



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JUCINEIDE DOS SANTOS BARBOSA COELHO

**Automatização de um Bioensaio para a Determinação de
Colesterol Total**

Salvador-Bahia

2017

JUCINEIDE DOS SANTOS BARBOSA COELHO

**Automatização de um Bioensaio para a Determinação de
Colesterol Total**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal da Bahia como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientadora: Professora Dra. Maria das Graças Andrade Korn

Coorientadora: Professora Dra. Maria Lúcia M.F. Sousa

Salvador-Bahia

2017

DOS SANTOS BARBOSA COELHO, JUCINEIDE

AUTOMATIZAÇÃO DE UM BIOENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DE COLESTEROL TOTAL / JUCINEIDE DOS SANTOS BARBOSA COELHO. -- SALVADOR, 2017.

68 f.: il

Orientadora: MARIA DAS GRAÇAS ANDRADE KORN.

Coorientadora: MARIA LÚCIA M. F. SOUZA SARAIVA.

Dissertação (Mestrado - MESTRADO EM QUÍMICA ANALÍTICA) -- Universidade Federal da Bahia, INSTITUTO DE QUÍMICA- UFBA, 2017.

1. ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIA (SIA). 2. LAB-ON-VALVE (LOV. 3. COLESTEROL. 4. MÉTODO ENZIMÁTICO. 5. SORO. I. ANDRADE KORN, MARIA DAS GRAÇAS. II. M. F. SOUZA SARAIVA, MARIA LÚCIA. III. Título.

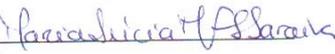
TERMO DE APROVAÇÃO

JUCINEIDE DOS SANTOS BARBOSA COELHO

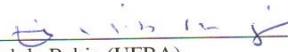
“AUTOMATIZAÇÃO DE UM BIÔENSAIO PARA A DETERMINAÇÃO DE
COLESTEROL TOTAL”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química,
Universidade Federal da Bahia, pela seguinte banca examinadora:

Prof.^a. Dr.^a. Maria das Graças Andrade Korn 
Doutorado em Química, Universidade de São Paulo (USP)
Universidade Federal da Bahia

Prof.^a. Dr.^a. Maria Lúcia Marques Ferreira de Souza Saraiva 
Doutorado em Farmácia, Universidade do Porto (U.PORTO)
Universidade do Porto

Prof. Dr. Rodolfo de Melo Magalhães Santana 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade Federal da Bahia

Prof. Dr. Anibal de Freitas Santos Junior 
Doutorado em Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)
Universidade do Estado da Bahia

Salvador, 20 de outubro de 2017.

“O educador não tem o vírus da sabedoria. Ele orienta a aprendizagem, ajuda a formular conceitos, a despertar as potencialidades inatas dos indivíduos para que se forme um consenso em torno de verdades e eles próprios encontrem as suas opções”.

Ivone Boechat

Agradecimentos

A professora Dra. Maria das Graças Korn, pela orientação, pela compreensão, pelo companheirismo e por ter me recebido tão bem em seu grupo de pesquisa.

A professora Dra. Maria Lúcia Saraiva, pela coorientação, pelo acolhimento, pelos ensinamentos e por me aceitar de braços abertos para trabalhar em seu projeto de pesquisa juntamente com a Marieta Passos, que também teve grande contribuição nesse trabalho.

Ao professor Dr. Rui Costa pela ajuda técnica e principalmente por me receber todos os dias com um grande sorriso e cumprimentos muito agradáveis durante toda a pesquisa no exterior.

Ao Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia, ao Grupo de Pesquisa em Química Analítica (GPQA), ao grupo de pesquisa BIL (biocatalysis and ionic liquids) e ao Laboratório de Química Aplicada da Universidade do Porto, pelo acolhimento e pelo ensinamento sobre a arte da pesquisa.

As minhas amigas da Universidade do Porto (UP), Sophie (Sofia Rodrigues) por ser amiga, companheira e meu porto seguro quando me senti "perdida" em outro país.

Aos amigos do grupo de pesquisa BIL, que me fizeram companhia e me ajudaram com palavras confortáveis durante a pesquisa no exterior, nomeadamente Susana Costa, Ana Marta, Edite Cunha e Sara.

A minha família, principalmente a meu pai Benigno e a minha mãe, Lindaura por terem acreditado em mim em todos os momentos.

Ao meu filho Ian, o meu combustível para a vida, que me dá forças pelo simples fato de existir.

Ao meu esposo Francisco, por me fazer acreditar que tudo isso era possível, por me fazer seguir em frente e por ficar do meu lado durante toda a minha jornada acadêmica.

Ao meu bebê de quatro patas, Willy, por ser meu companheiro durante as madrugadas de estudo e por vezes me distrair e me fazer rir quando o cansaço era mais forte do que eu.

A Cláudix (Cláudia Santos), por me dar abrigo (literalmente) e me acalmar com a sua sabedoria e serenidade, e a Natália Ramos, que me fez sentir em casa e me trazer lembranças do Nordeste do Brasil quando eu mais necessitei.

Aos meus amigos da Universidade Federal da Bahia (UFBA), principalmente Gabi, Marcela e Júlia, por serem amigas em todas as situações.

A todas as pessoas que contribuíram para esta dissertação, que não foram mencionadas nesse texto, por falta de espaço e não por falta de importância.

A FAPESB, CNPq, CAPES e a FCT pela ajuda financeira.

Resumo

No âmbito dessa dissertação desenvolveu-se um sistema de análise por injeção sequencial (SIA) com a utilização do módulo Lab-on-Valve (LOV) com potencialidades para ser usada na determinação do colesterol total em amostras de soro sanguíneo humano. Nesse trabalho optou-se pelo método enzimático, colorimétrico, em que o uso de solventes orgânicos está excluído. A determinação baseou-se na utilização de enzimas, extraídas de microrganismos, capazes de agir sobre os analitos de forma seletiva. Em presença da enzima colesterol esterase, o ester é convertido em colesterol que na presença da enzima colesterol oxidase (CO) dá origem a colesteno e peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado, por ação catalítica da enzima peroxidase (POD) e com o reagente cromogênico constituído pela mistura de fenol e 4-aminoantipirina, dá origem a quinoneimina que apresenta máximo de absorção em 500 nm. A otimização do sistema foi feita levando em consideração a concentração e o volume das enzimas colesterol esterase, colesterol oxidase e a peroxidase, o volume do reagente cromogênico, bem como a concentração dos reagentes que o compõe, o tempo de reação, a ordem de aspiração e a temperatura do banho. As condições otimizadas para o método proposto são: 10 µL de amostra, 20 µL de reagente cromogênico, 10 µL de enzima colesterol esterase 10 U mL⁻¹, 10 µL da enzima colesterol oxidase 4 U mL⁻¹ e tempo de 6 minutos. A curva analítica de calibração apresentou uma faixa linear de trabalho de 6 - 40 mg dL⁻¹ de acetato de colesterol com R² = 0,998, e limites de detecção e quantificação de 2,3 mg dL⁻¹ e 5,9 mg dL⁻¹, respectivamente. A metodologia desenvolvida demonstrou ser robusta, de baixo custo, considerando os baixos volumes de reagentes e menor geração de resíduos e exibiu bons valores de repetibilidade (RSD < 4%) e de reprodutibilidade (RSD < 2%) em todos os ensaios realizados. A análise de amostras de referência de soro sanguíneo humano resultou em erros que não ultrapassaram a faixa de 5% quando foram comparadas ao valor de concentração teórico.

Palavras-chave: Análise por Injeção Sequencial (SIA), Lab-on-Valve (LOV), Colesterol, Método Enzimático e Soro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. Diferentes metodologias desenvolvidas para a determinação de colesterol em soro e em padrões.....	36
Tabela 2.1. Ciclo analítico usado para determinação do colesterol total, em amostra de soro, num sistema SIA-LOV.....	49
Tabela 3.1. Resultados da aplicação do método proposto em amostras de soro de referência.....	64

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. 1. Representação esquemática da aspiração de zonas num sistema SIA e o gráfico empírico da sobreposição da mesma. a) Aspiração sequencial da amostra A e do reagente R, a partir de uma válvula seletora; b) Perfil das concentrações que atingem o detector e; c) Registro da sobreposição S das zonas de amostra e reagente. Adaptada da referência [10]..... 19

Figura 1. 2. Esquema básico de uma montagem SIA. T: solução transportadora; P: dispositivo de propulsão; VS: válvula seletora; TA: tudo de armazenamento; TR: tubo reator; D: detector; A: amostra; R: reagente. .. 20

Figura 1. 3. FIAlab-3500 com Lab-on-valve (LOV) 23

Figura 1. 4. Representação esquemática dos fenômenos de convecção e de difusão axial e radial num sistema SIA/LOV 25

Figura 1. 5. Demonstração gráfica dos parâmetros S, Ls, Lr, La e ID. (adaptado [18])..... 26

Figura 1. 6. Estrutura química do colesterol 28

Capítulo 2

Figura 2. 1. Sistema μ SIA-LOV para a determinação de colesterol total em soro, BT, banho termostático (45°C); T, transportador tampão fosfato pH 7,0); S, seringa; LOV; FL, fonte de luz; FO, fibra óptica; D, detector espectrofotométrico; R4, resíduos da porta 4; R: resíduos da reação..... 45

Figura 2. 2. Representação esquemática de uma seringa. B: barra condutora do pistão; S: reservatório de solução; SF: sistema de fluxo; VS: válvula solenoide. 46

Capítulo 3

Figura 3. 2. Efeito do volume do padrão sobre a reação para a determinação de colesterol total.....	54
Figura 3. 3. Efeito da concentração da enzima peroxidase sobre a resposta analítica.	55
Figura 3. 4. Efeito da concentração da 4-AAP sobre o sinal analítico.	56
Figura 3. 5. Efeito da variação do volume do reagente cromogênico sobre o sinal analítico.	57
Figura 3. 6. Efeito do volume da enzima colesterol oxidase sobre o sinal analítico.	58
Figura 3. 7. Efeito do volume da enzima colesterol oxidase sobre o sinal analítico.	59
Figura 3. 8. Efeito da concentração da enzima CE sobre o sinal analítico.	60
Figura 3. 9. Efeito do tempo de paragem sobre o sinal analítico.....	61
Figura 3. 10. Curva analítica de calibração	62

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

SFA – Análise por Fluxo Segmentado

FIA – Análise por Injeção em Fluxo

SIA – Análise por Injeção Sequencial

LOV – “Laboratório em uma Válvula”

MSFIA – Análise por Injeção em Fluxo com Multiseringa

SIA/LOV – Análise por Injeção Sequencial com módulo LOV

CE – Enzima Colesterol Esterase

CO – Enzima Colesterol Oxidase

POD – Enzima Peroxidase

4-AAP – 4-aminoantipirina

ABTS – Ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico

DMAB – Ácido 3-dimetilaminobenzoico

DCHBS-AAP – 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfônico + 4-aminoantipirina

Au-NPs – Nanopartículas de ouro

SPE – Eletrodo de Carbono Modificado por Impressão

FTIR-ATR – Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Técnicas de Análise em Fluxo	15
1.2. Introdução/Evolução Histórica.....	16
1.3. Análise por Injeção Sequencial (SIA) e Lab-on-Valve (LOV)	18
1.3.1. Fundamentos e Características	19
1.3.2. Componentes da Montagem	21
1.3.3. Dispersão e Sobreposição de Zonas.....	24
1.4. Colesterol: Química, Produção e Uso	27
1.4.1. Problemática do Colesterol.....	28
1.4.2. Metodologias Usadas na Detecção do Colesterol	29
1.5. Enquadramento e Objetivos do Trabalho.....	34
1.5.1. Objetivo Geral.....	34
1.5.2. Objetivos Específicos	35
2. MATERIAIS E MÉTODOS	42
2.1. Introdução	42
2.2. Reagentes e Soluções	42
2.3. Instrumentação	44
2.3.1. Equipamento Auxiliar	44
2.3.2. Componentes do Sistema de Fluxo.....	45
2.4. Procedimento Experimental	48
2.4.1. SIA/LOV.....	48
2.4.2. Modo Discreto (Batelada)	48
2.5. Desenvolvimento e Otimização do Sistema SIA/LOV	50
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
3.1. Introdução	51
3.2. Resultados da Otimização do Sistema.....	52
3.3. Características Analíticas do Sistema SIA/LOV Desenvolvido.....	62

3.4. Aplicação da Metodologia à Análise de Amostras de Referência de Soro Sanguíneo.....	63
4. CONCLUSÕES	65
5. REFERÊNCIAS	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. Técnicas de Análise em Fluxo

A existência de um elevado número de amostras ambientais, alimentares, clínicas e químicas remete à necessidade de automação das análises químicas (Vakh et al. 2016). Além disso, existe a preocupação dos laboratórios em desenvolver procedimentos analíticos mais ecológicos e com menores custos, uma vez que a automação garante a utilização de pequenos volumes de amostras e reagentes, gerando menos resíduos sem dificultar o desempenho analítico (Melchert, Reis, and Rocha 2012). Neste tópico será descrito de forma sucinta o fundamento, as vantagens e as limitações de algumas técnicas de análise em fluxo.

As análises em fluxo baseiam-se na introdução e processamento de amostras num escoamento controlado (Zagatto and Collins 1999). Nestes métodos, introduz-se sucessivamente um volume pré-determinado de amostra e de reagentes num canal, por onde flui um líquido, chamado de solução transportadora; neste momento forma-se uma zona de reação, que é encaminhada para um sistema de detecção no qual, cada amostra, produz um sinal analítico contínuo, transiente em forma de curva, cuja intensidade é correlacionada com alguma propriedade física ou química da solução analisada (Rodrigues 2009)

Os métodos de fluxo podem ser classificadas quanto ao tipo de escoamento, e portanto podem ser métodos de fluxo contínuo segmentado, métodos de fluxo contínuo não-segmentado e métodos de fluxo-parado (José Martínez Calatayud 2003), e quanto a forma de introdução da amostra, aspiração ou injeção (Zagatto and Collins 1999)

Nos métodos de fluxo segmentado as amostras são delimitadas no líquido transportador por bolhas de ar, com vista à individualidade de cada amostra (Karlberg and Pacey 1989)(José Martínez Calatayud 2003). Nos métodos de fluxo não segmentado, desaparecem as bolhas de ar e as amostras e os reagentes são misturados em linha através do escoamento contínuo (José

Martínez Calatayud 2003), e dispersão controlada. Ademais os métodos de fluxo-parado são, fundamentalmente, aplicados para métodos cinéticos, no qual a mistura da amostra com os reagentes é parada na célula de detecção a fim de se fazer um monitoramento do desenvolvimento da reação (José Martínez Calatayud 2003).

1.2. Introdução/Evolução Histórica

A primeira técnica completamente automática foi descrita na década de cinquenta por Skeggs (Leonard Skeggs 1957). Essa técnica foi empregada para a determinação de nitrogênio uréico realizada em um fluxo contínuo segmentado por bolhas de ar (do inglês *Segmented-Flow Analysis*, SFA) (Leonard Skeggs 1957)(Fortes 2010). Pouco tempo depois o instrumento foi comercializado pela Technicon® Corporation e recebeu o nome de Technicon Autoanalyzer SFA, cujas primeiras aplicações foram para a análise clínica. Este método baseia-se na aspiração sequencial das amostras para um canal, introduzindo-se, entre elas, bolhas de ar que as separam e que devem ser eliminadas antes da chegada ao detector, para que não interfiram com o sinal analítico. A função das bolhas é evitar a contaminação cruzada entre as amostras, impedir a dispersão e facilitar a mistura da amostra com os reagentes.

No início da década de setenta, o sistema proposto por Skeggs passou por modificações, e a alíquota da amostra passou a ser inserida em fluxo contínuo não-segmentado, e assim surgiram os sistemas de análise por injeção em fluxo (do inglês *Flow Injection Analysis*, FIA) (Ruzicka and Hansen 1975). Nesta técnica, a reprodutibilidade nos processos de amostragem e detecção foi aumentada significativamente, uma vez que não é necessário atingir condições de equilíbrio químico ou físico; isso ocorre porque os padrões e as amostras estão sujeitos ao mesmo nível de dispersão (Rodrigues 2009)

Diante de todas essas vantagens, desde então, foram desenvolvidas novas técnicas de gestão de fluidos e a expansão da utilização das mesmas nas mais variadas áreas da química, dentre elas, a análise por injeção sequencial ((SIA, do inglês “Sequential Injection Analysis”) que surgiu para incrementar a

versatilidade analítica do sistema FIA, possibilitando a sua adaptação a diferentes amostras e reações químicas, bem como uma maior independência do conhecimento empírico do utilizador (Saraiva 1999)(Ruzicka and Marshllall 1990). O sistema SIA baseia-se na aspiração sequencial de volumes precisos de amostra e de reagente, feito pela seleção prévia do canal de acesso às respectivas soluções, para um canal de armazenamento (“holding coil”), no qual, por comutação da válvula seletora e inversão de sentido do escoamento ocorre a sobreposição reprodutível das zonas de amostra e reagente (Saraiva 1999).

A crescente procura pela miniaturização e compactação dos sistemas de análise em fluxo levaram a uma adaptação do sistema SIA e o aparecimento dos módulos de análise “Laboratório em uma válvula” (LOV, do inglês “Lab-on-valve”) (Ruzicka 2000). Esses módulos correspondem a uma versão miniaturizada da metodologia SIA apresentando, portanto, os mesmos princípios de funcionamento acrescido da grande vantagem de trabalhar obedecendo os princípios da química verde.

Embora o sistema SIA tenha trazido flexibilidade, facilidade de operação e versatilidade, surgiu também a análise por fluxo multicomutado. Esses sistemas são baseados no conceito de utilização de válvulas solenoides com elevada rapidez de comutação controladas por um microcomputador (Pires et al. 2003). As válvulas são montadas para favorecer a mistura entre a solução e o desenvolvimento da reação química (Pires et al. 2003).

Anos depois, a análise por injeção em fluxo baseada em multiseringa (MSFIA, do inglês “Multisyringe Flow Injection Analysis”), foi descrita por Cerdá *et al* (Albertús et al. 1999) e caracteriza-se pela utilização de uma bureta multiseringa que permite o movimento simultâneo de quatro seringas com volumes variáveis (Albertús et al. 1999). Essa técnica possui a grande vantagem que combina um modo de operação multicanal com elevada precisão, associada a dispensa de volumes pelas seringas, que por sua vez, possuem uma válvula solenoide na extremidade, o que se traduz numa redução considerável de reagentes (Albertús et al. 1999).

Em 2002 surge uma nova técnica de análise em fluxo recorrendo a sistemas multibombas, cuja configuração e o controle do sistema de fluxo são

bastante simplificados (Lapa et al. 2002). O funcionamento básico dessa técnica utiliza bombas solenoides em pequenas dimensões que operam individualmente para a impulsão de amostras e reagentes, dispensando dispositivos de introdução de amostra e de comutação (Lapa et al. 2002).

Finalmente, Ribeiro *et al* (Ribeiro et al. 2005) desenvolveram a técnica de análise em fluxo mais recente, a análise em sistemas de fluxo de interface única. Nesta técnica, o conceito de interface de reação dual ou múltipla, foi substituído por um único conceito de interface: não dependem da utilização de um volume de amostra bem definido, mas depende apenas da penetração mútua de zonas de amostra e reagentes em uma única interface de reação. Neste local ocorrerá a mistura da amostra com o reagente para a posterior detecção do produto (Ribeiro et al. 2005).

Nesta dissertação serão abordados com mais detalhes os sistemas de Análise por Injeção Sequencial (SIA) e Lab-on-Valve (LOV).

1.3. Análise por Injeção Sequencial (SIA) e Lab-on-Valve (LOV)

A metodologia SIA é considerada a segunda geração do sistema FIA (Saraiva 1999), e portanto, mantém os mesmos princípios das metodologias FIA, quanto a precisão na introdução da amostra e no controle da dispersão (Rodrigues 2009). No entanto, a metodologia SIA possui maior simplicidade no que diz respeito ao sistema e maior versatilidade analítica, o que resulta na possibilidade de análise de amostras diversas, assim como variadas reações químicas (Saraiva 1999). Além de todas essas vantagens, o sistema SIA pode ser adaptado na válvula, com um módulo lab-on-valve, desenrolando-se a reação num menor percurso e, portanto, reduzindo-se significativamente o volume dos reagentes e dos resíduos. O dispositivo LOV possui portas de injeção, microcanais e uma célula de detecção que são integrados em um micro-dispositivo, acoplado a um aparelho convencional como por exemplo, fibras ópticas e um sistema de detecção (Melchert et al. 2012).

1.3.1. Fundamentos e Características

Como já foi mencionado anteriormente, o sistema SIA foi criado por Ruzicka e Marshall em 1990 como uma alternativa versátil, fiável, robusta e que implique em baixa manutenção quando se refere à automatização de procedimentos analíticos que envolvem mais de um reagente, uma vez que o sistema FIA requeria a reconfiguração física das montagens de modo a adaptá-las para diferentes determinações (Ruzicka and Marshall 1990). A análise por injeção sequencial baseia-se na aspiração sequencial de volumes precisos de amostra e reagentes, cujas zonas se sobrepõem de forma reprodutível através da conjugação de períodos de paragem e mudanças de sentido do escoamento (Figura 1.1.)

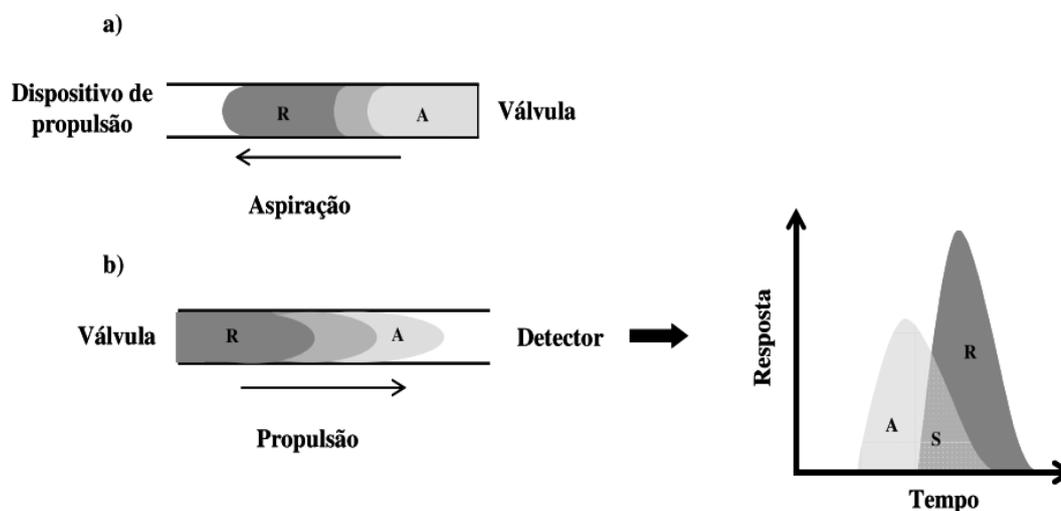


Figura 1. 1. Representação esquemática da aspiração de zonas num sistema SIA e o gráfico empírico da sobreposição da mesma. a) Aspiração sequencial da amostra A e do reagente R, a partir de uma válvula seletora; b) Perfil das concentrações que atingem o detector e; c) Registro da sobreposição S das zonas de amostra e reagente. Adaptada da referência (Saraiva 1999).

O funcionamento do sistema SIA consiste na aspiração das diferentes soluções a partir de uma válvula seletora (VS) para um tudo de armazenamento

(TA). Esta seleção é controlada por um computador numa sequência previamente estabelecida, movimentando-se a válvula seletora e o dispositivo de propulsão (P) de modo sincronizado. A válvula seletora multiposição está ligada a um canal central da válvula que comunica com cada uma das portas laterais por comutação da válvula entre os diferentes canais (por onde são aspiradas as soluções) (Rodrigues 2009). A partir da inversão do sentido do fluxo, propulsiona-se as diferentes soluções, aspiradas para o TA, até o detector, através de um fluido carregador (T), cujas zonas de sobreposição serão formadas, resultantes da penetração mútua das zonas, para o qual contribui os processos de transporte por convecção e de difusão molecular (Rodrigues 2009) (Figura 1.2).

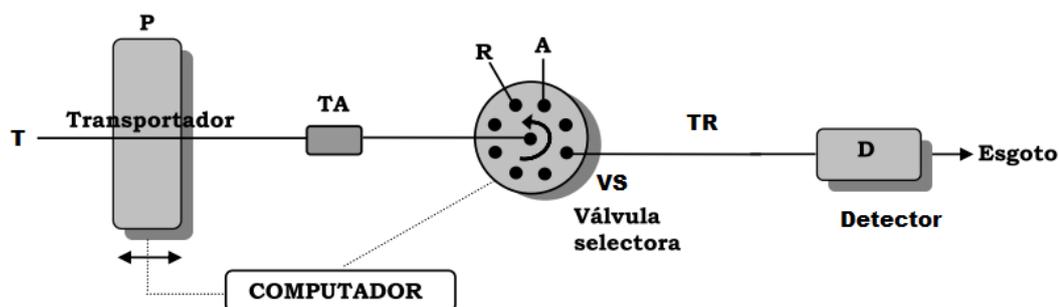


Figura 1. 2. Esquema básico de uma montagem SIA. T: solução transportadora; P: dispositivo de propulsão; VS: válvula seletora; TA: tubo de armazenamento; TR: tubo reator; D: detector; A: amostra; R: reagente.

Os volumes de amostra e reagentes dos sistemas em fluxo já são significativamente baixos quando comparados às análises em modo discreto (batelada). Essa vantagem pode ser ampliada ao adaptar um módulo LOV à válvula rotatória do SIA. Essa montagem trata-se da miniaturização do sistema em fluxo no qual todo o processamento da amostra ocorre em uma única placa (Dos Santos and Masini 2010). A diminuição dos volumes para a faixa de μL , e até mesmo de nL de consumo de reagentes, torna o LOV muito atraente para as análises que utilizam reagentes biológicos, assim como as enzimas, que possuem alto custo e, muitas vezes, pouca disponibilidade no mercado (Dos Santos and Masini 2010).

1.3.2. Componentes da Montagem

A válvula seletora de fluídos, o dispositivo de aspiração e propulsão e o detector são os principais componentes da montagem SIA (figura 1.2.), e serão descritos mais detalhadamente a seguir.

1.3.2.1. Dispositivo de Aspiração/Propulsão

O dispositivo de aspiração/propulsão deve possuir a capacidade de executar movimentos precisos que definem o início, paragem e inversão do sentido do fluxo que seja capaz de garantir aspirações e propulsões reproduzíveis, uma vez que os volumes introduzidos nesse sistema são definidos pelo fluxo e tempo de aspiração/propulsão. Para o efeito, ao longo do tempo, foram experimentados diversos dispositivos de aspiração/propulsão na montagem SIA (Miguel and Lima 2012)

A bomba de pistão ou de fluxo sinusoidal surgiu junto com a técnica SIA, com a função de conduzir os fluídos nesse sistema (Saraiva 1999). Esse dispositivo é capaz de produzir um escoamento de características sinusoidais com um padrão perfeitamente repetido no tempo. O seu sistema é composto por uma came que permite variar o seu raio e acionar o pistão/seringa, cuja variação da velocidade de rotação da came, do raio do pistão ou do raio da came, permitem modificar o caudal. Entretanto, o comportamento dessa bomba originava ritmos de amostragem relativamente baixos devido ao fato de que era necessário o reenchimento constante da mesma. E por isso, pouco tempo depois a bomba peristáltica foi testada numa montagem SIA, no qual apresentou a vantagem significativa de redução do tempo de análises por permitirem o preenchimento rápido e possuir a função de lavagem dos sistemas e ainda, permitir um escoamento micropulsado regular (Saraiva 1999). No entanto, os tubos de impulsão usados nesse dispositivo sofrem desgastes consideráveis com a utilização, havendo a necessidade de manutenção frequente e, introduziu-se, em alternativa, as seringas na montagem SIA.

As seringas possuem uma válvula com duas posições, que permitem direcionar a aspiração e a propulsão seja para o sistema ou para a solução transportadora. As soluções são impulsionadas mediante o movimento linear do pistão da seringa, que proporciona um escoamento linear constante, perfeitamente controlado e livre de pulsos (Saraiva 1999).

1.3.2.2. Válvula Seletora de Fluidos

O acesso às soluções ocorre por meio da válvula seletora de fluidos, no qual todos os componentes da montagem estão ligados à mesma (detectores, reatores, câmaras de mistura e válvulas adicionais) (Saraiva 1999).

A válvula seletora possui uma quantidade de orifícios variáveis, o qual determinam o número de soluções a serem utilizadas, bem como a quantidade de operações a serem realizadas durante a análise (Miguel and Lima 2012). No mercado existem válvulas com mais de 10 orifícios (<http://www.flowinjection.com>), entretanto esses dispositivos demandam muito tempo para a revolução completa da válvula, quando a rotação ocorre somente em um sentido. Essa limitação, quando existe, pode ser contornada com a incorporação de uma ou mais válvulas adicionais à montagem (Lukkari, Ruzicka, and Christian 1993).

O sistema LOV, possui os mesmos princípios de funcionamento do sistema SIA, a única diferença é a utilização de uma unidade de processamento central que integra todos os canais de fluxo e as portas de amostragem dentro de uma única célula de detector multiuso (LOV) que está montado sobre uma válvula de seleção multiposição e uma unidade de aspiração/propulsão SIA (Wu et al. 2001). O LOV é uma estrutura monolítica e transparente, feito normalmente de Perspex®, onde estão integrados uma célula de fluxo polivalente, o canal central, que liga todas as portas, e os canais das portas de ligação, estes últimos distribuídos por três planos (Figura 1.3) (Costa, Passos, and Saraiva 2015). A célula pertencente ao módulo LOV, incorporada a uma das portas de ligação pode ser configurada para a medição da absorvância, fluorescência ou

reflectância, consoante a posição das fibras ópticas com que a célula tenha sido equipada (Costa et al. 2015).

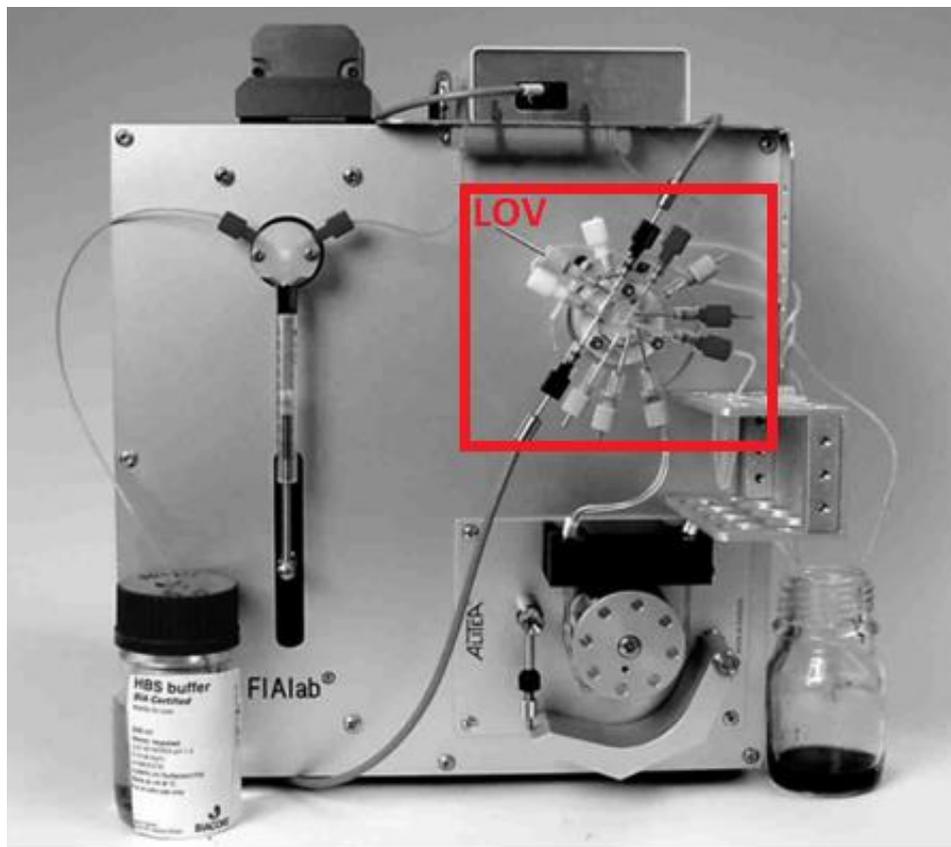


Figura 1. 3. FIAlab-3500 com Lab-on-valve (LOV)

1.3.2.3. Dispositivos de Detecção

O dispositivo de detecção adequado para os sistemas de fluxo em geral, deve ser acoplado à montagem e ser capaz de efetuar a detecção em condições de fluxo provocando dispersão mínima da espécie a detectar, no momento da medida (Saraiva 1999). Logo, existem muitos detectores que são designados especificamente para sistemas em fluxo, desde modelos simples para aplicações em análises de rotina até modelos complexos para laboratórios de pesquisa (Cerdà 2006).

Os detectores no sistema SIA podem ter diferentes posições, isso vai depender da determinação ou do estudo a ser efetuado (Saraiva 1999). Na

primeira montagem SIA, em 1990, Ruzicka e Marshall (Ruzicka and Marshall 1990) posicionaram o detector entre o dispositivo propulsor e a válvula e como resultados, obtinha-se dois picos em cada ciclo analítico: o primeiro pico era registrado durante a aspiração da amostra a ser detectada e o segundo era obtido após a inversão do sentido do fluxo, quando se propulsionava o produto para o descarte. Este último possuía menor intensidade, uma vez que era influenciado por maior grau de dispersão quando comparado ao primeiro (Saraiva 1999). Esta configuração caiu em desuso, devido ao fato de que a passagem do produto pelo detector era feita com pressão negativa e favorecia o aparecimento de bolhas e conseqüentemente, interferências no sinal obtido (Marshall and Staden 1992). Entretanto, na maior parte das montagens SIA, o detector encontra-se unido através do canal de transmissão à válvula seletora de fluidos através de uma das portas laterais. O tamanho deste canal deve ser estrategicamente escolhido levando em consideração os volumes dos reagentes e a dispersão da amostra durante o escoamento.

1.3.3. Dispersão e Sobreposição de Zonas

Como já foi mencionado anteriormente, a análise por injeção sequencial baseia-se no princípio do controle da dispersão e manipulação da amostra de forma reprodutível, conjugando períodos de paragem com mudanças de sentido no escoamento, esta técnica envolve a sobreposição reprodutível de zonas de amostra e reagentes, no qual o conceito de fluxo programado é acentuado (Miguel and Lima 2012).

O controle da dispersão no sistema SIA/LOV é determinante para que ocorra maior ou menor mistura da amostra com os reagentes. A dispersão dos segmentos de amostra e reagentes ocorre por dois processos, são eles: transporte por convecção e transporte por difusão (Cerdà 2006) No início do transporte, predominantemente ocorre o transporte por convecção, condicionado pelas dimensões da tubagem, no qual as partículas inseridas no fluxo laminar sujeitam-se, ao longo do diâmetro do tubo, a um perfil de velocidades parabólico, em que as partículas que se movem no centro têm o dobro da velocidade média das partículas que se movem junto à parede do tubo, que possuem velocidade

linear nula. No entanto, o transporte por difusão, pode ser axial ou radial, e segue os gradientes de concentração gerados nos diversos instantes do transporte por convecção (Figura 1.4) (Miguel and Lima 2012).

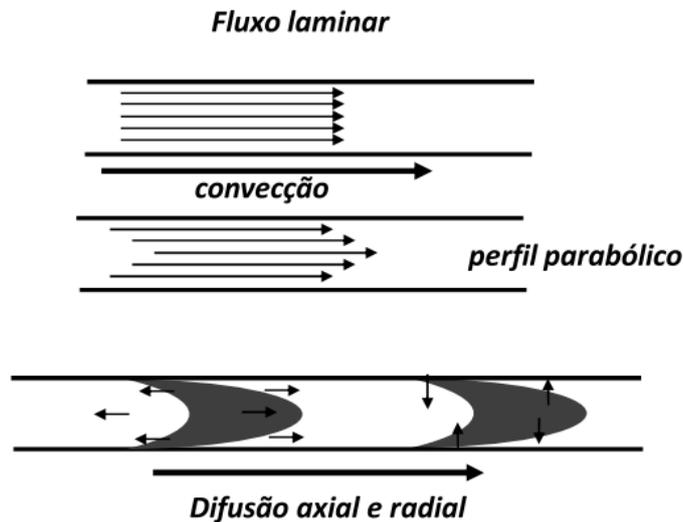


Figura 1. 4. Representação esquemática dos fenômenos de convecção e de difusão axial e radial num sistema SIA/LOV.

A difusão axial ocorre na direção do fluxo, é responsável por uma diluição significativa do segmento de zona composta e pelo alargamento dos picos e pode ser minimizada ao inverter o sentido do fluxo, contribuindo assim para um perfil de concentrações relativamente simétrico, e conseqüentemente, o pico registrado ao passar pelo detector, tem a forma gaussiana. Por sua vez, a difusão radial provoca o movimento das partículas adjacentes às paredes do tubo para o centro e vice-versa, de forma perpendicular à direção do fluxo, provocando o retardamento da diluição da zona composta, comportamento este que caracteriza a sua identidade, levando a um aumento de sensibilidade e originando picos mais estreitos (Miguel and Lima 2012). Mudanças frequentes e acentuadas na direção do fluido, no percurso das soluções, conseguidas usando tubulações com uma configuração em forma de oito (serpentina), promovem e intensificam a dispersão radial das soluções ao longo do seu percurso.

Para compreender melhor o fenômeno de dispersão das zonas nos sistemas em fluxo, foram definidos três parâmetros: o coeficiente de dispersão

(D), o volume injetado necessário para se atingir um D igual a duas unidades ($S_{1/2}$) e o grau de sobreposição de zonas (S) (Christian 1994) (Fundamentals, Of, and Injection 2008).

O grau de sobreposição (S) pode ser definido pela expressão:

$$S = \frac{2 L_s}{(L_a + L_r)}$$

Em que L_a e L_r referem-se às larguras do pico na linha de base da amostra e reagente, respetivamente, enquanto L_s refere-se à largura da base da região de sobreposição das zonas.

Quando $S = 0$, não existe sobreposição e quando $S = 1$, existe sobreposição total das zonas. Quando se verifica, como habitualmente acontece, uma ausência de sobreposição completa, observa-se um pondo de isodispersão (ID) (Figura 1.5).

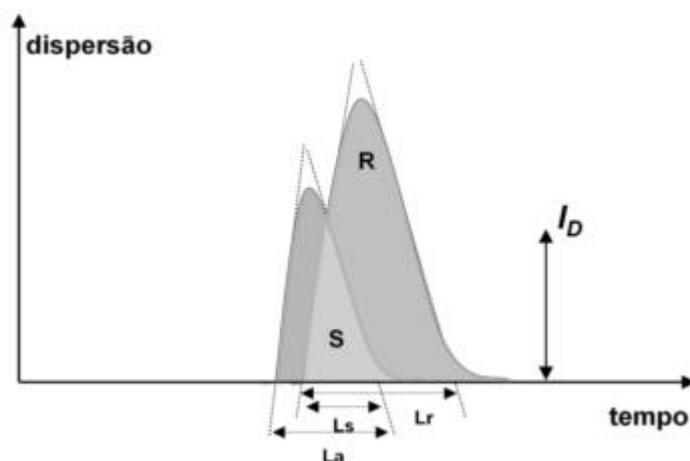


Figura 1. 5. Demonstração gráfica dos parâmetros S, L_s , L_r , L_a e ID. (adaptado [18])

O estudo da sobreposição de zonas descreve o grau de penetração entre as zonas de amostra e reagentes, de forma a estabelecer o intervalo de tempo em que é possível obter uma medida significativa baseada na altura ou área do

pico e, portanto, é de grande importância para garantir a implementação efetiva, com rentabilização máxima da montagem. Por sua vez, é importante saber que o grau de sobreposição é dependente das dimensões dos tubos usados, do caudal, da ordem de aspiração e da relação dos volumes das soluções aspiradas (Christian 1994) (Miguel and Lima 2012).

1.4. Colesterol: Química, Produção e Uso

O colesterol é considerado o mais importante esterol dos tecidos animais e está presente na maioria das células (Lehninger, Nelson, and Cox 2009), tendo como função manter a fluidez e a permeabilidade da membrana celular (Sozen and Ozer 2017). Também é o precursor de compostos com atividades biológicas específicas, como por exemplo, os ácidos biliares que são responsáveis pela emulsificação das gorduras obtidas através da dieta, tornando-as acessíveis às lipases digestivas.

O colesterol possui 27 átomos de carbono, como mostrado na figura 1.6, dentre eles 17 estão distribuídos em múltiplos anéis aromáticos, que caracterizam a estrutura de um esterol; ligado a esse grupo está um grupo hidroxila, e por isso, o colesterol também é classificado como um álcool (Doutorado and Alegre 2007). Sua estrutura contribui para a pouca solubilidade em água, sendo preciso transportar o colesterol de um tecido a outro, no organismo animal, em meio aquoso, no sangue. O transporte do colesterol ocorre por meio de lipoproteínas, isto é, estruturas micelares que comportam em seu interior substâncias apolares e nas extremidades, proteínas, que são macromoléculas solúveis em água. Existem as lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que transportam o colesterol do fígado para as células. Existem também, as lipoproteínas de alta densidade (HDL), que fazem o transporte do colesterol presente nas células para o fígado, e portanto pensa-se que o HDL seja uma das soluções para as doenças arteriais (HMOS 2008).

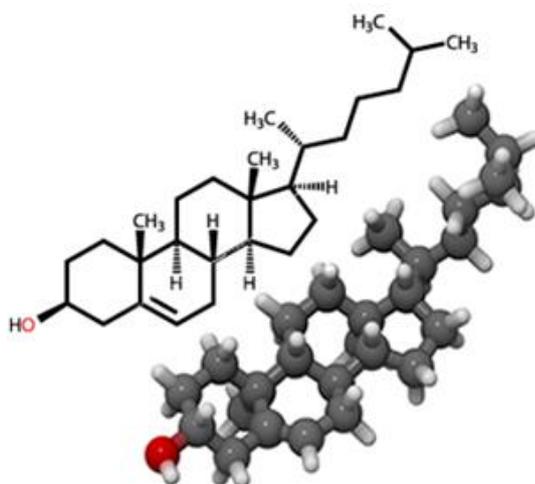


Figura 1. 6. Estrutura química do colesterol

O colesterol presente no organismo animal é sintetizado endogeneamente, um pouco mais de 50% de todo o colesterol (Morgan et al. 2016)(Matheus 2013), o restante é proveniente da dieta, através da ingestão de ovos, leite, carnes e derivados. No entanto, existem vários genes envolvidos no metabolismo do colesterol, que sofrem mutações podendo impactar nos níveis de colesterol do sangue; além disso os níveis de colesterol no plasma sanguíneo também podem ser influenciados por fatores genéticos ou até mesmo pela dieta alimentar (Morgan et al. 2016).

1.4.1. Problemática do Colesterol

Visto que o colesterol é de suma importância para os animais, inclusive para o homem, surge o questionamento sobre a necessidade em fazer o controle do colesterol presente no plasma sanguíneo. Estudos epidemiológicos e clínicos em humanos correlacionam o aumento do colesterol no soro com a doença coronária (Srisawasdi et al. 2006), isto é, doença causada pelo estreitamento das artérias que levam sangue ao coração. Esse estreitamento é causado pelo acúmulo de gordura, como o colesterol, no interior da artéria, e como consequência, limitam o fluxo de sangue, aumentando a pressão arterial (HMOS 2008).

Além da subida do colesterol causada pelo aumento da idade (Morgan et al. 2016), altos índices de colesterol no soro também estão relacionados com a ingestão de alimentos ricos nesse esterol, referentes a absorção deste pelo fígado. Estudos feitos em humanos por volta dos anos 60 (Keys, Anderson, and Grande 1957), mostraram que um aumento do colesterol dietético causa um aumento em 36% do colesterol no soro. Portanto, experiências com animais e com humanos, além da composição química das placas formadas na parede das artérias, levam à conclusão de que o colesterol dietético tem um papel muito importante no aumento do colesterol sanguíneo, mas não exclusivo (Connor and Connor 2002). Nesse sentido, a grande importância para o controle do colesterol em soro sanguíneo está diretamente relacionada com os níveis de colesterol no sangue e as doenças cardiovasculares.

1.4.2. Metodologias Usadas na Detecção do Colesterol

As metodologias usadas para a determinação do colesterol em amostras de soro sanguíneo podem ser feitas tanto em batelada quanto em sistemas em fluxo.

1.4.2.1. Modo Discreto (Batelada)

O colesterol pode ser quantificado por métodos enzimáticos e não-enzimáticos. Os métodos não-enzimáticos baseiam-se na extração do colesterol da amostra utilizando solventes orgânicos, como por exemplo o álcool, éter, acetona, clorofórmio, éter de petróleo, ou uma mistura deles; e posteriormente a detecção é feita espectrofotometricamente, através de reações que resultam em um composto colorido (Brown et al. 1954).

O colesterol livre foi, por algum tempo, isolado de forma quantitativa pela precipitação do seu digitonido em uma alíquota do soro (Brown et al. 1954). Esse método é baseado na adição do digitonina a amostra, que converte o colesterol livre de forma quantitativa para o colesterol insolúvel. O precipitado é convertido em um cromóforo, utilizando um reagente de cor, e determinado

espectrofotometricamente (Método de Pearson) (Brown et al. 1954). Entretanto, esse método possuía um ponto final lento e tedioso e, portanto, Brown *et al*, propuseram um método para a determinação do colesterol livre em soro humano que reduziu o tempo para a precipitação do colesterol solúvel e conseqüentemente, reduziu o tempo da reação (Brown et al. 1954).

Muitos outros trabalhos foram publicados utilizando os métodos não-enzimáticos, como por exemplo, Zlatkis e Boyle desenvolveram um método sensível para a determinação do colesterol em soro utilizando o cloreto férrico dissolvido numa mistura de ácido acético glacial e ácido sulfúrico para o tratamento da amostra (Zlatkis, Zak, and Boyle 1953)(Feleke 2006). Algum tempo depois Jamieson *et al*, desenvolveram um método para a extração preliminar do colesterol sem a utilização de solventes orgânicos, mas ainda assim, utilizaram ácidos para este fim (Feleke 2006).

Os métodos não-enzimáticos requerem muito tempo para a extração e o tempo para a determinação torna-se muito longo (Burke et al. 1974)(Wybenga et al. 1970) e, portanto, surgiu a necessidade de utilizar enzimas para as reações com o colesterol esterificado ou livre presente nas amostras.

O método enzimático com detecção espectrofotométrica é o método de referência usado para a determinação do colesterol em amostras de sangue (Doles 2000)(Krug, Göbel, and Kellner 1994). Esse método baseia-se na utilização de enzimas, extraídas de microrganismos, capazes de agir sobre o éster de colesterol (Laboratórios Gold Analisa 2012). Numa primeira etapa, o éster de colesterol é hidrolisado na presença da enzima colesterol esterase (CE) produzindo colesterol livre e ácidos graxos, em seguida, o colesterol livre é oxidado na presença de oxigênio e da enzima colesterol oxidase (CO) produzindo uma cetona, a colest-4-en-3-ona e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Krug et al. 1992)(Malavolti, Nieman, and Pilosof 1985). Este último, pode ser determinado utilizando um sistema de indicadores cromogênicos (reagente de cor), no qual será capaz de reagir com o peróxido de hidrogênio catalisado pela enzima peroxidase (POD), formando um produto cromogênico, cuja intensidade da cor é proporcional à concentração do colesterol na amostra (Krug et al. 1994)(Costa 2015). Os reagentes de cor frequentemente utilizados para essa detecção são o 2,2-azinobis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS),

ácido 3-dimetilaminobenzoico (DMAB), 4-aminoantipirina (4-AAP) e o 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfônico (DCHBS)-AAP (Krug et al. 1994).

Zhang *et al* determinou colesterol total em soro sanguíneo, utilizando o método enzimático colorimétrico com nanoesferas de nitreto de boro e nano-híbridos de sulfeto de cobre como mímico semelhante a enzima peroxidase; os autores mostraram que o método é econômico, confiável, altamente eficiente e viável (Zhang et al. 2017). Entretanto, Pundir utilizou enzimas imobilizadas em esferas de vidro para a determinação enzimática colorimétrica do colesterol em amostras de soro (Pundir 2003). O método apresentado por esse autor mostrou uma boa correlação com o método que faz uso de enzimas livres em solução (Pundir 2003).

Embora o método enzimático colorimétrico seja bastante utilizado em laboratórios clínicos e de pesquisa, existem trabalhos que utilizam o método enzimático com detecção amperométrica. Huang *et al*, projetou um biossensor de colesterol simples e ultra-sensível, baseado na deposição de prata na qual as enzimas CO e CE foram imobilizadas na superfície de nanopartículas de ouro (Au-NPs) com um eletrodo de carbono modificado por impressão (SPE) (Huang et al. 2017). Os resultados desse trabalho mostraram grande especificidade, reprodutibilidade aceitável e excelentes recuperações para detecção de colesterol em amostras de soro (Huang et al. 2017).

Aggarwal *et al.*, também mostrou um método enzimático amperométrico para a determinação do colesterol em soro, o método baseia-se na co-imobilização das enzimas CO e CE em nanopartículas de ouro e os resultados mostraram coeficientes de variação bastante baixos, em torno de 2% e um boa correlação entre o método proposto e o método enzimático colorimétrico (Aggarwal et al. 2016).

Os métodos cromatográficos surgem também na literatura, mas maioritariamente a cromatografia gasosa e líquida são aplicadas na análise de amostras de alimentos. Para a separação e quantificação de colesterol em amostras de soro sanguíneo utiliza-se a cromatografia por exclusão de tamanho seguida de uma reação enzimática (Rambaldi et al. 2009). Esse método baseia-se na separação das lipoproteínas, presentes no soro, de acordo com o seu

tamanho. A fração eluída entrará em contato com os reagentes enzimáticos ao final da coluna e o produto será detectado (Qureshi et al. 2011)(Rambaldi et al. 2009). Também é utilizado em laboratórios de pesquisa a cromatografia líquida com detecção eletroquímica para esse tipo de determinação, como por exemplo, Hojo *et al.*, determinou simultaneamente o colesterol e latosterol recorrendo à cromatografia líquida semi-micro de alta eficiência com detecção eletroquímica, com êxito (Hojo, Hakamata, and Kusu 2011).

Alguns trabalhos encontrados na literatura também mostram diversos métodos para a determinação do colesterol em soro, como por exemplo, a determinação simultânea de glicose e colesterol em amostras de sangue utilizando Espectroscopia no Infravermelho por Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR) (Li et al. 2017). Malavolti *et al.*, utiliza o método quimioluminescente que se baseia na utilização do reagente luminol, cuja luminescência decresce quanto maior for a quantidade do peróxido de hidrogênio, isto é, o produto da reação enzimática do colesterol catalisado pela enzima CO (Malavolti et al. 1985).

Entretanto todos esses métodos apresentados acima, exigem muito tempo disponível, alto custo relacionado ao gasto excessivo de reagentes enzimáticos e/ou a aquisição de equipamentos mais sofisticados, e por isso, muitos pesquisadores tem buscado alternativas para a determinação de colesterol em soro sanguíneo que sejam capazes de reduzir os gastos com reagentes, aumentar a frequência analítica e reduzir o contato do analista com as amostras. E, portanto, a determinação do colesterol em sistemas de fluxo tem sido uma alternativa viável para os pesquisadores.

1.4.2.2. Análises em Fluxo

A necessidade de automatizar as análises em um laboratório, seja ele químico ou clínico, pode ser justificada por vários fatores, dentre eles, a possibilidade de substituir parcialmente um analista em tarefas de rotina ou tarefas perigosas, além de reduzir significativamente o volume de reagentes e

conseqüentemente, o volume do resíduo químico (José Martínez Calatayud 2003).

Existem muitos trabalhos na literatura para a determinação do colesterol em sistemas de Fluxo. Um dos primeiros trabalhos de Fernández-Romero *et al* utilizou a Análise por Injeção em Fluxo (FIA) para determinar colesterol total em soro sanguíneo. Foi adotado o método enzimático e enzimas em solução com detecção espectrofotométrica e fluorimétrica (Fernandez-Romero, Luque de Castro, and Valcarcel 1987). Pouco tempo depois esses mesmos autores otimizaram a determinação de colesterol em soro, utilizando o sistema FIA com as enzimas imobilizadas em esferas de vidro, e os resultados obtidos foram bastantes satisfatórios (Fernández-Romero, de Castro, and Valcárcel 1987).

Ainda na mesma época, Yao *et al*, determinou colesterol livre e total em amostras de soro usando as enzimas CO e CE imobilizadas em suporte de sílica, e a enzima POD imobilizada em eletrodo com detecção amperométrica (Yao and Wasa 1988). Krug *et al* também recorre a enzimas imobilizadas em esferas de vidro para a determinação do colesterol total e livre em soro com o método enzimático colorimétrico (Krug et al. 1992). As análises foram feitas utilizando o sistema FIA com detector de fibra ótica e os resultados mostraram bastante eficácia do sistema (Krug et al. 1992).

Gupta *et al*. utilizou FIA para a determinação de colesterol em padrões através da imobilização da enzima CO em nanotubos de carbono multicamada (MWCNT) e nanopartículas ZnO com detecção eletroquímica (Gupta et al. 2013). Esse trabalho resultou na determinação do colesterol com baixos limites de detecção. Ainda utilizando o método enzimático amperométrico, Situmorang *et al* emprega um fio de tungstênio como sensor contra um eletrodo de Ag/AgCl em conjunto com um mediador redox de ferrocianeto para detectar o colesterol em amostras de soro humano (Situmorang, Alexander, and Hibbert 1999). Os resultados desse trabalho mostraram boa repetibilidade (3%), interferências insignificantes e pouca dificuldade na construção do sensor. Araújo *et al* utilizou um sistema em fluxo monosegmentado para a determinação espectrofotométrica enzimática do colesterol em soro sanguíneo (Araújo, Catita, and Lima 1999), o sistema apresentou uma frequência analítica de 42 amostras por hora.

Com outras técnicas de fluxo como a Análise por Injeção Sequencial (SIA) e Lab-on-valve não existem trabalhos publicados para a determinação de colesterol (Tabela 1.1).

1.5. Enquadramento e Objetivos do Trabalho

A crescente procura de métodos automatizados, com redução do consumo de reagentes e produção de resíduos, e a substituição dos reagentes tóxicos, estão em concordância com os princípios da Química Verde.

Diante das vantagens apresentadas na introdução desse trabalho sobre os sistemas em fluxo e, em especial, sobre o sistema SIA/Lab-on-valve, como a redução significativa dos reagentes e resíduos; a robustez; a sensibilidade; maior versatilidade analítica, diminuindo ou evitando, desta forma, os efeitos indesejáveis de alguns métodos analíticos dentre outras, propõe-se o método para determinação de colesterol total em soro.

Na verdade, a determinação do colesterol em amostras de soro humano, tem levado a um grande número de pesquisas relativas ao melhoramento dessas análises; no sentido de reduzir o tempo de análise, os volumes das amostras e reagentes; diminuir os custos envolvidos bem como a minimização da exposição física do analista. Embora já exista na literatura trabalhos relatando análise de colesterol total em amostras de soro humano, ainda não foi reportado a utilização do sistema SIA/LOV para tal determinação (Tabela 1.1)

1.5.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento de um método automatizado utilizando o sistema por injeção sequencial, SIA com o módulo de análise lab-on-valve (LOV) para a determinação de colesterol total em amostras de soro sanguíneo humano.

1.5.2. Objetivos Específicos

- Otimizar os parâmetros envolvidos na reação enzimática para a determinação de colesterol total: concentrações das enzimas CO, CE e POD; concentração de 4-AAP; volume do reagente cromogênico; volume do padrão e; volume da enzima CO.
- Validar os resultados obtidos através do limite de determinação (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão, precisão e teste *t* student.
- Aplicar o método em amostras de referência de soro sanguíneo.

Tabela 1.1. Diferentes metodologias desenvolvidas para a determinação de colesterol em soro e em padrões

Metodologia analítica	Reagentes	Matriz	Analito	Método de detecção	Tratamento da amostra	Referência
Não enzimática	Hidróxido de alumínio e cloreto de alumínio HCl, etanol e acetona	Soro	Colesterol livre	Espectrofotometria UV-vis	Extração	Brown <i>et al.</i> (1954)
Não enzimática – <i>Batch</i>	Ácido sulfúrico, acetato de etila e perclorato férrico	Soro	Colesterol total	Espectrofotometria UV-vis	Diluição com ácido acético glacial	Wybenga <i>et al.</i> (1970)
Enzimática – <i>batch</i>	CE, CO e POD	Soro	Colesterol total	Amperometria	Diluição com solução de etanol e triton X-100.	KARUBE <i>et al.</i> (1982)
Enzimática – <i>batch</i>	CE, CO e POD-luminol	Soro	Colesterol total	Quimioluminescência	Diluição com solução tampão PBS	Lundback, Johansson and Holst (1983)
Enzimática – <i>batch</i>	CE, CO e POD-luminol	Soro	Colesterol total e livre	Quimioluminescência	Dissolução com solução de triton X-100	Malavolti, Nieman and Pilosof (1985)

Enzimática - FIA	CE, CO e POD	Soro	Colesterol total e livre	Amperometria	Diluição com triton X-100	Yao <i>et al.</i> (1985)
------------------	--------------	------	--------------------------	--------------	---------------------------	--------------------------

Continuação Tabela 1.1. Diferentes metodologias desenvolvidas para a determinação de colesterol em soro e em padrões

Metodologia analítica	Reagentes	Matriz	Analito	Método de detecção	Tratamento da amostra	Referência
Enzimática - FIA	CE, CO e POD 4-aminofenazona e fenol	Padrões	Colesterol total	Espectrofotometria UV-vis e Fluorimetria	Diluição com isopropanol e triton X-100	Fernández-Romero, de Castro and Valcárcel. (1987)
Enzimática-FIA	CE, CO e POD-eletrodo	Soro	Colesterol livre e total	Potenciometria	Diluição com triton X-100	Yao and Wasa. (1988)
Enzimática - FIA	CE e CO e POD ABTS	Soro	Colesterol total e livre	Espectrofotometria UV-vis	Diluição com isopropanol e triton X-100	Krug <i>et al.</i> (1992)

Enzimática - FIA	CE e CO e POD ABTS, DMAB, DCHBS e fenol-AAP	Soro	Colesterol total	Espectrofotome- tria UV-vis	Diluição com triton X-100	Krug, Göbel and Kellner (1994)
Enzimática - FIA	CE e CO e POD- eletrodo	Soro	Colesterol total	Potenciometria	Diluição com isopropanol e triton X-100	Situmorang, Alexander and Hibbert (1999)
Enzimática – FIA monosegmentado	CE e CO e POD Fenol-4-AAP	Soro	Colesterol total	Espectrofotome- tria UV-vis	Diluição com fenol e triton X-100	Araújo, Catita and Lima (1999)

Continuação Tabela 1.1. Diferentes metodologias desenvolvidas para a determinação de colesterol em soro e em padrões

Metodologia analítica	Reagentes	Matriz	Analito	Método de detecção	Tratamento da amostra	Referência
Enzimática – <i>batch</i>	CE, CO e POD 4-aminofenazona e fenol	Soro	Colesterol total	Espectrofotome- tria UV-vis	Diluição com isopropanol e triton X-100	Pundir (2003)

Enzimática - MSFIA	CE e CO e POD Luminol, Fenol-4- AAP	Soro	Colesterol total	Quimiolumines- cência	Diluição com isopropanol e triton X-100	Pires <i>et al.</i> (2003)
HPLC	NA (não se aplica)	Soro	Colesterol total	Eletroquímica	Extração e separação com solventes orgânicos	Hojo <i>et al.</i> (2007)
Cromatografia por exclusão de tamanho	CE e CO e POD Fenol-4-AAP	Soro	Colesterol total e triglicerídeos	Espectrofotome- tria UV-vis	Diluição com triton X-100	Qureshi, Kok and Schoenmakers (2009)
Enzimática - FIA	CE e CO e POD Fenol-4-AAP	Soro	Colesterol e triglicerídeos	Espectrofotome- tria UV-vis	Fracionação em fluxo	Rambaldi <i>et al.</i> (2009)
Enzimática-FIA microfluidico	CO-eletrodo	Padrões	Colesterol livre	Amperometria	Diluição com triton X-100	Wisitsoraat <i>et al.</i> (2010)

Continuação Tabela 1.1. Diferentes metodologias desenvolvidas para a determinação de colesterol em soro e em padrões

Metodologia analítica	Reagentes	Matriz	Analito	Método de detecção	Tratamento da amostra	Referência
HPLC	NA	Soro	Colesterol e latosterol	Eletroquímica	Saponificação e extração com solventes orgânicos	Hojo, Hakamata and Kusu (2011)
CG	NA	Soro	Colesterol total e triglicerídeos	Espectrometria de massas	Sem tratamento	Qureshi <i>et al.</i> (2011)
Enzimática – <i>batch</i>	CO-eletrodo	Padrões	Colesterol livre	Voltametria	Diluição com isopropanol e triton X-100	Gupta <i>et al.</i> (2013)
Enzimática – <i>batch</i>	CO, CE Eletrodo	Soro	Colesterol total	Amperometria	Diluição com triton X-100	Aggarwal <i>et al.</i> (2016)
Enzimática – <i>batch</i>	CO, CE	Soro	Colesterol total	Espectrofotometria UV-vis	Diluição com triton X-100	Zhang <i>et al.</i> (2017)

Enzimática – <i>batch</i>	CO, CE	Padrões	Colesterol total	Voltametria	Diluição com isopropanol e triton X-100	Huang <i>et al.</i> (2017)
---------------------------	--------	---------	---------------------	-------------	---	-------------------------------

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Introdução

Neste capítulo serão abordados todos os aspectos relativos ao preparo das soluções, bem como dos equipamentos e materiais utilizados durante a execução do trabalho.

Serão apresentados também, o programa de controle da montagem SIA/LOV, para melhor compreensão do procedimento experimental; os estudos prévios e o procedimento de otimização das variáveis do sistema.

2.2. Reagentes e Soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico ou similar, não havendo a necessidade de nenhum tratamento ou purificação adicional.

As soluções foram preparadas usando água ultrapura obtida através do sistema de purificação de água arium[®] pro Sartorius, constituído por cartuchos preenchidos com um adsorvente de carbono ativado e uma resina de troca iônica de leito misto.

Todas as soluções eram obtidas por pesagem rigorosa do sólido em balança analítica e dissolução, em solvente apropriado, em material de vidro classe A ou equivalente, devidamente lavado. Por sua vez, as soluções de menor concentração, preparadas a partir destas, eram obtidas por diluição rigorosa, com recurso a pipetas automáticas da marca Labmate, calibradas regularmente com água, de pontas de plástico descartáveis, modelos P100, P1000 e P5000 de volume variável e com capacidades máximas respetivas de 100, 1000 e 5000 μL . Relativamente aos reagentes líquidos, a preparação das respectivas soluções era efetuada por diluições diretas sucessivas.

A solução tampão de fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,0, usada como solução transportadora e para a reconstituição das enzimas, foi preparada a partir dos

reagentes hidrogenofosfato dissódico (Sigma Aldrich) e dihidrogenofosfato de sódio (Sigma Aldrich). Essa solução era armazenada em geladeira até 3 meses.

A solução aquosa da enzima colesterol oxidase 4 U mL^{-1} foi obtida a partir do sólido da enzima colesterol oxidase de microorganismos, *E. coli*, da Sigma Aldrich (EC 1.1.3.6, atividade específica de 40 U mg^{-1} de sólido), dissolvida em tampão fosfato pH 7,0.

A solução aquosa de colesterol esterase 10 U mL^{-1} , foi preparada utilizando a enzima colesterol esterase de suíno, da Sigma Aldrich (EC 3.1.1.13, atividade específica de 35 U mg^{-1}) e solução de colato de sódio 10 mmol L^{-1} em solução tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, usado para solubilizar a enzima.

A solução de enzima peroxidase 36 U mL^{-1} foi preparada a partir do sólido da enzima peroxidase de rábano, tipo I, da Sigma Aldrich (EC 1.11.1.7, atividade específica de 146 U mg^{-1}) dissolvida em tampão fosfato pH 7,0.

Todas as soluções que continham enzimas foram estocadas no congelador logo após a sua preparação, em alíquotas suficientes para o uso diário. A solução de peroxidase, constituía exceção sendo preparada no momento do ensaio.

O reagente cromogênico era constituído por três reagentes: solução de fenol 6%, preparada a partir do fenol puro, da Merck, em água deionizada; solução de 4-aminoantipirina 1,76%, feita a partir do reagente puro em água deionizada e a solução de peroxidase 36 U mL^{-1} citada anteriormente. Essas soluções foram misturadas numa proporção 1,0 :0,75 :1,0, respectivamente e utilizadas nos ensaios durante 5 dias, no máximo, e depois descartadas.

A solubilidade limitada do colesterol é um grande problema associado à determinação deste em soluções aquosas (Malavolti et al. 1985). Portanto, o método de solubilização do colesterol usado neste trabalho foi proposto por Richmond em 1976 (Richmond 1976), e consiste no uso de uma solução de triton X-100 como solvente (Malavolti et al. 1985).

A curva analítica de calibração foi preparada com o padrão de acetato de colesterila, da Sigma Aldrich 97% (EC 210-066-4). Preparou-se uma solução do padrão com concentração 100 mg dL^{-1} em triton 1,5% (v.v). Adicionou-se uma

massa de 5 mg de sólido do padrão de éster de colesterila em 75 μL de triton X-100 puro (Sigma Life Science) aquecido a aproximadamente 72°C , em agitação. Após a dissolução completa do sólido, adicionou-se 3 mL de água deionizada aquecida e manteve-se em agitação e aquecimento ($\sim 72^{\circ}\text{C}$) por 30 minutos. Nesse momento, a solução apresentou turbidez. Depois adicionou-se mais 1,5 mL de água deionizada aquecida e aguardou-se mais 30 minutos. A solução foi posta para resfriar em agitação até que ficasse completamente límpida. Essa solução foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL e avolumado com água deionizada, posteriormente foi feita a diluição em volumes sucessivos até a concentração de 6 mg dL^{-1} .

Foi preparado uma solução de triton X-100 1,5% (v.v), utilizando o mesmo procedimento de preparo da solução padrão de acetato de colesterila. Essa solução foi utilizada para os ensaios do branco.

As amostras de referência utilizadas nesse estudo foram ABX Pentra N Control (Horiba Medical) e possuem concentrações padrão.

2.3. Instrumentação

2.3.1. Equipamento Auxiliar

Para o ajuste de pH da solução tampão foi utilizado um medidor de pH milivoltímetro de alta impedância de entrada, da marca Crison Instruments modelo GLP 22 acoplado a um eletrodo de vidro combinado de Ag/AgCl da mesma marca e modelo 52-02. A calibração do eletrodo combinado era realizada a partir de padrões comerciais disponíveis: pH = 4,00 (Riedel-de-Haën, 33543), pH = 7,00 (Riedel-de-Haën, 33546) e pH = 9,00 (Merck, 9889) diariamente.

As pesagens foram feitas utilizando uma balança da marca Kern e modelo 440-35N (precisão de $1 \times 10^{-2} \text{ g}$) ou utilizando a balança analítica Mettler Toledo AG285 (precisão de $2 \times 10^{-5} \text{ g}$).

As leituras de absorvância feitas em modo discreto foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV/VIS da marca Jasco, modelo STR-707 V-660, usando células de quartzo com 1 cm de passo ótico (Hellma, ref. 6030-UV).

2.3.2. Componentes do Sistema de Fluxo

O sistema desenvolvido (figura 2.1), apresenta uma seringa multibureta 1S da marca Crison Instruments S.A. (Allela, Barcelona, Espanha), equipada com uma seringa de vidro (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Switzerland, uma válvula de seleção da marca VICI Valco Instruments Co Inc, modelo 12U-0304L, no qual foi acoplada um LOV; num sistema de detecção; e num equipamento para banho termostático da marca Variomag acoplado com um termômetro de mercúrio.

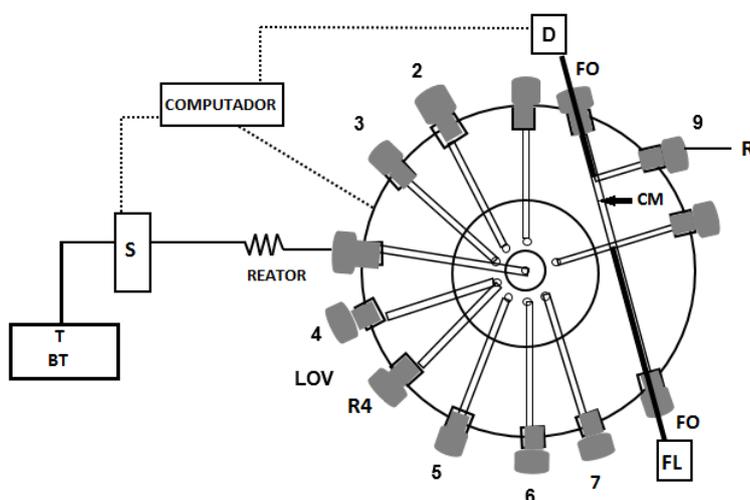


Figura 2. 1. Sistema μ SIA-LOV para a determinação de colesterol total em soro, BT, banho termostático (45°C); T, transportador tampão fosfato pH 7,0); S, seringa; LOV; FL, fonte de luz; FO, fibra óptica; D, detector espectrofotométrico; R4, resíduos da porta 4; R: resíduos da reação

2.3.2.1. Dispositivo de Aspiração/Propulsão

O dispositivo de aspiração e propulsão usado nesse trabalho, trata-se de uma seringa, um pistão e conectores de politetrafluoroetileno (PTFE). A seringa apresenta um volume de 5 mL, e é movimentada por um motor de passos de uma seringa automática convencional e possuem, numa das extremidades, um êmbolo responsável pelo seu enchimento e esvaziamento. À saída de cada seringa encontra-se uma válvula solenóide de três vias, que permite ligar a seringa ao sistema (Figura 2.2.) ou ao reservatório da solução transportadora, o que incrementa a flexibilidade do sistema e permite economizar reagentes.

O movimento completo do pistão corresponde a 40000 passos. O volume correspondente a cada passo depende da capacidade da seringa.

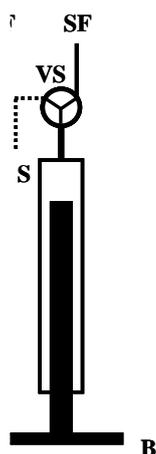


Figura 2. 2. Representação esquemática de uma seringa. B: barra condutora do pistão; S: reservatório de solução; SF: sistema de fluxo; VS: válvula solenoide.

2.3.2.2. Válvula seletora de fluídos e LOV

A válvula seletora de seletora de fluídos usada foi uma multiposição, que possui 10 portas e rotação unidirecional. A essa válvula foi acoplada a um módulo LOV, que possui 9 portas das quais: 1, 6 e 7 não foram usadas para a determinação de colesterol em soro e, portanto, continha somente solução transportadora; 2, reagente de cor; 3, a colesterol esterase; 4, amostra/padrão; 5, colesterol oxidase; e porta 9, resíduos. A porta 4 apresenta uma dupla entrada,

que possibilita a lavagem e introdução de solução, manualmente, sem ser necessário recorrer ao software de controlo do sistema, o que implica poupança de reagente e de tempo (figura 2.1).

2.3.2.3. Tubulação e outros Componentes

A ligação entre a seringa e a válvula foi feita utilizando tubo de politetrafluoretileno (PTFE), da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8 mm.

O fluído transportador era mantido em aquecimento (45°C) por um banho termostático. A esse banho, acoplava-se um copo de paredes duplas, aquecido por recirculação da água presente neste banho onde eram colocadas as soluções de amostra, padrões ou de triton 1,5%.

2.3.2.4. Controle Informático

O sistema analítico implementado foi controlado por computador, recorrendo a uma interface RS-232C e software Visual Basic.

De um modo geral, cada programa permitia definir a sequência de etapas para cada determinação, bem como a sua repetição programada. Em cada caso particular as instruções dadas referiam-se à posição da válvula seletora a aceder, ao tempo de permanência na posição definida, o início e o fim da operação da seringa, velocidade e direção dos movimentos e ainda à posição da válvula solenóide.

2.3.2.5. Dispositivo de Detecção

A detecção foi efetuada num espectrofotómetro miniaturizado de fibras óticas (USB4000, Ocean Optics Inc.) e uma fonte de luz (lâmpada de tungsténio halogénio, LS-1-LL, Ocean Optics Inc.). A conexão entre a fonte de luz e a célula de fluxo (no LOV) e entre esta e o espectrofotómetro foi efetuada através de fibras óticas simples.

O sinal analítico é obtido a partir do programa Ocean Optics SpectraSuite e transmitido por um computador.

2.4. Procedimento Experimental

2.4.1. SIA/LOV

Antes de começar as análises, todas as portas do sistema eram preenchidas com solução transportadora de tampão fosfato, pH 7,0. As portas de número 2, 3 e 5 eram preenchidas com as soluções de reagente cromogênico, colesterol esterase e colesterol oxidase, respectivamente. Enquanto isso, era ligado o sistema de aquecimento para que o banho alcançasse a temperatura de 45°C.

O ciclo analítico (Tabela 2.1) durava cerca de 10 minutos, levando em consideração os tempos para cada etapa e os tempos entre as etapas. A aspiração do reagente cromogênico era feita de forma fracionada com o intuito de obter uma mistura mais eficiente e evitar a dispersão, portanto, aspirava-se um total de 10 µL colesterol esterase, 10 µL de colesterol oxidase, 10 µL da amostra e 20 µL do reagente cromogênico. Depois, eram aguardados 6 minutos para a reação e invertia-se o sentido do fluxo, propulsionando toda a mistura para a célula de detecção e posterior descarte. A amplitude do sinal obtido em 500nm, era proporcional à quantidade de colesterol presente na amostra.

2.4.2. Modo Discreto (Batelada)

As soluções eram as mesmas do sistema em fluxo, entretanto, eram pipetadas 100 µL das soluções de enzimas colesterol oxidase e colesterol esterase, 200 µL da solução de reagente cromogênico, bem como 100 µL do padrão e transferido para um frasco eppendorf de 2mL. Esse frasco era condicionado em um banho de aquecimento a 37°C por 6 minutos. Posteriormente a solução resultante era medida em um espectrofotômetro UV-vis no comprimento de onda de 500 nm (Sigma-Aldrich n.d.).

Tabela 2.1. Ciclo analítico usado para determinação do colesterol total, em amostra de soro, num sistema SIA-LOV.

Etapa	Posição	Volume (µL)	Tempo (s)	Vazão (mL min ⁻¹)	Direção	Evento
1	2	10	4	0,15	Aspiração	Reagente cromogênico
2	3	5	2	0,15	Aspiração	CO
3	5	5	2	0,15	Aspiração	CE
4	4	5	2	0,15	Aspiração	Amostra
5	3	5	2	0,15	Aspiração	CE
6	4	5	2	0,15	Aspiração	Amostra
7	5	5	2	0,15	Aspiração	CO
8	2	10	4	0,15	Aspiração	Reagente cromogênico
9	9	-	360	0,0	Parado	Reação
10	9	10000	75	1,25	Propulsão	Lavagem

CO – Colesterol oxidase
CE – Colesterol esterase

Asp – aspiração
Prop - propulsão

O ensaio em branco era feito com as soluções das enzimas de colesterol oxidase e colesterol esterase, solução de reagente cromogênico e solução de triton 1,5%, com os mesmos volumes dos ensaios com o padrão.

2.5. Desenvolvimento e Otimização do Sistema SIA/LOV

O sistema SIA/LOV passou por uma etapa de otimização, no qual se recorreu ao método de otimização univariado, que consiste em variar, num determinado intervalo, o parâmetro a otimizar mantendo e, garantindo, que os outros parâmetros estão constantes/fixos. Eram construídas curvas de calibração para cada parâmetro avaliado e a seleção da condição ótima era feita levando em consideração a sensibilidade do método, limite superior de resposta linear, limite de detecção, ritmo de determinação, precisão, exatidão, menor volume e menor concentração de reagentes.

Para definir a relação linear entre a concentração de colesterol e a medida de absorbância, foi feita uma representação gráfica da curva analítica de calibração, com soluções de concentrações crescentes do padrão de éster de colesterol, utilizando o método dos mínimos quadrados. Entretanto a avaliação da linearidade da curva foi feita através do coeficiente de correlação linear (R^2).

Tanto os padrões quanto as amostras eram analisadas, consecutivamente, 3 vezes, e o resultado final da intensidade do sinal analítico era dado pela média das leituras. Para obter o valor das concentrações do colesterol total nas amostras de referência, fez-se a interpolação dos valores máximos de absorbância de cada amostra, na curva de calibração.

O limite de detecção de uma operação analítica é considerado como o valor mínimo de concentração (C_{LD}) para o qual se consegue obter uma resposta analítica (Y_{LD}) significativamente diferente do valor de um branco ou do ruído de fundo (Butler, Laqua, and Strasheim 1986). Desta forma, Y_{LD} foi obtido através da equação $Y_{LD} = Y_B + 3 S_B$, onde Y_B corresponde à média de dez medições do sinal analítico do branco e S_B ao desvio padrão dessas mesmas medições.

As medições do branco foram efetuadas com uma solução com a mesma composição das soluções padrão com exceção do analito a determinar. A

concentração mínima detetável (C_{LD}) era calculada por interpolação na curva de calibração do valor de Y_{LD} (Ziegel 2004).

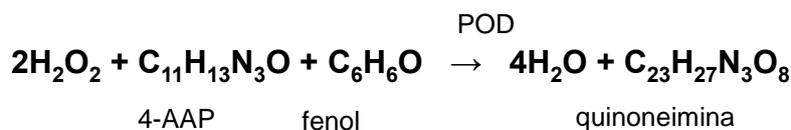
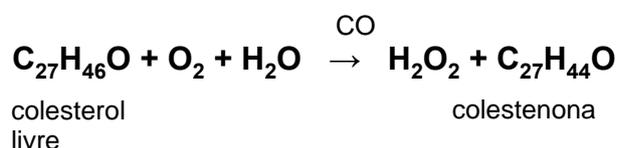
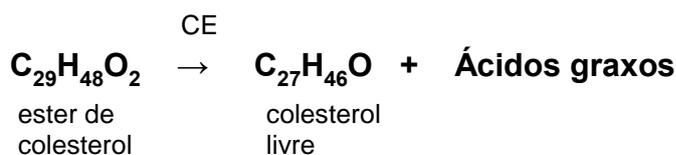
O limite de quantificação (também designado por limite de determinação), definido como o valor mínimo de concentração (C_{LQ}) para o qual se consegue obter uma resposta quantitativa e precisa (Y_{LQ}), pode ser obtido após o cálculo do Y_{LQ} através das equações: $Y_{LQ} = b + 10 S_{y/x}$ ou $Y_{LQ} = Y_B + 10 S_B$ (Ziegel 2004).

A repetibilidade da metodologia foi avaliada em termos de desvio padrão relativo, (RSD), expresso em percentagem.

O ritmo de amostragem foi determinado levando em consideração o tempo gasto para cada ciclo analítico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Introdução



No trabalho que seguidamente se refere estuda-se a aplicabilidade de um sistema de SIA/LOV na determinação de colesterol total em soro, recorrendo ao sistema enzimático colesterol esterase (CE)/ colesterol oxidase (CO)/peroxidase (POD). Em presença da enzima colesterol esterase o ester é convertido em colesterol que por ação da ação catalítica da colesterol oxidase (CO) dá origem a colesteno e a peróxido de hidrogénio. O peróxido de hidrogénio formado por ação catalítica da POD decompõe-se por oxidação do reagente cromogénio constituído pela mistura de 4-clorofenol e 4-aminoantipirina, dando origem a

quinoneimina e água. A monitorização do produto de reação corado é efetuada espectrofotometricamente a 500 nm, como é mostrado na figura abaixo.

Figura 3.1: Esquema simplificado das reações que se verificam na determinação do colesterol pelo método enzimático (adaptado de (Sigma-Aldrich))

No desenvolvimento deste novo método, foi necessário testar e otimizar vários parâmetros: a concentração e o volume das enzimas colesterol esterase, colesterol oxidase e a peroxidase; o volume do reagente cromogénico, bem como a concentração dos reagentes que o compõe; o tempo de reação; a ordem de aspiração; e temperatura.

A otimização do sistema foi realizada levando em consideração a sensibilidade, a precisão, o limite de deteção, o limite de quantificação, o limite superior de resposta linear e o ritmo de amostragem. Portanto, os resultados de cada parâmetro da otimização serão apresentados e discutidos na ordem pela qual foram estudados. Foi feita uma otimização univariada dos parâmetros, que consiste em fazer variar, num determinado intervalo, um único parâmetro a otimizar, mantendo todos os outros fixos. A partir do momento em que cada parâmetro foi otimizado, a sua condição ótima passou a ser utilizada em todos os ensaios realizados posteriormente.

3.2. Resultados da Otimização do Sistema

Antes de iniciar a otimização propriamente dita, foram realizados ensaios em batelada como testes preliminares, para verificar basicamente a concentração mínima de triton X-100 necessária para solubilizar o padrão de éster de colesterol, bem como averiguar se as reações envolvidas nessa determinação ocorriam. Primeiramente fez-se os testes com o colesterol livre e posteriormente, com o éster de colesterol. A concentração de Triton X-100 foi testada numa faixa de 1,25 a 10% (v/v) e a quantidade mínima necessária para a solubilização do padrão de acetato de colesterila nas condições estudadas foi de 1,5%.

Mediante estudos na literatura, no qual as enzimas e as reações envolvidas nessa determinação possuem melhor desempenho quando a solução está tamponada em pH 7,0, foi mantido o tampão fosfato de sódio para a diluição das enzimas e como solução transportadora (Fernández-Romero et al. 1987)(Laboratórios Gold Analisa 2012)(Srisawasdi et al. 2006).

É válido ressaltar que, para a hidrólise eficiente do éster de colesterol pela enzima colesterol esterase, foi necessário usar uma solução de colato de sódio 10 mmol L^{-1} , como solução ativadora da enzima colesterol esterase (Araújo et al. 1999)(Malavolti et al. 1985). Essa solução foi usada inicialmente numa concentração de 1 mmol L^{-1} . Entretanto, os sinais analíticos obtidos eram muito pequenos, próximo dos sinais do ensaio em branco.

Com o objetivo de reduzir ao máximo o volume do padrão e consequentemente o volume das amostras, inicialmente foi feita a otimização do volume do éster de colesterol e, portanto, foram testados os volumes de 25, 50, 75 e $125 \mu\text{L}$, cujos parâmetros fixados foram: 40 mg dL^{-1} da solução padrão de acetato de colesterila, $25 \mu\text{L}$ da solução da enzima CO, $25 \mu\text{L}$ da solução da enzima CE, $50 \mu\text{L}$ da solução de reagente cromogênico, 10 minutos de parada e banho termostático a $45 \text{ }^\circ\text{C}$. O resultado dessa otimização é mostrado na figura 3.2.

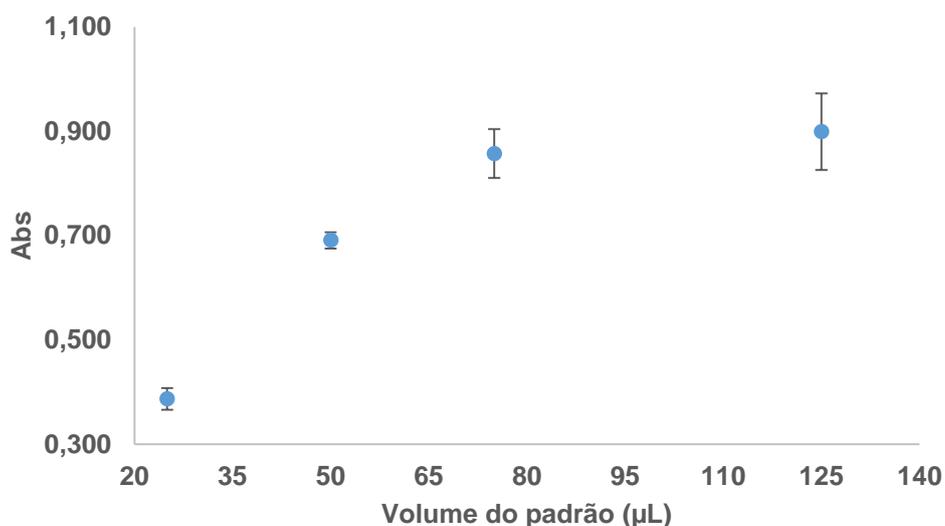


Figura 3. 1. Efeito do volume do padrão sobre a reação para a determinação de colesterol total.

A curva acima, mostra que o aumento do volume do padrão resulta em um aumento significativo do sinal analítico. Esse comportamento era esperado, uma vez que o aumento na quantidade do éster de colesterol resulta numa maior quantidade do produto até que a reação entre em equilíbrio. Embora, os volumes de 75 e 125 µL apresentem uma diferença discreta no sinal, o volume de 75 µL apresenta menor desvio com relação aos ensaios em triplicata, além de envolver menor quantidade. Portanto, o volume de 75 µL foi escolhido como volume ótimo.

Após fixar o volume da solução padrão em 75 µL, a solução de reagente cromogênico foi otimizada levando em consideração cada uma das soluções presente na mesma. A solução da enzima peroxidase foi testada nas concentrações de 18 U mL⁻¹; 36,5 U mL⁻¹; 73 U mL⁻¹; e 146 U mL⁻¹ (figura 3.3).

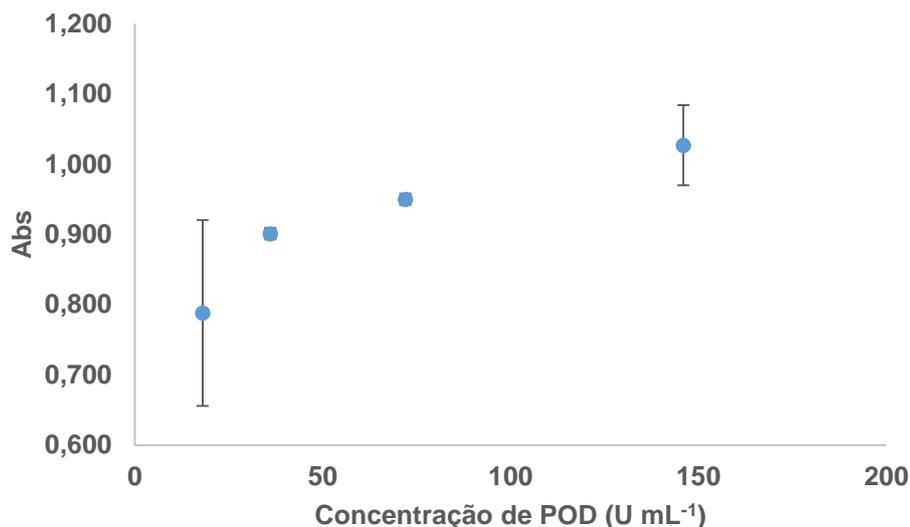


Figura 3. 2. Efeito da concentração da enzima peroxidase sobre a resposta analítica.

Pode-se verificar que o aumento da concentração da enzima peroxidase é diretamente proporcional ao sinal analítico, isso indica que a melhor concentração de POD é 146 U mL^{-1} (Figura 3.3). Esse aumento do sinal analítico refere-se a maior quantidade de produto quando há maior quantidade da solução da enzima POD. No entanto, a redução significativa dessa concentração para $36,5 \text{ U mL}^{-1}$ (4 vezes) observa-se uma diminuição do sinal analítico em poucas unidades de absorbância. Portanto, quando essa concentração é usada, a perda de sinal será compensada pela redução significativa do consumo do reagente. E para tal, considerou-se essa concentração como valor ótimo.

Depois de fixada a concentração da enzima POD em $36,5 \text{ U mL}^{-1}$, além do volume da solução do padrão de acetato de colesterila em $75 \mu\text{L}$, testou-se a concentração da solução de 4- aminoantipirina (4-AAP), que compõe o reagente cromogênico. As concentrações testadas foram: 1%; 1,76%; e 2,5%, como pode-se observar na figura 3.4.

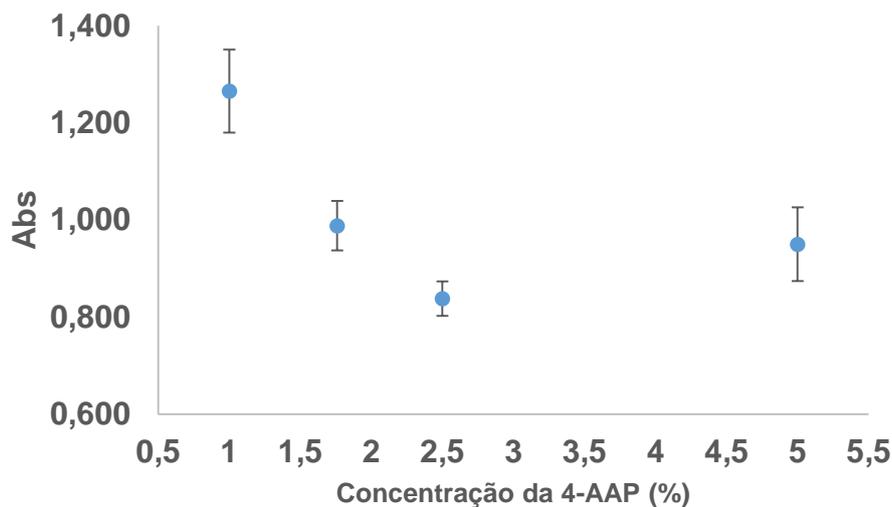


Figura 3. 3. Efeito da concentração da 4-AAP sobre o sinal analítico.

A concentração da 4-AAP é inversamente proporcional ao sinal analítico, ou seja, quanto maior a concentração dessa solução no reagente cromogênico, menor será o sinal analítico. Esse comportamento pode ser atribuído a algum efeito inibidor da 4-AAP sobre as enzimas CO, CE e/ou POD, entretanto é necessário que se faça uma pesquisa mais avançada sobre o assunto, uma vez não há estudos na literatura que justifiquem esse comportamento. Levando em consideração que o maior sinal possui um maior desvio, a escolha da concentração intermediária, 1,76%, prevaleceu sobre as outras concentrações testadas.

Levando em consideração a solubilidade do fenol em água (8,0 g/100mL) (Martins, Lopes, and De Andrade 2013), preferiu-se manter a concentração de fenol em 6% (v/v).

Para finalizar a otimização do reagente cromogênico, variou-se o volume deste em 10, 20, 25 e 30 μL , cuja composição era de 4-AAP 1,76% (m/v), fenol 6% (v/v) e POD 36 U mL^{-1} (0,75: 1: 1) (figura 3.5).

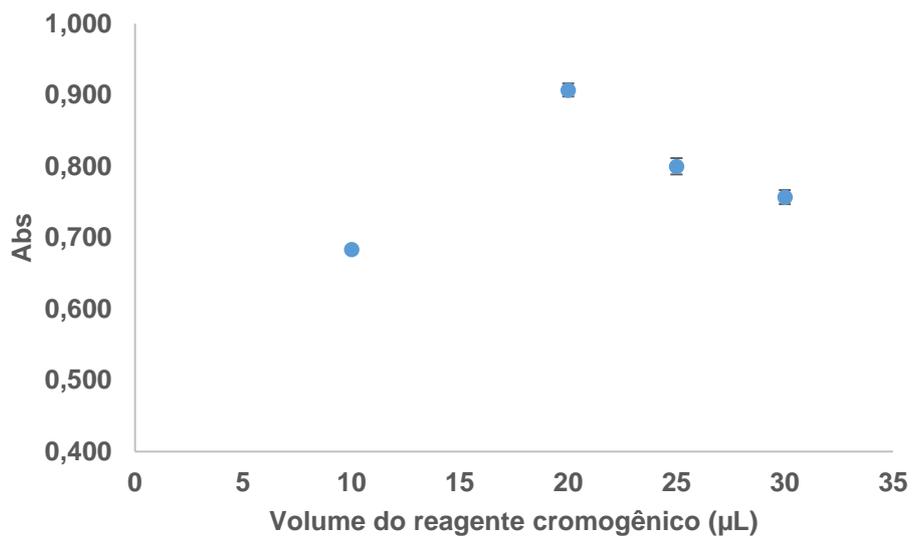


Figura 3. 4. Efeito da variação do volume do reagente cromogênico sobre o sinal analítico.

Considerando os valores de absorvância obtidos, observa-se que o maior sinal se refere ao volume de 20 µL da solução de reagente cromogênico. Esse valor foi escolhido como ótimo, uma vez que apresentou melhores resultados.

O volume da enzima colesterol oxidase também foi otimizado, mantendo fixa a concentração da enzima em 2 U mL⁻¹. Foram testados os volumes de 25, 50, 75, 100, 125 e 150 µL e a cuja curva obtida é apresentada na figura 3.6.

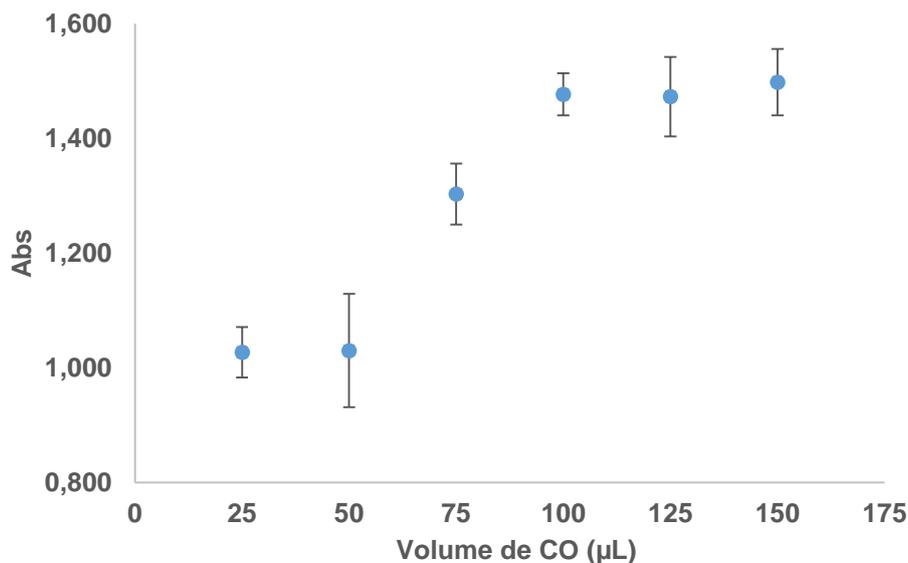


Figura 3. 5. Efeito do volume da enzima colesterol oxidase sobre o sinal analítico.

Baseado na Figura 3.6, pode-se constatar que o aumento do sinal foi praticamente linear até a volume de 100 µL, após esse valor um aumento da enzima disponível não conduz a incremento de sinal uma vez que esta já se encontra em excesso. Observa-se assim que não há aumento de formação de produto da reação e, portanto, o menor volume de enzima CO, que resulta num maior sinal analítico é de 100 µL.

Os sinais analíticos obtidos, embora apresentando um valor máximo definido, eram irregulares na subida e descida, denunciando uma deficiente mistura em virtude do número de zonas a sobrepor. Assim, e considerando todos os estudos efetuados, foram reduzidos todos os volumes tanto para os reagentes, quanto para as amostras, tendo-se adicionalmente subdividido estes em 2 porções. Os volumes adotados foram 20 µL de reagente de cor, 10 µL das enzimas oxidase e peroxidase, e 10 µL da solução padrão. O produto obtido diminuiu apenas ligeiramente, dada a eficácia da mistura entre os volumes usados, tendo sido apenas necessário estudar o volume e concentração da enzima colesterol oxidase.

Como o volume escolhido é grande quando se tem em mente a dispersão do sistema e, conseqüentemente, a mistura entre os reagentes, foi-se testado volumes menores cujas concentrações de colesterol oxidase foram aumentadas.

Os testes foram feitos com concentrações de 1, 2 e 4 U mL⁻¹ com os volumes de 10 e 12,5 µL (figura 3.7).

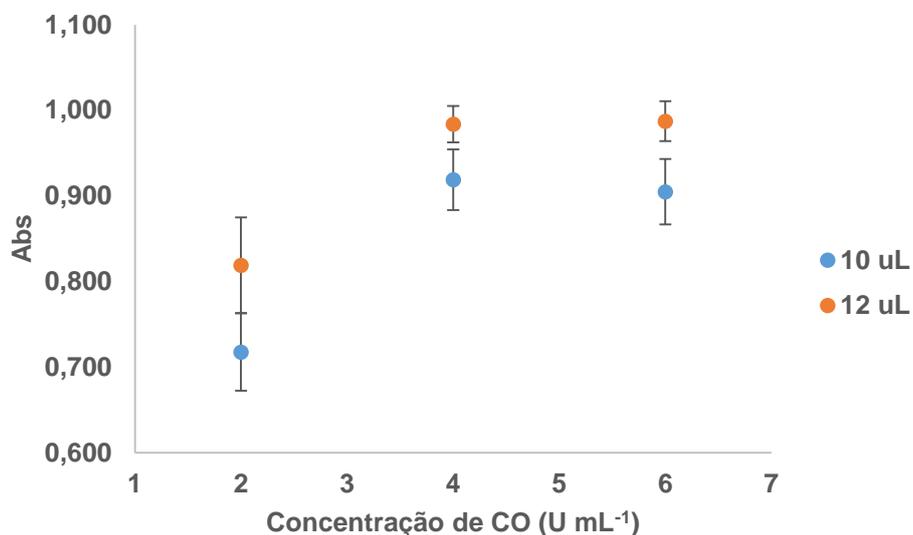


Figura 3. 6. Efeito do volume da enzima colesterol oxidase sobre o sinal analítico.

Pode-se verificar na Figura 3.7, que para os dois volumes de colesterol oxidase testados, a concentração da enzima influencia no sinal analítico de forma positiva, e que o volume de 12 µL com concentração de 4 U mL⁻¹ possui os melhores resultados. Entretanto, nesse trabalho, procurou-se os menores volumes cujos sinais analíticos eram suficientes para a análise e, portanto, o volume de 10 µL com concentração de 4 U mL⁻¹ foi considerado ótimo.

Embora os volumes de todos os reagentes já estivessem definidos, a concentração da enzima colesterol esterase estava muito elevada, uma vez que a proposta do trabalho é ir de encontro com os princípios da química verde. Portanto, na tentativa de encontrar a concentração da enzima CE mínima que mantivesse a intensidade do sinal analítico, testou-se as concentrações de 2, 5 e 10 U mL⁻¹ (figura 3.8). Entretanto, essa possibilidade foi descartada ao verificar que, com as menores concentrações testadas da enzima CE, o sinal analítico

diminuiu significativamente quando comparado aquele cuja concentração é de 10 U mL^{-1} e, portanto, esta última concentração foi considerada ótima.

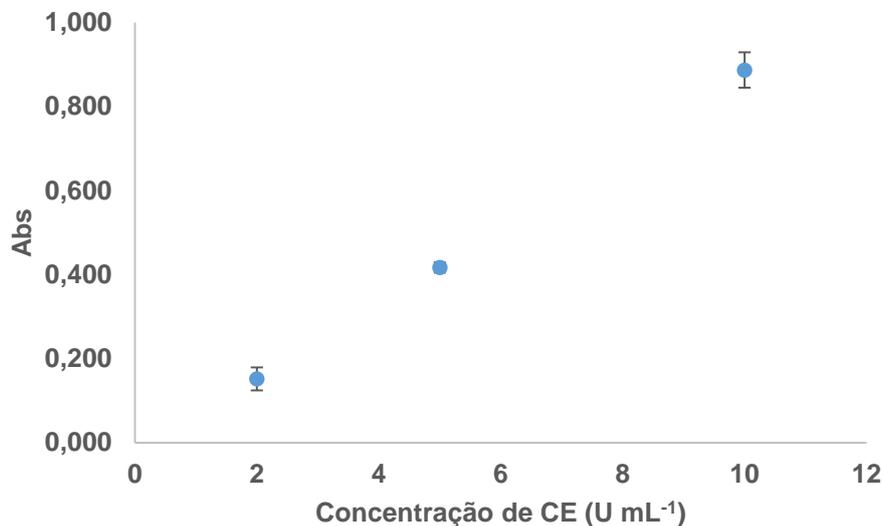


Figura 3. 7. Efeito da concentração da enzima CE sobre o sinal analítico.

O método proposto possui uma etapa de fluxo parado considerado alto para essa reação, de 10 minutos, portanto, esse tempo de paragem também foi testado a fim de aumentar a frequência analítica. Os tempos de 5, 6, 7 e 10 minutos foram testados. Através da representação gráfica dos dados adquiridos para os diferentes tempos de reação (Figura 3.9) foi possível verificar-se o aumento do sinal analítico quanto maior o tempo de reação. Entretanto, o tempo de 6 minutos possui uma perda de sensibilidade em aproximadamente 12% em relação ao tempo de 10 minutos, que é compensada com o aumento da frequência analítica em aproximadamente 40%, portanto, o tempo de 6 minutos foi considerado ótimo.

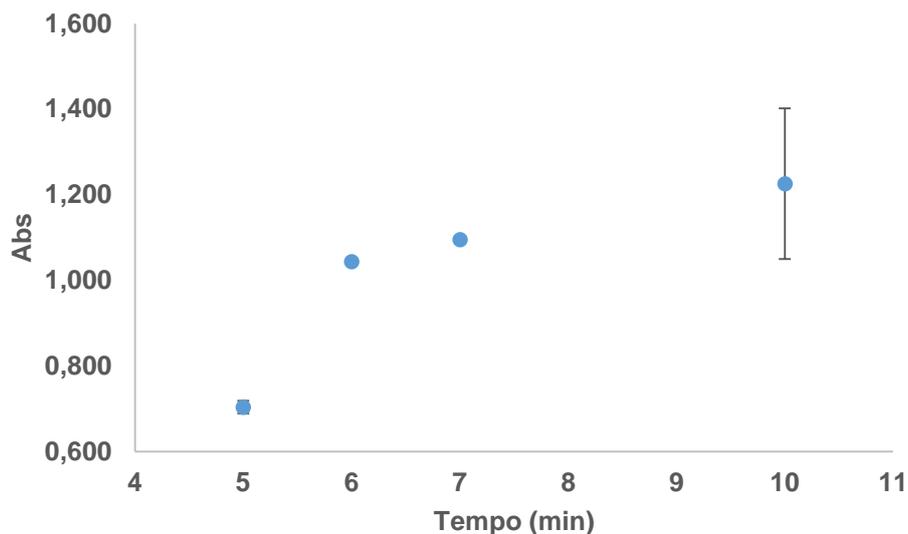


Figura 3. 8. Efeito do tempo de paragem sobre o sinal analítico.

Em SIA, a ordem de aspiração das soluções influencia o grau de interdispersão das mesmas, no qual afeta significativamente a forma e a intensidade do sinal resultante da mistura (Cerdà 2006). Assim, com os volumes, as concentrações e o tempo de paragem definidos, testou-se também, a ordem de aspiração das soluções da seguinte forma: todas as soluções aspiradas em alíquotas fracionadas e todas as soluções em alíquotas únicas.

Verificou-se que com a aspiração das soluções em alíquotas únicas, eram obtidos picos duplos, remetendo uma má sobreposição das zonas de reagentes. No entanto, ao separar as alíquotas aspiradas, o pico obtido tinha uma forma bem definida, remetendo uma melhor mistura das zonas de reagentes.

Procedeu-se, também, à avaliação do efeito da temperatura sobre a cinética da reação enzimática. Para este estudo, variou-se a temperatura do banho até 50°C. Observou-se um aumento da intensidade dos sinais analíticos, desde a temperatura ambiente até aos 45°C. Para temperaturas superiores verificava-se a formação de bolhas de ar, que originavam sinais analíticos pouco reprodutíveis.

3.3. Características Analíticas do Sistema SIA/LOV Desenvolvido

Após determinar todos os parâmetros para o método proposto, fez-se a determinação das características analíticas do sistema desenvolvido. Foram determinados a faixa linear de trabalho, os limites de detecção e quantificação, o ritmo de amostragem e a repetibilidade do método.

O intervalo de concentrações, em que existe uma relação linear entre as concentrações do analito e a absorbância, foi definido através do traçado de curvas de calibração, com soluções padrão de concentrações crescentes de acetato de colessterila.

A curva de calibração usada para o cálculo das concentrações das amostras é apresentada na figura 3.10. Este método possui linearidade até concentrações de acetato de colessterila 40 mg dL^{-1} e a curva de calibração estabelecida após a otimização dos parâmetros é descrita pela equação da reta: intensidade de absorbância = $(16,8 \pm 0,8) \times$ concentração de colesterol livre (mg dL^{-1}) - $(0,11 \pm 0,02)$, com $R^2 = 0,9981$, considerando um intervalo de confiança de 95% para a ordenada na origem e o declive.

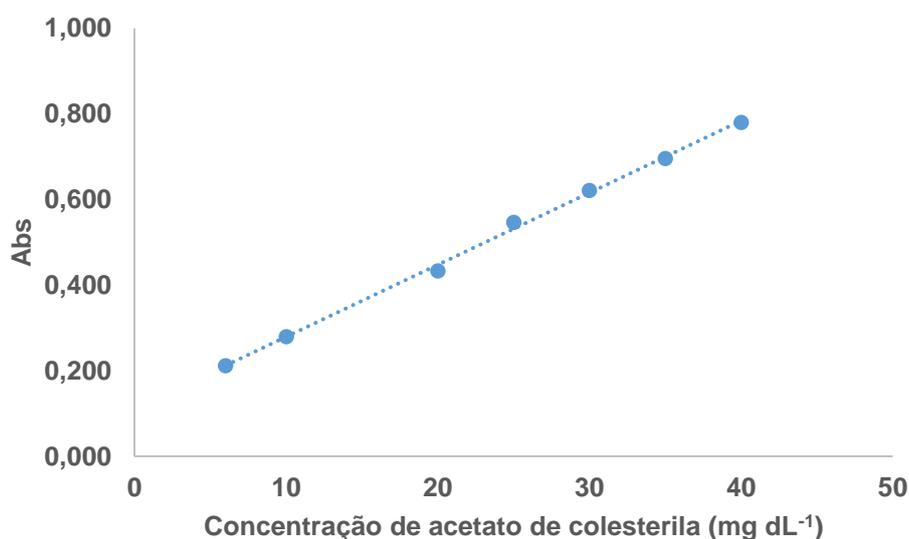


Figura 3. 9. Curva analítica de calibração

A repetibilidade da metodologia proposta foi avaliada em termos de desvio padrão relativo (RSD). Esse teste foi feito usando uma solução do padrão de

acetato de colesterila 20 mg dL^{-1} em dez ciclos e a absorvância obtida em cada um deles foi interpolada na curva de calibração de forma a obter a concentração correspondente. Em seguida, foram calculados a média e o desvio padrão das concentrações e, com estes valores, determinou-se RSD. O valor calculado do RSD foi de 3,60 % a partir da análise repetida ($n=10$). Desta forma, verificou-se uma boa repetibilidade do sistema e confirmou-se a aplicabilidade deste na determinação de colesterol total. Por sua vez, a reprodutibilidade deste método também foi testada, efetuando a mesma análise repetida anteriormente em 3 dias diferentes, que resultou num RSD $< 1\%$.

O limite de detecção foi calculado interpolando na curva de calibração o valor de absorvância correspondente ao sinal do branco com a adição de três vezes o desvio padrão foi de $2,3 \text{ mg dL}^{-1}$. O limite de quantificação foi obtido por interpolação dos sinais do branco na curva de calibração, somado a dez vezes o respetivo desvio padrão, cujo valor foi de $5,9 \text{ mg dL}^{-1}$.

O ritmo de amostragem foi de cerca de 7 determinações por hora. O seu cálculo foi feito, tendo em conta o tempo necessário para a realização de cada operação do ciclo analítico, nomeadamente a aspiração da amostra e reagentes para o tubo de armazenamento, a propulsão do fluxo no sentido do detector e o período de paragem de fluxo.

3.4. Aplicação da Metodologia à Análise de Amostras de Referência de Soro Sanguíneo

Após a determinação de todos os parâmetros e as características da metodologia proposta, fez-se necessário avaliar o método aplicando em amostras de soro de referência. Foram utilizadas amostras de referência ABX Pentra N Control de dois lotes diferentes, cujas concentrações da solução estoque eram de 98 mg dL^{-1} para o lote denominado como 01; e 107 mg dL^{-1} para o lote denominado 02. Essas soluções estoque foram diluídas em concentrações na faixa de $20\text{-}40 \text{ mg dL}^{-1}$, analisadas como amostras utilizando o método proposto e interpoladas na reta da curva de calibração. Os resultados são mostrados na tabela 3.1.

Tabela 3.1. Resultados da aplicação do método proposto em amostras de soro de referência

Amostra	Concentração teórica (mg dL⁻¹)	Concentração obtida calculada (mg dL⁻¹)	Erro (%)
1	20,00	20,90 ± 0,12	4,694
2	25,00	24,20 ± 0,14	3,054
3	30,00	29,90 ± 0,41	0,130
4	35,00	36,80 ± 0,06	5,237
5	40,00	40,40 ± 0,02	1,144

As concentrações teóricas das amostras de referência de soro foram escolhidas de modo que todas estivessem dentro da faixa linear de trabalho. A análise dos resultados, das diferentes amostras de referência, mostra baixos desvios e o erro está dentro do limite de intervalo aceitável ($\pm 5\%$).

4. CONCLUSÕES

Neste trabalho demonstrou-se a aplicabilidade dos sistemas baseados na técnica de análise por injeção sequencial, SIA, com o módulo de análise lab-on-valve (LOV), na implementação de um método automatizado para a determinação de colesterol total em amostras de soro sanguíneo, através de reações enzimáticas.

A metodologia desenvolvida é automática e econômica, incorporando equipamentos relativamente simples e com controle informático de fácil entendimento. Essa metodologia permite cerca de 7 determinações por hora de forma reprodutível, com consumo reduzido de reagentes (na faixa de μL) e baixa produção de resíduos, 675 μL por determinação. Portanto o método desenvolvido vai de encontro aos princípios da “Química Verde”.

O uso do sistema SIA/LOV e das suas propriedades, nomeadamente o controle rigoroso na manipulação das soluções, devido à minimização da intervenção humana, resultou numa metodologia reprodutível e repetível.

E, portanto, a metodologia proposta neste trabalho pode ser aplicada em amostras reais, fazendo as necessárias diluições, para que se enquadrem no intervalo de linearidade da metodologia. Entretanto, a faixa linear de trabalho e a sensibilidade do método podem ser alteradas, para tanto é necessário a modificação de alguns parâmetros, por exemplo, o aumento do tempo de reação, o aumento da concentração das enzimas ou até mesmo, fazer um estudo com vários reagentes cromogênicos.

A metodologia desenvolvida apresenta condições para ser considerada num laboratório de controle de qualidade, permitindo efetuar, com reprodutibilidade, economia de reagentes e custos, a quantificação de colesterol total em soro, assegurando assim que as amostras se encontrem abaixo dos limites legais em vigor.

O presente trabalho, além de agregar todo o conhecimento citado, deixa como perspectivas futuras o estudo, para a aplicação desse método, na quantificação do colesterol LDL e HDL.

5. REFERÊNCIAS

- Aggarwal, V., J. Malik, A. Prashant, P. K. Jaiwal, And C. S. Pundir. 2016. "Amperometric Determination Of Serum Total Cholesterol With Nanoparticles Of Cholesterol Esterase And Cholesterol Oxidase." *Analytical Biochemistry* 500:6–11. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2016.01.019>).
- Albertús, F., B. Horstkotte, A. Cladera, And V. Cerdá. 1999. "A Robust Multisyringe System For Process Flow Analysis. Part I. On-Line Dilution And Single Point Titration Of Protolytes." *Analyst* 124(9):1373–81.
- Araújo, Alberto N., José A. M. Catita, And José L. F. C. Lima. 1999. "Monosegmented Flow-Analysis Of Serum Cholesterol." *Farmaco* 54(1–2):51–55.
- Brown, H. H., Albert Zlatkis, Bennie Zak, And A. J. Boyle. 1954. "Rapid Procedure For Determination Of Free Serum Cholesterol." *Analytical Chemistry* 26(2):397–99. Retrieved (<http://pubs.acs.org/cgi-bin/doilookup/?10.1021/ac60086a034>).
- Burke, R. W., B. I. Diamondstone, R. A. Velapoldi, And O. Menis. 1974. "Mechanisms Of The Liebermann Burchard And Zak Color Reactions For Cholesterol." *Clinical Chemistry* 20(7):794–801.
- Butler, L. R. P., K. Laqua, And A. Strasheim. 1986. "Nomenclature, Symbols, Units And Their Usage In Spectrochemical Analysis—V Radiation Sources." *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy* 41(5):507–44.
- Cerdà, Víctor. 2006. *Introducción A Los Métodos De Análisis En Flujo*. Palma De Maiorca.
- Christian, G. D. 1994. "Sequential Injection-Analysis For Electrochemical Measurements And Process Analysis." *Analyst* 119(11):2309–14.
- Connor, William E. And Sonja L. Connor. 2002. "Dietary Cholesterol And Coronary Heart Disease." *Current Atherosclerosis Reports* 4(6):425–32. Retrieved (<http://link.springer.com/10.1007/s11883-002-0046-y>).
- Costa, Diana, Marieta Passos, And Maria Lúcia Saraiva. 2015. "Projeto Diana: Desenvolvimento De Um Método Automático Baseado No Sistema

- psia-Lov Para A Avaliação Da Atividade Da Peroxidase.”
- Costa, Guilherme Hideki Yoshizane. 2015. “Estudo Da Ação De Poliânions Sobre A Atividade Das Enzimas Colesterol Esterase E Colesterol Oxidase, Utilizando Lipoproteínas Plasmáticas Como Substratos.”
 - Doles. 2000. “Colesterol Enz. Líquido.” (X):1–2.
 - Doutorado, Tese De And Porto Alegre. 2007. “Polimorfismo Da Apolipoproteína C-ii (Apoc-ii) E Níveis De Triacilgliceróis Em Japoneses Residentes Leandro Parzianello No Sul Do Brasil Leandro Parzianello.”
 - Feleke, Abisake. 2006. “Determination Of Cholesterol In Foods By Flow Injection Analysis With Perroxyoxalate.”
 - Fernández-Romero, J. M., M. D. L. De Castro, And M. Valcárcel. 1987. “Determination Of Total Cholesterol In Serum By Flow Injection Analysis With Immobilized Enzymes.” *Clinica Chimica Acta* 167(1):97–104.
 - Fernandez-Romero, J. M., M. D. Luque De Castro, And M. Valcarcel. 1987. “Enzymatic Determination Of Total Cholesterol In Serum By Flow Injection Analysis.” *Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis* 5(4):333–40. Retrieved (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16867502>).
 - Fortes, Paula Regina. 2010. “Sistemas De Análises Químicas Em Fluxo Explorando Mecanismos De Re- Alimentação , Calibração Multivariada E Outras Abordagens Para Melhoria Em Desempenho Sistemas De Análises Químicas Em Fluxo Explorando Mecanismos De Re- Alimentação , Calibração Multivar.”
 - Fundamentals, Demonstrating T. H. E., Limitations Of, And Sequential Injection. 2008. “Demonstrando Os Fundamentos, Potencialidades E Limitações Da Análise Por Injeção Seqüencial Jorge Cesar Masini.” 31(3):704–8.
 - Gupta, Vinod Kumar, P. Norouzi, H. Ganjali, F. Faridbod, And M. R. Ganjali. 2013. “Flow Injection Analysis Of Cholesterol Using Fft Admittance Voltammetric Biosensor Based On Mwcnt-Zno Nanoparticles.” *Electrochimica Acta* 100:29–34. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.electacta.2013.03.118>).
 - Hmos, Queen’S Printer And Controller Of. 2008. “Colesterol.” Nhs

Choices 1–4.

- Hojo, Kazuhiro Et Al. 2007. “Determination Of Total Cholesterol In Serum By High-Performance Liquid Chromatography With Electrochemical Detection.” *Journal Of Chromatography A* 1166(1–2):135–41.
- Hojo, Kazuhiro, Hideki Hakamata, And Fumiyo Kusu. 2011. “Simultaneous Determination Of Serum Lathosterol And Cholesterol By Semi-Micro High-Performance Liquid Chromatography With Electrochemical Detection.” *Journal Of Chromatography B: Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences* 879(11–12):751–55. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2011.02.017>).
- Huang, Yong Et Al. 2017. “Ultrasensitive Cholesterol Biosensor Based On Enzymatic Silver Deposition On Gold Nanoparticles Modified Screen-Printed Carbon Electrode.” *Materials Science And Engineering C* 77:1–8. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.253>).
- José Martínez Calatayud. 2003. *Flow Injection Analysis Of Pharmaceuticals Automation In The Laboratory*.
- Karlberg, Bo And Gil E. Pacey. 1989. *Flow Injection Analysis A Practical Guide*.
- Karube, Isao, Hideaki Matsuoka, Shuiclii Suzuki, And Kenji Hara. 1982. “Amperometric Determination Of Cholesterol In Serum With Use Of Immobilized Cholesterol Esterase And Cholesterol Oxidase.” *Analytica Chimica Acta* 139:127–32.
- Keys, Ancel, Joseph Anderson, And Francisco Grande. 1957. “Prediction Of Serum-Cholesterol Responses Of Man To Changes In Fats In The Diet.” *The Lancet* 270(7003):959–66. Retrieved (http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673657919980%5cnhttp://www.sciencedirect.com.offcampus.lib.washington.edu/science/article/pii/S0140673657919980%5cnhttp://www.sciencedirect.com.offcampus.lib.washington.edu/science?_ob=miamiimageurl&_c).
- Krug, A., A. A. Suleiman, G. G. Guilbault, And R. Kellner. 1992. “Colorimetric Determination Of Free And Total Cholesterol By Flow Injection Analysis With A Fiber Optic Detector.” *Enzyme And Microbial Technology* 14(4):313–16. Retrieved

(<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/014102299290157j>).

- Krug, Achim, Roman Göbel, And Robert Kellner. 1994. "Flow-Injection Analysis For Total Cholesterol With Photometric Detection." *Analytica Chimica Acta* 287(1–2):59–64.
- Laboratórios Gold Analisa. 2012. "Determinação De Colesterol - Informe Técnico." 2.
- Lapa, Rui A. S., José L. F. C. Lima, Boaventura F. Reis, João L. M. Santos, And Elias A. G. Zagatto. 2002. "Multi-Pumping In Flow Analysis: Concepts, Instrumentation, Potentialities." *Analytica Chimica Acta* 466(1):125–32.
- Lehninger, A. L., D. Nelson, And M. Cox. 2009. "Princípios De Bioquímica, Sarvier." São Paulo 280–300.
- Leonard Skeggs. 1957. "An Automatic Method For Colorimetric Analysis." 28(36).
- Li, Zhigang Et Al. 2017. "Reagent-Free Simultaneous Determination Of Glucose And Cholesterol In Whole Blood By Ftir-Atr." *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular And Biomolecular Spectroscopy* 178:192–97.
- Lukkari, Ingrid, Jaromir Ruzicka, And Gary D. Christian. 1993. "Determination Of Total Ammonium-Nitrogen And Free Ammonia In A Fermentation Medium By Sequential Injection Analysis *." 813–18.
- Lundback, Hans, Gillis Johansson, And Olle Holst. 1983. "Determination Of Cholesterol With A Laboratory-Built Chemiluminescence System." 155:47–56.
- Malavolti, Nathan L., Timothy A. Nieman, And David Pilosof. 1985. "Determination Of Cholesterol With A Microporous Membrane Chemiluminescence Cell With Cholesterol Oxidase In Solution." *Analytica Chimica Acta* 170:199–207.
- Marshall, Graham D. And Jacobus F. Van Staden. 1992. "Instrumentation Science & Technology Computer-Aided Flow- Analysis For Laboratory Use And Process Analysis." (December 2014):37–41.
- Martins, Cláudia Rocha, Wilson Araújo Lopes, And Jailson Bittencourt De Andrade. 2013. "Solubilidade Das Substâncias Orgânicas." *Quimica Nova* 36(8):1248–55.
- Matheus, Juliana Pereira. 2013. "Biossíntese De Colesterol."

- Melchert, Wanessa R., Boaventura F. Reis, And Fábio R. P. Rocha. 2012. "Green Chemistry And The Evolution Of Flow Analysis. A Review." *Analytica Chimica Acta* 714:8–19. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.044>).
- Miguel, Nuno And Ferreira Lima. 2012. "Automatização Da Extração E Quantificação Da Melamina Em Amostras Alimentares Lácteas . Automatização Da Extração E Quantificação Da Melamina Em Amostras Alimentares Lácteas ."
- Morgan, A. E., K. M. Mooney, S. J. Wilkinson, N. A. Pickles, And M. T. McAuley. 2016. "Cholesterol Metabolism: A Review Of How Ageing Disrupts The Biological Mechanisms Responsible For Its Regulation." *Ageing Research Reviews* 27:108–24. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2016.03.008>).
- Pires, Cherrine K., Boaventura F. Reis, Cristiane X. Galhardo, And Patrícia B. Martelli. 2003. "A Multicommuted Flow Procedure For The Determination Of Cholesterol In Animal Blood Serum By Chemiluminescence." *Analytical Letters* 36(14):3011–24. Retrieved (<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0345528214&partnerid=tzotx3y1>).
- Pundir, C. S. 2003. "Co-Immobilization Of Cholesterol Esterase, Cholesterol Oxidase And Peroxidase Onto Alkylamine Glass Beads For Measurement Of Total Cholesterol In Serum." *Current Applied Physics* 3(2–3):129–33.
- Qureshi, Rashid Nazir, Erwin Kaal, Hans-Gerd Janssen, Peter J. Schoenmakers, And Wim Th. Kok. 2011. "Determination Of Cholesterol And Triglycerides In Serum Lipoproteins Using Flow Field-Flow Fractionation Coupled To Gas Chromatography–Mass Spectrometry." *Analytica Chimica Acta* 706(2):361–66. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000326701100612x>).
- Qureshi, Rashid Nazir, Wim Th Kok, And Peter J. Schoenmakers. 2009. "Fractionation Of Human Serum Lipoproteins And Simultaneous Enzymatic Determination Of Cholesterol And Triglycerides." *Analytica Chimica Acta* 654(1):85–91.

- Rambaldi, Diana Cristina, Pierluigi Reschiglian, Andrea Zattoni, And Christoph Johann. 2009. "Enzymatic Determination Of Cholesterol And Triglycerides In Serum Lipoprotein Profiles By Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation With On-Line, Dual Detection." *Analytica Chimica Acta* 654(1):64–70.
- Ribeiro, Marta F. T., João L. M. Santos, José L. F. C. Lima, Ana C. B. Dias, And Elias A. G. Zagatto. 2005. "Single Reaction Interface In Flow Analysis." *Talanta* 68(2):351–58.
- Richmond, W. 1976. "Use Of Cholesterol Oxidase For Assay Of Total And Free Cholesterol In Serum By Continuous Flow Analysis." *Clinical Chemistry* 22(10):1579–88.
- Rodrigues, Sandra Sofia Mota. 2009. "Modelização Matemática Do Fenómeno De Dispersão Em Sistemas De Fluxo De Interface Única."
- Ruzicka, Jaromir. 2000. "Lab-On-Valve: Universal Microflow Analyzer Based On Sequential And Bead Injection." *The Analyst* 125(6):1053–60. Retrieved (<http://xlink.rsc.org/?doi=b001125h>).
- Ruzicka, Jaromir And Elo Hansen Hansen. 1975. "Flow Injection Analysis. Part I. A New Concept Of Fast Continuous Flow Analysis." *Analytica Chimica Acta* 78(1):145–57.
- Ruzicka, Jaromir And Graham D. Marshall. 1990. "Sequential Injection : A New Concept For Chemical Sensors , Process Analysis And Laboratory Assays." 237:329–43.
- Dos Santos, Allan Cezar Vieira And Jorge Cesar Masini. 2010. "A Análise Por Injeção Sequencial (Sia): Vinte Anos Em Uma Perspectiva Brasileira." *Quimica Nova* 33(9):1949–56.
- Saraiva, Maria Lúcia Marques Ferreira De Sousa. 1999. "Desenvolvimento De Sistemas Baseados Na Análise Por Injeção Sequencial."
- Sigma-Aldrich. N.D. "Enzymatic Assay Of Cholesterol Esterase (Ec 3.1.1.13) Principle: Cholesterol Oleate." 4–7.
- Situmorang, Manihar, Peter W. Alexander, And D.Brynn Hibbert. 1999. "Flow Injection Potentiometry For Enzymatic Assay Of Cholesterol With A Tungsten Electrode Sensor." *Talanta* 49(3):639–49.

- Sozen, Erdi And Nesrin Kartal Ozer. 2017. "Impact Of High Cholesterol And Endoplasmic Reticulum Stress On Metabolic Diseases: An Updated Mini-Review." *Redox Biology* 12(February):456–61. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2213231717300782>).
- Srisawasdi, Pornpen Et Al. 2006. "Application Of Streptomyces And Brevibacterium Cholesterol Oxidase For Total Serum Cholesterol Assay By The Enzymatic Kinetic Method." *Clinica Chimica Acta* 372(1–2):103–11.
- Vakh, Christina Et Al. 2016. "Flow Analysis: A Novel Approach For Classification." *Critical Reviews In Analytical Chemistry* 46(5):374–88. Retrieved (<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408347.2015.108730>).
- Wisitorsaat, A. Et Al. 2010. "Fast Cholesterol Detection Using Flow Injection Microfluidic Device With Functionalized Carbon Nanotubes Based Electrochemical Sensor." *Biosensors And Bioelectronics* 26(4):1514–20. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bios.2010.07.101>).
- Wu, Chao-Hsiang, Louis Scampavia, Jaromir Ruzicka, And Bruce Zamost. 2001. "Micro Sequential Injection: Fermentation Monitoring Of Ammonia, Glycerol, Glucose, And Free Iron Using The Novel Lab-On-Valve System." *The Analyst* 126(3):291–97. Retrieved (<http://xlink.rsc.org/?doi=b009167g>).
- Wybenga, D. R., V. J. Pileggi, P. H. Dirstine, And J. Di Giorgio. 1970. "Direct Manual Determination Of Serum Total Cholesterol With A Single Stable Reagent." *Clinical Chemistry* 16(12):980–84.
- Yao, Toshio, Minoru Sato, Yoshiaki Kobayashi, And Tamotsu Wasa. 1985. "Amperometric Assays Of Total And Free Cholesterols In Serum By The Combined Use Of Immobilized Cholesterol Esterase And Cholesterol Oxidase Reactors And Peroxidase Electrode In A Flow Injection System." *Analytical Biochemistry* 149(2):387–91.
- Yao, Toshio And Tamotsu Wasa. 1988. "Flow-Injection System For Simultaneous Assay Of Free And Total Cholesterol In Blood Serum By Use Of Immobilized Enzymes." 207:319–23.
- Zagatto, Elias A. G. And Carol Collins. 1999. "Classificação E Definição

Dos Métodos De Análises Em Fluxo# (Recomendações - IUPAC 1994).”
Química Nova 22(1):143–46.

- Zhang, Ying, Ya-Ning Wang, Xiao-Ting Sun, Lei Chen, And Zhang-Run Xu. 2017. “Boron Nitride Nanosheet/Cus Nanocomposites As Mimetic Peroxidase For Sensitive Colorimetric Detection Of Cholesterol.” *Sensors And Actuators B: Chemical* 246:118–26. Retrieved (<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0925400517302861>).
- Ziegel, Eric R. 2004. *Statistics And Chemometrics For Analytical Chemistry*. Retrieved (<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1198/tech.2004.s248>).
- Zlatkis, A., B. Zak, And A. J. Boyle. 1953. “A New Method For The Direct Determination Of Serum Cholesterol.” *Journal Of Laboratory And Clinical Medicine* 41(12):486–92. Retrieved (<http://rspa.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rspa.1963.0204>).