com os canais e uma placa de acrílico transparente plana com 2,0 mm de espessura, que recobre as estruturas gravadas, entre duas placas de vidro. Esta composição em sanduíche é então prensada com uma morsa (Figura 7) e levada para uma estufa com temperatura de 140 °C por 40 min a fim de selar as placas de acrílico. (Figura 9)

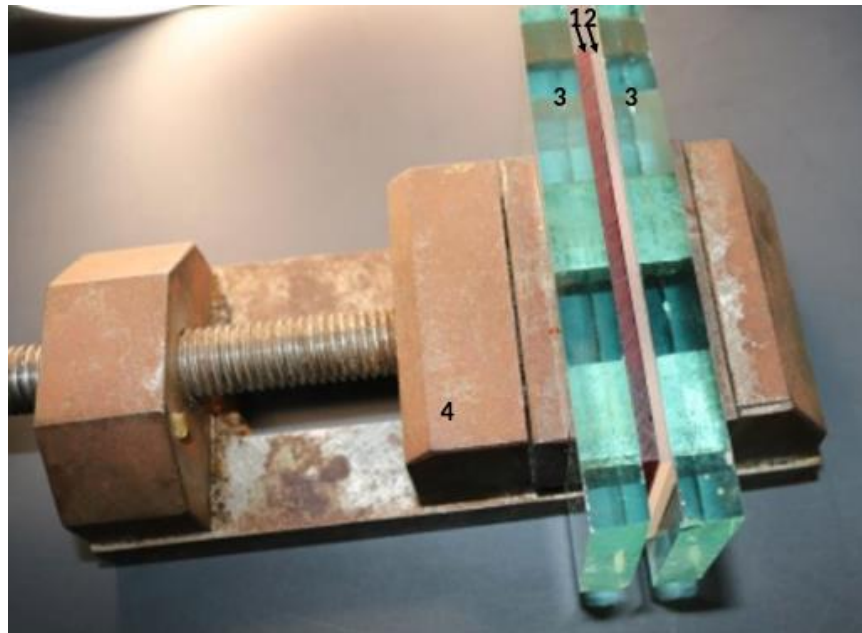


Figura 7: Morsa com as placas de acrílico entre placas de vidro para selagem. 1- Placa de acrílico vermelha; 2- Placa de acrílico transparente; 3- Placas de vidro; 4- Morsa

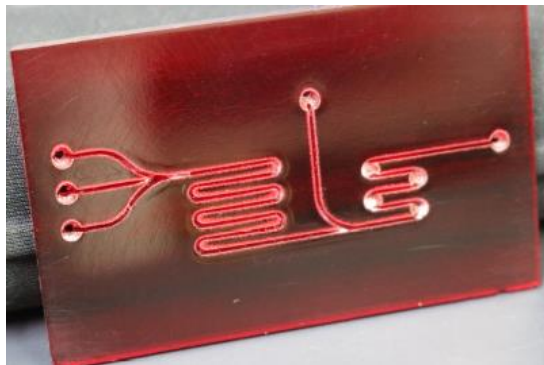


Figura 8: Placa de acrílico antes da selagem

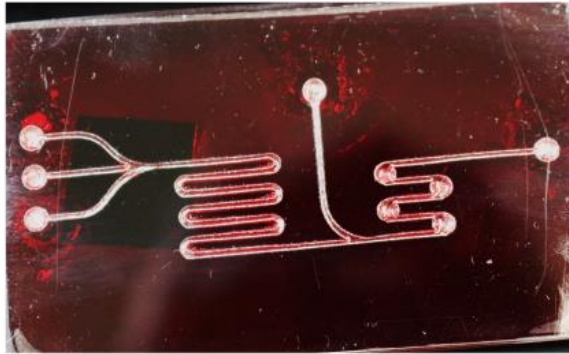


Figura 9: Placas de acrílico após a selagem

Com a selagem concluída, através dos furos previamente confeccionados, são conectadas agulhas hipodérmicas com 1,6 mm de diâmetro externo na parte traseira do microsistema (Figura 11). Para reforçar a conexão e prevenir vazamentos, um pequeno tubo de Tygon® é colado ao acrílico com cola instantânea. Vale relatar que os furos de 1,5 mm são alargados com auxílio da própria agulha hipodérmica até que haja uma conexão justa entre as partes. Além disso, o bisel da agulha é removido para evitar acidentes, formando um pequeno tubo metálico como mostrado na *Figura 10*.

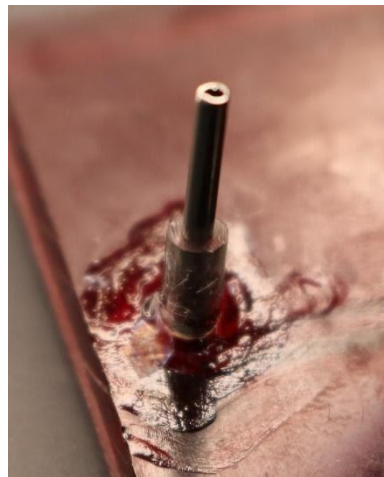


Figura 10: Detalhe de uma conexão com agulha e tubo Tygon® no dorso do microsistema

3.2 Estrutura de suporte

Utilizando uma impressora 3D (Clever – CL1 Black) uma estrutura de ácido polilático (PLA), necessária para comportar o microsistema, as bombas, os circuitos eletrônicos e o smartphone, foi construída. Essa estrutura é dividida em duas partes, a primeira parte é inferior e a segunda é a superior. Ela também possui uma tampa que é utilizada para que o smartphone seja fixado e sua câmera se alinhe à célula de detecção. A estrutura impressa em 3D possui como dimensões: 14 cm de comprimento; 13 cm de largura e 9 cm de altura. (Figura 11)



Figura 11: Fotografia da estrutura com as suas respectivas dimensões.

Na parte inferior da estrutura são armazenadas até quatro microbombas piezoelétricas (1), o controlador Arduino Nano (2), a fonte de alimentação (3), o dispositivo para conexão via *bluetooth* (4), além dos tubos Tygon® (1,4 mm de diâmetro interno) que conectam os frascos às microbombas. (Figura 12)

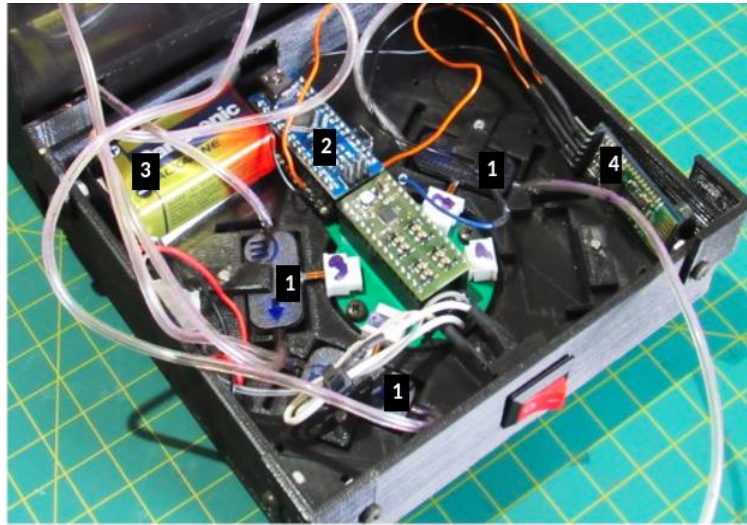


Figura 12: Fotografia do compartimento inferior da estrutura. 1- Microbombas piezoelétricas; 2- Arduino nano; 3- fonte de alimentação do sistema (bateria 9V); 4- dispositivo para conexão *bluetooth* (HC-05).

A parte superior é reservada para o dispositivo microfluídico no centro e para os compartimentos dos frascos, sendo três deles para as soluções e um para o resíduo da análise. (Figura 13)

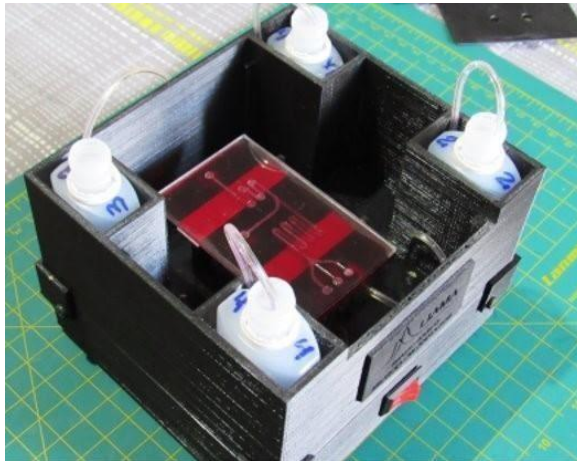


Figura 13: Fotografia do compartimento superior da estrutura

Para a parte superior da estrutura foi confeccionada, também pela impressora 3D, uma tampa (Figura 14), na qual é acoplado o *smartphone*. Na capa de proteção do celular foram fixados dois pinos que se encaixam com os dois pequenos furos da tampa do sistema permitindo um encaixe compatível e alinhado com a célula de detecção (Figura 15).

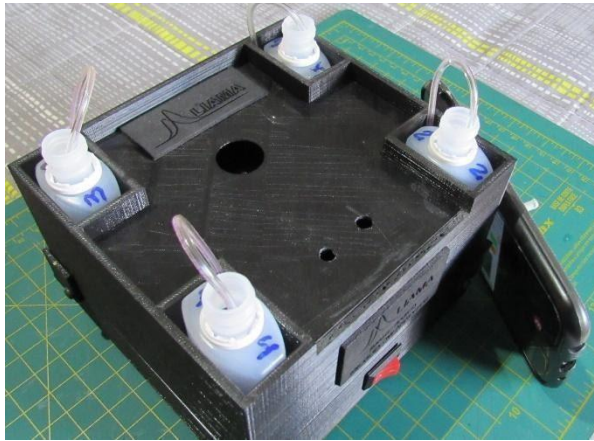


Figura 14: Fotografia da parte superior com a tampa



Figura 15: Fotografia do celular com a capa para encaixe

A tampa possui um orifício que possibilita o alinhamento entre a câmera do celular com a célula de detecção do sistema. Essa tampa, além de servir como suporte para o celular, é utilizada para vedar a entrada de luz na parte superior da estrutura que contém o microsistema fluídico. (Figura 16)



Figura 16: Fotografia do processo de quimiluminescência em execução no interior do microsistema sendo acompanhado pela câmera do *smartphone* acoplado

3.3 Aplicativo microFIA

Um aplicativo para sistema operacional Android foi desenvolvido para controle do dispositivo e para a detecção por imagem digital em tempo real. O aplicativo foi chamado de microFIA e para utilizá-lo o usuário deve clicar no ícone (Figura 17) disponível na seção de aplicativos do *smartphone*. Ao abrir, é apresentada uma tela onde se dará o pareamento do sistema microfluídico com o aplicativo. Para isso deve-se selecionar a primeira opção ‘HC-05’, sombreado na Figura 18, o qual é um circuito integrado que realiza a comunicação via *bluetooth* com o *smartphone*.

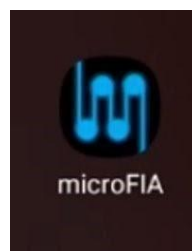


Figura 17: ícone do aplicativo

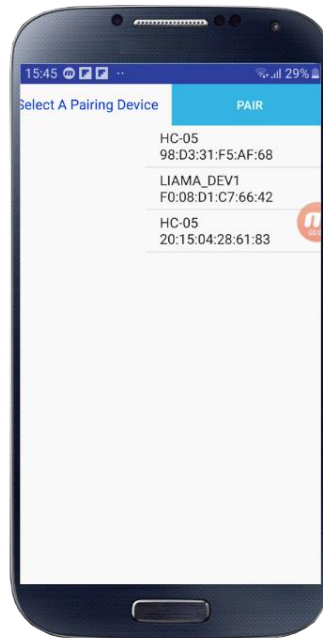


Figura 18: Tela inicial para pareamento do aplicativo com equipamento

Após a conexão entre o sistema microfluídico e o aplicativo ter sido estabelecida, aparecerá a tela indicada na Figura 19, na qual o usuário deve clicar inicialmente no botão *pump on* para ligar todas as bombas simultaneamente e assim realizar o condicionamento do sistema com as soluções dos reagentes e do analito. Nessa etapa, é possível observar o caminho do canal devido à quimiluminescência ocorrida pela confluência das soluções, o que permite posicionar, de forma efetiva, os amostradores circulares que delimitam as regiões da imagem em que as respostas de RGB serão obtidas. Vale relatar que antes do posicionamento dos amostradores, a imagem em tempo real obtida pela câmera do celular deve ser ajustada através dos controles deslizantes, onde são controlados os níveis de exposição (EXP), de sensibilidade à luz (ISO), o equilíbrio de branco (AWB), tamanhos dos amostradores de RGB (SSW) e o foco (FOCUS) nessa ordem. É necessário ressaltar que sempre ao mexer no equilíbrio do branco é preciso reajustar os níveis de exposição e de sensibilidade à luz.

Conforme ilustra a Figura 20, os amostradores circulares de RGB são posicionados ao longo dos canais nos pontos onde a intensidade da luminescência é maior, o que contribui para

uma maior sensibilidade. De fato, o sinal médio para R, G e B de todos os pixels delimitados por um amostrador é somado ao sinal médio obtido pelos outros cinco amostradores, gerando uma resposta global que é utilizada como sinal analítico. Após a realização desses procedimentos para o condicionamento clica-se em *pump off*.

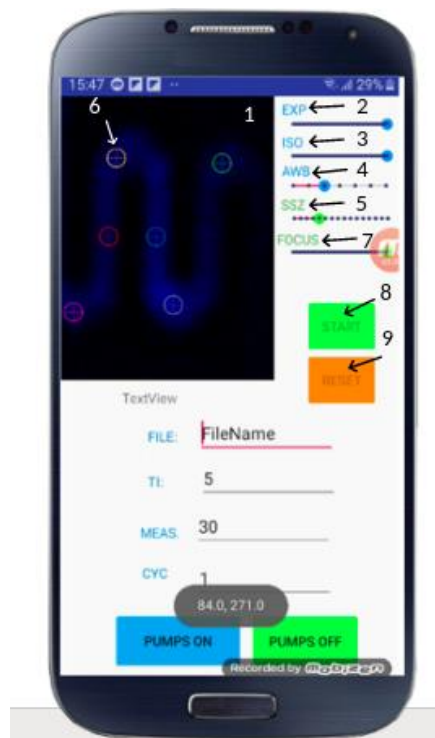


Figura 19: Tela para ajustes antes da análise. 1 -Imagem da célula de detecção em tempo real; 2- Barra para controle de exposição; 3- Barra para controle de ISO; 4- Barra para controle de branco; 5- Barra para controlar o tamanho amostradores de RGB; 6- Amostradores RGB; 7- Barra para controle de focos; 8- Botão de *start*; 9- Botão de *reset*

Antes da realização da análise é preciso ainda, acrescentar um nome no espaço “FILE” para a gravação do arquivo que será gerado, ajustar o tempo de injeção, em segundos, requerido em “TI”, informar em “MEAS” o número de medidas que serão realizadas e por fim, em “CYC”, acrescentar a quantidade de ciclos de medidas que serão feitos. Em outras palavras, como o sistema foi configurado para a injeção direta das soluções dos padrões ou

amostras, o tempo de injeção define o volume injetado de acordo com a vazão utilizada na mini bomba piezoelétrica que bombeia a amostra. O número de medidas se refere ao número de pontos de leituras, obtidos em intervalos de 0,3 s, que são necessários para a obtenção de um pico completo (usualmente 150 medidas). Para cada solução de amostra ou padrão são necessárias replicatas dos picos, o que é definido pelo número de ciclos. Ou seja, quando se define cinco ciclos, serão obtidos cinco picos, mas apenas os quatro últimos serão considerados para as medidas quantitativas já que o primeiro pico é obtido para um tempo de injeção maior (pré-definido em 30 s) necessário à limpeza da linha de injeção. Com todos esses procedimentos realizados, aperta-se *start* para iniciar a análise.

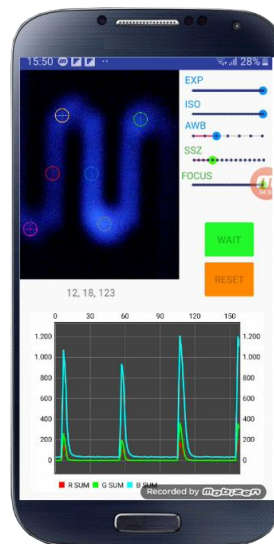


Figura 20: Tela durante uma análise

Ao pressionar *start*, a tela se altera (Figura 20), fornece um gráfico em tempo real com os dados que estão sendo adquiridos após as injeções das soluções produzindo a resposta em forma de picos. Vale destacar que cada linha presente no gráfico representa o sinal para uma cor do sistema RGB, sendo a vermelha o R, a verde o G e a ciano o B.

Ao terminar um ciclo de medidas, o aplicativo informa, através de um sinal sonoro, que é necessária a troca da solução do padrão ou da amostra e que o usuário deve clicar

novamente em “*start*” para a realização de um novo ciclo de medidas com a nova solução. Se todos os ciclos desejados já tiverem sido efetuados, o usuário pode clicar em “*reset*” para alterar as configurações, trocar o nome do arquivo e iniciar uma nova análise.

Vale pontuar que para a reação de luminol com o hipoclorito de sódio, utilizado para avaliação prévia do aplicativo (Figura 20), foi observado que os picos da cor ciano produzem uma maior resposta, uma vez que a luminescência ocorre com cor azul. Além disso, a presença de uma luz vermelha na imagem da célula de detecção se deve a um LED do circuito presente do dispositivo, mas que não interfere na resposta dos sinais devido a posição dos amostradores RGB não estarem em cima dela.

Os dados obtidos para todas as injeções de todos os ciclos são salvos em formato *.txt* e ficam organizadas em quatro colunas, das quais a primeira é o número da medida e as outras três são a resposta para as somas de R, G e B respectivamente. O arquivo é armazenado em uma pasta interna do *Android* e deve ser aberto e manipulado em um aplicativo externo para uso analítico.

3.4 - Reagentes e soluções

Todas as soluções para o trabalho foram preparadas utilizando água destilada.

3.4.1 Soluções de trabalho

Inicialmente foi preparada uma solução de KOH 0,4 mol L⁻¹ a partir da dissolução de massa apropriada de KOH 85% (*Vetec*) em 500 mL de água destilada.

Uma solução de Luminol 0,3% (m/v) foi preparada pela dissolução da massa adequada do reagente (*Aldrich 99%*) em 100 mL de solução de KOH 0,4 mol L⁻¹ e adicionando H₂O₂ (35% *Dinâmica*) para obter uma concentração de 0,25% (m/v) de peróxido ao final. Posteriormente, para o processo de análise apresentado ao final do texto, uma solução de Luminol 0,06 % (m/v) foi preparada em uma solução de KOH 80 mmol L⁻¹, sem o acréscimo de peróxido de hidrogênio.

O peróxido de hidrogênio, quando utilizado separadamente, foi preparado diluindo-se o H₂O₂ (35% *Dinâmica*) a fim de se obter uma solução 0,1% (m/V).

Soluções padrões de Co^{2+} com diferentes concentrações foram preparadas a partir de diluições de uma solução estoque comercial do reagente Co^{2+} 1000 mg L^{-1} (*Dinâmica*) em água.

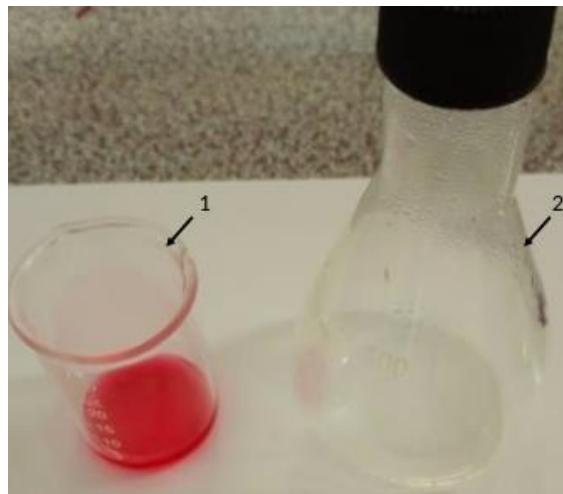
Uma solução tampão acetato/ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 5 foi preparada pela diluição de uma alíquota adequada de ácido acético Glacial (*Synth*) em água seguida de adições sucessivas de uma solução saturada de KOH até que o pH da solução chegasse a 5, o que foi verificado com o auxílio de um pHmetro.

3.4.2 Preparo da Amostra

Foram analisadas 6 amostras de vitamina B12, as quais são comercializadas em forma de soluções injetáveis para uso humano e veterinário. Empregando-se em um micro-ondas doméstico e Erlenmeyers de 125 mL com tampa de rosca, volumes de amostras de 60 μL a 2,3 mL foram misturadas com 0,5 mL de ácido nítrico 65% (*Synth*) e 0,5 mL de peróxido de hidrogênio (*Dinâmica* 35%) e posteriormente aquecidos em potência máxima por 10 s. Realizada a digestão para a liberação dos íons cobalto (II) da cobalamina, transferiu-se os digeridos para balões volumétricos, aferindo-se os volumes com as águas de lavagem dos Erlenmeyers. A Tabela 1 lista os volumes utilizados nos procedimentos e a Figura 21 mostra a fotografia das soluções de uma das amostras, antes e depois da abertura, indicando a decomposição completa da matéria orgânica.

Tabela 1: Volumes de amostras digeridos e volumes finais após diluição.

Amostra	Volume digerido	Balão
A	50 μ L	50 mL
B	50 μ L	50 mL
C	150 μ L	25 mL
D	130 μ L	25 mL
E	60 μ L	25 mL
F	2,3 mL	10 mL

**Figura 21:** Fotografia de uma das amostras antes (1) e depois (2) da abertura.

Em seguida, foi necessário diluir as amostras em solução tampão e água para que se adequassem à curva analítica conforme a Tabela 2.

Tabela 2: Diluição das amostras para curva analítica

Amostras	Volume	Balão
A	300 μL	50 mL
B	300 μL	10 mL
C	1000 μL	25 mL
D	300 μL	10 mL
E*	-	-
F*	-	-

Legenda: * - não foi realizada diluição, apenas adequação do pH na etapa anterior.

3.5 Sistema e procedimento de análise

No trabalho foram utilizadas duas configurações de fluxo para as análises. A primeira configuração é composta por três microbombas, conforme mostra a Figura 22, operando com vazões iguais a $75 \mu\text{L s}^{-1}$.

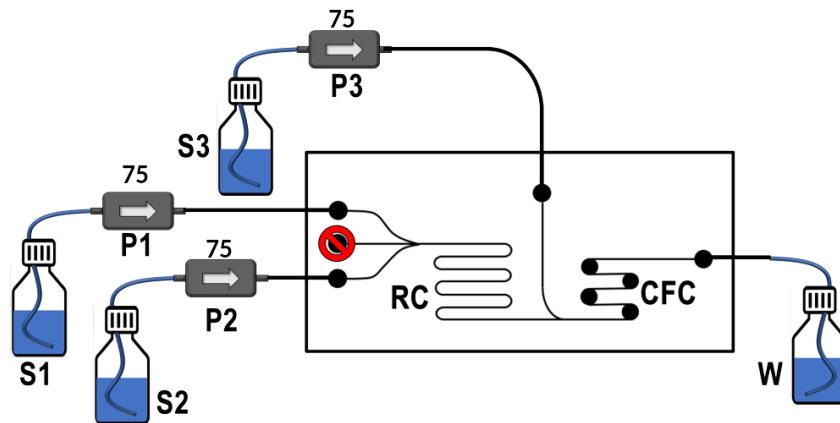


Figura 22: Configuração inicial do sistema para análise. (vazões indicadas sobre as bombas em $\mu\text{L s}^{-1}$)

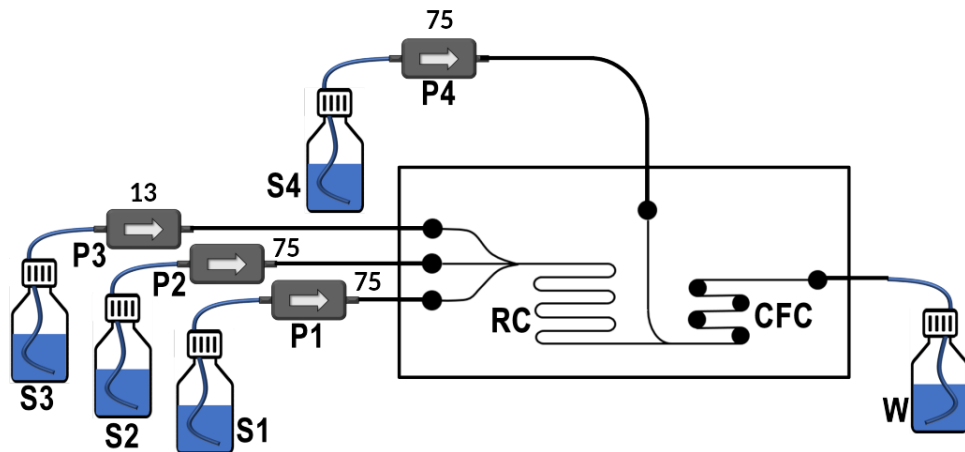
P1, P2, P3 – microbombas piezoelétricas; **S1**-padrão ou amostra; **S2**- Água destilada; **S3** – luminol 0,3 % (m/v) + H_2O_2 0,25% (m/v) em KOH $0,4 \text{ mol L}^{-1}$; **W**-resíduo; **RC** – Bobina de reação e **CFC** – Célula de fluxo.

O procedimento se dava conforme resumido na Tabela 3. Primeiramente, para a troca de solução de padrão/amostra, mantinha-se somente a bomba P3 desligada por 30 s. Em seguida, as bombas P2 e P3 eram ligadas por 30 segundos e P1 mantinha-se desligada de forma a carregar o injetado até a célula de detecção (CFC) e se realizar a aquisição do sinal analítico em intervalos de 0,3 s. Não havia repetição dessas duas etapas. Em seguida, realizava-se a injeção dos padrões ou amostras onde as bombas P1 e P2 eram ligadas e P3 permanecia desligada por 5, 7 ou 10 segundos, dependendo do experimento. Na sequência, o segmento injetado era carregado por água até a célula de detecção, mantendo-se as bombas P2 e P3 ligadas e P1 desligada. Essas duas etapas foram repetidas 3 vezes para a obtenção dos sinais em replicata. Deve-se salientar que o injetado, contendo Co^{2+} , era confluído com a solução de luminol, imediatamente antes da célula de detecção e que as leituras eram realizadas em intervalos de 0,3 s durante 30 s.

Tabela 3: Procedimento para configuração do sistema conforme Figura 22

Ordem	Procedimento	P1	P2	P3	Tempo (s)	Repetições por padrão
1º	Troca de padrão	ON	ON	OFF	30	1x
2º	Leitura	OFF	ON	ON	30	
3º	Injeção	ON	ON	OFF	5, 7 ou 10	3X
4º	Leitura	OFF	ON	ON	30	

A configuração definitiva do procedimento é composta por 4 microbombas com vazão de $75 \mu\text{L s}^{-1}$ para P1, P2 e P4 e de $13 \mu\text{L s}^{-1}$ para P3 conforme ilustra a Figura 23. Além disso, as soluções utilizadas sofreram alteração para concentrações menores e a solução de peróxido de hidrogênio passou a ser realizada de forma independente da solução de luminol através da bomba P3.

**Figura 23:** Configuração final do sistema para análise.

Legenda: **P1, P2, P3 e P4** – microbombas piezoelétricas; **S1**-padrão ou amostra em solução tampão pH 5,0; **S2**- Água destilada ou tampão pH 5,0; **S3**- H_2O_2 – 0,10% (m/v); **S4**– luminol 0,06 % (m/v) em KOH $0,08 \text{ mol L}^{-1}$; **W**- resíduo.

O procedimento se dá conforme resumido na Tabela 4, onde primeiramente se realizava a injeção de troca de amostra/padrão por 30 s, mantendo-se apenas a P1 acionada.

Em seguida (etapa 2), realiza-se o carregamento do injetado e a leitura do sinal com a ligação de P2 e P4, mantendo-se as outras bombas desligadas por 12s. Essas duas etapas eram realizadas duas vezes para cada padrão, de forma a garantir a ambientação da linha de conexão de S1 ao microssistema com a nova solução. Para a análise, as bombas P1 e P3 eram ligadas para injetarem o padrão/amostra e o peróxido de hidrogênio respectivamente durante 5 ou 10 s, dependendo do experimento. Por último (quarta etapa), realizou-se a leitura do sinal analítico em intervalos de 0,3 s durante 12 s seguindo as mesmas condições da etapa 2. Esses procedimentos (etapas 3 e 4) eram realizados 3 vezes para a geração dos sinais em triplicata.

Tabela 4: Procedimento para configuração do sistema conforme Figura 23

Ordem	Procedimento	P1	P2	P3	P4	Tempo (s)	Repetições por padrão
1º	Troca de padrão	ON	OFF	OFF	OFF	30	2x
2º	Leitura	OFF	ON	OFF	ON	12	
3º	Injeção	ON	OFF	ON	OFF	5 ou 10	3X
4º	Leitura	OFF	ON	OFF	ON	12	

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Figuras 24, 25 e 26 mostram os diagramas obtidos com injeções dos padrões em 5, 7 e 10 segundos, respectivamente, para as quais foi empregado o procedimento descrito na seção 3.5 (Figura 22 e Tabela 2). Pode-se observar que para a injeção com 5 s (Figura 24) houve um aumento da intensidade do sinal da componente B de RGB para a faixa de concentração de 0,02 a 0,5 mg L⁻¹ em Co²⁺. Porém, nota-se também variações relativamente grandes para as triplicatas de mesma concentração, indicando problemas de repetibilidade, principalmente para as injeções de concentrações maiores.

Com o objetivo de minimizar essas variações, foi verificado se o aumento do tempo de injeção, com conseqüente aumento do volume injetado, acarretaria uma maior repetibilidade. Porém, utilizando-se 7 s como tempo de injeção, observou-se uma diminuição inesperada do sinal para o padrão de 0,3 mg L⁻¹ em relação ao padrão de 0,2 mg L⁻¹ (Figura 25) e uma repetibilidade ainda insatisfatória. Para injeções com o tempo de 10 s (Figura 26), observou-se um aumento dos sinais até a concentração de 0,3 mg L⁻¹, quando então atingiu-se a saturação da resposta para os padrões com 0,4 e 0,5 mg L⁻¹ em Co²⁺. Com este tempo de injeção foi observada uma melhora na repetibilidade das medidas, sendo avaliada então a faixa linear de aplicação sob esta condição.

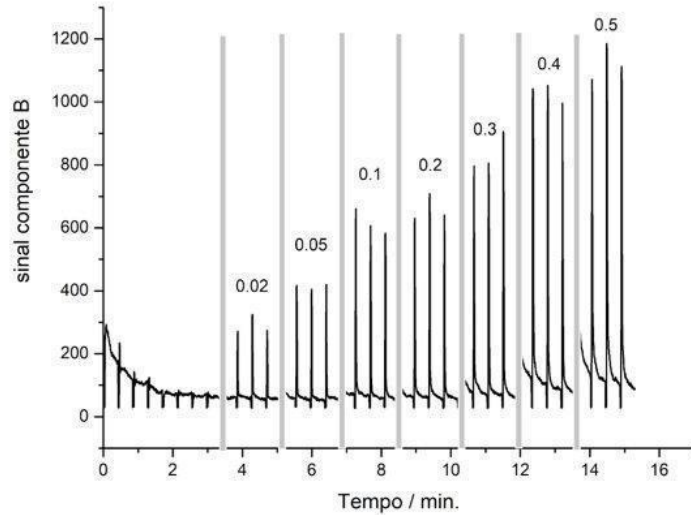


Figura 24: Fiograma obtido a partir do sistema da Figura 22 e procedimento da Tabela 3 com tempo de injeção de 5 s. Picos referentes a solução do branco e sete padrões de $[\text{Co}^{2+}]$. Concentrações indicadas em mg L^{-1} . Barras em cinza ocultam picos referentes às injeções de limpeza.

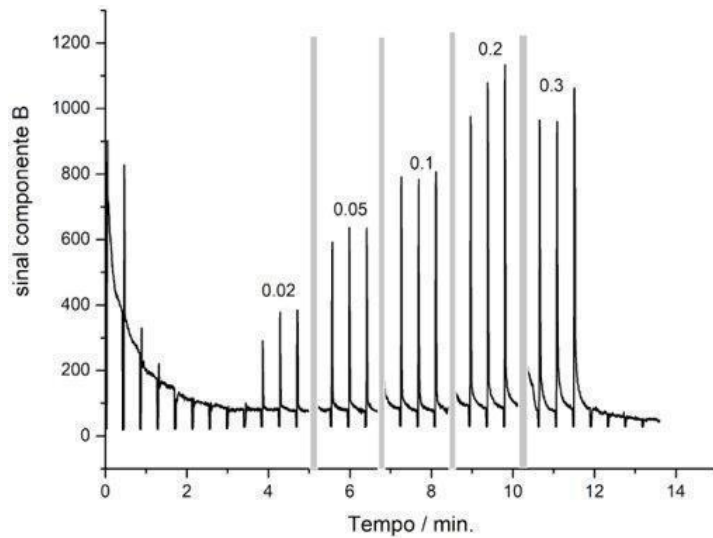


Figura 25: Fiograma obtido a partir do sistema da Figura 22 e procedimento da Tabela 3 com tempo de injeção de 7s. Picos referentes a solução do branco e cinco padrões de $[\text{Co}^{2+}]$. Concentrações indicadas em mg L^{-1} . Barras em cinza ocultam picos referentes às injeções de limpeza.

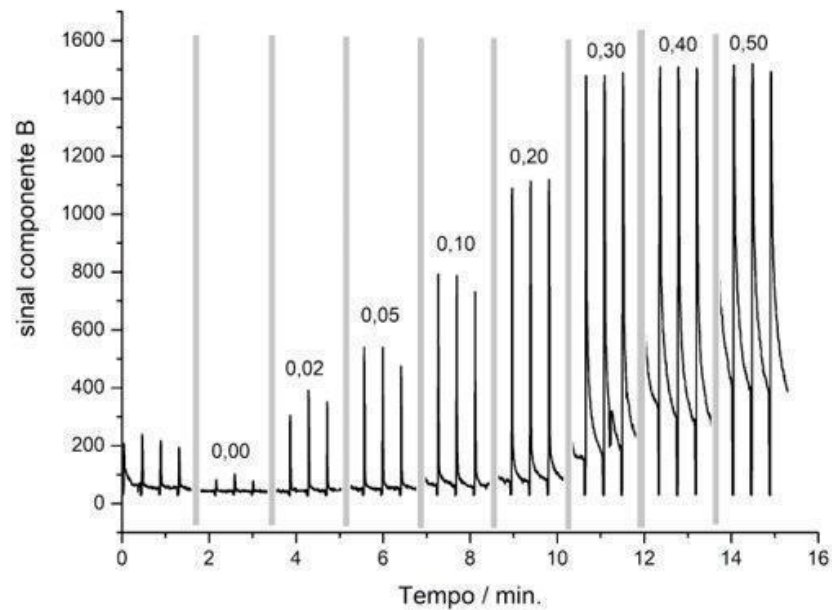


Figura 26: Diagrama obtido a partir do sistema da Figura 22 e procedimento da Tabela 3 com tempo de injeção de 10s. Picos referentes a solução do branco e sete padrões de $[\text{Co}^{2+}]$. Concentrações indicadas em mg L^{-1} . Barras em cinza ocultam picos referentes às injeções de limpeza.

Conforme observado na Figura 27, há uma tendência linear entre a concentração de Co^{2+} e altura dos picos para os padrões de 0,02 a 0,3 mg L^{-1} quando se utiliza a injeção por 10 s. De fato, como ilustra a Figura 28, obteve-se uma boa correlação linear ($R^2 = 0,9975$) para essa faixa de concentração o que indica a possibilidade de uso dessa configuração de fluxo (Figura 22) para determinações quantitativas. Apesar disso, ao se reproduzir as mesmas condições do procedimento, em outro momento, não foi possível obter um resultado similar ao da Figura 26, demonstrando uma instabilidade desta proposta inicial de procedimento.

Uma hipótese para o problema foi relacionada à concentração elevada de KOH e de luminol no meio, o que poderia dificultar a reação entre o luminol e o peróxido com catálise mediada pelo Co^{2+} , tornando o procedimento de difícil reprodutibilidade. Além disso, a degradação do H_2O_2 , injetado continuamente com o luminol durante as leituras, poderia estar levando à uma produção excessiva de bolhas de O_2 levando a variações no sinal analítico.

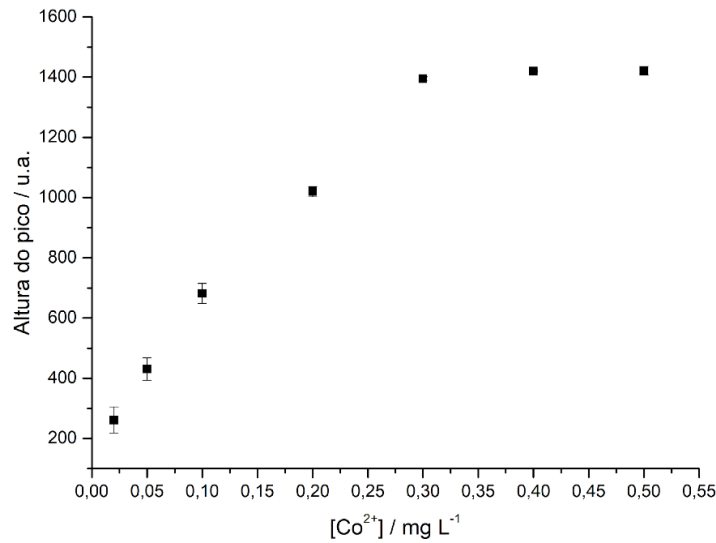


Figura 27: Resposta para altura média dos picos (n=3) para injeções de soluções de Co²⁺ na faixa de concentração de 0,02 a 0,5 mg L⁻¹ - empregando-se o tempo de injeção de 10 s

Para solucionar esses problemas, além das reduções das concentrações foi pensado em uma nova configuração do sistema de análise com a utilização de quatro bombas piezoelétricas e injeção de peróxido de hidrogênio separadamente do Luminol e em uma vazão menor, conforme mostrado na Figura 23.

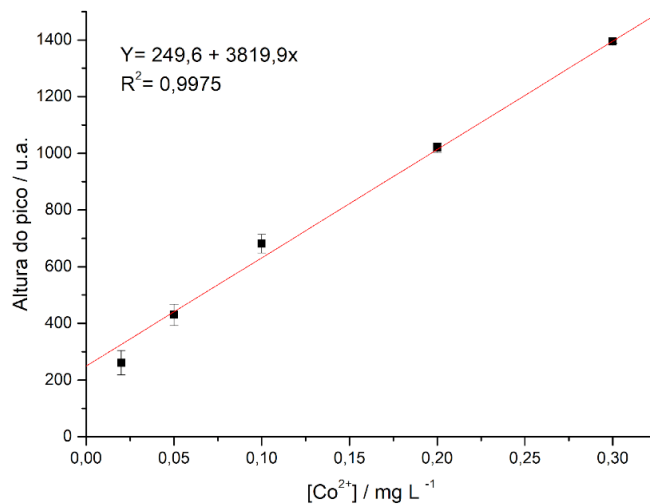


Figura 28: Curva analítica obtida para determinação de [Co²⁺]. Faixa de concentração de 0,02 – 0,3 mg L⁻¹.

No primeiro teste realizado com a configuração de sistema da Figura 23 e com o procedimento da Tabela 4, empregou-se água destilada no preparo dos padrões e como solução carreadora, além de se empregar soluções diluídas dos reagentes em cerca de cinco vezes em relação aos primeiros ensaios. Vale destacar também a utilização de dois ciclos de limpeza para garantir a ambientação da linha que liga o reservatório de soluções dos padrões.

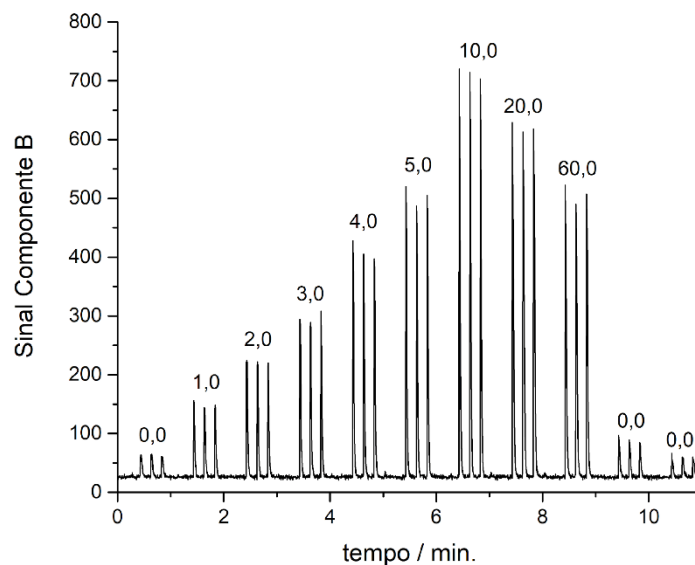


Figura 29: Diagrama obtido a partir do sistema da Figura 23 e procedimento da Tabela 4 com tempo de injeção de 10s utilizando água destilada no preparo de solução padrão e como carreadora. Picos referentes a solução do branco e oito padrões de $[\text{Co}^{2+}]$. Concentrações indicadas em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Conforme indica o diagrama na Figura 29, obtido com as novas condições, vemos que os picos de limpeza nesse procedimento não são perceptíveis e que os picos, referentes às injeções dos padrões, estão mais reprodutíveis. Ademais, deve-se destacar que foram detectados sinais para concentrações cerca de 20 vezes menores que as concentrações das soluções utilizadas no procedimento anterior. Cabe observar, entretanto, que para as concentrações acima de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, houve uma diminuição inesperada do sinal, cuja origem

não foi determinada, mas pode estar relacionada ao aumento da velocidade da reação que dificulta a detecção por imagens utilizando a aquisição dos sinais em intervalos de 0,3 s.

Considerando esse resultado, buscou-se diluir as amostras, previamente digeridas, de forma a atender as concentrações da faixa de calibração ($1,0$ a $5,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e realizar a determinação quantitativa. Porém, como mostra a Figura 30, o sinal produzido para uma amostra diluída com concentração de Co^{2+} de aproximadamente $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ produziu um sinal muito superior ao apresentado por uma solução padrão de $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$, evidenciando uma inconsistência nas respostas.

Esse resultado pode ser atribuído a acidez elevada da amostra (pH 3) em relação à solução padrão que apresentou um pH 5, de forma que diferentes graus de hidrólise do íon cobalto (II) nos meios poderia estar afetando a intensidade da emissão.

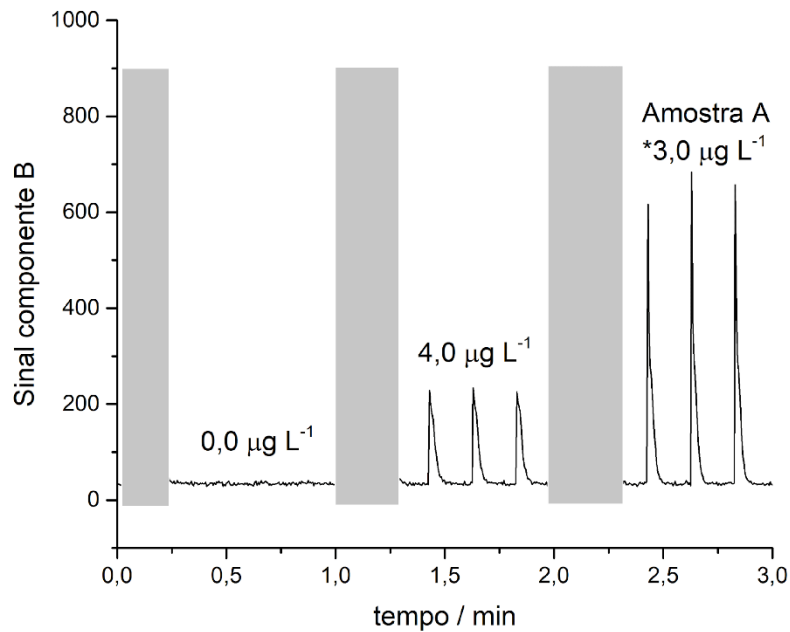


Figura 30: Diagrama obtido a partir do sistema da Figura 23 e procedimento da Tabela 4 com tempo de injeção de 10s utilizando água destilada no preparo de solução padrão e como carregadora. Picos referentes a solução do branco, uma solução padrão de $[\text{Co}^{2+}]$ e a amostra A. Concentrações indicadas em $\mu\text{g L}^{-1}$. Barras em cinza ocultam picos referentes às injeções de limpeza.

Desse modo, utilizou-se uma solução tampão de pH 5 para ajustar o pH das soluções diluídas das amostras e das soluções padrões e para ser empregada como solução carreadora do sistema, em substituição à água destilada.

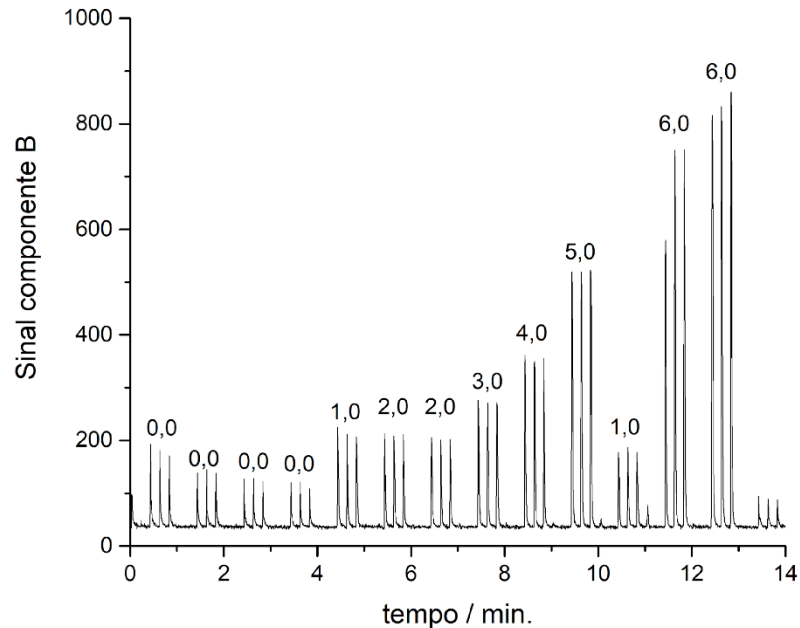


Figura 31: Diagrama obtido a partir do sistema da Figura 23 e procedimento da Tabela 4 com tempo de injeção de 5s utilizando solução tampão pH 5 no preparo de solução padrão e como carreadora. Picos referentes a solução do branco e seis soluções padrões de $[Co^{2+}]$. Concentrações indicadas em $\mu g L^{-1}$.

Conforme mostra o diagrama na Figura 31, não houve diferenciação significativa na altura dos picos obtidos para as soluções padrões de $1,0 \mu g L^{-1}$ e $2,0 \mu g L^{-1}$, o que foi observado para as soluções de concentrações maiores. Entretanto, mesmo para as concentrações acima de $2,0 \mu g L^{-1}$, não houve um aumento de sinal de forma linear, uma vez que a diferença de altura dos picos para as concentrações de $3,0 \mu g L^{-1}$ e $4,0 \mu g L^{-1}$ é notadamente menor que a diferença de altura para os picos de $4,0 \mu g L^{-1}$ e $5,0 \mu g L^{-1}$. Possivelmente essa condição levou a um excesso de tampão ácido no meio, pois ele se encontra nas soluções e como carreador do sistema, afetando dessa forma a reação do luminol com peróxido que deve ocorrer em meio básico. Dessa forma, pensou-se que a presença do

tampão seria necessária somente no preparo das amostras e dos padrões para assim manter o cobalto em sua forma não hidrolisada.

De fato, substituindo a solução carregadora por água destilada e mantendo-se as soluções de padrão/amostra tamponadas, obteve-se o fiograma da Figura 32, sendo obtidos picos crescentes para as concentrações de 1,0 a 5,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ e possibilitando as análises das amostras diluídas dentro da faixa de análise. Com base na média das alturas dos picos ($n=3$), foi possível construir a curva analítica apresentada na Figura 33.

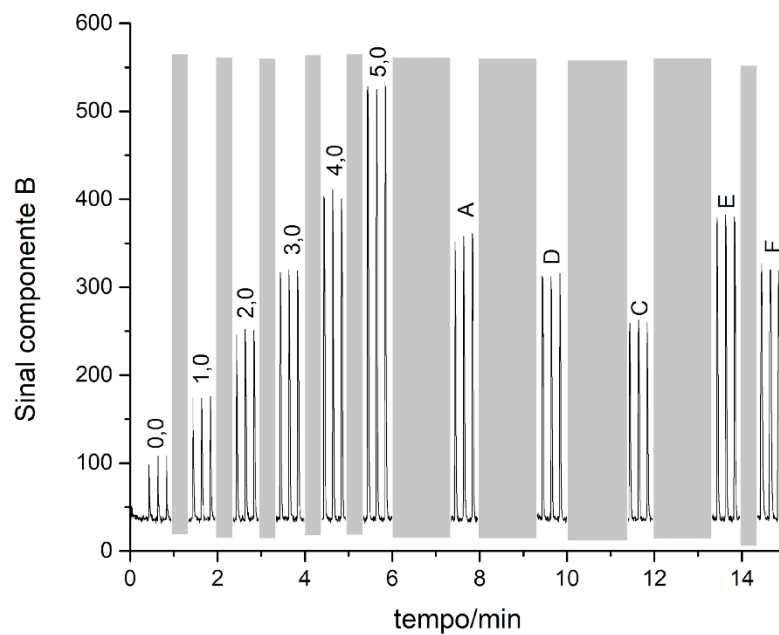


Figura 32: Fiograma obtido a partir do sistema da Figura 23 e procedimento da Tabela 4 com tempo de injeção de 5s utilizando solução tampão pH 5 no preparo de solução padrão e água destilada como carregadora. Picos referentes a solução do branco, cinco soluções padrões de $[\text{Co}^{2+}]$ e amostras **A**, **C**, **D**, **E** e **F**. Concentrações indicadas em $\mu\text{g L}^{-1}$

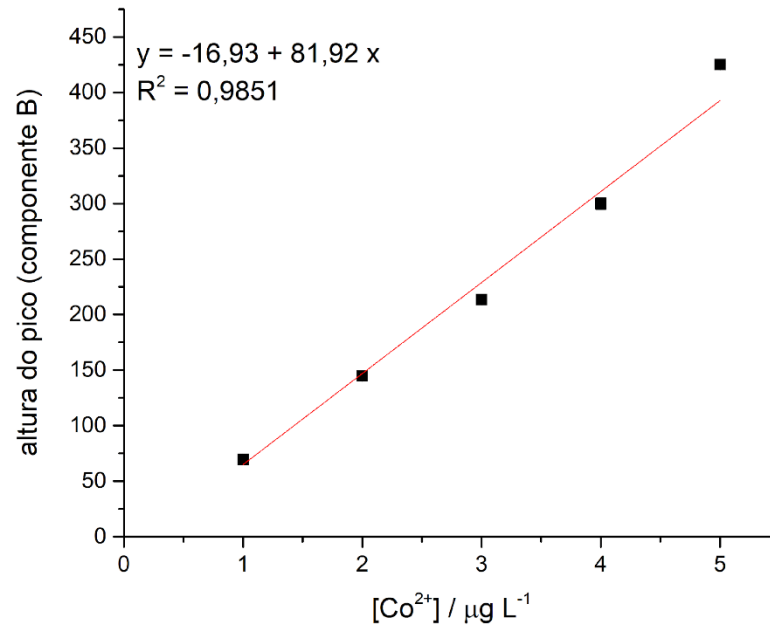


Figura 33: Curva analítica obtida para determinação de $[Co^{2+}]$. Faixa de concentração de 1 – 5 $\mu g L^{-1}$. Coeficiente de correlação (R^2): 0,9851.

Através da Figura 33, observamos que o quinto ponto ainda mostra uma inadequação, o que é notado também no fiograma da Figura 32, onde o sinal para a concentração de 5,0 $\mu g L^{-1}$ é acrescido de forma não proporcional às demais concentrações. De fato, ao se desconsiderar esse ponto, a curva analítica com 4 pontos (Figura 34) apresentou uma correlação linear satisfatória ($R^2=0,9990$), indicando que a faixa linear deve ser um pouco mais estreita.

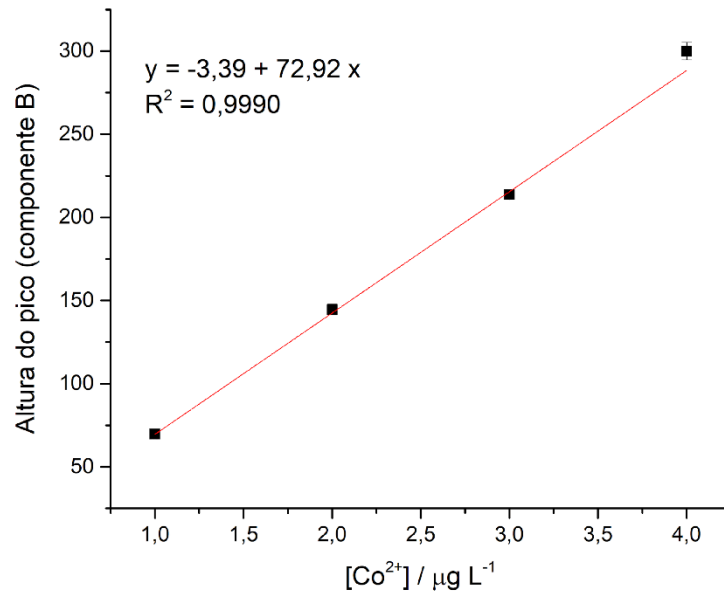


Figura 34: Curva analítica obtida para determinação de $[Co^{2+}]$. Faixa de concentração de 1 – 4 $\mu g L^{-1}$. Coeficiente de correlação (R^2): 0,9990.

Analisando a situação exposta, resolvemos então limitar a faixa de calibração até a concentração de 4,5 $\mu g L^{-1}$ e aumentar o tempo de injeção para 10 s, o que levou à aquisição do diagrama apresentado na Figura 35 e à curva analítica da Figura 36.

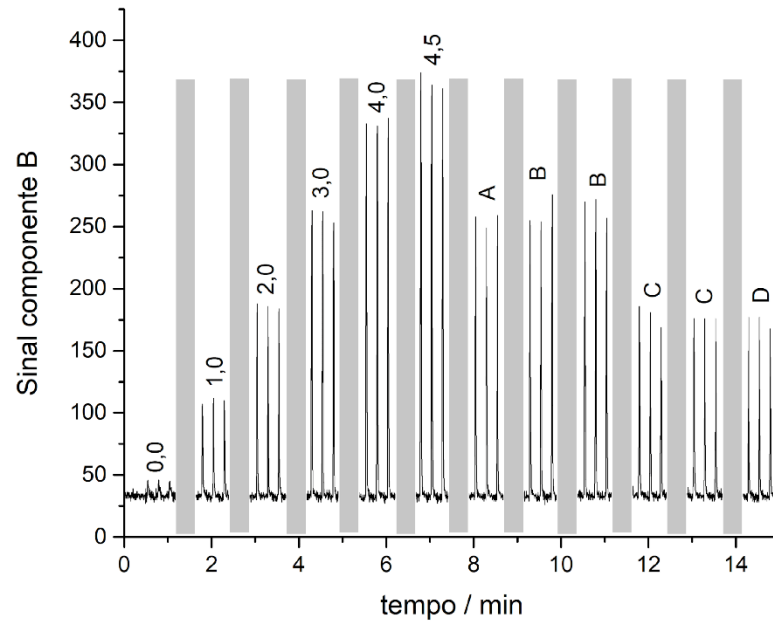


Figura 35: Diagrama obtido a partir do sistema da Figura 23 e procedimento da Tabela 4 com tempo de injeção de 10s utilizando solução tampão pH 5 no preparo de solução padrão e água destilada como carregadora. Picos referentes a solução do branco, cinco soluções padrões de $[\text{Co}^{2+}]$ e amostras **A, B, C e D**. Concentrações indicadas em $\mu\text{g L}^{-1}$.

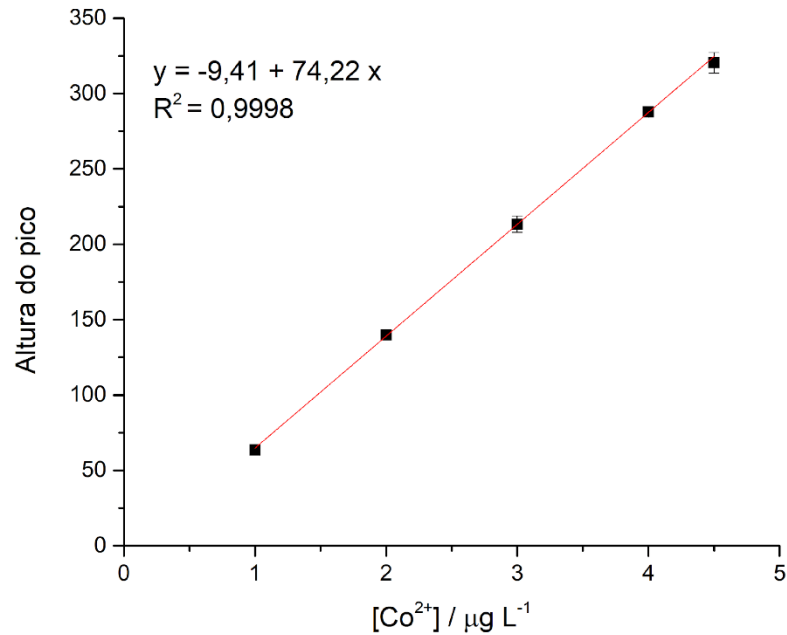


Figura 36: Curva analítica obtida para determinação de $[Co^{2+}]$. Faixa de concentração de 1 – 4,5 $\mu g L^{-1}$. Coeficiente de correlação (R^2): 0,9998.

A curva analítica construída com 5 pontos para soluções padrões contendo de 1,0 a 4,5 $\mu g L^{-1}$ de cobalto (II) apresentou um coeficiente de determinação elevado ($R^2 = 0,9998$), além de barras de erro menores que os pontos da curva para as triplicatas, sendo verificado uma maior imprecisão nas injeções de concentrações de 3,0 $\mu g L^{-1}$ e 4,5 $\mu g L^{-1}$. Isso indica que, para os padrões utilizados, foi observada uma variação de precisão (medida como coeficiente de variação) de 1,1 a 4,0% conforme indicado na Tabela 5. Esse resultado mostra que o sistema possui uma boa precisão para as injeções e procedimentos realizados com as microbombas piezoelétricas e que a reação luminescente acontece de forma reprodutível no interior do microsistema.

Tabela 5: Precisões estimadas pelos coeficientes de variação dos 5 padrões utilizados

$[\text{Co}^{2+}] \mu\text{g L}^{-1}$	Coefficiente de variação %
1,0	4,0
2,0	1,4
3,0	2,6
4,0	1,1
4,5	2,1

Com base nos resultados apresentados na Figuras 35 e 36, o limite de detecção de $0,70 \mu\text{g L}^{-1}$ foi estimado com base em uma resposta que apresenta uma razão Sinal/Ruído de 3 unidades, o que é especificado pela Farmacopeia Europeia [Shrivastava A, Gupta VB, 2011]. Assim sendo, o limite é plenamente satisfatório para a determinação de Vitamina B12 em medicamentos, uma vez que apresentam concentração de cobalto muito maiores que $0,70 \mu\text{g L}^{-1}$, sendo necessária a sua diluição para aplicação do método

No trabalho, foram analisados seis medicamentos, sendo três para uso veterinário (C, D e F) e três para uso humano (A, B e E), sendo os resultados comparados com o método espectrofotométrico de referência indicado na Farmacopeia internacional [The International Pharmacopoeia, 2016]. Ao se realizar as comparações, conforme exposto na Tabela 6, nota-se que, para a maioria das amostras (4 em 6), foi obtido um erro relativo menor que 10%, indicando uma exatidão aceitável para o método. A amostra que apresentou um maior erro (Amostra C, -25%), é de uso veterinário e acredita-se que esse erro negativo pode ser atribuído a abertura ineficiente da amostra, realizada em um micro-ondas doméstico e sem pressurização.

Duas das amostras estudadas (E e F) não foram analisadas através do método de referência uma vez que a amostra E apresenta como princípio ativo a hidroxocobalamina (e não cianocobalamina como as demais), o que exigiria o uso de um método que emprega cianeto de potássio para a sua análise e que, portanto, apresenta muitos riscos para a sua execução. Já

para a amostra F, o nível de concentração de vitamina B12 está abaixo do limite de detecção do método de referência, o que impossibilita o seu uso de maneira confiável.

Tabela 6: Resultados obtidos para a determinação de vitamina B12 em medicamentos pelo método proposto e concentrações de referência (determinadas por método espectrofotométrico ou citadas no rótulo).

AMOSTRA	MÉTODO PROPOSTO ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	REFERÊNCIA ($\mu\text{g} / \text{mL}$)	ERRO RELATIVO (%)
A	5.370,4 \pm 96,4	*5.311,4 \pm 51,1	+ 1,1
B	1017,1 \pm 36,1	*1092,2 \pm 0,9	- 6,9
C	557,4 \pm 7,3	*745,6 \pm 4,6	-25,2
D	858,5 \pm 8,4	*945,2 \pm 3,22	-9,2
E	2284,6 \pm 108,6	**2000,0	+ 14,2
F	5,04 \pm 0,10	**5,00	+ 0,8

Legenda: *método de referência internacional, ** não pode ser realizado pelo método de referência [The International Pharmacopoeia,2016], sendo utilizado o valor do rótulo.

O teste de hipótese T de student foi realizado para verificar se os resultados obtidos pelo método proposto e o de referência diferem a um nível de confiança de 95%. Ao realizá-los, foi constatado que não há diferenças significativas entre os resultados apenas para as amostras A, B e F. Apesar disso, acredita-se que a menor acurácia para as amostras C, D está, como já mencionado, na abertura ineficiente das amostras, uma vez que os resultados ficaram abaixo daqueles obtidos pelo método de referência. Por outro lado, a amostra E apresentou um erro positivo de 14 % em relação ao rótulo, o que é considerado aceitável pela farmacopeia brasileira que preconiza como aceitáveis teores entre 95 % e 115 % em relação ao descrito no rótulo. Dessa maneira, pode-se afirmar que o método apresentou exatidão aceitável para as amostras de uso humano.

Por último, considerando os resultados apresentados na Figuras 35 e o procedimento da Tabela 4, foi possível realizar a aquisição de 36 picos de uso analítico em um intervalo de 34 minutos, o que corresponde a obtenção de um sinal analítico a cada 56 s, já considerando o tempo necessário para a troca das soluções (ambientação). Em outras palavras, foi possível realizar o procedimento com uma frequência analítica de aproximadamente 60 leituras por hora.

Outro fato importante é que, para obtenção do fiograma da Figura 35, foram consumidos aproximadamente 54 mL da solução de luminol 0,06 % m/V, o que corresponde à massa de 33 mg do reagente para a realização de todo o procedimento. Esse resultado indica um baixo consumo de um reagente de custo elevado (R\$ 100,00 por grama) e a geração de baixa quantidade de resíduo, o que caracteriza a proposta como colaboradora da chamada Química-Verde [Roger A. Sheldon,2018].

5- Conclusão

A partir dos resultados obtidos foi concluído que a determinação indireta de vitamina B12 através da determinação de cobalto em microssistemas de análise em fluxo com detecção por imagem digital pode ser aplicada com exatidão e precisão adequadas para amostras de soluções injetáveis de uso humano. A estratégia utilizada neste trabalho se mostrou promissora para realização de medidas sendo apoiada por uma boa correlação linear e uma frequência analítica satisfatória além de uma boa correlação vista a partir da realização do teste T entre os métodos de referência e o proposto. Por ser um material caro, foi tido como vantajoso o baixo consumo de luminol durante a análise sem afetar a reação, além de um ser um método de análise que produz sinais para baixas concentrações, evitando assim o desperdício e sendo aplicável para amostras com baixos volumes disponíveis e consequentemente um método que produz uma baixa quantidade de resíduo. Outra vantagem obtida com esse método foi a diminuição de energia elétrica consumida durante o processo.

6-REFERÊNCIAS

1. A. Manz; N. Graber; H. M. Widmer. Miniaturized Total Chemical Analysis Systems: A Novel Concept for Chemical Sensing. **Sensors and Actuators**. 1990, Vol.1, p.244-248
2. Al Lawati, H.A.J. Flow-based analysis using microfluidics–chemiluminescence systems. **Luminescence**, 2013 Vol 28: p.618-627
3. Al Mughairy, Baqia ; Al-Lawati, Haider A.J. Recent analytical advancements in microfluidics using chemiluminescence detection systems for food analysis. **Trends in analytical chemistry**, 2020, Vol.124
4. Albrecht, H. O.; Z. **Phys. Chem.** 1928, 10, 70
5. Albertin, R. et al. Quimiluminescência orgânica: Alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. **Química Nova**, 1998, Vol.21, p.772-779
6. Andrea Rainelli, et al. Miniature flow-injection analysis manifold created by micromilling, **Talanta**, Volume 61, 2003, P 659-665,
7. Andrew G. Hadd, et al Microchip Device for Performing Enzyme Assays. **Analytical Chemistry**,1997, Vol. 69
8. Byrne, Liam et al Digital imaging as a detector for generic analytical measurements. **Trends in analytical chemistry**, 2000, Vol.19, pp.517-522
9. C. Terry, J. H. Jerman and J. B. Angell, "A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer," in IEEE. **Transactions on Electron Devices**, vol. 26, 1979, p. 1880-1886
10. Clóvis Paniz et al; Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial
Physiopathology of vitamin B12 deficiency and its laboratorial diagnosis. **Jornal brasileiro de patologia e medicina laboratorial**, 2005, Vol.41, p.323-334
11. Coltro, W. T. K. et al. Microsistemas de análises químicas. Introdução, tecnologias de fabricação, instrumentação e aplicações. **Química Nova**. Vol. 30, no. 8, 2007, p 1986 – 2000
12. D. Agustini et al. Characterization and optimization of low-cost microfluidic thread based electroanalytical device for micro flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta** Vol.951 (2017) p 108-115
13. D J Laser and J G Santiago 2004 J. **Micromech. Microeng.** 14 R35
14. David O. Kennedy B. Vitamins and the Brain: Mechanisms, Dose and Efficacy-A Review. **Nutrients**, 2016, Vol.8(2), p.68

15. De Souza Ramos Pontes Moura, Hadassa; Mól, Alan Ribeiro; Sampaio, Thiago Rosa; Fonseca, Alexandre. Image-based luminescence detection for quantitative determinations in continuous flow analysis microsystems. **Analytical Methods**, 2018, Vol 10. p 5571-5576
16. Duffy David C., et al. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). **Analytical Chemistry**, Volume 70, 1998, p 4974-4984
17. Ferreira, E.C.; Rossi, A.V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: Do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química Nova**, 2002, Vol.25, p.1003-1011
18. Fuquan Dang, et al Rapid analysis of oligosaccharides derived from glycoproteins by microchip electrophoresis, **Journal of Chromatography A**, Vol. 1109, 2006, P138-143
19. H.Y Wang, et al. Low temperature bonding for microfabrication of chemical analysis devices, **Sensors and Actuators**, Volume 45, 1997, P199-207
20. H. Helmholtz. On the theory of compound colours, **Philosophical Magazine**, (1852). p 519-534
21. Helene Andersson et al. A valve-less diffuser micropump for microfluidic analytical systems. **Sensors and Actuators** Volume 72, 2001, P259-265
22. Holger Becker; Claudia Gärtner. Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications; **Electrophoresis**. Volume 21, 2000 P 12-26
23. José A. Murillo Pulgarín , Luisa F. García Bermejo & M. Nieves Sánchez García. Chemiluminescent Determination of Vitamin B 12 Using Charge Coupled Device (CCD), **Analytical Letters**, 2011, Vol. 44
24. Kar, Shantimoy. et al Microfluidics on Porous Substrates Mediated by Capillarity-Driven Transport. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, 2020, Vol.59, p 3644-3654
25. Kate Grudpan et al. Applications of everyday IT and communications devices in modern analytical chemistry: A review, **Talanta**, 2015
26. Klaus B. Mogensen, Henning Klank, Jörg P. Kutter. Recent developments in detection for microfluidic systems. **Electrophoresis**. Vol 25, 2004, p.3498-3512.
27. L.F. Capitán-Vallvey, et al Recent Developments in Computer Vision-Based Analytical Chemistry: A Tutorial Review, **Analytica Chimica Acta** (2015)
28. Maria Luíza de Andrade Rodrigues. **Sistema microfluídico equipado com microbombas piezoelétricas para a realização de análises por quimiluminescência**. Instituto de Química, UNB, Brasília- DF 2019

29. Paul Lawrance. **Vitamin B 12 - A review of analytical methods for use in food.** 2015
30. Roger A. Sheldon, **Metrics of Green Chemistry and Sustainability: Past, Present, and Future**, ACS Sustainable Chemistry & Engineering 2018 6 (1), 32-48
31. S. Mohith, P. Navin Karanth, S.M. Kulkarn. Recent trends in mechanical micropumps and their applications: A review. **Mechatronics**, Vol. 60, 2019, p 34-55
32. Sampaio, Thiago Rosa; Fonseca, Alexandre. Chemiluminescence detection in urethane-acrylate microfluidic devices. **Sensors and Actuators**. 2015. Vol. 213. p 215 – 221
33. Shrivastava A, Gupta VB. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. **Chron Young Sci** 2011; 2:21-5.
34. **The International Pharmacopoeia** - Sixth Edition, 2016. Site acessado em 7 de Outubro de 2021:
<https://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/Cyanocobalamin.pdf?ua=1>
35. Van den Broek, Egon L. Human-centered content-based image retrieval. **Neuroscience research communications**. (2005)
36. Wang J., et al. Towards disposable lab-on-a-chip: Poly(methylmethacrylate) microchip electrophoresis device with electrochemical detection. **Electrophoresis**. Vol. 23, 2002, p 596-601
37. Y.K. Zhou; H. Li e Y. Liu Chemiluminescence determination of vitamin B by a flow- injection method. **Analytica Chimica Acta**, Vol 243 1997 p 127-130
38. Yebá N. M. Fagundes et al. Uma bomba seringa labmade para sistemas de análise em fluxo. **Sociedade Brasileira de Química**. 2009