

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

Programa de Pós-Graduação em Química

**Diogo Librandi da Rocha**

Desenvolvimento de procedimento analítico  
em fluxo com multicomutação para a determinação  
espectrofotométrica de ácido úrico em urina

São Paulo

Data do Depósito na SPG:  
05/08/2009

DIOGO LIBRANDI DA ROCHA

**Desenvolvimento de procedimento analítico em  
fluxo com multicomutação para a determinação  
espectrofotométrica de ácido úrico em urina**

*Dissertação apresentada ao Instituto de  
Química da Universidade de São Paulo para  
obtenção do Título de Mestre em Química  
(Química Analítica)*

*Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha*

São Paulo  
2009

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

R672d Rocha, Diogo Librandi da  
Desenvolvimento de procedimento analítico em fluxo com  
multicomutação para determinação espectrofotométrica de ácido  
úrico em urina / Diogo Librandi da Rocha. -- São Paulo, 2009.  
100p.

Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade  
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.  
Orientador: Rocha, Fábio Rodrigo Piovezani

1. Análise por injeção em fluxo : Química analítica 2. Análise  
colorimétrica : Química analítica 3. Análise clínica : Medicina  
I. T. II. Rocha, Fábio Rodrigo Piovezani, orientador.

543.08 CDD

Diogo Librandi da Rocha

Desenvolvimento de procedimento analítico em fluxo com multicomutação para a determinação espectrofotométrica de ácido úrico em urina.

*Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Química Analítica.*

Aprovado em: \_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

*Aos meus pais **Ivone e Milton**,  
por transmitirem os bons  
princípios que regem a minha  
vida, com amor e carinho. Nada  
que até hoje se concretizou seria  
possível sem seus incentivos e  
confiança.*

*Ao meu orientador e amigo  
**Prof. Fábio**, por compartilhar  
experiências e conhecimentos.  
Sua competência, dedicação,  
compreensão e paciência são  
admiráveis. Ainda tenho muito a  
aprender com ele, tanto na vida  
acadêmica quanto como ser  
humano.*

*Aos amigos **Wanessa, Mariana, Tatiana, Erlando e Sidnei**, que sempre se dispuseram a ajudar e compartilhar experiências, sem nada pedirem em troca. Tão importante quanto à seriedade no trabalho, foram as risadas nos momentos de descontração.*

*Ao **Carlos Eduardo**, por sua leal amizade, sempre ajudando nos momentos mais difíceis, dizendo as palavras certas. Sua força e determinação são exemplos a serem seguidos. Já o tenho como da família.*



## **AGRADECIMENTOS**

Aos técnicos, docentes, amigos e colegas do IQ-USP, pelos conhecimentos e experiências compartilhados, por todo o auxílio que puderam oferecer e pelos bons momentos que para sempre serão lembrados.

Aos Profs. Drs. Jorge César Masini e Mauro Bertotti pela participação no Exame de Qualificação e pelas sugestões que enriqueceram o trabalho.

Aos Profs. Drs. Maria Encarnación Vázquez Suárez Iha, Nina Coichev e Paulo Celso Isolani pela oportunidade de participar, como monitor, da disciplina de Química Analítica, ministrada para o curso de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (CNPq) pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida através do Programa de Aperfeiçoamento Didático (PAE).

Ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP) e aos seus funcionários.

Aos membros da banca da defesa de mestrado pela disponibilidade e pelos comentários e sugestões apresentados.

## RESUMO

ROCHA, D. L. **Desenvolvimento de procedimento analítico em fluxo com multicomutação para a determinação espectrofotométrica de ácido úrico em urina.** 2009. 100 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2009.

A mecanização de procedimentos analíticos em análises clínicas traz vantagens tais como minimização de erros sistemáticos e do tempo das análises. Sistemas de análises em fluxo com multicomutação apresentam grandes potencialidades nesse sentido, atendendo às necessidades da mecanização de procedimentos analíticos de maneira versátil e robusta. Estes sistemas permitem minimizar o consumo de reagentes e a geração de resíduos, devido ao gerenciamento preciso de pequenos volumes de soluções por dispositivos controlados eletronicamente, tais como microbombas solenoide. O fluxo pulsado proporcionado pelas microbombas e a estratégia da amostragem binária melhoram a mistura entre amostra e reagentes. O ácido úrico é o principal produto final do metabolismo de purinas. A determinação deste analito em amostras de urina apresenta importância clínica, uma vez que sua concentração pode auxiliar no diagnóstico de disfunções no organismo humano, como a gota e o mau funcionamento dos rins. Um procedimento analítico empregando sistema de análises em fluxo com microbombas solenoide foi desenvolvido para a determinação de ácido úrico em amostras de urina. Os íons Cu(II) são reduzidos pelo ácido úrico a íons Cu(I), que podem ser quantificados por espectrofotometria na presença do ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolínico (BQA). Resposta linear foi observada entre 10 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido úrico, sendo a curva analítica representada pela equação  $A=(0,0063\pm 0,0002)C_{\text{AU}} + (0,0285\pm 0,0040)$ ,  $r = 0,999$ , em que  $C_{\text{AU}}$  é a concentração de ácido úrico em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . O limite de detecção foi estimado em 3,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (99,7% de nível de confiança;  $n = 20$ ). O coeficiente de variação foi estimado em 1,2% com 20 medidas de uma solução de ácido úrico 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e a frequência de amostragem foi de 150  $\text{h}^{-1}$ . As principais espécies concomitantes presentes na urina não interferem na determinação de ácido úrico em concentrações até 5 vezes maiores que as usualmente encontradas. Recuperações entre 91 e 112% foram estimadas e os resultados das análises de 4 amostras de urina concordaram com os obtidos pelo procedimento enzimático para a determinação de ácido úrico (95% de nível de confiança). O alto grau de diluição da amostra necessário (100 vezes) minimiza o volume de amostra utilizado e os efeitos de matriz. Uma simples reconfiguração do sistema e a reotimização das frações volumétricas permitiram que a amostra fosse diluída em linha por reamostragem na zona dispersa. Resposta linear foi observada até 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  de ácido úrico, sendo a curva analítica obtida representada pela equação  $A=(0,105\pm 0,001) C_{\text{AU}}' + (0,023\pm 0,003)$ ,  $r=0,999$ , em que  $C_{\text{AU}}'$  é a concentração de ácido úrico em  $\text{mmol L}^{-1}$ . O coeficiente de variação, o limite de detecção e a frequência de amostragem foram estimados em 1,0%, 0,2  $\text{mmol L}^{-1}$  e 95  $\text{h}^{-1}$ , respectivamente. Os resultados da análise de 3 amostras de urina concordaram com os obtidos pelo procedimento enzimático, com nível de confiança de 95%.

Palavras-chave: ácido úrico, urina, multicomutação, análises clínicas.

## ABSTRACT

ROCHA, D. L. **Development of a multicommuted flow-based analytical procedure for the spectrophotometric determination of uric acid in urine.** 2009. 100 p. Masters Thesis – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, 2009.

Mechanization of analytical procedures in clinical analysis brings advantages such as minimization of systematic errors and analysis time. Multicommuted flow systems attain the requirements to mechanization of analytical procedures in a versatile and robust way, minimizing reagent consumption and waste generation, due to the low solution volumes handled by electronically controlled devices, such as solenoid micro-pumps. The pulsed flow characteristic of the micro-pumps and the binary sampling approach improve sample and reagent mixing. Uric acid is the main end product of purine metabolism and its determination in urine shows clinical importance, because its concentration can be related to human organism dysfunctions, such as gout and renal disorders. An analytical procedure employing a flow system with solenoid micro-pumps was developed, aiming the determination of uric acid in urine samples. Cu(II) ions are reduced by uric acid to Cu(I) ions that can be quantified by spectrophotometry in the presence of 2,2'-biquinoline 4,4'-dicarboxylic acid (BCA). Linear analytical response was observed between 10 and 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  uric acid and the analytical curve corresponds to the equation  $A=(0.0063\pm 0.0002) C_{\text{UA}} + (0.0285\pm 0.0040)$ ,  $r = 0.999$ , in which  $C_{\text{UA}}$  is the uric acid concentration in  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . The detection limit was estimated as 3.0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (99.7% confidence level;  $n = 20$ ). The coefficient of variation was estimated in 1.2% with 20 replicates of a 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$  uric acid solution and sampling rate of 150  $\text{h}^{-1}$  was achieved. The main concomitant species does not interfere in uric acid determination in concentrations up to 5-fold higher than that usually found in urine samples. Recoveries from 91 to 112% were estimated and the results for 4 urine samples agreed with those obtained by the commercially available enzymatic kit for determination of uric acid (95% confidence level). The 100-fold sample dilution minimizes sample consumption and matrix effects. A simple system reconfiguration and a re-optimization of volumetric fractions attained on-line sample dilution by zone sampling. Linear response was observed up to 5.0  $\text{mmol L}^{-1}$  uric acid and the analytical curve corresponds to the equation  $A=(0.105\pm 0.001) C_{\text{UA}'} + (0.023\pm 0.003)$ ,  $r = 0.999$ , in which  $C_{\text{UA}'}$  is the uric acid concentration in  $\text{mmol L}^{-1}$ . The coefficient of variation, detection limit and sampling frequency were estimated as 1.0%, 0.2  $\text{mmol L}^{-1}$  and 95  $\text{h}^{-1}$ , respectively. The results of the analysis of 3 urine samples also agreed with those obtained with the enzymatic procedure at the 95% confidence level.

Keywords: uric acid, urine, multicommutation, clinical analysis.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A – Absorbância.

AA – Ácido ascórbico.

AU – Ácido úrico.

4-AP – 4-aminoantipirina.

BQA – 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolinato

CC – Concomitante.

$C_{AU}$  – Concentração de ácido úrico em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

$C_{AU}'$  – Concentração de ácido úrico em  $\text{mmol L}^{-1}$ .

CCD – Dispositivos de carga acoplada (do inglês *Charge-coupled devices*).

CV – Coeficiente de Variação.

DHBS – ácido 3,5-diclorohidroxibenzenosulfônico.

*d.i.* – Diâmetro interno

FIA – Análises por injeção em fluxo (do inglês *Flow Injection Analysis*).

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*).

HPRT – Hipoxantina fosforribosiltransferase.

n – número de replicatas.

NaAc – Acetato de sódio.

$\text{NH}_4\text{Ac}$  – Acetato de amônio

U – Unidades da enzima.

USB – Porta serial universal (do inglês *Universal serial bus*).

UV-vis – Espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta e visível.

XOD – Xantina oxidase.

## Lista de Tabelas

<b>TABELA 1</b> – Características analíticas de alguns procedimentos para a determinação de ácido úrico em amostras biológicas.....	33
<b>TABELA 2</b> – Rotina de acionamento das microbombas solenoide para a determinação de ácido úrico em amostras de urina.....	42
<b>TABELA 3</b> – Rotina de acionamento das microbombas solenoide para a determinação direta de ácido úrico em urina com diluição em linha da amostra.....	45
<b>TABELA 4</b> – Avaliação da estabilidade das soluções de ácido úrico preparadas em meio alcalino ou com aquecimento a 50°C.....	72
<b>TABELA 5</b> – Estudo de adição e recuperação em diferentes amostras de urina.....	75
<b>TABELA 6</b> – Avaliação do efeito de espécies concomitantes sobre o sinal analítico de ácido úrico.....	76
<b>TABELA 7</b> – Variação do sinal analítico referente a soluções contendo ácido úrico com diferentes concentrações de ácido ascórbico.....	78
<b>TABELA 8</b> – Valores das concentrações e incertezas obtidas na determinação de ácido úrico em amostras de urina pelos procedimentos proposto e de referência.....	87

## Lista de Figuras

<b>FIGURA 1</b>	–	Esquema das etapas de atuação de uma microbomba solenoide.....	21
<b>FIGURA 2</b>	–	Distribuição percentual dos trabalhos publicados com a utilização de análises por injeção em fluxo em análises clínicas, de acordo com a natureza das amostras.....	24
<b>FIGURA 3</b>	–	Diagrama do ciclo metabólico de purinas e produção de ácido úrico no organismo humano.....	30
<b>FIGURA 4</b>	–	Diagrama do circuito empregado para o controle das válvulas e microbombas solenoide através de uma das portas paralelas do computador. ....	38
<b>FIGURA 5</b>	–	Formulário principal do programa desenvolvido em Visual Basic 6.0 para controle dos dispositivos ativos do módulo de análises. ....	38
<b>FIGURA 6</b>	–	Fotografia dos equipamentos empregados para medidas espectrofotométricas. ....	39
<b>FIGURA 7</b>	–	Formulário do programa utilizado para aquisição de dados.....	40
<b>FIGURA 8</b>	–	Diagrama do sistema de análises em fluxo empregado para o desenvolvimento do procedimento analítico.....	41
<b>FIGURA 9</b>	–	Diagrama do sistema de análises em fluxo empregado para a diluição em linha da amostra.....	44
<b>FIGURA 10</b>	–	Espectro de absorção do branco analítico.....	49
<b>FIGURA 11</b>	–	Espectro de absorção de uma amostra de urina diluída 100 vezes.....	50
<b>FIGURA 12</b>	–	Espectro de absorção da mistura dos reagentes.....	51
<b>FIGURA 13</b>	–	Estudo cinético com soluções contendo diferentes concentrações de ácido úrico.....	52
<b>FIGURA 14</b>	–	Estudo cinético com soluções contendo diferentes concentrações de íons Cu(I).....	53
<b>FIGURA 15</b>	–	Estudo cinético de soluções contendo ácido úrico, com sinal monitorado em 562 e 750 nm.....	54
<b>FIGURA 16</b>	–	Efeito da concentração de Cu <sup>2+</sup> sobre o sinal analítico e do branco.....	56
<b>FIGURA 17</b>	–	Efeito da concentração de BQA sobre o sinal analítico e do branco.....	57
<b>FIGURA 18</b>	–	Efeito do número de pulsos de Cu(II) sobre o sinal analítico e do branco.....	58
<b>FIGURA 19</b>	–	Efeito do número de pulsos de BQA sobre o sinal analítico e do branco	59
<b>FIGURA 20</b>	–	Efeito do número de pulsos da amostra sobre o sinal analítico e do branco.....	60

<b>FIGURA 21</b> – Efeito do número de ciclos de amostragem sobre o sinal analítico e do branco.....	61
<b>FIGURA 22</b> – Efeito do comprimento do reator sobre o sinal analítico e do branco.....	62
<b>FIGURA 23</b> – Efeito do pH sobre o sinal analítico e do branco.....	63
<b>FIGURA 24</b> – Efeito da concentração de $\text{NH}_4\text{Ac}$ sobre o sinal analítico e do branco....	64
<b>FIGURA 25</b> – Efeito do tempo de parada de fluxo sobre o sinal analítico e do branco..	65
<b>FIGURA 26</b> – Avaliação da estabilidade da linha base utilizando $\text{H}_2\text{O}$ ou $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ $\text{NH}_4\text{OH}$ como transportador.....	67
<b>FIGURA 27</b> – Efeito da concentração de $\text{NH}_4\text{OH}$ sobre o sinal analítico e do branco...	68
<b>FIGURA 28</b> – Sinais transientes e curva analítica para determinação de ácido úrico.....	69
<b>FIGURA 29</b> – Variação do sinal analítico em função do grau de diluição de diferentes tratamentos de uma amostra de urina.....	74
<b>FIGURA 30</b> – Sinais transientes referentes ao branco e solução de ácido úrico com e sem adição de ácido ascórbico.....	78
<b>FIGURA 31</b> – Curva analítica empregando sistema de análises em fluxo com diluição em linha da amostra por reamostragem na zona dispersa, empregando 1 pulso da amostra, 17 pulsos de $\text{NH}_4\text{OH}$ para dispersão.....	81
<b>FIGURA 32</b> – Curva analítica empregando sistema de análises em fluxo com diluição em linha da amostra por reamostragem na zona dispersa, empregando 1 pulso da amostra, 17 pulsos de $\text{NH}_4\text{OH}$ para dispersão e concentrações dos reagentes $\text{CuSO}_4$ e BQA iguais a 4,0 e $10 \text{ mmol L}^{-1}$ .....	82
<b>FIGURA 33</b> – Sinais transientes obtidos com diferentes frações da zona de amostra dispersa, utilizando o sistema em fluxo para diluição em linha da amostra.....	83
<b>FIGURA 34</b> – Curva analítica empregando sistema de análises em fluxo com diluição em linha da amostra por reamostragem na zona dispersa, empregando 1 pulso da amostra, 15 pulsos de $\text{NH}_4\text{OH}$ para dispersão, 2 pulsos de $\text{P}_4$ para a reamostragem e 5 pulsos de cada reagente, com 3 ciclos de amostragem.....	85
<b>FIGURA 35</b> – Sinais transientes obtidos para a construção da curva analítica e para a análise das amostras, empregando o sistema em fluxo após diluição manual.....	86
<b>FIGURA 36</b> – Sinais transientes obtidos para a construção da curva e para a análise direta das amostras (E – G).....	87

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	Análises clínicas.....	16
1.2	Análises por injeção em fluxo.....	19
1.3	Aplicações de sistemas de análises por injeção em fluxo em análises clínicas.....	23
1.4	Ácido úrico: propriedades e importância.....	29
1.5	Determinação de ácido úrico em amostras biológicas.....	32
<b>2</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>38</b>
2.1	Equipamentos e acessórios.....	38
2.2	Reagentes e soluções.....	41
2.3	Estudos preliminares.....	42
2.4	Sistema de análises em fluxo para a determinação de ácido úrico em urina.....	42
2.5	Avaliação da estabilidade das soluções de ácido úrico e preparo das amostras.....	44
2.6	Efeito de espécies concomitantes e estudo de adição e recuperação do analito.....	44
2.7	Determinação direta de ácido úrico em urina com diluição em linha da amostra.....	45
2.8	Procedimento de referência.....	47
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
3.1	Estudos preliminares.....	49
3.1.1	<i>Espectros de absorção das soluções.....</i>	<i>49</i>
3.1.2	<i>Efeito da ordem de adição dos reagentes.....</i>	<i>50</i>
3.1.3	<i>Estudos cinéticos.....</i>	<i>52</i>
3.2	Otimização do sistema de análises em fluxo.....	55
3.3	Características analíticas.....	69



3.4	Estabilidade das soluções de ácido úrico.....	71
3.5	Preparo das amostras de urina.....	73
3.6	Estudos de adição e recuperação do analito e avaliação de espécies concomitantes.....	75
3.7	Diluição em linha da amostra para a determinação direta de ácido úrico	80
3.8	Comparação com procedimento de referência.....	86
4	CONCLUSÕES.....	89
5	REFERÊNCIAS.....	91

1

*Introdução*

## 1.1 Análises clínicas

As análises clínicas se destacam devido à grande importância perante a sociedade. A partir de diagnósticos clínicos, a escolha, aplicação e monitoramento de tratamentos médicos são realizados, além de fornecer prognósticos e confirmar suspeitas sobre o desenvolvimento de patologias, mesmo na ausência de sintomas<sup>1</sup>.

Atualmente, a demanda por análises é alta em laboratórios clínicos, devido à maior disponibilidade de procedimentos para análises de diversas espécies de interesse, à menor taxa de mortalidade de pacientes em função de enfermidades, que requer maior número de testes para assegurar a boa saúde desses indivíduos, e à necessidade de se obter resultados em curto intervalo de tempo para auxiliar nas avaliações médicas<sup>1</sup>. Esta demanda motiva a mecanização de procedimentos, pois etapas cansativas e repetitivas geralmente estão envolvidas no preparo e análise das amostras, induzindo o analista a cometer erros que implicam na perda de precisão e de exatidão dos resultados<sup>2,3</sup>.

Além de minimizar a variabilidade dos resultados, a mecanização das análises clínicas permite que sejam empregados sistemas nos quais diversas espécies podem ser analisadas sem nenhuma ou com mínima reconfiguração. Muitos laboratórios de pequeno porte cresceram com a utilização de sistemas mecanizados, devido à redução de custos operacionais e à diminuição do tempo requerido para a obtenção dos resultados<sup>1</sup>.

Os analisadores de fluxo segmentado, originalmente propostos por Skeggs<sup>4</sup>, foram empregados no final da década de 60 em uma das propostas pioneiras de mecanização<sup>5</sup>. Porém, a complexidade, baixa versatilidade e acúmulo de resíduos nas paredes dos tubos, que causava *carryover* entre os segmentos, fizeram com que estes analisadores fossem substituídos por analisadores centrífugos na grande maioria dos laboratórios de análises clínicas<sup>5</sup>. Estes instrumentos armazenam reagentes e amostras, que podem ser identificadas com códigos de barras<sup>1</sup>, definindo as análises a serem realizadas. As soluções são aspiradas

através de dispositivos mecanizados e dispensadas em frascos ou cubetas posicionados de forma concêntrica em um disco da centrífuga. Nesses recipientes, as reações se desenvolvem, sendo a rotação do disco responsável pela homogeneização das misturas. Simultaneamente, um sistema de detecção (usualmente fotométrico) realiza as medidas analíticas. Em seguida, o *software* do instrumento faz as conversões necessárias para valores de concentração. Entre as análises, os dispositivos que aspiram as soluções são submetidos a uma etapa de limpeza para que não ocorram contaminações<sup>6</sup>.

Apesar de realizar diluições, alguns analisadores não permitem que determinações diretas sejam realizadas com volumes pequenos de amostra, porque mesmo após a adição dos reagentes, a mistura não atingirá o volume mínimo necessário na cubeta para que o feixe de radiação incida sobre a solução. Além disso, a cada ciclo de análises, uma grande quantidade de frascos é lavada e seca, consumindo tempo que poderia ser utilizado para análises. Se os recipientes forem descartáveis, uma grande quantidade de descarte com resíduos biológicos é gerada. Por outro lado, o risco de contaminação das amostras é minimizado nestes analisadores, uma vez que cada amostra é processada em um compartimento separado.

Alguns sistemas mecanizados, como os analisadores centrífugos, exigem grande espaço físico dentro do laboratório. A miniaturização de sistemas em laboratórios clínicos também é visada, não somente em função da limitação do espaço físico, mas também da possibilidade de realizar análises em casos de emergência dentro de quartos ou enfermarias de hospitais. Unidades portáteis possibilitam a rápida obtenção de resultados, além de minimizar o risco de contaminações ou de degradação das espécies durante o transporte e armazenamento das amostras.

A complexidade das amostras também é uma dificuldade enfrentada em análises clínicas<sup>2</sup>. Em vista do grande número de espécies presentes na urina, plasma, líquido espinhal e em outros fluidos biológicos, são comuns as interferências de espécies concomitantes e

efeitos de matriz. Sendo assim, estratégias devem ser adotadas para minimizar estes efeitos na quantificação dos analitos. O emprego de enzimas é a estratégia mais usual para melhorar a seletividade de procedimentos analíticos, como na determinação de citrato em amostras de urina<sup>7</sup>. O alto custo de algumas enzimas é uma dificuldade que pode ser parcialmente superada com a imobilização em um suporte apropriado. Além da reutilização, essa estratégia permite que um maior número de unidades de enzima entre em contato com a amostra quando comparado à adição do reagente em solução<sup>8</sup>. Por outro lado, muitos procedimentos enzimáticos apresentam desvantagens quanto à estabilidade das enzimas, que devem ser armazenadas sob refrigeração e/ou requerem a adição de reagentes estabilizadores. A temperatura e o pH de reações enzimáticas devem ser rigorosamente controlados, pois mínimas variações destes parâmetros podem alterar a atividade da enzima e, por consequência, o desenvolvimento da reação enzimática. Portanto, o emprego de enzimas exige, usualmente, banhos termostatizados, o que aumenta a complexidade dos procedimentos.

O volume que pode ser coletado de alguns fluidos, como sangue, líquido espinhal e saliva, é limitado<sup>9</sup>. Sendo assim, é necessário que seja consumido o menor volume possível de amostra, o que exige o emprego de procedimentos suficientemente sensíveis para as análises. A utilização de volumes pequenos de amostras cuja disponibilidade não é tão limitada (*e.g.* urina) também é importante para reduzir o volume gerado de resíduos biológicos. Uma das desvantagens atribuídas à utilização de volumes tão pequenos de amostras é a maior suscetibilidade a erros durante as operações analíticas, como transferência da amostra do recipiente de coleta para sistemas de tratamento ou de análise.

Os aspectos mencionados nos parágrafos anteriores ressaltam que há uma constante necessidade de se desenvolver ou incrementar procedimentos analíticos em análises clínicas, visando superar as dificuldades existentes, tornando os procedimentos mais rápidos e

seletivos, minimizando o consumo de amostras, reagentes e a geração de resíduos. Grande parte destas dificuldades pode ser superada com a utilização de sistemas de análises em fluxo.

## **1.2 Análises por injeção em fluxo**

A análise por injeção em fluxo (FIA) utiliza um fluxo contínuo e não-segmentado de uma solução que transporta um volume fixo de amostra do ponto de injeção até a cela de detecção. Esta técnica foi utilizada pioneiramente por Ruzicka e Hansen<sup>10</sup>, na Dinamarca, e por Stewart e colaboradores, nos Estados Unidos, no início da década de 70. Um volume fixo de amostra era introduzido com uma seringa hipodérmica em tubulações que continham um fluido a uma vazão constante, em regime laminar, que proporcionava dispersão controlada e controle preciso do tempo de residência da zona de amostra no percurso analítico, garantindo a repetibilidade das análises. Devido aos gradientes de concentração na zona de amostra, decorrentes da dispersão, o sinal analítico obtido é transiente e pode ser relacionado com a concentração da espécie de interesse<sup>11</sup>.

Os sistemas FIA possibilitam o emprego de equipamentos simples e baratos<sup>12</sup>. Em comparação com analisadores em fluxo segmentado, apresentam configurações mais simples, consomem menos amostras e reagentes<sup>13</sup> e são mais versáteis pela possibilidade de assumirem diversas configurações para realizar tarefas como diluições em linha<sup>14</sup>. Sistemas FIA possibilitam a implementação de procedimentos sem que a reação atinja o estado de equilíbrio químico, que minimiza o tempo de análise e permite a exploração de aspectos cinéticos das reações<sup>15</sup>.

As etapas envolvidas em um sistema de análises por injeção em fluxo são basicamente propulsão de fluidos, injeção da amostra, dispersão/mistura e detecção<sup>12</sup>. Alguns dispositivos são empregados para propulsão contínua dos fluidos através das tubulações, como as bombas peristálticas<sup>13</sup> e bombas tipo seringa<sup>16</sup> ou pneumáticas<sup>17</sup>, além da possibilidade de explorar a

ação da gravidade<sup>18,19</sup>. As bombas peristálticas são as mais amplamente empregadas, pois impulsionam os fluidos a um fluxo constante<sup>20</sup> e permitem que diferentes soluções sejam gerenciadas simultaneamente de maneira simples. A propulsão pneumática e o escoamento por gravidade apresentam pulsação desprezível e são muito empregadas em sistemas de análises em fluxo com detectores eletroquímicos.

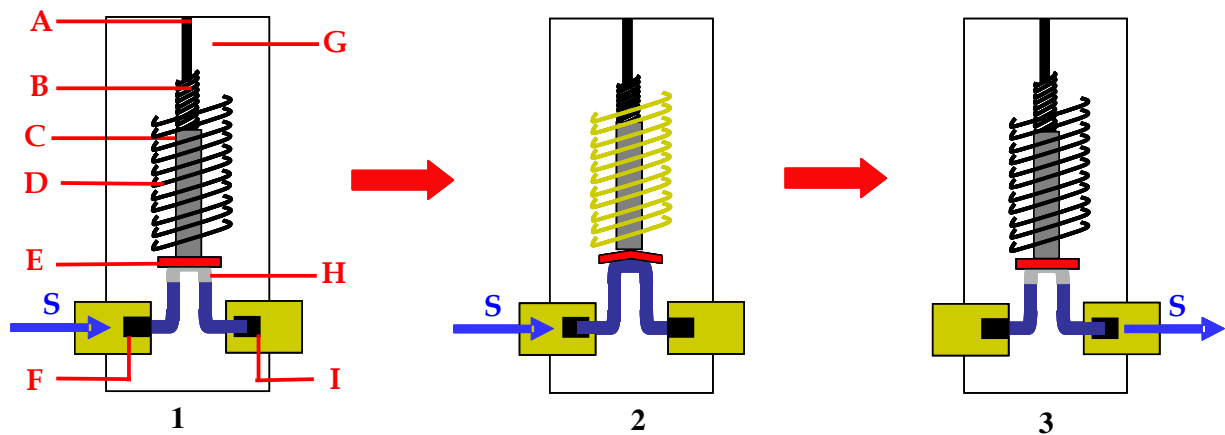
Os primeiros dispositivos utilizados para injeção foram as seringas hipodérmicas, posteriormente substituídas por válvulas rotatórias, válvulas de 6 ou 8 vias e injetores proporcionais<sup>21</sup>. As válvulas rotatórias são compostas por um rotor com um espaço a ser preenchido pela amostra. As válvulas de 6 ou 8 vias apresentam pares de canais interligados e permitem o preenchimento da alça de amostragem pela passagem da amostra por um canal e o fluxo da solução transportadora por outro canal. O injetor proporcional, que foi desenvolvido por pesquisadores do Centro de Energia Nuclear e Agricultura (CENA), é composto por duas peças de acrílico fixas e uma móvel central, contendo orifícios que permitem a passagem de fluidos para o preenchimento de uma alça de amostragem. A comutação destes dispositivos permite que o fluxo da solução transportadora seja redirecionado para a alça de amostragem, transportando a amostra e/ou reagentes através do percurso analítico.

A dispersão e a mistura ocorrem em tubos cilíndricos, usualmente fabricados com material polimérico, com 0,3 a 0,8 mm de diâmetro interno e 25 a 200 cm de comprimento. Esta etapa pode ou não envolver reação química e as soluções podem ser misturadas com a zona de amostra em pontos de confluência, por exemplo<sup>12</sup>. A detecção pode ser realizada por técnicas espectroscópicas ou eletroquímicas, sendo que as características de cada uma delas devem ser levadas em consideração para o desenvolvimento dos procedimentos.

A exploração do conceito de multicomutação em sistemas de análises em fluxo expandiu as vantagens do processo<sup>22</sup>. O emprego de dispositivos discretos controlados

eletronicamente (válvulas ou microbombas solenoide) para o gerenciamento independente de cada solução permitiu que o desempenho analítico destes sistemas fosse melhorado.

Em sistemas FIA com microbombas solenoide, a inserção e a propulsão das soluções são realizadas durante a atuação dos dispositivos<sup>23</sup>, dispensando o emprego de outros componentes para manter a vazão dos fluidos. O esquema de funcionamento de uma microbomba solenoide é ilustrado na Figura 1.



**Figura 1.** Esquema das etapas de atuação de uma microbomba solenoide. A – Suporte fixo, B – Mola compressível, C – Barra ferromagnética, D – Solenoide, E – Diafragma flexível, F – Válvula de entrada, G – Invólucro, H – Via para passagem de soluções, I – Válvula de saída, S – Solução. Microbomba desligada (1 e 3) ou acionada (2).

De acordo com o diagrama apresentado na Figura 1, cada microbomba contém um suporte para manter os componentes internos fixos (A). Uma mola compressível (B) é posicionada sobre uma barra metálica ferromagnética (C), conectada a um diafragma flexível (E) e com um solenoide (D) ao seu redor. Os componentes são envolvidos por um invólucro metálico isolado (G) e a parte inferior é recoberta por material polimérico resistente ao calor, à passagem de corrente e ao choque mecânico. A passagem do fluido (H) é obstruída pelo diafragma e por uma válvula de entrada (F) enquanto o dispositivo permanece desligado (sem aplicação de corrente ao solenoide), como é apresentado na Figura 1.1. Quando um pulso de



corrente (ca. 100 mA) é aplicado ao solenoide da microbomba (Figura 1.2), um campo eletromagnético é gerado, deslocando a barra metálica verticalmente e pressionando a mola situada na parte superior. Este movimento é responsável pela flexão do diafragma, gerando uma diferença de pressão na câmara interna e permitindo o preenchimento do canal H com a solução (S). Simultaneamente ocorre a abertura da válvula F e o fechamento da válvula I. Em seguida, a microbomba é desligada e a barra retorna à sua posição inicial pela ação da mola na parte superior, dispensando o volume fixo da solução que preenchia a câmara interna (Figura 1.3), devido à abertura da válvula I e fechamento da válvula F. O tempo de atuação do mecanismo da microbomba solenoide é da ordem de milissegundos e um volume fixo de solução, da ordem de microlitros, é dispensado de maneira precisa a cada pulso aplicado ao solenoide do dispositivo<sup>23</sup>. Desta forma, o uso destes dispositivos minimiza o consumo de reagentes e a geração de resíduos em comparação com procedimentos desenvolvidos em sistemas de análises em fluxo com adição contínua de reagentes. A manipulação de pequenos volumes de solução em sistemas que empregam outros dispositivos de propulsão, como bombas peristálticas, é dificultada pela pulsação que afeta a precisão das medidas<sup>24</sup>.

Em sistemas com multicomutação, pode-se utilizar a amostragem binária<sup>24</sup>, que consiste em inserir pequenas alíquotas de amostra e reagentes de maneira intercalada, o que gera diversas interfaces entre as soluções. A sequência das etapas de inserção de soluções é denominada ciclo de amostragem. Esta estratégia e o fluxo pulsado característico das microbombas<sup>25</sup> promovem melhores condições de mistura entre amostra e reagentes. Com isso, a dimensão dos reatores pode ser reduzida e as perturbações causadas pelas diferenças de índice de refração das soluções (Efeito Schlieren<sup>26</sup>) podem ser atenuadas.

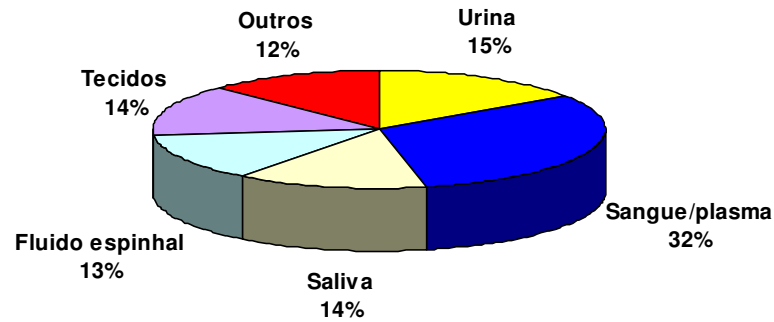
Na literatura, existem trabalhos que utilizam sistemas de análises em fluxo com microbombas solenoide para a determinação de espécies em amostras de interesse

ambiental<sup>27,28</sup>, farmacêuticas<sup>29,30</sup> e em alimentos<sup>31,32</sup>. Contudo, o emprego desses sistemas para a quantificação de espécies de interesse clínico é escasso<sup>33</sup>.

### 1.3 Aplicações dos sistemas de análises por injeção em fluxo em análises clínicas

Os primeiros artigos de revisão sobre as aplicações de sistemas de análises em fluxo em análises clínicas, na década de 1980<sup>5,11</sup>, registram a dificuldade de aceitação do processo nesta área, apesar das vantagens inerentes<sup>13</sup>. Essa situação surgiu devido às experiências malsucedidas com os analisadores com fluxo segmentado e pela baixa variedade de sistemas disponíveis comercialmente<sup>5</sup>. Atualmente, a dificuldade para implementar sistemas FIA em laboratórios clínicos se deve às maiores exigências em análises de rotina, em que é necessário determinar diversos analitos nas amostras. Os instrumentos comerciais em fluxo não atendem a esta exigência de forma eficiente, uma vez que o número de análises simultâneas destes analisadores é limitado se comparado com analisadores em batelada<sup>34</sup>. Por outro lado, há uma grande variedade de *kits* para a determinação de espécies de interesse clínico adaptados para análises em batelada. Sendo assim, a introdução de um novo procedimento que precisa ser validado não é justificável para os responsáveis pelos laboratórios clínicos<sup>35</sup>.

Apesar da situação descrita, diversos procedimentos em fluxo foram descritos na literatura, mostrando suas potencialidades na aplicação em laboratórios de análises clínicas. A Figura 2 apresenta o percentual dos trabalhos publicados com a utilização de análises por injeção em fluxo em análises clínicas, de acordo com a natureza das amostras. A pesquisa foi realizada através do mecanismo de busca do *Analytical Abstracts*, com as palavras-chave *flow injection analysis* OU *FIA* E *clinical analysis* OU *clinical chemistry* E, sendo o resultado combinado com o tipo de fluido biológico.



**Figura 2.** Distribuição percentual dos trabalhos publicados com a utilização das análises por injeção em fluxo em análises clínicas, de acordo com a natureza das amostras. Total de 4954 trabalhos.

Os sistemas de análises por injeção em fluxo podem trazer vantagens intrínsecas para a análise de rotina de laboratórios clínicos, aumentando a frequência de amostragem e a precisão das medidas analíticas e minimizando o consumo de reagentes e a geração de resíduos<sup>13</sup>. A determinação de creatinina em amostras de urina é uma das análises mais comuns e importantes em laboratórios clínicos. Os valores urinários diários desta espécie são constantes e utilizados para corrigir a concentração de outros metabólitos<sup>9</sup>. Um procedimento em fluxo foi desenvolvido para a determinação de creatinina em urina empregando a reação de Jaffé (formação de um complexo colorido entre o ânion picrato e a creatinina, em meio alcalino), com adição de reagentes por confluência, banho termostaticado e detecção espectrofotométrica<sup>36</sup>. A variação < 3% dos resultados quando comparados com o procedimento em batelada, a frequência de amostragem (100 h<sup>-1</sup>) e o coeficiente de variação (0,6%; n = 10), indicam que o procedimento desenvolvido pode ser aplicado em análises de rotina para a determinação de creatinina em amostras de urina, minimizando o consumo de reagentes em relação ao procedimento de referência em batelada.

Os objetivos de alguns sistemas de análises por injeção em fluxo vão além de se obter altas frequências de amostragem e mínimo consumo de reagentes. A complexidade das amostras é, muitas vezes, uma dificuldade para a determinação de algumas espécies em

amostras biológicas, pois as análises realizadas se tornam mais suscetíveis às interferências e efeitos de matriz. Sendo assim, é necessário desenvolver procedimentos seletivos para separar o analito da matriz e os sistemas em fluxo apresentam grande potencialidade nesse sentido.

Uma das estratégias utilizadas para eliminar ou reduzir efeitos de matriz é o acoplamento de uma técnica de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Sistemas de análises em fluxo podem ser empregados no preparo das amostras (*Clean up*) ou para gerar a espécie a ser detectada (derivação pós-coluna). Esta estratégia foi empregada na determinação de fármacos em fluidos biológicos, como na determinação de tiopronina (presente em formulações de medicamentos diuréticos) e seu metabólito em amostras de urina<sup>37</sup>. Após a coluna cromatográfica, uma solução de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  foi adicionada por confluência, gerando quimiluminescência pela oxidação dos analitos. Uma reação pouco seletiva pôde ser utilizada para a determinação das espécies de interesse, devido à prévia etapa de separação na coluna cromatográfica. Neste procedimento, as faixas de resposta linear para o fármaco e seu metabólito foram estimadas entre 1 – 200 e 4 – 400  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Devido à frequência de amostragem (30  $\text{h}^{-1}$ ), à possibilidade de se realizar estudos farmacocinéticos e, principalmente, à seletividade adequada, o emprego deste procedimento é viável em laboratórios de análises clínicas. Entretanto, os custos de aquisição e manutenção dos equipamentos de HPLC ainda dificultam o emprego em laboratórios de pequeno porte.

A separação do analito da matriz também pode ser realizada através da conversão em linha do analito em outra espécie na fase gasosa, que permeia por uma membrana porosa em uma cela de difusão, sendo absorvida por uma solução acceptora. Um dos trabalhos pioneiros que empregou esta estratégia permitiu a determinação de carbonatos totais ( $\text{CO}_3^{2-} + \text{HCO}_3^-$ ) em amostras de plasma<sup>38</sup>. A amostra foi misturada em linha com solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e o  $\text{CO}_2$  gerado a partir dos carbonatos, difundiu através de uma membrana hidrofóbica de silicone

porosa para ser absorvido pela solução indicadora de vermelho de cresol. A coloração desta solução muda de amarelo para vermelho, devido à variação de pH, gerando o sinal analítico. A frequência de amostragem estimada em  $90 \text{ h}^{-1}$  e o baixo coeficiente de variação (1,8%) indicam a viabilidade da aplicação deste sistema em análises clínicas.

A transferência do analito para a fase gasosa também pode ser realizada com uma câmara de separação líquido-gás, como a empregada na determinação de selênio total em amostras de urina, através da geração em linha de  $\text{SeH}_2$ . A espécie gerada é transferida para o interior de um forno de grafite para a detecção por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica<sup>39</sup>. As amostras foram digeridas *off-line* para converter as espécies de selênio em  $\text{SeO}_3^{2-}$ , adequado para a geração do hidreto. Um fluxo de argônio foi responsável pela transferência da espécie formada da fase aquosa para o forno de grafite. O limite de detecção e a frequência de amostragem foram estimados em  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $53 \text{ h}^{-1}$ , respectivamente, indicando a possibilidade da determinação de Se total em amostras de urina. Por eliminar os efeitos de matriz, o procedimento proporcionou seletividade adequada para a determinação de selênio, que está presente em baixas quantidades na urina.

Enzimas podem ser utilizadas para melhorar a seletividade de procedimentos analíticos. Entretanto, o custo para aquisição é muitas vezes alto para laboratórios clínicos. Uma estratégia para reduzir os custos é a imobilização de enzimas em colunas de fase sólida ou em biossensores, como já foi discutido anteriormente. Como exemplo, pode ser citado um biossensor óptico desenvolvido para a determinação de glicose em amostras biológicas<sup>40</sup>. A enzima glicose oxidase foi adsorvida na superfície de um filme fino de poliéster revestido com  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$  que era atravessado por um feixe de radiação. Inicialmente, o biossensor foi mantido em contato com a solução transportadora (ácido ascórbico) que convertia a espécie adsorvida em  $\text{Fe}_2[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ . Quando a zona de amostra alcançava o biossensor, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  gerado na reação enzimática da glicose oxidava o adsorbato a  $\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$ , sendo o

sinal analítico devido à mudança de coloração do composto adsorvido na superfície do sensor. A possibilidade de utilização da enzima imobilizada por 30 dias e sua estocagem por pelo menos 3 meses demonstram as vantagens para desenvolver procedimentos mais seletivos, minimizando o consumo de reagentes enzimáticos.

O pré-tratamento das amostras permite eliminar espécies interferentes, minimizar os efeitos de matriz e/ou converter o analito em uma espécie mais facilmente detectável<sup>41</sup>. A quantificação de metais em fluidos biológicos é importante para o monitoramento da concentração destas espécies no organismo de indivíduos que são rotineiramente expostos aos vapores em ambientes de algumas indústrias, como de galvanoplastia. Sistemas de análises por injeção em fluxo podem ser utilizados para realizar a digestão em linha das amostras, minimizando a intervenção do analista, perdas das espécies de interesse e contaminações que poderiam ocorrer durante as etapas da digestão, além de evitar que operações morosas e cansativas sejam executadas. A determinação simultânea dos pares de metais Cu/Fe e Zn/Mn em amostras de urina foi realizada em um sistema FIA com válvulas rotatórias controladas eletronicamente, utilizadas para direcionar o fluxo das soluções no sistema. O tratamento da amostra e a detecção foram realizados em linha<sup>42</sup>. Um banho com ultrassom foi acoplado ao sistema para digerir a amostra. Uma coluna preenchida com resina contendo grupos funcionais iminodiacéticos foi empregada para a pré-concentração dos metais, que foram eluídos e transportados para o espectrômetro de absorção atômica com chama. O tratamento em linha da amostra e a pré-concentração permitiram a quantificação de metais presentes em baixas concentrações em amostras de urina com uma frequência de amostragem de 25 h<sup>-1</sup>.

Operações manuais repetitivas, como diluições, podem causar fadiga do analista e afetar a precisão e a exatidão das medidas. Dispositivos controlados eletronicamente podem ser empregados na construção de sistemas mecanizados em fluxo para realizar operações repetitivas em análises de rotina com maior precisão do que se fossem realizadas

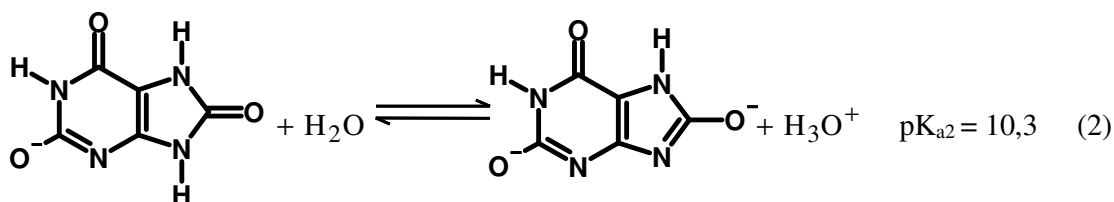
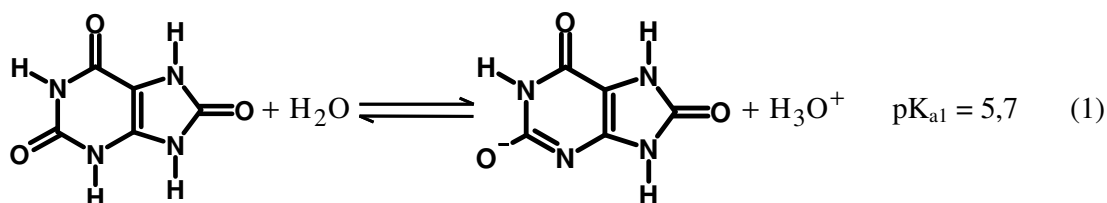
manualmente. A determinação de creatinina em urina por espectrofotometria empregando a reação de Jaffé e diluição em linha da amostra por reamostragem na zona dispersa foi implementada em um sistema de análises em fluxo com multicomutação<sup>43</sup>. Um dos dispositivos foi responsável por gerenciar a amostra e a solução transportadora. A amostra (22 µL) foi inserida no primeiro reator no qual ocorria a dispersão da zona de amostra. Em seguida, outra válvula foi acionada para direcionar a fração selecionada da zona de amostra para um segundo reator, sendo misturada com os reagentes. A zona de amostra passa por uma unidade de aquecimento durante o transporte para a detecção. Em comparação ao sistema em fluxo para determinação de creatinina com adição contínua de reagentes<sup>36</sup>, este procedimento traz a vantagem da diluição da amostra em linha de forma precisa (CV < 3%). Por esse motivo e pela frequência de amostragem estimada (45 h<sup>-1</sup>), este procedimento atende às necessidades de laboratórios clínicos e pode ser utilizado para análises de rotina com vantagens adicionais proporcionadas pela mecanização.

Um procedimento em fluxo para a determinação de Zn<sup>2+</sup> em amostras de saliva com detecção por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica<sup>44</sup> também empregou a reamostragem na zona dispersa. Neste caso, o volume da amostra é crítico em comparação a outros fluidos biológicos, como a urina. Sendo assim, é essencial que pequenos volumes da amostra sejam gerenciados de forma precisa, evitando contaminações e erros de diluições. Uma alíquota de saliva (10 µL) foi inserida no fluxo da solução transportadora (Triton-X). Com o acionamento de uma válvula solenoide, uma fração do centro da zona de amostra dispersa foi introduzida no forno de grafite para a análise, com CV < 3.

As aplicações citadas acima são alguns exemplos da literatura que demonstram as vantagens que sistemas de análises em fluxo podem trazer para as análises clínicas, visando superar obstáculos devidos à complexidade, baixa disponibilidade das amostras e ao acúmulo de erros sistemáticos em operações repetitivas.

### 1.4 Ácido úrico: propriedades e importância

O ácido úrico, 7,9-dihidro-1H-purina-2,6,8(3H)-triona, é um composto pouco solúvel em água (6 mg/100 mL)<sup>45</sup> e apresenta dois hidrogênios ionizáveis, com valores de  $pK_{a1} = 5,7$  e  $pK_{a2} = 10,3$ <sup>46</sup> (Reações 1 e 2). De acordo com a literatura, os hidrogênios mais facilmente ionizáveis encontram-se nas posições 3 e 9<sup>47</sup>, devido ao maior número de estruturas de ressonância que os ânions assumem com a perda destes hidrogênios para estabilizar a carga negativa. Não existem informações sobre as constantes de ionização dos outros dois hidrogênios, que necessitam de alta energia para serem ionizados, provavelmente porque as estruturas de ressonância envolvem estabilização da carga negativa nos átomos de carbono e de nitrogênio<sup>47</sup>, o que leva a molécula a um nível energético elevado e instável.

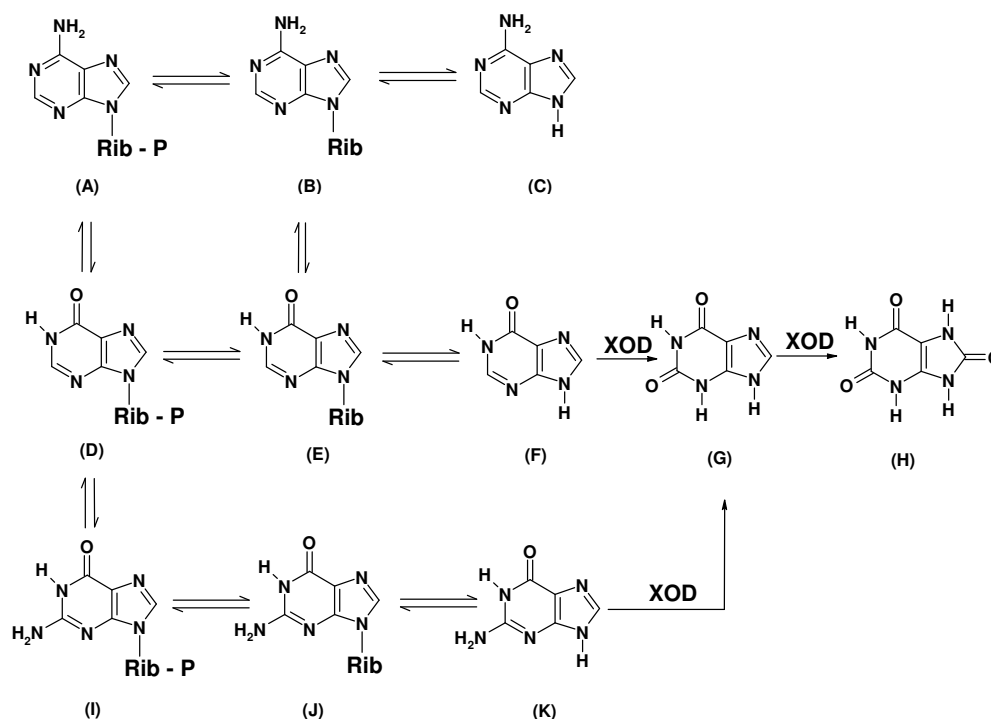


O ácido úrico é encontrado no organismo humano devido à ingestão de alimentos como carnes, crustáceos, cereais e de bebidas alcoólicas, especialmente as fermentadas<sup>48</sup>. É o principal produto do metabolismo das purinas, sendo quase totalmente eliminado pela urina, em quantidades diárias que variam de 1,5 a 4,5 mmol L<sup>-1</sup><sup>49</sup>. O ciclo metabólico das purinas que leva à formação do ácido úrico nos seres humanos é apresentado na Figura 3.

As adeninas monofosforilada (A) e a desfosforilada (B) são convertidas em iminosinas monofosforilada (D) e desfosforilada (E), respectivamente. A iminosina desfosforilada (E) é



convertida em xantina (F), que na presença da enzima xantina oxidase (XOD) é convertida irreversivelmente em hipoxantina (G) e posteriormente a ácido úrico (H). A adenina sem a ribose (C) não produz outros derivados. A guanina monofosforilada (I) passa por um processo semelhante de conversão em iminina monofosforilada (D) ou perde o fosfato (J) e a ribose (K), sendo convertida diretamente a hipoxantina (G) na presença da xantina oxidase.



**Figura 3.** Diagrama do ciclo metabólico de purinas e produção de ácido úrico no organismo humano. Rib – Ribose, P – Fosfato, XOD – Xantina oxidase.

A determinação de ácido úrico em amostras de urina apresenta importância clínica significativa, uma vez que pode auxiliar no diagnóstico de disfunções no organismo. Os níveis urinários de ácido úrico podem indicar o aparecimento da gota<sup>50</sup>, que causa o desenvolvimento da artrite reumatoide devido à alta concentração sérica de ácido úrico e consequente deposição de cristais nas articulações. Esta doença pode apresentar diversas causas, desde alimentação inadequada até falhas genéticas. A profilaxia geralmente indicada para o tratamento da gota é a ingestão de alopurinol, que inibe a ação da enzima xantina

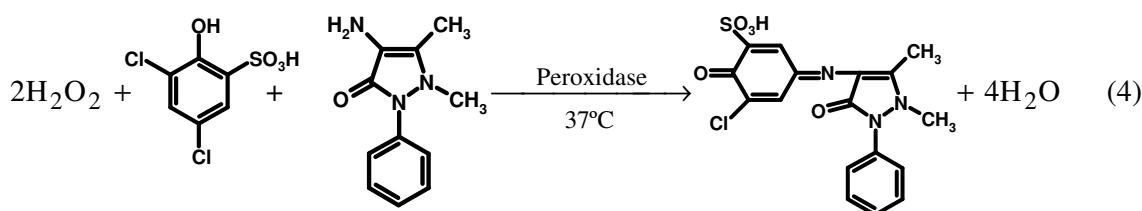
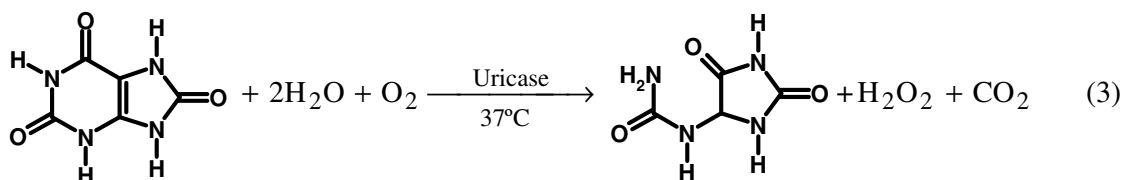
oxidase e permite que a xantina seja reaproveitada na síntese das bases nitrogenadas<sup>50</sup>. A síndrome de Lesch-Nyhan<sup>51</sup> é uma disfunção genética em que o indivíduo não produz a enzima hipoxantina fosforribosiltransferase (HPRT), que é uma das responsáveis pelo processo de reutilização de purinas. Este processo causa hiperuricosúria (altas concentrações de ácido úrico na urina), indicando a possível manifestação da síndrome. A nefrolitíase<sup>52</sup> também pode ser identificada com diagnóstico de hiperuricosúria, uma vez que os cristais de ácido úrico podem se formar nos rins e reduzir o volume urinário. A intoxicação por chumbo afeta o funcionamento do fígado e desequilibra a produção de ácido úrico no organismo, uma vez que o metabolismo das purinas ocorre em grande parte neste órgão, levando à geração e excreção de quantidades elevadas de ácido úrico<sup>50</sup>. A acidose pode ser uma das causas de hipouricosúria (baixa concentração de ácido úrico na urina), pois os ácidos orgânicos competem com esta espécie durante os processos de filtração do sangue nos rins<sup>9</sup>. A quantificação dos níveis urinários de ácido úrico auxilia no monitoramento da ação de drogas quimioterapêuticas<sup>2</sup>, uma vez que quimio e radioterapias atuam na destruição de células cancerígenas e consequente degradação de ácidos nucleicos.

A prática de exercícios físicos e a ingestão de bebidas alcoólicas diminuem a excreção de ácido úrico na urina, pois o ácido lático produzido por esforço muscular intenso ou pelo metabolismo do etanol compete com o ácido úrico no processo de reabsorção no trato renal<sup>48</sup>. Sendo assim, é importante ressaltar que a quantificação de ácido úrico em urina não deve ser empregada para diagnósticos definitivos. Devido à importância da determinação desta espécie em fluidos biológicos, diversos procedimentos foram desenvolvidos para a sua determinação, principalmente em amostras de urina e de sangue.

### 1.5 Determinação de ácido úrico em amostras biológicas

Os procedimentos mais comumente empregados para a determinação de ácido úrico em amostras biológicas são enzimáticos<sup>8,53-55</sup>, cromatográficos<sup>56</sup> ou baseados nas propriedades redox do analito<sup>57-60</sup>. A Tabela 1 apresenta alguns procedimentos descritos na literatura para a determinação de ácido úrico em amostras biológicas.

Os métodos enzimáticos baseiam-se na oxidação do ácido úrico pelo O<sub>2</sub> na presença da uricase, gerando alantoína, CO<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Detectores eletroquímicos foram empregados para medir o consumo de oxigênio<sup>8</sup> ou a geração de dióxido de carbono<sup>53</sup>. Etapas trabalhosas de preparo de amostra ou de condicionamento de eletrodos são geralmente necessárias, devido à presença de diversas espécies eletroativas em amostras biológicas. O consumo do analito pode ser monitorado diretamente por espectrofotometria no ultravioleta<sup>54</sup>, porém este procedimento requer complexo preparo das amostra para eliminar outras espécies absorventes, como proteínas e íons sulfato. Por outro lado, a concentração de ácido úrico pode ser relacionada com a geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que reage com ácido 3,5-diclorohidroxibenzenossulfônico (DHBS) e 4-aminoantipirina (4-AP) formando uma quininoimina de coloração vermelha, com máximo de absorção em 505 nm<sup>55</sup> (equações 3 e 4). Este procedimento é o mais usualmente empregado para a determinação de ácido úrico em análises clínicas, apesar da baixa estabilidade dos reagentes de trabalho (30 dias sob refrigeração) e da etapa de aquecimento controlado (37 °C) requerida para o desenvolvimento do produto final.



**Tabela 1** – Características analíticas de alguns procedimentos para a determinação de ácido úrico em amostras biológicas.

<i>Procedimento</i>	<i>Princípio</i>	<i>Faixa linear (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Referência</i>
Enzimático - espectrofotometria em batelada <sup>a</sup>	Monitoramento do H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> gerado na oxidação enzimática do ácido úrico	< 1500	2,2 (n=20)	55
Enzimático - potenciometria em batelada <sup>b</sup>	Monitoramento do CO <sub>2</sub> gerado na oxidação enzimática do ácido úrico	400 – 300	5,0 (n=5)	53
Enzimático – potenciometria em fluxo <sup>b</sup>	Monitoramento do consumo de O <sub>2</sub> na reação de oxidação enzimática do ácido úrico	< 6000	4,0 (n=30)	8
Espectrofotometria em batelada <sup>a</sup>	Descoloração do hidroxihidroquininaftaleína de Pd(II) devido à complexação do Pd(II) pelo ácido úrico	0,059 – 1,2	1,5 (n=5)	61
Espectrofotometria em batelada <sup>a,b</sup>	Redução do íon fosfotungstato a azul de tungstênio	< 1100	5,0 (n=20)	59
Espectrofotometria em fluxo <sup>a</sup>	Redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ácido úrico para formar o complexo Fe(II)/tripiridiltriazina	120 – 600	2,9 (n=12)	60
Amperometria em fluxo <sup>a</sup>	Detecção amperométrica de ácido úrico em um sistema em fluxo com linha única	2,0 – 6,0	3,0 (n=10)	57
Amperometria em fluxo <sup>a</sup>	Detecção amperométrica de ácido úrico em um sistema em fluxo com multicomutação	1000 – 8000	3,0 (n=10)	58
Cromatografia líquida <sup>a</sup>	Cromatografia de fase reversa	< 6000	4,5 (n=12)	56

a – urina; b – sangue

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa também foi utilizada para a determinação de ácido úrico em amostras de sangue e urina<sup>56</sup> com fase móvel H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH em tampão NH<sub>4</sub>Ac (pH = 7,0). A baixa frequência de amostragem (6 h<sup>-1</sup>) e o alto custo para aquisição e manutenção do equipamento, assim como a geração de resíduos tóxicos, dificultam o emprego desta técnica em análises de rotina em laboratórios clínicos.

Sistemas de análises em fluxo em linha única<sup>57</sup> e com multicomutação<sup>58</sup>, ambos com detecção amperométrica, foram utilizados para a determinação de ácido úrico em amostras de urina. No primeiro procedimento<sup>57</sup>, a amostra foi inserida em um fluxo de solução transportadora (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e a zona de amostra foi conduzida diretamente para o detector amperométrico. No sistema com multicomutação<sup>58</sup>, válvulas solenoide foram responsáveis pela inserção da amostra em um fluxo da solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para dispersão e outra válvula pela seleção de uma fração da zona de amostra dispersa para enviar ao detector amperométrico. Ambos os procedimentos apresentaram frequências de amostragem que permitem a aplicação dos sistemas em análises clínicas. Contudo, outros derivados de purina, como cafeína, tendem a ser adsorvidos na superfície do eletrodo de trabalho e isto exige a sua remoção periódica para substituição ou ativação.

O ácido úrico também pode ser quantificado por espectrofotometria, através da redução do íon fosfotungstato na presença do analito com formação do complexo azul de tungstênio<sup>59</sup>. Este procedimento apresenta baixa seletividade devido à precipitação de proteínas na presença do ácido fosfotungstístico, exigindo separação prévia. Um procedimento espectrofotométrico em fluxo para a determinação de ácido úrico, na presença de ácido ascórbico, leva em conta a diferença dos sinais obtidos em dois tempos de residência<sup>60</sup>. A amostra foi misturada por confluência com uma solução contendo Fe(III) e o íon metálico em sua forma reduzida gerou um complexo colorido com tripiridiltriazina. O primeiro sinal obtido foi correspondente à formação do complexo devido à reação entre Fe(III) e ácido

ascórbico. Então, a zona de amostra atravessou outro reator, sendo redirecionada para o detector para a obtenção do sinal correspondente à soma das concentrações de ácido ascórbico e ácido úrico. Devido à dispersão adicional da zona de amostra e às diferentes taxas de conversão dos analitos, a determinação de ácido úrico exige cálculos trabalhosos. Como a concentração final é obtida pela subtração dos sinais, os resultados são afetados pela propagação de erros.

O ácido úrico pode ser quantificado por espectrofotometria na presença do complexo hidroxihidroquinonaftaleína de paládio (II), que apresenta máxima absorção em 635 nm<sup>61</sup>. O ácido úrico forma um complexo com Pd(II), atenuando o sinal analítico devido à decomposição do complexo colorido de Pd(II). As principais desvantagens são alto custo dos sais de Pd(II), etapas trabalhosas para o preparo da solução do reagente complexante e aquelas associadas aos procedimentos em batelada.

Devido às desvantagens atribuídas aos procedimentos para a determinação de ácido úrico em amostras biológicas, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um procedimento rápido, mecanizado, portátil e de baixo custo para a determinação desta espécie em amostras de urina, empregando um sistema de análises em fluxo com microbombas solenoide. O analito reduz íons Cu(II) e, na presença do ânion 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolinato (BQA), ocorre a formação do complexo  $[\text{Cu}(\text{BQA})_2]^{3-}$ , monitorado por espectrofotometria. Esta reação já foi utilizada anteriormente para determinação de proteínas totais em fluidos biológicos<sup>62</sup> e de taninos em bebidas<sup>63</sup>.

2

*Parte*

*Experimental*

## 2.1 Equipamentos e acessórios

O sistema de análises em fluxo foi construído empregando tubos de polietileno (*d.i.* 0,8 mm), duas válvulas solenoide (NRResearch) e quatro microbombas solenoide (Biochem Valve) com volumes nominais de 10  $\mu\text{L}$  ( $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$ ) e 60  $\mu\text{L}$  ( $P_4$ ). As vazões das soluções nas microbombas  $P_1$ ,  $P_2$  e  $P_3$  (operadas a 5 Hz) foram estimadas em 54, 61 e 65  $\mu\text{L s}^{-1}$ , respectivamente. A microbomba  $P_4$  foi operada a 3 ou 5 Hz, gerando vazões de 150 ou 169  $\mu\text{L s}^{-1}$ , respectivamente. Estes dispositivos foram controlados eletronicamente por um microcomputador AMD Athlon através de uma das interfaces paralelas disponíveis. Para o acionamento dos dispositivos, um circuito integrado do tipo ULN2803 foi empregado e a alimentação foi realizada através de uma fonte de diferença de potencial constante (18 V) e de um regulador de voltagem LM317, utilizado para a compatibilização da intensidade de corrente e da diferença de potencial necessárias (12 V). O diagrama do circuito eletrônico é apresentado na Figura 4. O programa para o controle dos dispositivos foi desenvolvido em linguagem Visual Basic 6.0 (Microsoft) e permitia a variação do número de pulsos aplicados a cada microbomba, do número de ciclos de amostragem e de replicatas, além do intervalo de tempo de parada de fluxo. O formulário principal do programa desenvolvido é mostrado na Figura 5.



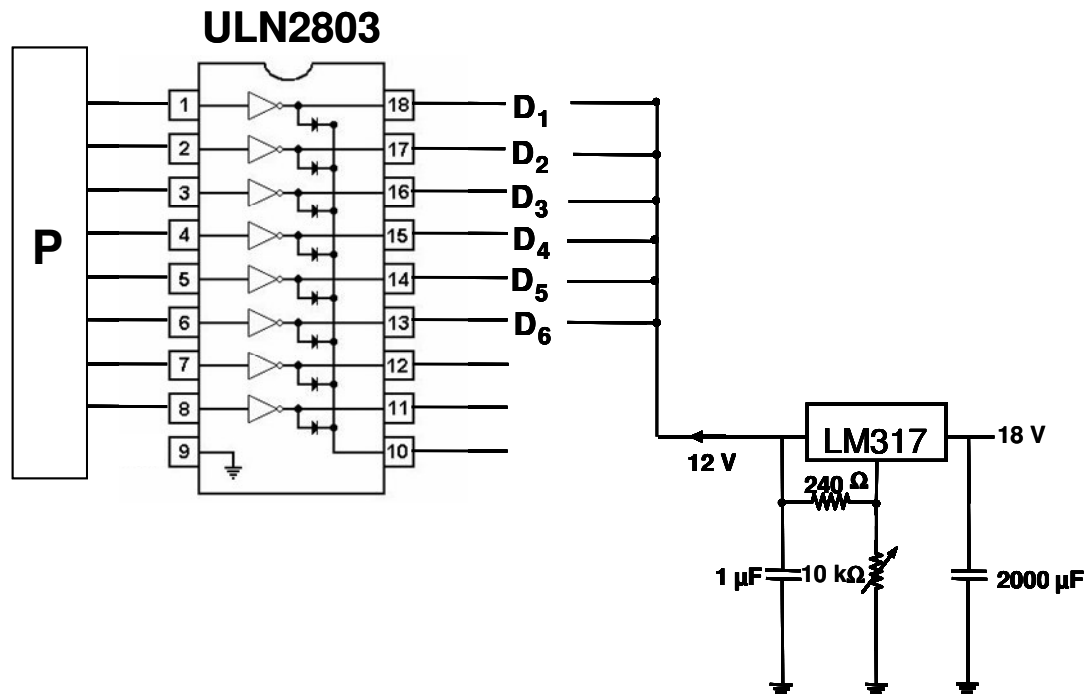
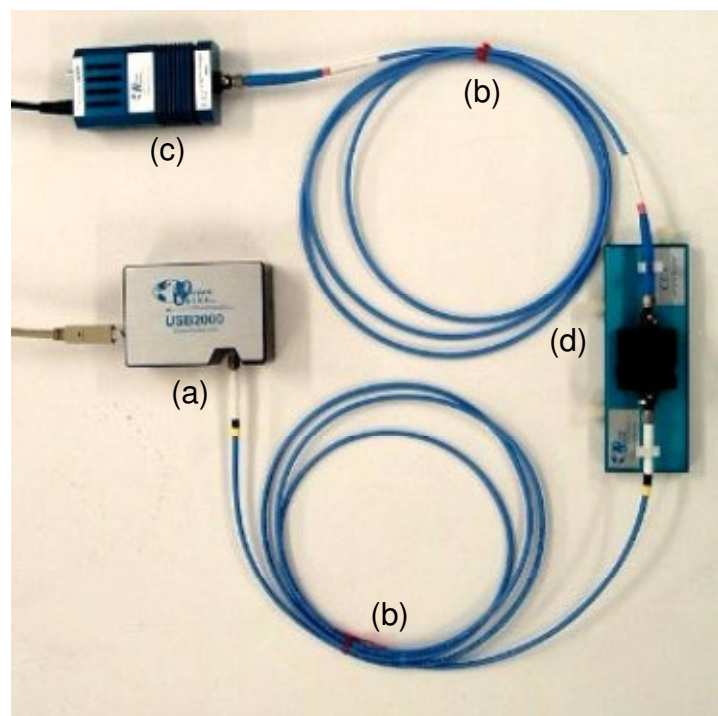


Figura 4. Diagrama do circuito empregado para o controle das válvulas e microbombas solenoide (Di) através de uma das portas paralelas (P) do computador.

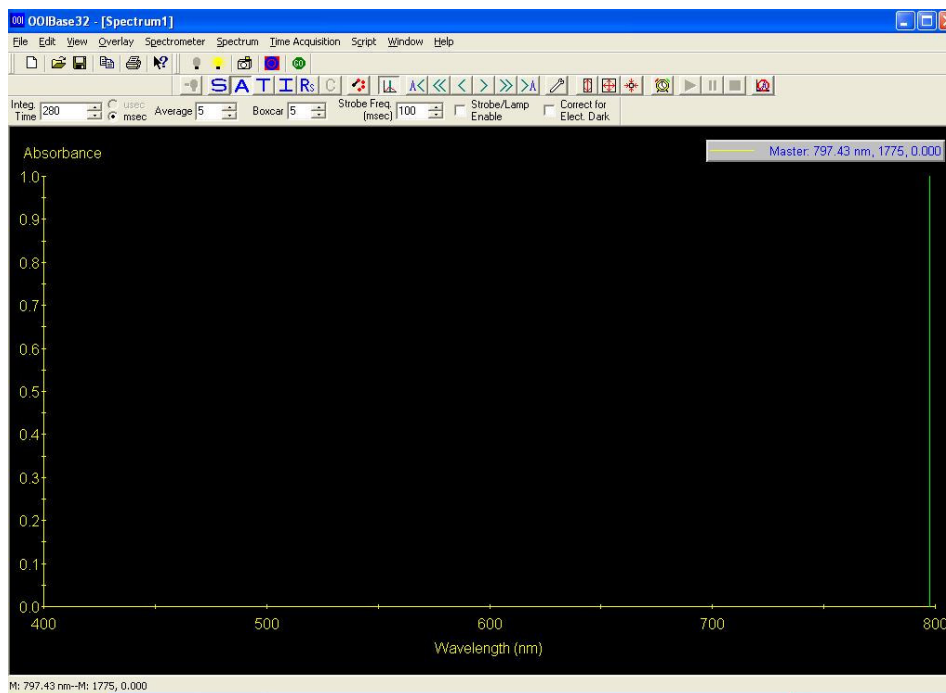


Figura 5. Formulário principal do programa desenvolvido em Visual Basic 6.0 para controle dos dispositivos ativos do módulo de análises.

Para as medidas dos sinais, foi empregado um detector multicanal (Figura 6a) que consiste de um arranjo linear de 2048 fotodetectores do tipo CCD (*Charge-coupled devices*, Ocean Optics), conectado ao microcomputador através de uma das portas USB, permitindo medidas entre 200 e 800 nm. Cabos de fibra óptica (6b) foram utilizados para conduzir a radiação emitida por uma lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics, modelo LS-1), Figura 6c, até a cela de fluxo (Hellma) com volume interno de 80  $\mu\text{L}$  e caminho óptico de 1 cm (Figura 6d), e da saída dessa até o sistema de detecção. O software OOIBase32, fornecido pelo fabricante do espectrômetro multicanal, foi utilizado para aquisição de dados (Figura 7).



**Figura 6.** Fotografia dos equipamentos empregados para medidas espectrofotométricas. (a) espectrômetro multicanal; (b) cabos de fibra óptica; (c) fonte de radiação - lâmpada tungstênio-halogênio; (d) suporte contendo a cela de fluxo.



**Figura 7.** Formulário do programa OOIBase32 (Ocean Optics) utilizado para aquisição de dados.

Um espectrofotômetro de duplo feixe Hitachi U3000, equipado com cubeta de quartzo (Hellma) com 1 cm de caminho óptico foi utilizado nos estudos preliminares. Um pHmetro Metrohm, modelo 654 e chapa de aquecimento Quimis também foram empregados.

## 2.2 Reagentes e soluções

No preparo de todas as soluções foram utilizados reagentes de grau analítico e água desionizada. Durante as etapas de otimização, foram utilizadas soluções de  $\text{CuSO}_4$  (Merck) de 0,2 a 8,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , preparadas em tampão acetato de amônio ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ) em concentração de 0,1 a 0,8  $\text{mol L}^{-1}$  ( $\text{R}_1$ ). Soluções de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  1,0  $\text{mol L}^{-1}$  foram preparadas em pH 6,0 – 8,0, ajustado com solução de  $\text{NaOH}$ . O reagente  $\text{R}_2$  foi preparado dissolvendo o sal dissódico de 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolinato (Sigma) em água para obter soluções com concentração de 0,5 a 20  $\text{mmol L}^{-1}$ . Soluções de  $\text{NH}_4\text{OH}$  entre 5 e 30  $\text{mmol L}^{-1}$  foram preparadas por diluição de uma solução 25% (m/v) (Merck) e empregadas como solução transportadora. Soluções

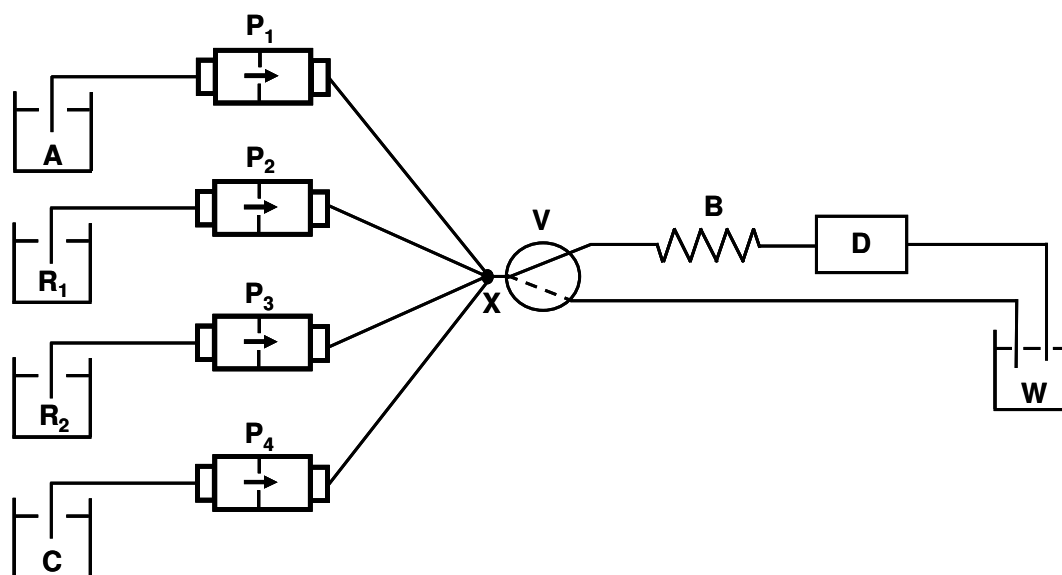
estoque de ácido úrico (Sigma)  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  e  $120 \mu\text{mol L}^{-1}$  foram preparadas pela dissolução em NaOH (Merck) ou em  $\text{H}_2\text{O}$  aquecida a  $50 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### 2.3 Estudos Preliminares

Os espectros de absorção das soluções de  $\text{CuSO}_4$ , acetato de amônio, BQA, ácido úrico e da amostra foram obtidos entre 200 e 800 nm. Subseqüentemente, a influência da ordem de adição dos reagentes foi avaliada e alguns estudos cinéticos sobre as reações envolvidas foram realizados.

### 2.4 Sistema de análises em fluxo para a determinação de ácido úrico em urina

O diagrama da Figura 8 apresenta o arranjo do módulo de análises utilizado para o desenvolvimento do procedimento analítico. A rotina de acionamento dos dispositivos para a determinação de ácido úrico é descrita na Tabela 2.



**Figura 8.** Diagrama do sistema de análises em fluxo empregado para o desenvolvimento do procedimento analítico. A: Amostra;  $R_1$ :  $\text{CuSO}_4 + \text{NH}_4\text{Ac}$ ;  $R_2$ : BQA; C:  $\text{NH}_4\text{OH}$ ;  $P_1 - P_4$ : Microbombas solenoide; V: Válvula solenoide; X: Ponto de confluência; B: Reator; D: cela de fluxo do espectrofotômetro; W: Descarte

**Tabela 2** – Rotina de acionamento das microbombas solenoide para a determinação de ácido úrico em amostras de urina.<sup>a</sup>

<i>Etapa</i>	<i>Descrição</i>	$P_1$	$P_2$	$P_3$	$P_4$	$V$	<i>Nº de pulsos</i>
1	Amostragem <sup>b</sup>	1/0	0	0	0	0	5
2	Inserção do reagente 1 <sup>b</sup>	0	1/0	0	0	0	2
3	Inserção do reagente 2 <sup>b</sup>	0	0	1/0	0	0	2
4	Transporte e detecção	0	0	0	1/0	0	60
5a	Substituição da amostra	1/0	0	0	0	1	100
5b		0	0	0	1/0	1	50

a – O acionamento de uma válvula ou microbomba solenoide é representado pelos códigos 1 e 1/0, respectivamente. O código 0 indica que os dispositivos foram mantidos desligados.

b – Etapas repetidas 4 vezes (4 ciclos de amostragem).

A zona de amostra foi formada por 4 repetições das etapas de 1 a 3 (4 ciclos de amostragem), para a inserção sequencial de alíquotas de amostra e reagentes, explorando a estratégia de amostragem binária<sup>24</sup>. Após estas etapas, a zona de amostra foi transportada até a cela de detecção espectrofotométrica com pulsos da solução transportadora (etapa 4).

Para a substituição da amostra ou soluções de referência, foi necessário garantir que a solução preenchesse toda a tubulação desde o reservatório até o ponto de confluência X. Sendo assim, 100 pulsos foram aplicados à microbomba  $P_1$  e, simultaneamente, a válvula solenoide  $V$  foi acionada, direcionando a amostra para o descarte (etapa 5a). O volume de amostra presente entre o ponto de confluência X e a válvula  $V$  foi removido com 50 pulsos da solução transportadora (etapa 5b). Desta forma, a passagem de fluidos através da cela de detecção durante a etapa de limpeza foi evitada, minimizando riscos de contaminação.

Os efeitos de parâmetros químicos (concentrações dos reagentes, pH da solução tampão e composição da solução transportadora) e hidrodinâmicos (número de pulsos aplicados em cada microbomba, número de ciclos de amostragem, comprimento do reator e efeito da parada de fluxo) foram avaliados empregando método univariado. A etapa de otimização foi realizada a fim de se maximizar a sensibilidade e minimizar o sinal referente ao branco e o consumo de reagentes. A diferença entre os sinais referentes à amostra e ao

branco e o desvio das medidas foram considerados. Em seguida, as características analíticas do procedimento foram estimadas. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e baseadas na altura máxima do pico.

### **2.5 Avaliação da estabilidade das soluções de ácido úrico e preparo das amostras**

Alguns procedimentos de preparo das soluções de ácido úrico foram avaliados, devido à maior solubilidade do analito em meio alcalino<sup>45</sup> ou com aumento de temperatura<sup>64</sup>. A estabilidade destas soluções foi avaliada pela obtenção de curvas analíticas em diferentes dias.

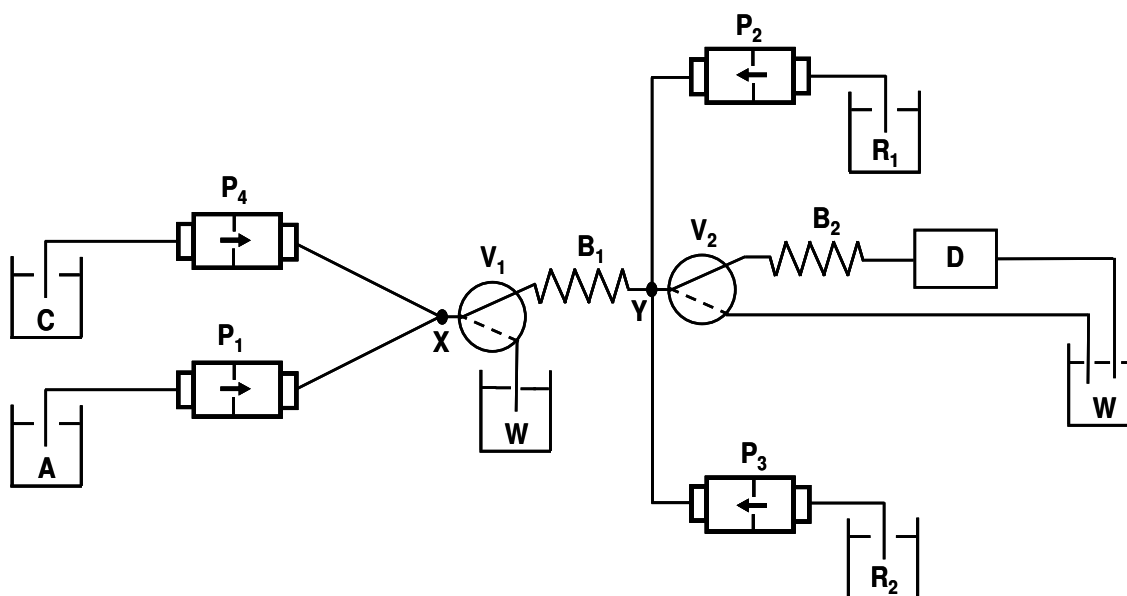
A influência de diferentes procedimentos de preparo de amostra sobre o sinal analítico foi avaliada. Uma amostra de urina foi analisada (1) sem pré-tratamento, (2) com adição de NaOH (até pH ~ 11), (3) com aquecimento a 50 °C e (4) com adição de NaOH (até pH ~11) e aquecimento a 50 °C. Nos procedimentos 2, 3 e 4, a diluição da amostra foi realizada após 15 minutos do início do pré-tratamento.

### **2.6 Efeito de espécies concomitantes e estudos de adição e recuperação do analito**

Estudos de adição e recuperação do analito foram realizados em quatro amostras de urina de diferentes indivíduos, a fim de avaliar a ocorrência de efeitos de matriz. As quantidades de analito adicionadas foram equivalentes a 25,2 e 35,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A influência da presença de ureia, creatinina, glicose, albumina, NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, ácido acético, propanona e H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> foi avaliada com adição destes concomitantes usualmente presentes na urina a uma solução de ácido úrico 35  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , em proporções pelo menos cinco vezes maiores em relação à concentração esperada do analito. Em seguida, diversas estratégias foram exploradas a fim de eliminar a interferência do ácido ascórbico.

## 2.7 Determinação direta de ácido úrico em urina com diluição da amostra em linha

O módulo de análises empregado para a determinação de ácido úrico em amostras de urina foi reconfigurado para que a diluição em linha da amostra fosse realizada (Figura 9), através da estratégia de reamostragem na zona dispersa<sup>33</sup>. Os reatores helicoidais  $B_1$  e  $B_2$  (100 cm) foram empregados para dispersão da zona de amostra e para a reamostragem, respectivamente.



**Figura 9.** Diagrama do sistema de análises em fluxo empregado para a diluição em linha da amostra. A: Amostra;  $R_1$ :  $\text{CuSO}_4 + \text{NH}_4\text{Ac}$ ;  $R_2$ : BQA; C:  $\text{NH}_4\text{OH}$ ;  $P_1 - P_4$ : Microbombas solenoide;  $V_1$  e  $V_2$ : Válvulas solenóide;  $B_1$  e  $B_2$ : Reatores; X e Y: Pontos de confluência; D: Espectrofotômetro; W: Descarte.

A Tabela 3 apresenta a rotina de acionamento das microbombas empregada na diluição em linha da amostra para a determinação direta de ácido úrico em urina. Com a válvula  $V_2$  acionada (via representada pela linha tracejada na Figura 9), um pulso foi aplicado à microbomba  $P_1$  e 15 pulsos à  $P_4$ , promovendo a dispersão da zona de amostra em  $B_1$  (etapas 1 e 2). Em seguida, a válvula  $V_2$  foi desligada e uma fração da zona dispersa (204  $\mu\text{L}$ ) e os reagentes  $R_1$  (55  $\mu\text{L}$ ) e  $R_2$  (60  $\mu\text{L}$ ) foram inseridos em  $B_2$  pelas microbombas  $P_4$ ,  $P_2$  e  $P_3$ , respectivamente, em 3 ciclos de amostragem (etapas 3-5). Antes do transporte da zona de

amostra em B<sub>2</sub>, a válvula V<sub>2</sub> foi acionada e 40 pulsos foram aplicados à microbomba P<sub>4</sub> para descartar o restante da zona de amostra dispersa em B<sub>1</sub> (etapa 6). Então, a válvula V<sub>2</sub> foi desligada e 60 pulsos da microbomba P<sub>4</sub> transportaram a zona de amostra em B<sub>2</sub> para a detecção (etapa 7). Para a substituição da amostra, 100 pulsos foram aplicados em P<sub>1</sub> com a válvula V<sub>1</sub> acionada, substituindo o volume da amostra anterior pela amostra seguinte no percurso entre a microbomba P<sub>1</sub> e o ponto de confluência X (etapa 8a). Ainda com V<sub>1</sub> acionada, 20 pulsos da microbomba P<sub>4</sub> foram utilizados para limpar o percurso entre o ponto de confluência X e a válvula V<sub>1</sub> (etapa 8b). Os outros parâmetros empregados foram os mesmos otimizados anteriormente para o sistema apresentado na Figura 8.

**Tabela 3** - Rotina de acionamento das microbombas solenoide para a determinação direta de ácido úrico em urina com diluição em linha da amostra.<sup>a</sup>

<i>Etapa</i>	<i>Descrição</i>	<i>P<sub>1</sub></i>	<i>P<sub>2</sub></i>	<i>P<sub>3</sub></i>	<i>P<sub>4</sub></i>	<i>V<sub>1</sub></i>	<i>V<sub>2</sub></i>	<i>Nº de pulsos</i>
1	Amostragem	1/0	0	0	0	0	1	1
2	Dispersão	0	0	0	1/0	0	1	15
3	Reamostragem <sup>b</sup>	0	0	0	1/0	0	0	2
4	Inserção do reagente 1 <sup>b</sup>	0	1/0	0	0	0	0	5
5	Inserção do reagente 2 <sup>b</sup>	0	0	1/0	0	0	0	5
6	Limpeza de B <sub>1</sub>	0	0	0	1/0	0	1	40
7	Transporte e detecção	0	0	0	1/0	0	0	60
8a	Substituição da amostra	1/0	0	0	0	1	0	100
8b		0	0	0	1/0	1	0	20

a – O acionamento de uma válvula ou microbomba solenoide é representado pelos códigos 1 e 1/0, respectivamente. O código 0 indica que os dispositivos foram mantidos desligados.

b – Etapas repetidas 3 vezes (3 ciclos de amostragem).

Após a otimização das frações volumétricas da amostra e dos reagentes, as características analíticas foram estimadas e os resultados das análises de 3 amostras de urina foram comparados com os obtidos pelo procedimento de referência.



## 2.8 Procedimento de referência

O procedimento enzimático disponível comercialmente em um *kit* para a determinação de ácido úrico em amostras biológicas foi utilizado como referência<sup>55</sup>. As análises foram realizadas de acordo com as instruções contidas no *kit* enzimático. As amostras foram alcalinizadas com NaOH até pH 7 – 9. Uma alíquota de 125 µL da amostra diluída dez vezes foi misturada a 1,0 mL do reagente de trabalho, que foi preparado com a mistura de 20 mL de uma solução de ácido 3,5-diclorohidroxibenzenossulfônico 4 mmol L<sup>-1</sup> (DHBS), com 1,0 mL da solução de 4-aminoantipirina 2 mmol L<sup>-1</sup> (4-AP), em azida de sódio 7,7 mmol L<sup>-1</sup>, contendo uricase (≥ 3.000 U L<sup>-1</sup>) e peroxidase (≥ 18.000 U L<sup>-1</sup>). Ambas as soluções estoque continham tampão fosfato 100 mmol L<sup>-1</sup> (pH = 7,5). A mistura foi imersa em banho aquecido a 37 °C por 5 minutos e a quininoimina formada foi quantificada por espectrofotometria, em 505 nm, empregando uma cela de volume reduzido.

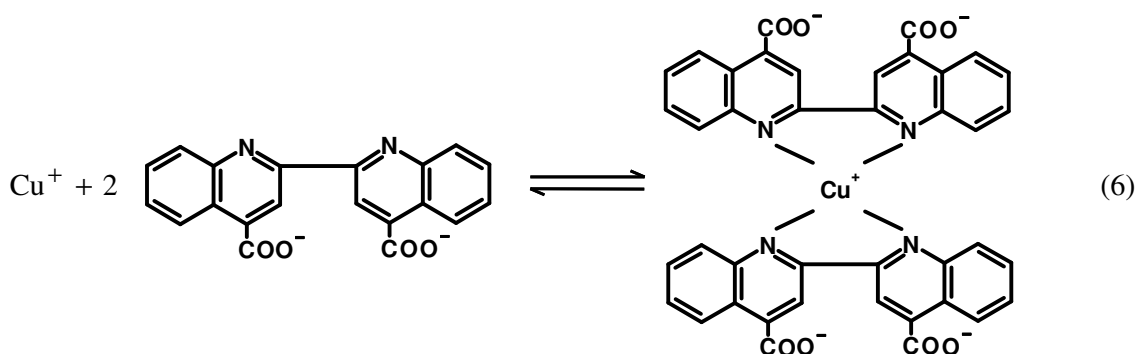
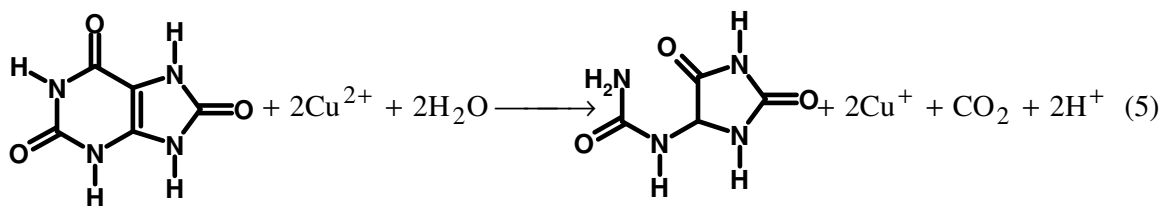
3

*Resultados*

*e*

*Discussão*

A quantificação de ácido úrico foi baseada na oxidação do analito a alantoína pelos íons Cu(II) (Equação 5), sendo a formação dos íons Cu(I) medida por espectrofotometria através da formação do complexo de cor púrpura com BQA (Equação 6).

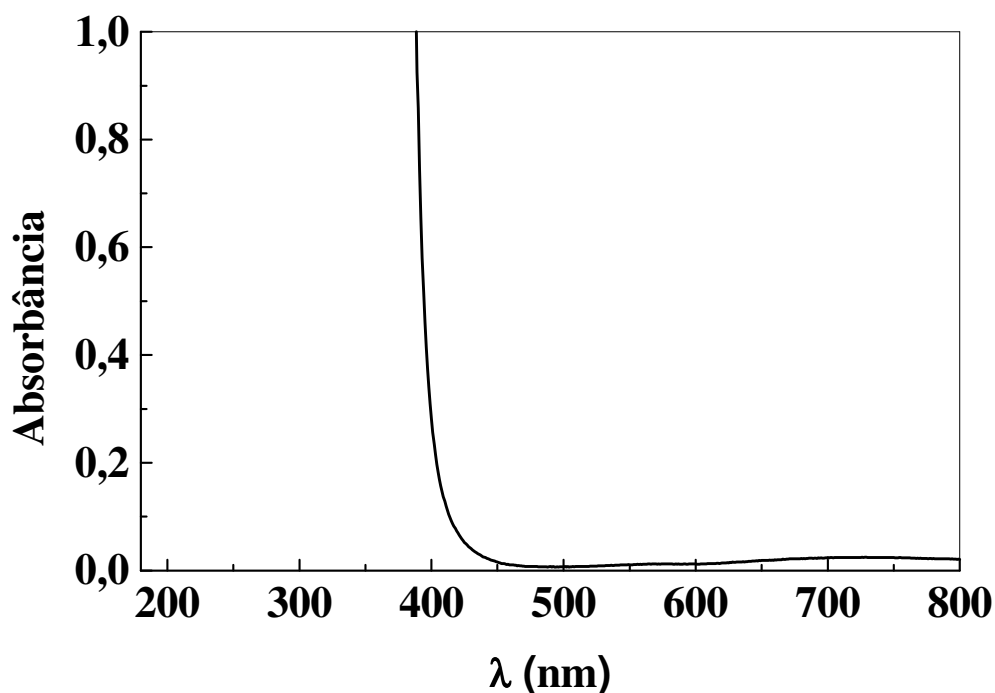


O espectro de absorção UV-vis do íon complexo  $[\text{Cu}(\text{BQA})_2]^{3-}$  apresenta duas bandas, sendo que a absorvidade molar em 354 nm é aproximadamente cinco vezes maior que em 562 nm<sup>63</sup>. Os espectros de absorção dos reagentes e de uma amostra de urina foram obtidos, a fim de avaliar o melhor comprimento de onda para a medida analítica. Um estudo cinético também foi realizado para melhor entendimento do sistema utilizado. Posteriormente, o sistema de análises em fluxo foi otimizado e as características analíticas para a determinação de ácido úrico em amostras de urina foram avaliadas.

### 3.1 Estudos preliminares

#### 3.1.1 Espectros de absorção das soluções

Como o íon complexo  $[\text{Cu}(\text{BQA})_2]^{3-}$  apresenta intensa absorção em 354 nm, os espectros das soluções dos reagentes  $\text{CuSO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Ac}$  e BQA foram obtidos, bem como um espectro de uma mistura destes reagentes (Figura 10), para avaliar a extensão da absorção de radiação no ultravioleta.



**Figura 10.** Espectro de absorção do branco analítico.  $\text{CuSO}_4$   $0,412 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $\text{NH}_4\text{Ac}$   $0,4 \text{ mol L}^{-1}$  e BQA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Um espectro de absorção de uma amostra diluída de urina (Figura 11) foi obtido com a mesma finalidade. A amostra foi coletada pela manhã, que é o período em que muitas espécies estão em alta concentração na urina. Diluição de 100 vezes foi realizada porque a concentração de ácido úrico em urina é elevada<sup>9</sup> e, para o procedimento proposto, a diluição da amostra seria necessária.

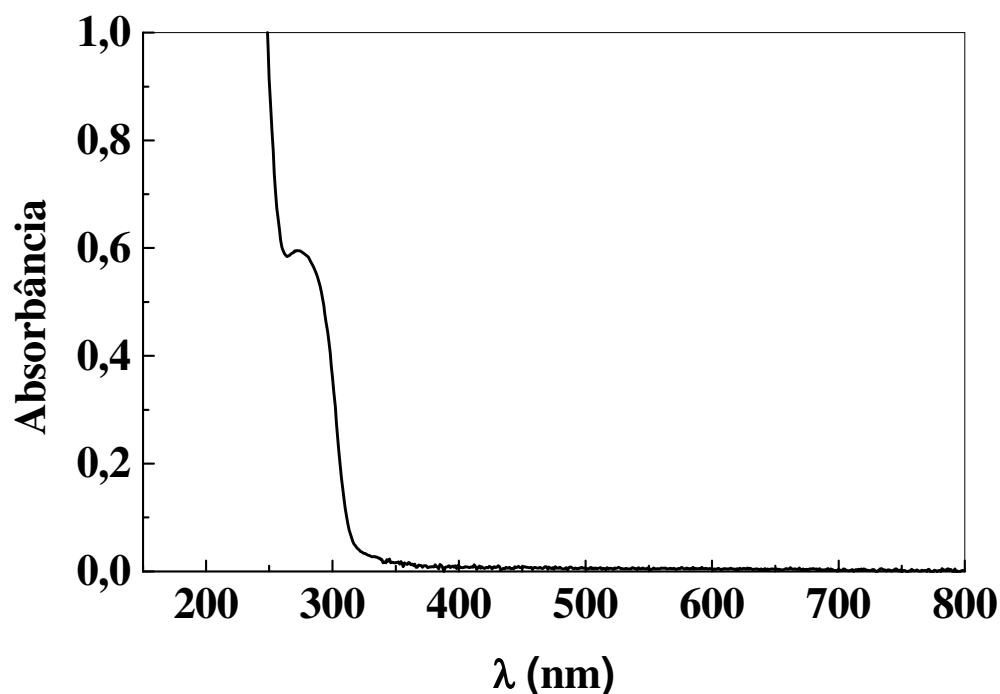


Figura 11. Espectro de absorção de uma amostra de urina diluída 100 vezes.

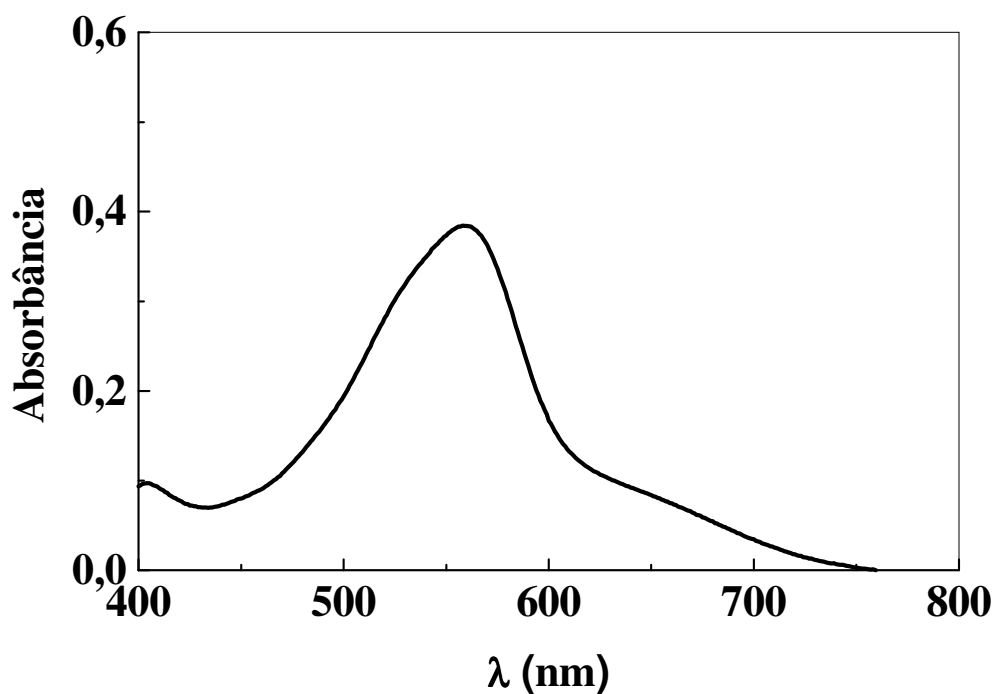
A partir dos espectros de absorção apresentados nas Figuras 10 e 11, confirma-se que a medida de absorbância do produto formado é mais seletiva na região do visível, uma vez que a amostra e os reagentes apresentam intensa absorção de radiação na região do ultravioleta. Dessa forma, apesar da maior absorvidade molar em 354 nm, o comprimento de onda de 562 nm foi selecionado para o desenvolvimento do procedimento analítico.

### 3.1.2 Efeito da ordem de adição dos reagentes

A ordem de adição dos reagentes mostrou-se importante para a formação do complexo  $[\text{Cu}(\text{BQA})_2]^{3-}$ . Neste estudo, a solução contendo ácido úrico sempre foi adicionada primeiramente, sendo investigadas diferentes ordens de adição dos demais reagentes.

Com a adição da solução de  $\text{CuSO}_4$ , seguida da solução de BQA, ou vice-versa, prontamente havia a formação de precipitado verde de  $\text{Cu}(\text{BQA})$ . A adição de uma solução de acetato de amônio ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ ), empregada para ajuste de acidez, desfavorece a formação deste

precipitado, devido à presença de pequenas quantidades de  $\text{NH}_{3(\text{aq})}$  e de íons acetato ( $\text{Ac}^-$ ) livres que levam à formação dos complexos  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  ( $K_f = 2,17 \times 10^{13}$ )<sup>65</sup> e  $[\text{Cu}(\text{Ac})_2]$  ( $K_f = 4,2 \times 10^3$ )<sup>66</sup>, a 25°C. A adição de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  após a formação do precipitado não foi efetiva para a solubilização. Sendo assim, a ordem preferencial de adição de reagentes (ácido úrico, Cu(II),  $\text{NH}_4\text{Ac}$  e BQA) foi empregada para a obtenção do espectro da Figura 12. Com esta ordem de adição, não foi visualmente observada a formação de precipitado em um intervalo de tempo de 30 min após a mistura dos reagentes. O máximo de absorção é coincidente com o relatado na literatura<sup>63</sup>.



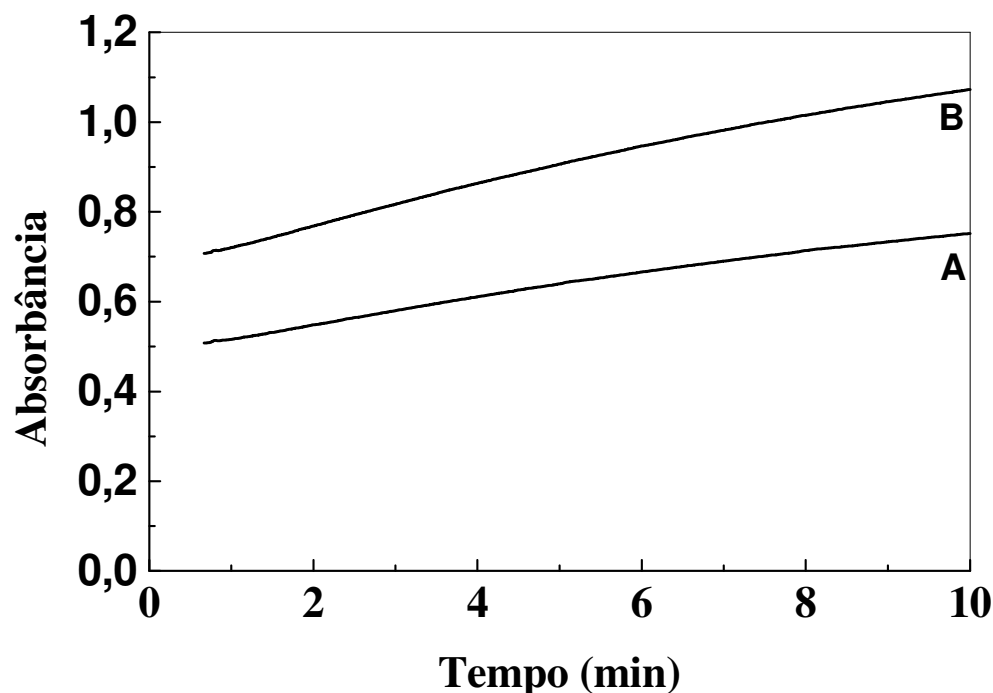
**Figura 12.** Espectro de absorção de uma solução contendo  $0,412 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$ ,  $0,40 \text{ mol L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{Ac}$ ,  $1,09 \text{ mmol L}^{-1}$  BQA e  $20,3 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  ácido úrico.

O emprego de uma solução tampão acetato/ácido acético também foi considerado para ajuste de acidez. Em um teste qualitativo, com solução contendo Cu(II)  $0,42 \text{ mmol L}^{-1}$ , acetato de sódio  $0,40 \text{ mol L}^{-1}$  e BQA  $1,1 \text{ mmol L}^{-1}$ , a formação do precipitado  $\text{Cu}(\text{BQA})$  foi observada visualmente em menos de 5 minutos. Uma solução tampão  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  forneceria

maiores concentrações de  $\text{NH}_{3(\text{aq})}$  livre, o que seria efetivo para evitar a formação do precipitado, devido à maior constante de formação do complexo  $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$  em relação àquela para o complexo  $[\text{Cu}(\text{Ac})_2]$ . Entretanto, a faixa de pH de máxima capacidade tamponante do sistema  $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$  é de 8,2 a 10,2 e, em meio alcalino, a reação dos íons  $\text{Cu}(\text{II})$  com proteínas é favorecida<sup>62</sup>, o que poderia resultar em uma interferência positiva na análise de amostras de urina. Portanto, para o desenvolvimento do procedimento em fluxo, decidiu-se preparar a solução de  $\text{Cu}(\text{II})$  em meio de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  para evitar a formação do precipitado no reator durante a etapa de amostragem.

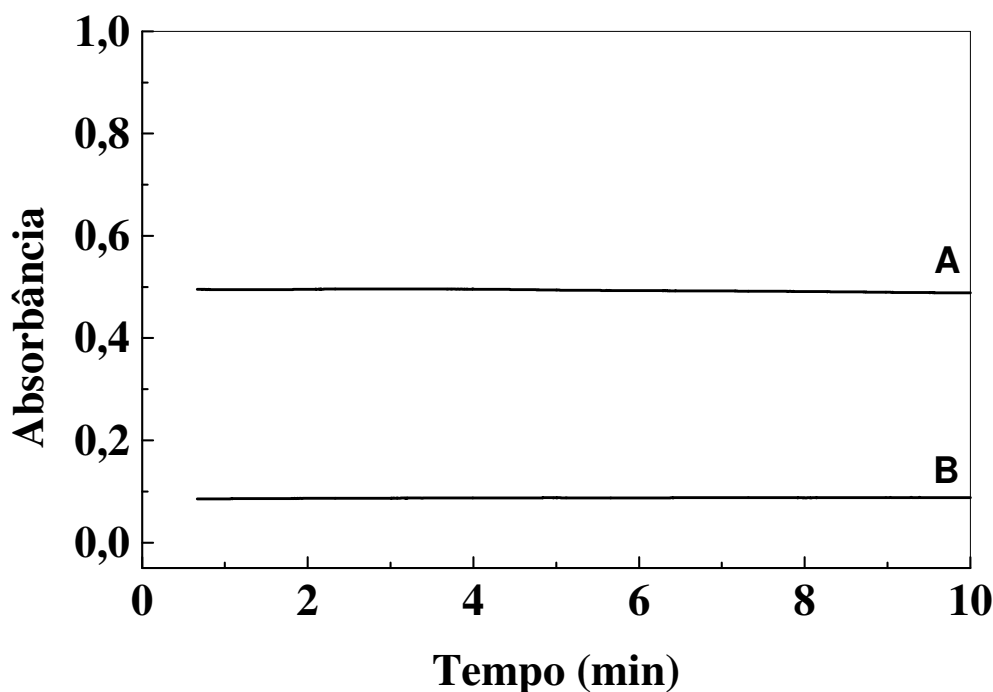
### 3.1.3. Estudos cinéticos

A formação do produto reacional em função do tempo foi monitorada após 40 segundos da adição dos reagentes, em duas soluções com diferentes concentrações de ácido úrico (Figura 13).



**Figura 13.** Estudo cinético com soluções contendo (A) 29,6 e (B) 41,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido úrico ( $\lambda = 562 \text{ nm}$ ). As demais condições são iguais às descritas na Figura 12.

Em um intervalo de tempo de 10 min, uma variação gradativa do sinal analítico de aproximadamente 40% foi observada. O valor de absorbância no instante inicial foi significativo, indicando que as reações se desenvolvem de forma apreciável em um curto período de tempo, o que é desejável para o desenvolvimento de um procedimento em fluxo. Nas condições em que o experimento foi realizado, a velocidade de formação do produto pode ter sido limitada pela redução de Cu(II) pelo ácido úrico ou pela formação do complexo  $[\text{Cu}(\text{BQA})_2]^{3-}$ . Para avaliar este aspecto, uma solução de íons Cu(I) foi preparada adicionando excesso de ácido ascórbico a uma solução de  $\text{CuSO}_4$ . Uma solução foi então preparada com alíquotas das soluções de Cu(I) e BQA e absorbância correspondente foi monitorada em função do tempo (Figura 14).



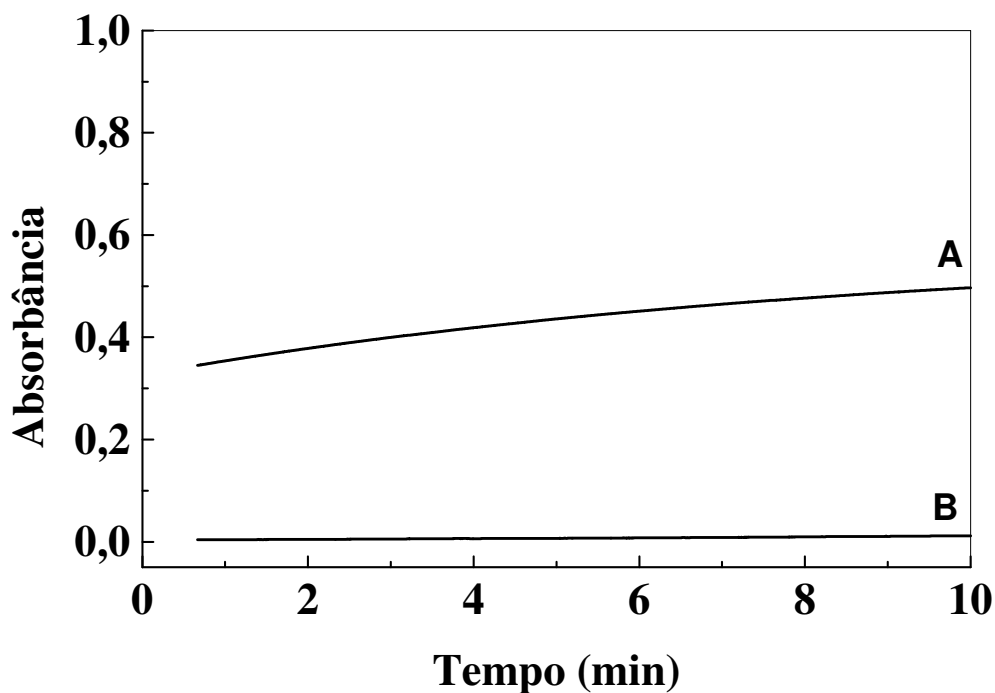
**Figura 14.** Estudo cinético com soluções contendo (A) 100 ou (B) 20,6  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de íons Cu(I),  $\lambda = 562 \text{ nm}$ . As demais condições são iguais às descritas na Figura 12.

O aumento do sinal analítico em função do tempo, observado na Figura 13, não se deve à cinética de reação de complexação entre Cu(I) e BQA. De acordo com a Figura 14,



esta espécie forma-se instantaneamente, não havendo variação significativa da concentração do complexo em função do tempo.

Outro fator que poderia contribuir para o aumento do sinal analítico na Figura 13 é a formação de precipitado Cu(BQA), com conseqüente espalhamento de radiação devido à presença de sólidos em suspensão. Este efeito deveria ser similar em todos os comprimentos de onda, inclusive naqueles em que o complexo não apresenta absorção significativa de radiação. A Figura 15 apresenta o monitoramento do sinal analítico em função do tempo em dois comprimentos de onda (562 e 750 nm) sendo que, neste último, a absorção de radiação pelo complexo é desprezível (Figura 12). Os resultados indicam que a formação de precipitado também não foi a causa do aumento do sinal.



**Figura 15.** Estudo cinético com soluções contendo  $20,3 \mu\text{mol L}^{-1}$  de ácido úrico, com sinal monitorado em (A) 562 e (B) 750 nm. As demais condições são iguais às descritas na Figura 12.

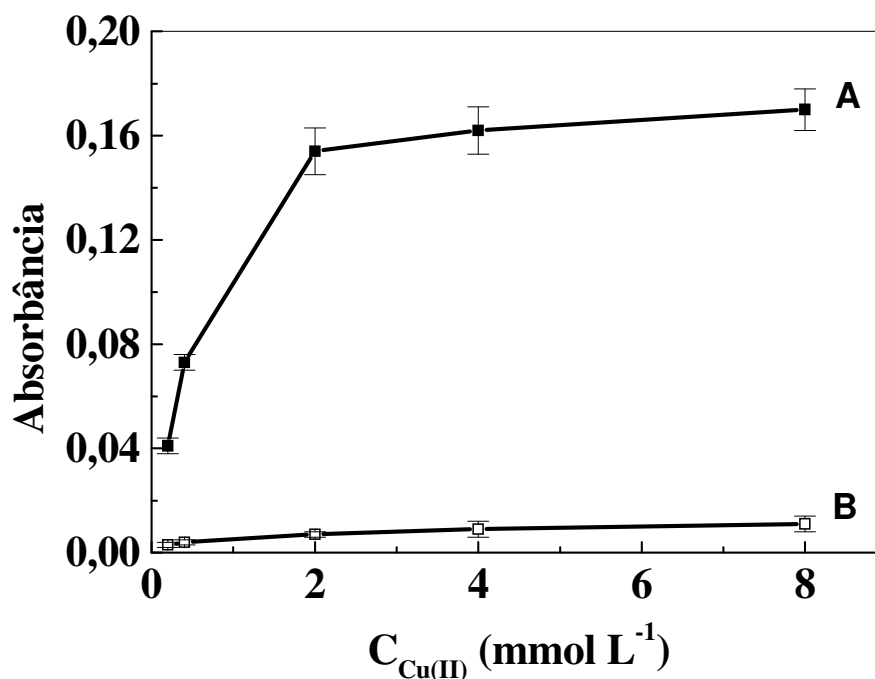
Sendo assim, conclui-se que o aumento do sinal analítico em função do tempo, observado na Figura 13, ocorreu devido à cinética da reação entre Cu(II) e ácido úrico. Em sistemas de análises em fluxo, a reprodutibilidade do tempo de residência das amostras permite que as análises sejam realizadas sem que as reações atinjam o estado de equilíbrio químico. Entretanto, é conveniente avaliar se o aumento do tempo de residência da zona de amostra contribui para o aumento de sensibilidade durante o desenvolvimento do procedimento, uma vez que a absorvância (Figura 13) foi monitorada em função do tempo após 40 s da mistura das soluções.

### **3.2 Otimização do sistema de análises em fluxo**

A influência de diversos parâmetros sobre o sinal analítico foi avaliada, a fim de se obter máxima sensibilidade para a determinação de ácido úrico. O monitoramento do sinal em dois comprimentos de onda foi cogitado para compensar sinais espúrios, como formação de precipitado ou perturbações por efeito Schlieren<sup>26,67</sup>. Entretanto, devido ao aumento do nível de ruído pela propagação de erros e por não terem sido observadas anomalias que exigissem a compensação do sinal, o monitoramento em 562 nm foi selecionado.

Nos estudos preliminares, o espectro de absorção do complexo (Figura 12) foi obtido com concentrações de Cu(II), BQA e ácido úrico iguais a 0,412 mmol L<sup>-1</sup>, 1,09 mmol L<sup>-1</sup> e 20,3 μmol L<sup>-1</sup>, respectivamente, garantindo excesso de ligante em relação ao íon metálico, que também estava em excesso em relação ao analito. Para avaliar a influência da concentração dos reagentes sobre o sinal analítico no sistema de análises em fluxo, as faixas escolhidas para as concentrações de Cu(II) e BQA foram 0,2-8,0 e 0,5-20 mmol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Neste estudo, os números de pulsos aplicados às microbombas que gerenciavam as soluções de ácido úrico, Cu(II) e BQA foram fixados em 5 (55 μL), 1 (12 μL) e 1(13 μL), respectivamente. O pH foi fixado em 7,0, com 0,40 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Ac, e o

comprimento do reator em 100 cm (*d.i.* 0,8 mm). A solução transportadora foi 30 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH para evitar a formação de precipitado, com a complexação do Cu(II) por NH<sub>3(aq)</sub> livre. Esta estratégia foi previamente utilizada na determinação de taninos em bebidas<sup>63</sup>, na qual, sem o uso de complexante, o depósito do precipitado Cu(BQA) era observado no reator e na cela de fluxo, causando deriva de linha base. A amostragem binária<sup>24</sup> foi empregada (2 ciclos de amostragem) para melhorar as condições de mistura entre amostra e reagentes. A Figura 16 apresenta a variação do sinal analítico em função da concentração da solução de CuSO<sub>4</sub>.

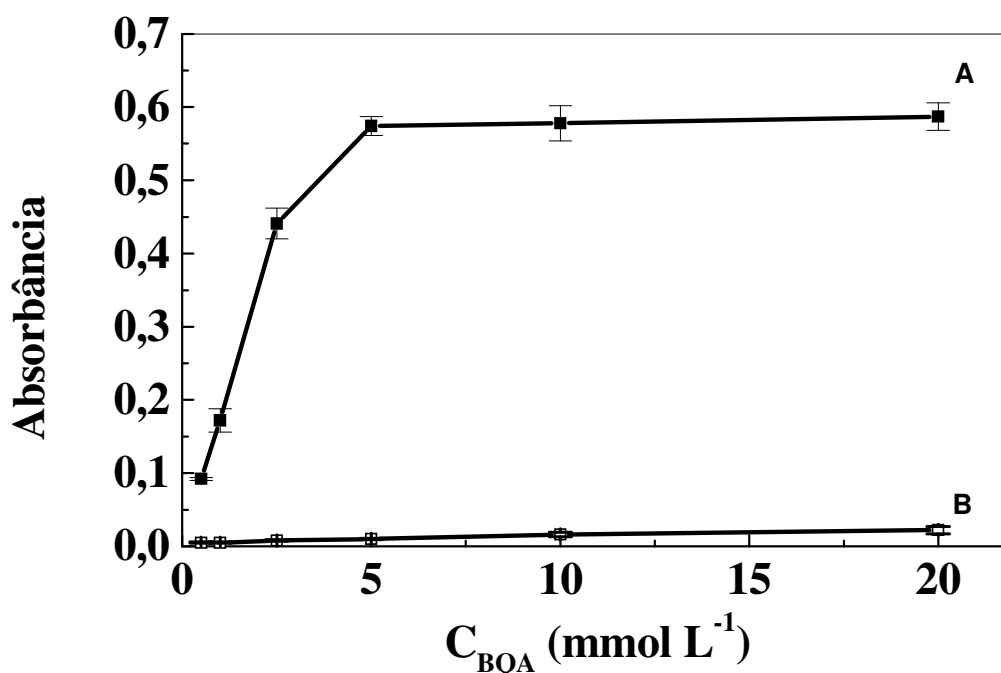


**Figura 16.** Efeito da concentração de Cu<sup>2+</sup> sobre o sinal analítico (A) e do branco (B). Solução de CuSO<sub>4</sub> em 0,40 mol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>Ac (pH = 7,0), 1,0 mmol L<sup>-1</sup> BQA, 0,3 mmol L<sup>-1</sup> ácido úrico, reator de 100 cm e 2 ciclos de amostragem. Solução transportadora: NH<sub>4</sub>OH 30 mmol L<sup>-1</sup>.

De acordo com a Figura 16, há um aumento significativo do sinal analítico com a concentração de Cu(II) até 2,0 mmol L<sup>-1</sup>. Para soluções mais concentradas, observa-se aumento de até 50% do sinal referente ao branco, provavelmente devido à formação do

precipitado Cu(BQA). A formação de precipitado também justifica o pequeno aumento do sinal analítico (10%) com a concentração de CuSO<sub>4</sub> a partir de 2,0 mmol L<sup>-1</sup>. Portanto, os estudos posteriores foram realizados com solução de Cu(II) 2,0 mmol L<sup>-1</sup>.

A concentração de BQA foi variada entre 0,5 e 20 mmol L<sup>-1</sup> e a influência sobre o sinal analítico é apresentada na Figura 17. Não foi verificada variação significativa do sinal analítico com concentrações de BQA acima de 5,0 mmol L<sup>-1</sup>, pois há excesso de ligante suficiente para reagir com todo Cu(I) formado. Entretanto, há um pequeno aumento do sinal do branco, provavelmente devido à formação do precipitado, embora o efeito seja menos significativo que aquele observado no aumento da concentração de Cu(II).

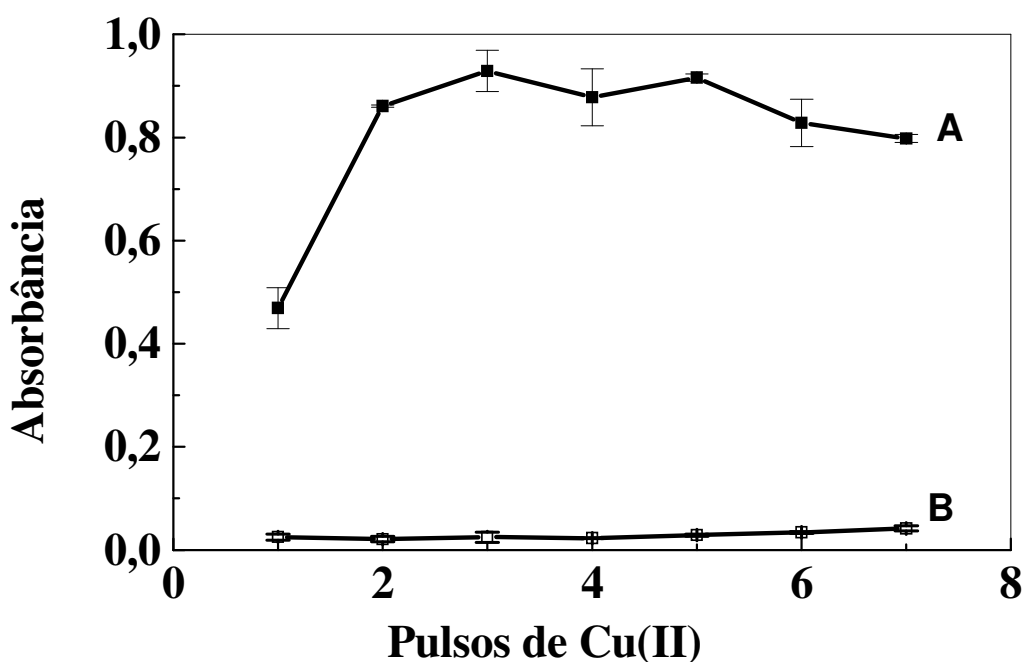


**Figura 17.** Efeito da concentração de BQA sobre o sinal analítico (A) e do branco (B). Concentração de Cu(II) = 2,0 mmol L<sup>-1</sup> e demais condições descritas na Figura 16.

As concentrações otimizadas são coerentes com o relatado na literatura. Na determinação de taninos em bebidas, em sistema de análises em fluxo, empregando válvulas solenoide<sup>63</sup>, a proporção das concentrações Cu(II):BQA utilizada foi 1:3, que é próxima à que

foi adotada no presente procedimento. A concentração do ligante deve ser, no mínimo, duas vezes maior que do Cu(I) gerado para atender à estequiometria da reação (equação 6)<sup>62</sup>.

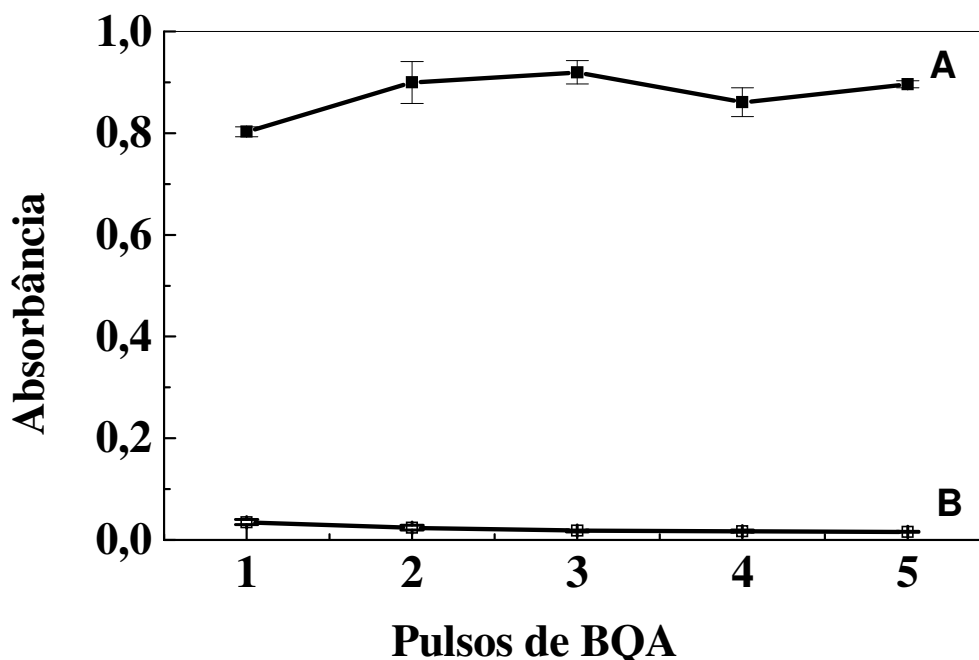
Após a otimização das concentrações dos reagentes, o efeito da fração volumétrica de amostra e reagentes foi avaliado pela alteração do número de pulsos de cada solução. O número de pulsos da solução de Cu(II) foi variado entre 1 e 7 (12 e 84  $\mu\text{L}$ ), com as concentrações de Cu(II) e de BQA fixadas em 2,0 e 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , respectivamente (Figura 18).



**Figura 18.** Efeito do número de pulsos de Cu(II) sobre o sinal analítico (A) e do branco (B). Soluções de Cu(II) 2,0  $\text{mmol L}^{-1}$ , BQA 5,0  $\text{mmol L}^{-1}$  e demais condições iguais às descritas na Figura 16.

Na Figura 18, observa-se que a partir de 2 pulsos de Cu(II) não ocorreu aumento significativo do sinal analítico. A partir de 5 pulsos, ocorreu diminuição de aproximadamente 13% do sinal analítico, devido à diluição da amostra, e nenhuma variação significativa do sinal do branco, devido à presença de maiores quantidades de Cu(II) na zona de amostra, o que favorece a formação do precipitado Cu(BQA). Visando obter melhor resposta e

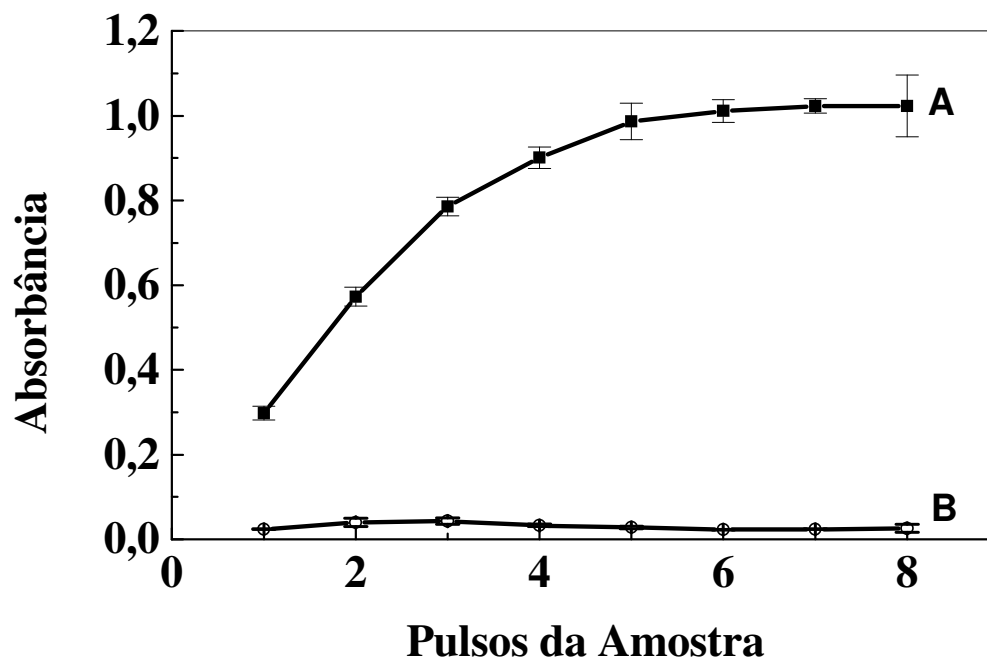
minimizar o consumo de reagentes, o número de pulsos de Cu(II) foi fixado em 2, que corresponde a 24  $\mu$ L. De forma similar, o efeito do número de pulsos de BQA (Figura 19) foi avaliado entre 1 e 5 (13 e 65 $\mu$ L).



**Figura 19.** Efeito do número de pulsos de BQA sobre o sinal analítico (A) e do branco (B). As condições são iguais às descritas na Figura 18.

O número de pulsos escolhido para a solução de BQA também foi igual a 2, correspondente a 26  $\mu$ L, pois acima deste valor não ocorre variação significativa do sinal analítico. Os sinais do branco mantiveram-se praticamente constantes com a variação do número de pulsos de BQA, uma vez que a presença de maiores quantidades do ligante não é tão crítica para a formação do precipitado quanto a presença de Cu(II).

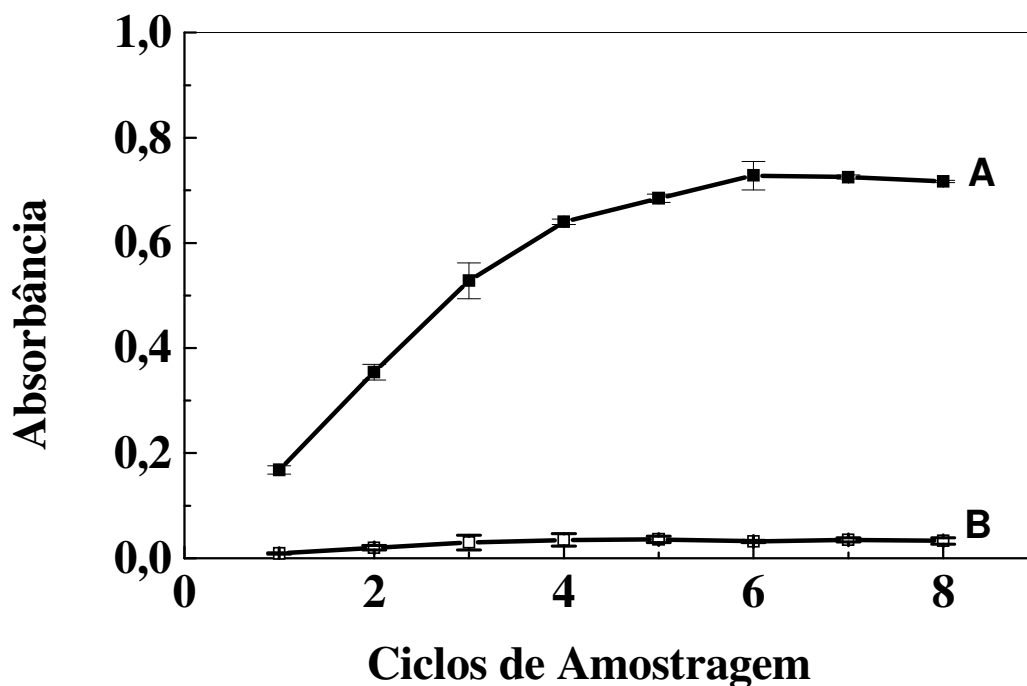
A influência do número de pulsos da amostra sobre o sinal analítico também foi avaliada. Fixando-se 2 pulsos para cada reagente, o número de pulsos da amostra foi variado entre 1 e 9 (11 e 99  $\mu$ L), sendo os resultados apresentados na Figura 20.



**Figura 20.** Efeito do número de pulsos da amostra sobre o sinal analítico (A) e do branco (B). As condições são iguais às descritas na Figura 18.

De acordo com o gráfico apresentado na Figura 20, com número de pulsos da amostra maior que 5, não há aumento significativo do sinal analítico, nem variação significativa do branco analítico.

A influência do número de ciclos de amostragem (1 a 8) sobre o sinal analítico foi avaliada, fixando os parâmetros anteriormente otimizados (Figura 21). Com a variação desse parâmetro, era esperado aumento do sinal analítico, devido à minimização do efeito da dispersão da zona de amostra. Desta forma, a concentração da solução de ácido úrico foi reduzida de 0,3 para 0,09 mmol L<sup>-1</sup>, para que a absorbância não ultrapassasse o valor 1,0.



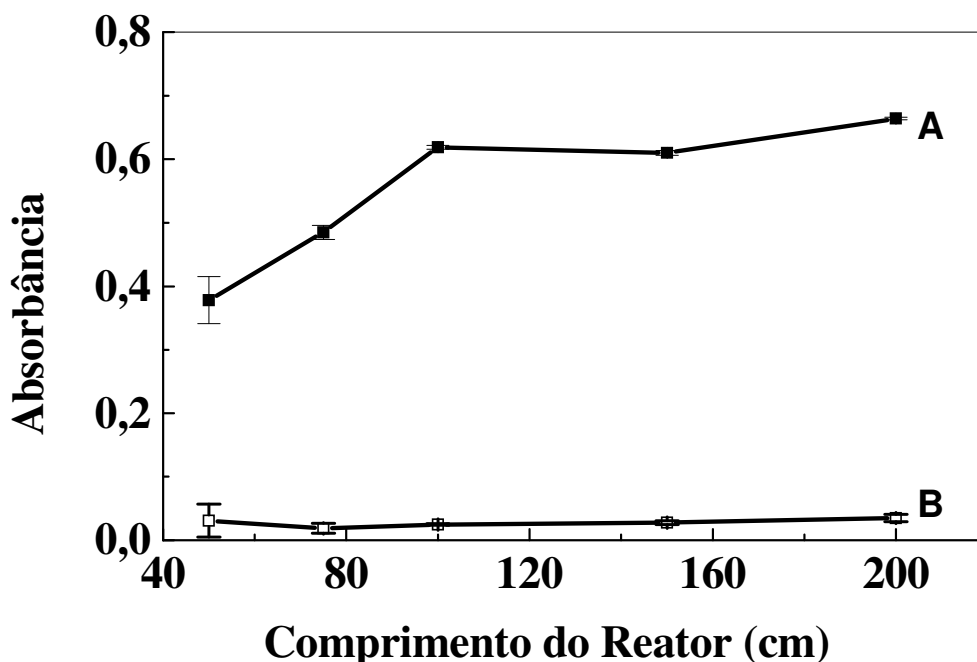
**Figura 21.** Efeito do número de ciclos de amostragem sobre o sinal analítico (A) e do branco (B). Solução de  $\text{CuSO}_4$   $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $0,40 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  ( $\text{pH} = 7,0$ ),  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  BQA,  $90 \mu\text{mol L}^{-1}$  ácido úrico e reator de  $100 \text{ cm}$ . Solução transportadora  $\text{NH}_4\text{OH}$   $30 \text{ mmol L}^{-1}$ .

A partir dos dados apresentados na Figura 21, observa-se que há aumento significativo do sinal analítico até 6 ciclos de amostragem. Apesar disto, 4 ciclos de amostragem foram escolhidos, uma vez que acima desse valor os sinais apresentavam ruído ao retornar à linha base, característico de perturbações por efeito Schlieren<sup>26</sup>. Além disso, com 6 ciclos de amostragem o consumo de reagentes aumentaria em 50%, para uma variação de sinal analítico de 13%.

O comprimento do reator pode afetar a dispersão e o tempo de residência da zona de amostra, influenciando diretamente na magnitude do sinal analítico. Sendo assim, o efeito da variação deste parâmetro sobre a resposta foi avaliado. Proporcionalmente à variação do comprimento do reator (50, 75, 100, 150 e 200 cm), o número de ciclos de amostragem foi



variado (2, 3, 4, 6 e 8 ciclos, respectivamente), para que a extensão da zona de amostra fosse proporcional ao comprimento do percurso analítico, minimizando efeitos de dispersão. A Figura 22 apresenta a influência desta variação sobre os sinais analítico e do branco.

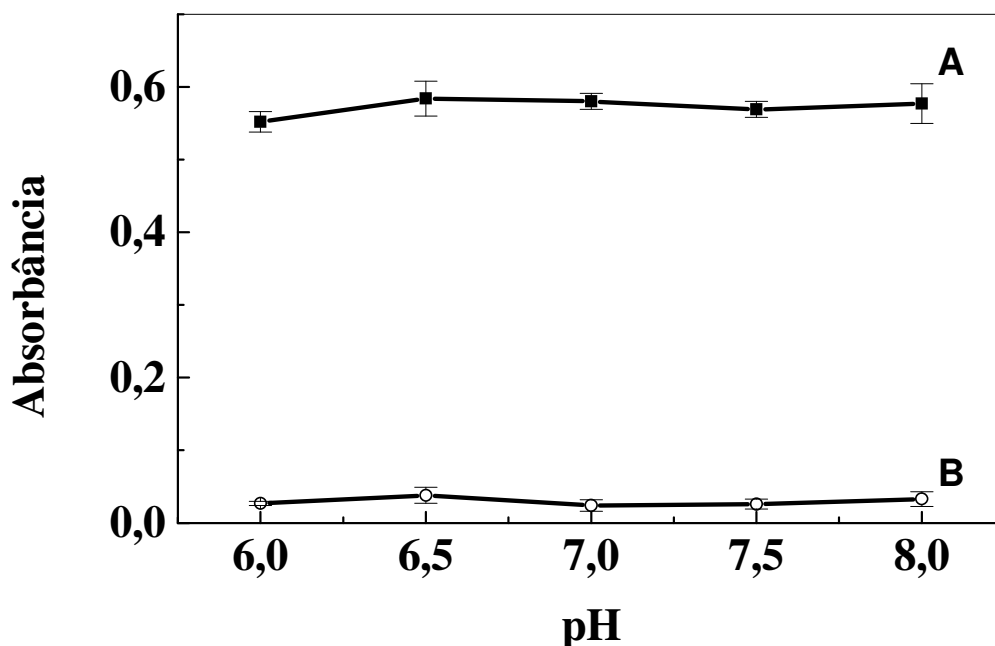


**Figura 22.** Efeito do comprimento do reator sobre o sinal analítico (A) e do branco (B). As demais condições são iguais às descritas na Figura 21.

A partir dos dados apresentados na Figura 22, observa-se que o sinal analítico aumenta em 30% e não há variação significativa do sinal do branco quando o reator aumenta de 75 para 100 cm. Com reatores maiores, além de não ser observado aumento significativo do sinal analítico, há maior consumo de reagentes e diminuição da frequência de amostragem. O emprego do reator de 100 cm, utilizando 4 ciclos de amostragem, foi então selecionado.

O efeito do pH da solução tampão também foi avaliado, visto que a acidez do meio pode afetar tanto a redução de Cu(II) pelo analito como a formação do complexo com BQA. Para a determinação de taninos em bebidas<sup>63</sup>, uma solução de NH<sub>4</sub>Ac foi utilizada para ajuste de acidez, fornecendo NH<sub>3(aq)</sub> livre e íons acetato para gerar complexos solúveis com os íons

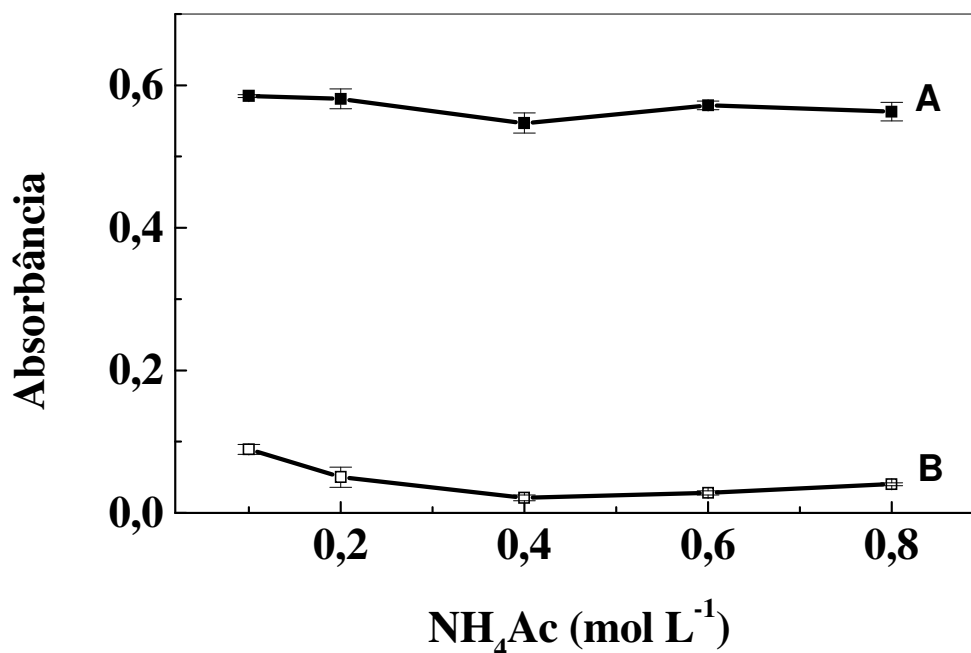
Cu(II) e evitando a formação de precipitado. Além disso, o emprego da solução tampão evita a diminuição do pH e o surgimento de bolhas de CO<sub>2</sub> devido à oxidação do ácido úrico (equação 5). Neste estudo, a solução de Cu(II) foi preparada em NH<sub>4</sub>Ac 0,4 mol L<sup>-1</sup> e a influência do pH sobre os sinais analítico e do branco foi avaliada entre 6,0 e 8,0 (Figura 23), intervalo em que o tampão apresenta maior capacidade tamponante.



**Figura 23.** Efeito do pH sobre o sinal analítico (A) e do branco (B). As demais condições são iguais às descritas na Figura 21.

Os sinais analíticos e do branco não variaram significativamente com o pH do tampão. Sendo assim, pH igual a 7,0 foi escolhido devido à solução de NH<sub>4</sub>Ac apresentar capacidade tamponante máxima nesta condição. Além disso, neste pH, evita-se a redução dos íons Cu(II) por proteínas, que ocorre em meio alcalino<sup>62</sup> e que poderia interferir nas análises das amostras de urina. As proteínas estão usualmente presentes na urina de indivíduos saudáveis em concentrações até 60 mg L<sup>-1</sup> (coleta em 24 horas)<sup>68</sup>, que é de 4 a 12 vezes menor que a concentração de ácido úrico.

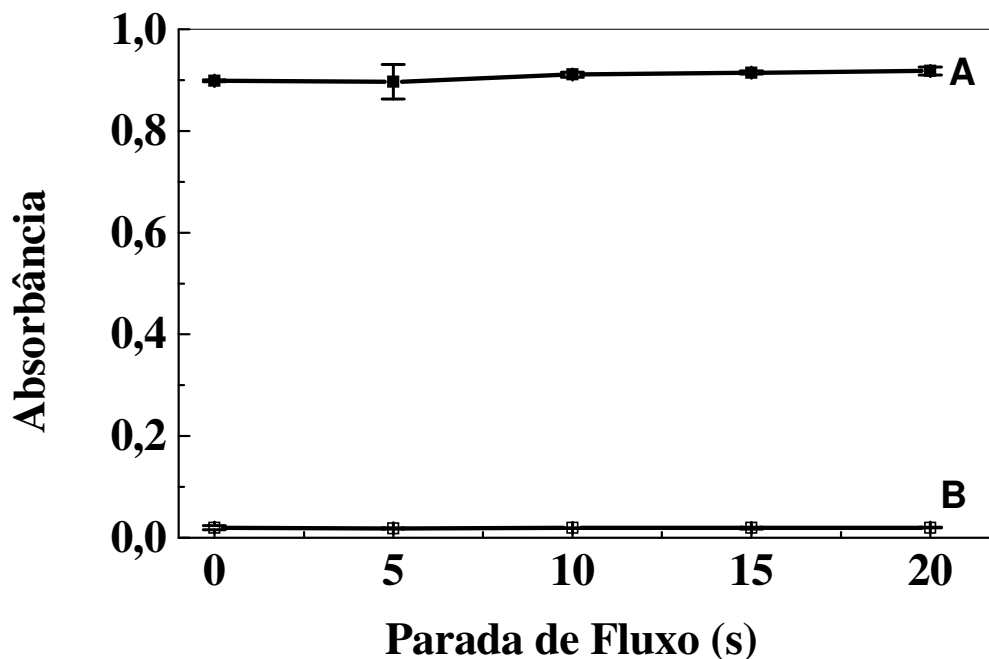
O efeito da capacidade tamponante foi avaliado pela variação da concentração de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  utilizada no preparo da solução de  $\text{Cu(II)}$  (Figura 24), não afetando significativamente o sinal analítico. A concentração escolhida foi  $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ , pois o sinal do branco foi mínimo neste valor. Em concentrações mais baixas, ocorreu a formação do precipitado, devido às menores concentrações de complexantes ( $\text{NH}_{3(\text{aq})}$  livre e íons acetato) no meio. Um pequeno aumento no sinal do branco ocorreu em concentrações maiores que  $0,40 \text{ mol L}^{-1}$  devido às perturbações por efeito Schlieren.



**Figura 24.** Efeito da concentração de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  sobre o sinal analítico (A) e do branco (B). As demais condições são as descritas na Figura 21.

O efeito do tempo de residência da zona de amostra sobre o sinal analítico foi avaliado pela interrupção do fluxo, uma vez que pequenas variações no sinal foram observadas em função do tempo durante os estudos cinéticos. A Figura 25 apresenta o efeito deste fator sobre os sinais analítico e do branco, demonstrando que o aumento do tempo de residência não afetou significativamente a resposta analítica, sendo descartado o emprego desta estratégia.

No estudo cinético (Figura 13), a variação do sinal foi mais significativa em intervalos de tempo maiores. Todavia, tempos de parada de fluxo muito altos (> 30 s) causam a diminuição da frequência de amostragem, não sendo adequados para o desenvolvimento de procedimentos em sistemas de análises em fluxo não segmentado.

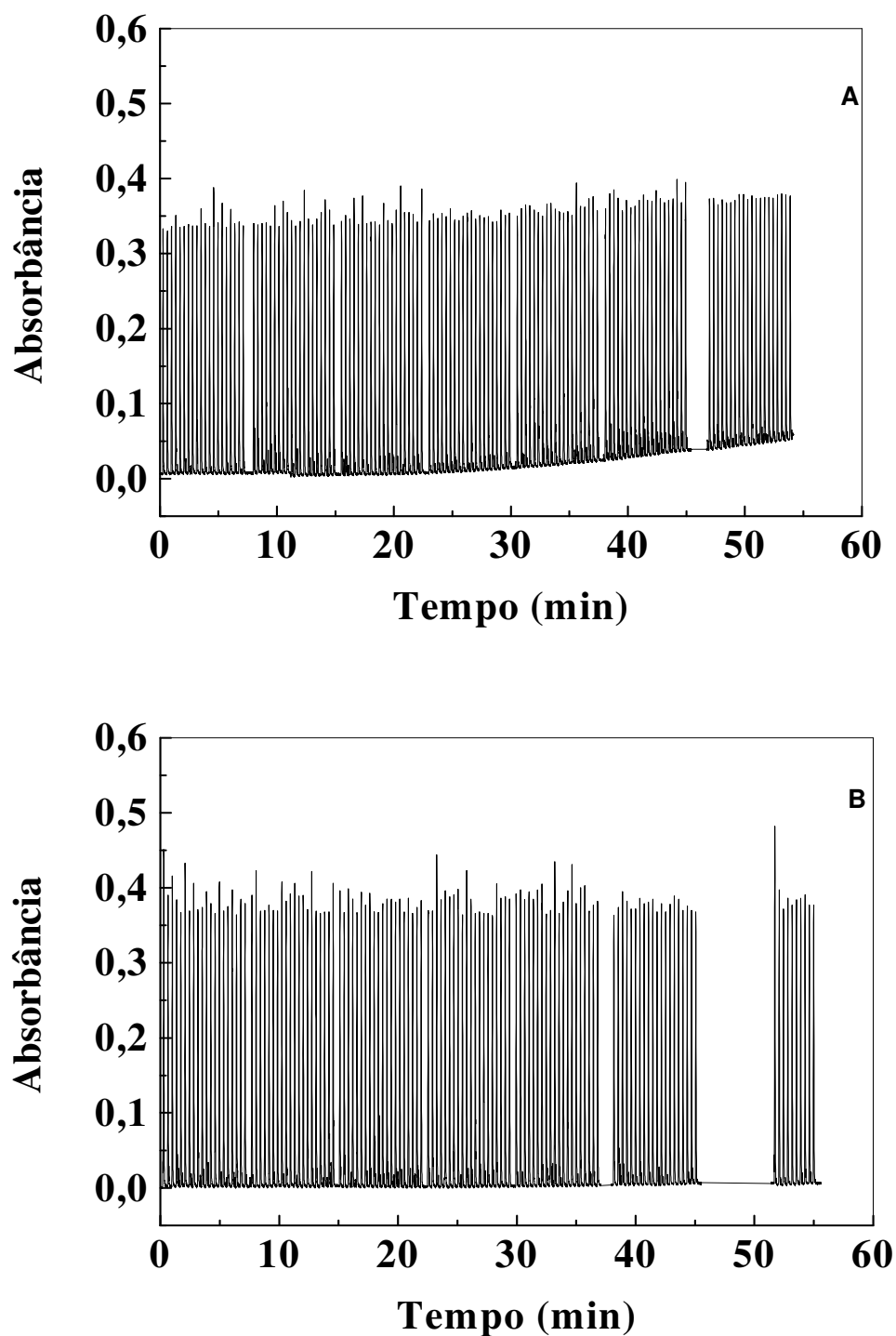


**Figura 25.** Efeito do tempo de parada de fluxo sobre o sinal analítico (A) e do branco (B). As demais condições são iguais às descritas na Figura 21.

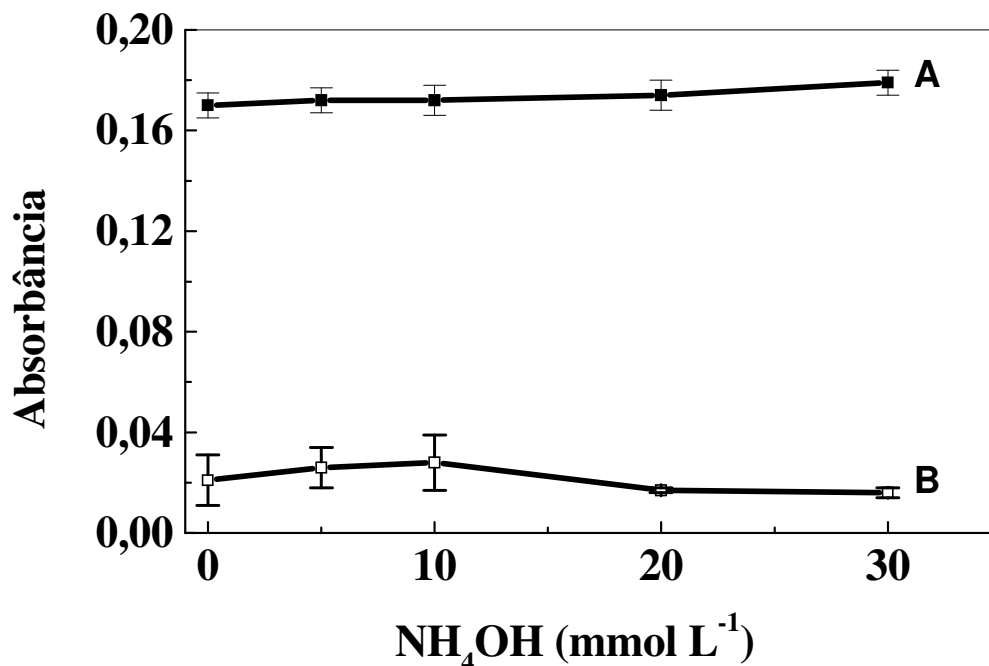
Comparando os sinais analíticos apresentados nas Figuras 24 e 25, obtidos com as mesmas concentrações dos reagentes, observa-se que houve um aumento aproximado de 50%. Durante as etapas de otimização, uma solução estoque de ácido úrico em meio alcalino foi empregada por mais de três semanas e, para o estudo do tempo de parada de fluxo, uma nova solução estoque foi preparada. Um estudo sobre a estabilidade e forma de preparação das soluções de ácido úrico foi realizado e os resultados serão discutidos posteriormente. De qualquer maneira, presume-se que a influência dos parâmetros avaliados sobre o sinal analítico é similar para qualquer concentração de ácido úrico.

O emprego de H<sub>2</sub>O como solução transportadora foi avaliado para verificar se ocorreria deriva da linha base, conforme observado em um trabalho anterior<sup>63</sup>. Após *ca.* 30 minutos de trabalho, foi observada deriva significativa da linha base, devido à deposição de sólido na cela de fluxo (Figura 26A). Após um período de trabalho de *ca.* 55 min (140 medidas), os depósitos de precipitado verde podiam ser claramente observados no interior do reator, sendo verificada deriva da linha base > 0,05. Para evitar este inconveniente, uma solução de NH<sub>4</sub>OH foi utilizada como solução transportadora, que gera [Cu(NH<sub>3</sub>)<sub>4</sub>]<sup>2+</sup> solúvel em meio aquoso e evita a formação de Cu(BQA) (Figura 26B).

Utilizando uma solução diluída de NH<sub>4</sub>OH (5,0 mmol L<sup>-1</sup>) como solução transportadora, deriva da linha base estimada em 0,004 foi observada após 55 minutos e nenhum depósito de sólido foi visualmente observado no reator. Isto evidencia que pequenas quantidades de NH<sub>3(aq)</sub> livre são suficientes para evitar a deriva da linha base. A influência da concentração de NH<sub>4</sub>OH sobre o sinal analítico foi avaliada, pois a escassez de NH<sub>3(aq)</sub> pode aumentar o sinal de branco e o excesso pode afetar o sinal analítico devido à complexação do íon metálico. A Figura 27 apresenta a influência da concentração da solução transportadora sobre os sinais da amostra e do branco.



**Figura 26.** Avaliação da estabilidade da linha base utilizando (A) H<sub>2</sub>O e (B) 5,0 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>OH como transportador. Sinais analíticos obtidos com solução de 50 μmol L<sup>-1</sup> de ácido úrico. As demais condições são iguais às descritas na Figura 21.



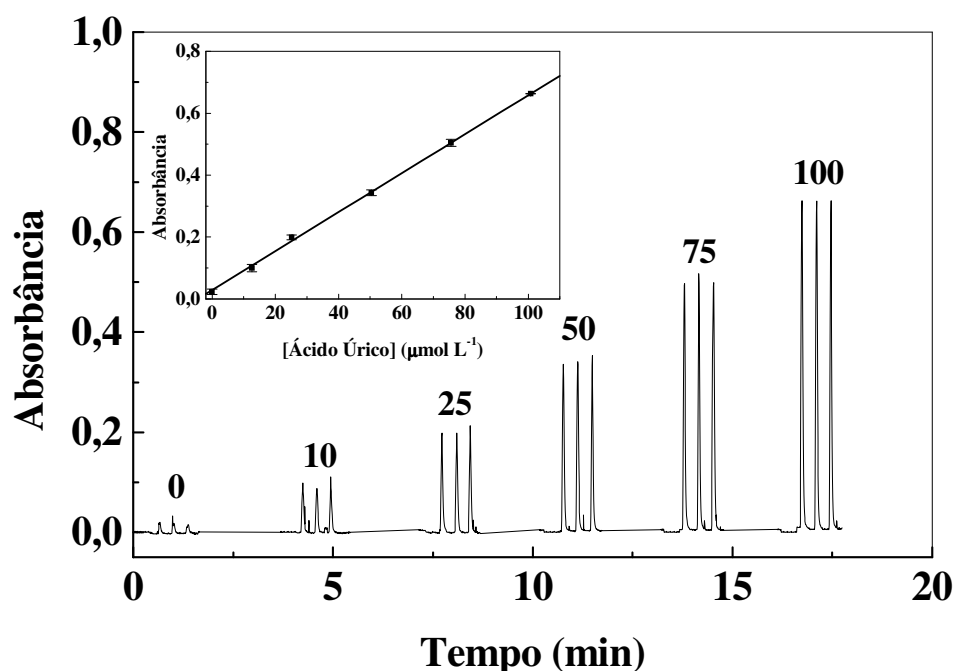
**Figura 27.** Efeito da concentração de NH<sub>4</sub>OH sobre o sinal analítico (A) e do branco (B). As demais condições são iguais às descritas na Figura 21.

A variação da concentração da solução transportadora não afetou significativamente o sinal analítico. Um aumento de aproximadamente 8% no sinal foi observado quando a concentração foi aumentada de 20 para 30 mmol L<sup>-1</sup>. Com solução transportadora NH<sub>4</sub>OH 20 mmol L<sup>-1</sup>, houve uma diminuição de aproximadamente 40% do sinal do branco em relação às concentrações mais baixas. Isto ocorre devido ao desfavorecimento da formação do precipitado, como discutido anteriormente, resultando também em melhor precisão com 20 mmol L<sup>-1</sup> de NH<sub>4</sub>OH. A formação aleatória de partículas em suspensão, mesmo em quantidades insuficientes para provocar deriva de linha base, pode afetar a precisão, conforme observado na Figura 26B. A deposição do precipitado foi evitada pelo fluxo pulsado característico das microbombas solenoide, como demonstrado na determinação turbidimétrica

de  $\text{SO}_4^{2-}$  em águas naturais<sup>28</sup>. Portanto, a concentração de  $\text{NH}_4\text{OH}$  de  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  na solução transportadora foi selecionada.

### 3.3 Características analíticas

Após a otimização do sistema de análises em fluxo, as características analíticas foram estimadas. Uma curva analítica foi construída com medidas em triplicata (Figura 28) e apresentou resposta linear entre  $10$  e  $100 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , descrita pela equação  $A = (0,0063 \pm 0,0002) C_{\text{AU}} + (0,0285 \pm 0,0040)$ ,  $r = 0,999$ , em que  $C_{\text{AU}}$  é a concentração de ácido úrico em  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .



**Figura 28.** Sinais transientes e curva analítica para a determinação de ácido úrico, utilizando reator de  $100 \text{ cm}$  e  $4$  ciclos de amostragem, com  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Cu(II)}$  em  $0,40 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  ( $\text{pH} = 7,0$ ) e  $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{BQA}$ . Solução transportadora:  $20 \text{ mmol L}^{-1}$   $\text{NH}_4\text{OH}$ .



Como a faixa linear de concentração situa-se entre 10 e 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e a concentração de ácido úrico na urina varia entre 1,2 e 4,5  $\text{mmol L}^{-1}$ , uma diluição de 100 vezes da amostra foi necessária para as análises.

A repetibilidade foi avaliada com uma solução de ácido úrico 75  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $n = 20$ ) e o coeficiente de variação foi estimado em 1,2%. A frequência de amostragem e o limite de detecção (99,7% de confiança) foram estimados em 150  $\text{h}^{-1}$  e 3,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. A cada determinação, 2,0 mL de resíduos foram gerados e 32  $\mu\text{g}$  de  $\text{CuSO}_4$ , 200  $\mu\text{g}$  de BQA, 2,3 mg de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  e 1,4 mg de  $\text{NH}_4\text{OH}$  foram consumidos.

O presente procedimento apresentou maior frequência de amostragem em relação a procedimentos descritos na literatura. A determinação de ácido úrico por HPLC<sup>56</sup> exige 10 minutos para a análise de uma amostra, dificultando sua aplicação em análises de rotina em laboratórios clínicos. Esta técnica é recomendada quando outros parâmetros também precisam ser determinados nas amostras de urina. O procedimento em fluxo com sistema em linha única e detecção amperométrica<sup>57</sup> apresentou frequência de amostragem 20% menor (120  $\text{h}^{-1}$ ) em comparação com o procedimento desenvolvido. O inconveniente da detecção amperométrica é a adsorção de algumas espécies, como cafeína, na superfície do eletrodo. O procedimento cinético para a determinação de ácido úrico<sup>60</sup> permite eliminar a interferência do ácido ascórbico, mas apresenta baixa frequência de amostragem (30  $\text{h}^{-1}$ ) e requer cálculos complexos para a obtenção da concentração de ácido úrico na amostra.

A precisão do procedimento desenvolvido é comparável com a obtida em outros procedimentos<sup>61</sup>. Por exemplo, o coeficiente de variação para a determinação espectrofotométrica de ácido úrico baseada na atenuação da coloração de um complexo de Pd(II) devido à complexação do íon metálico com o analito foi estimada em 1,5% ( $n = 5$ ). Uma desvantagem deste procedimento é a necessidade de aquecer a mistura para a formação do complexo colorido de Pd(II). O procedimento baseado na redução do íon fosfotungstato a

azul de tungstênio pelo ácido úrico<sup>59</sup> apresenta coeficiente de variação elevado (5,0%), além de baixa seletividade, requerendo a prévia separação de proteínas.

Apesar do comum emprego de enzimas para a determinação de ácido úrico, alguns cuidados são necessários com o armazenamento e o emprego de reagentes enzimáticos<sup>8</sup>. O procedimento desenvolvido não requer a utilização de enzimas e nem de reagentes instáveis. Sob refrigeração, os reagentes são estáveis por, no mínimo, 90 dias. No caso da uricase e da peroxidase<sup>55</sup>, a adição de azida de sódio e refrigeração são necessárias para preservar o reagente enzimático. A solução dos reagentes de trabalho é estável por, no máximo, 30 dias sob refrigeração.

### 3.4 Estabilidade das soluções de ácido úrico

Em um período de *ca.* 3 semanas, uma diminuição de 50% no sinal analítico foi observada para soluções de mesma concentração de ácido úrico preparadas a partir da mesma solução estoque. Devido a esta observação, um estudo de estabilidade das soluções do analito foi realizado, com a construção de curvas analíticas no período de 6 dias.

Devido à baixa solubilidade do ácido úrico em meio aquoso (6 mg/100 mL)<sup>45</sup>, diferentes estratégias foram utilizadas para solubilizá-lo. O aumento do pH e o aquecimento da água desionizada (50°C) foram avaliados. Em meio alcalino, o ácido úrico é desprotonado e permanece com duas cargas negativas ( $pK_{a1} = 5,7$  e  $pK_{a2} = 10,3$ )<sup>46</sup>, aumentando a solubilidade do composto em água. O aquecimento a 50°C também pode aumentar a solubilidade do analito<sup>64</sup>, evitando o uso de base. A preparação de soluções com misturas etanol:água também foi avaliada, mas a solubilidade do ácido úrico diminuiu visivelmente neste meio.

Soluções estoque de ácido úrico foram preparadas com as mesmas concentrações, em meio de NaOH 5,0 mmol L<sup>-1</sup> ou com água desionizada aquecida a 50°C. Curvas analíticas

foram construídas imediatamente após o preparo das soluções e após 3 e 6 dias. As soluções foram armazenadas sob refrigeração e todas as análises foram realizadas com soluções à temperatura ambiente. A Tabela 4 apresenta os parâmetros de regressão linear das curvas analíticas obtidas em diferentes dias. Em todos os casos, o coeficiente de correlação foi maior que 0,999.

**Tabela 4** - Avaliação da estabilidade das soluções de ácido úrico preparadas em meio alcalino ou com aquecimento a 50°C.

Preparo	Dias	Coeficiente angular L $\mu\text{mol}^{-1}$ $\text{cm}^{-1}$	Coeficiente linear
	0	0,00657	0,0140
NaOH	3	0,00674	0,0335
	6	0,00667	0,0271
	0	0,00674	0,0147
Aquecimento	3	0,00666	0,0210
a 50°C	6	0,00669	0,0183

O aquecimento da água acelerou a dissolução do ácido úrico e a recristalização não foi observada após o resfriamento. Em ambos os casos, pequena variação dos coeficientes angulares das retas foram observados após 6 dias. Porém, as soluções preparadas em meio alcalino apresentaram maior variação no valor de coeficiente angular ( $\leq 2,5\%$ ) em relação às soluções preparadas com água desionizada aquecida ( $\leq 1,0\%$ ). Além disso, observou-se que após 3 semanas de armazenamento, a solução de ácido úrico em meio alcalino foi instável, ao contrário do que foi observado com uma solução preparada em meio neutro, que apresentou boa estabilidade após este mesmo período, sob refrigeração.

A concentração de ácido úrico da solução estoque obtida empregando aquecimento era muito baixa. Cerca de 5,0 mg eram dissolvidos em 250 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ , que corresponde à concentração de 120  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Além dos erros associados às pesagens de massas tão

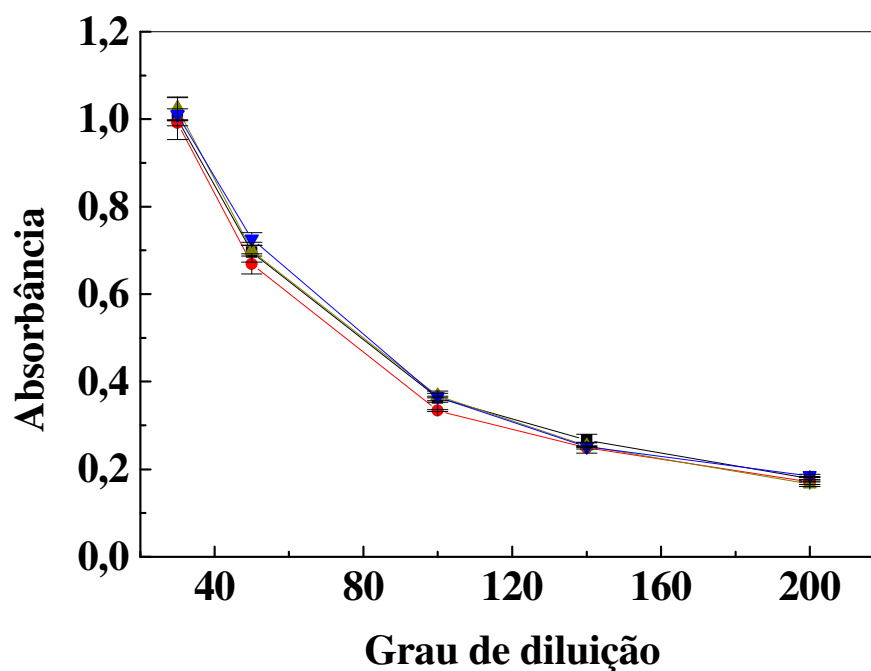
pequenas, para os estudos de diluição em linha, soluções com concentrações da ordem de  $\text{mmol L}^{-1}$  seriam necessárias. Sendo assim, as soluções estoque de ácido úrico foram preparadas diariamente em meio de NaOH  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ . As equações de ambas as curvas analíticas após dissolução de ácido úrico em NaOH ( $5,0 \times 10^{-3}$  e em  $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ ) foram iguais a  $0,0066 \text{ L } \mu\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , indicando que as soluções poderiam ser preparadas em meio alcalino com concentração mais alta de NaOH. Contudo, a solução de ácido úrico era estável por 24 horas se preparada em meio mais concentrado de NaOH. Apenas em estudos de eliminação de interferentes em que a estratégia de alcalinização do meio foi explorada, o ácido úrico foi dissolvido em  $\text{H}_2\text{O}$  aquecida a  $50^\circ\text{C}$ .

### **3.5 Preparo das amostras de urina**

A quantificação de ácido úrico em amostras de urina é comumente realizada sem pré-tratamento<sup>57</sup>. Entretanto, alguns autores citam um preparo de amostra antes da etapa de diluição, como a adição de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ou NaOH para alcalinizar o meio e eliminar espécies potencialmente interferentes e/ou dissolver as quantidades de ácido úrico que possivelmente estejam cristalizadas<sup>64</sup>. O aquecimento das amostras à temperatura de  $50^\circ\text{C}$  também foi avaliado para solubilizar possíveis cristais de ácido úrico e de urato de sódio que poderiam estar presentes na urina. Na literatura, consta que o aquecimento ou alcalinização da urina antes da análise é desnecessário, exceto nos casos em que a amostra apresenta turbidez<sup>69</sup>.

Uma amostra de urina recém-coletada foi submetida a quatro diferentes procedimentos. No procedimento 1, a amostra foi analisada sem pré-tratamento. No procedimento 2, a amostra foi alcalinizada com NaOH até  $\text{pH} \sim 11$ . O tratamento 3 envolvia aquecer a amostra a  $50^\circ\text{C}$ . O procedimento 4 envolveu adicionar NaOH à amostra para alcalinizar o meio ( $\text{pH} \sim 11$ ) e aquecê-la a  $50^\circ\text{C}$ . Todos os pré-tratamentos foram realizados por 15 minutos e, em seguida, diferentes diluições foram realizadas para avaliar a influência

dos tipos de tratamento sobre o sinal analítico. A amostra analisada não apresentava turbidez, nem sólidos em suspensão. A Figura 29 apresenta o comportamento do sinal analítico em função das diluições de 20, 50, 100, 150 e 200 vezes da amostra (graus de diluição), utilizando os diferentes pré-tratamentos.



**Figura 29.** Variação do sinal analítico em função do grau de diluição e do tratamento de uma amostra de urina. (■) Sem tratamento; (●) Adição de NaOH até pH ~11 (15 min); (▲) Aquecimento a 50 °C (15 min); (▼) Adição de NaOH até pH ~11 + aquecimento a 50 °C (15 min).

O sinal analítico não variou significativamente com os diferentes tratamentos (< 8%). Considerando a faixa de concentração esperada de ácido úrico em indivíduos saudáveis<sup>9</sup> (1,2 a 4,5 mmol L<sup>-1</sup>), as análises das amostras de urina podem ser realizadas com diluição de aproximadamente 100 vezes, pois com diluições maiores ou menores as concentrações se aproximariam muito dos limites do intervalo de resposta linear do procedimento. Alguns procedimentos de preparo de amostras foram reavaliados para eliminar interferência do ácido

ascórbico, que é rapidamente degradado em meio alcalino<sup>64</sup>. Esta discussão será apresentada juntamente com os resultados do efeito da presença de espécies concomitantes.

O estudo sobre o preparo das amostras também indicou que eventual turbidez da urina, que caracteriza a presença de cristais em suspensão, pode ser eliminada por aquecimento sem afetar o sinal analítico.

### 3.6 Estudos de adição e recuperação do analito e avaliação do efeito de espécies concomitantes

Para avaliar a presença de efeitos de matriz, quatro amostras de urina de diferentes indivíduos foram coletadas pela manhã e diluídas 100 vezes. A cada uma delas, foram adicionadas quantidades diferentes de ácido úrico, correspondentes a concentrações finais de 25,2 e 35,3  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A Tabela 5 apresenta as porcentagens de recuperação estimadas para cada uma das amostras.

**Tabela 5** - Estudo de adição e recuperação em diferentes amostras de urina.

Amostra	Ácido Úrico ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )		Recuperação (%)
	Adicionado	Recuperado	
1	25,2	28,3	112
	35,3	35,3	100
2	25,2	26,2	104
	35,3	33,8	95,6
3	25,2	27,0	107
	35,3	35,0	99,0
4	25,2	18,5	91,8
	35,3	28,3	93,5

O valor médio estimado para as recuperações foi  $(100 \pm 7)\%$ , indicando ausência de efeitos de matriz, devido à elevada diluição da amostra em função da sensibilidade do procedimento e elevadas concentrações de analito encontradas na urina.

O efeito da presença de espécies concomitantes foi avaliado empregando uma solução de ácido úrico  $35 \mu\text{mol L}^{-1}$  (AU) e concomitantes em concentração pelo menos cinco vezes maior que o máximo esperado em urina. Essa concentração corresponde ao valor médio esperado do ácido úrico nas amostras, após diluição de 100 vezes.

Os sinais referentes à concentração de ácido úrico  $35 \mu\text{mol L}^{-1}$  foram obtidos na ausência de concomitantes e na presença de ureia, creatinina, glicose, albumina, NaCl, KCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , acetona e ácido acético. A Tabela 6 apresenta a variação do sinal analítico na presença de cada uma destas espécies. A interferência foi considerada significativa quando a variação do sinal analítico na presença do concomitante foi  $\geq 5\%$ .

**Tabela 6** - Avaliação do efeito de espécies concomitantes sobre o sinal analítico de ácido úrico.

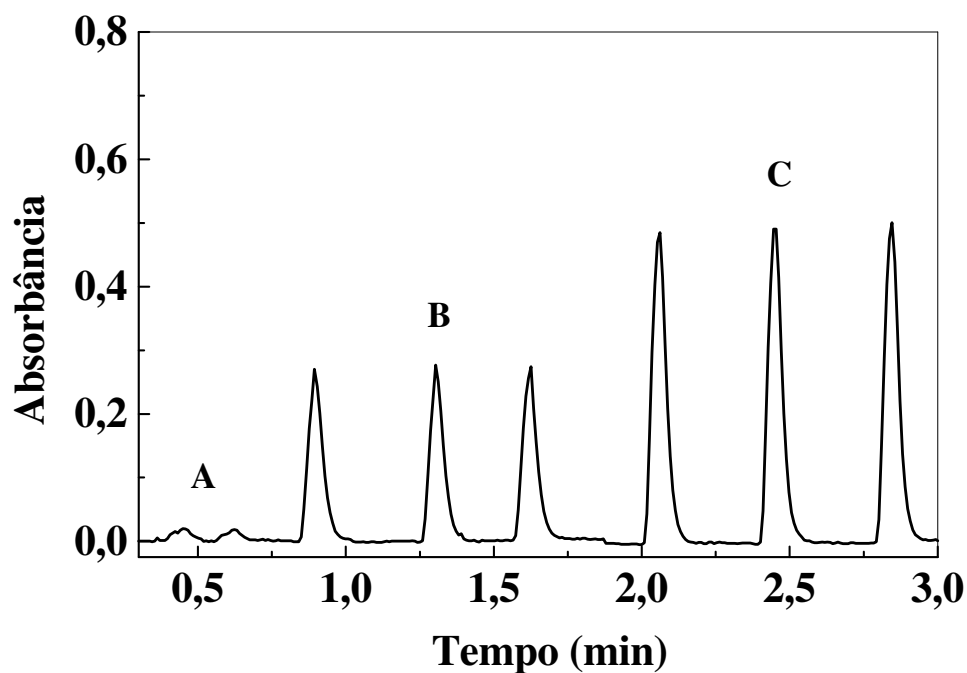
<i>Espécie Concomitante</i>	<i>Proporção máxima esperada (AU:CC*)</i>	<i>Proporção máxima avaliada (AU:CC*)</i>	<i>Varição do sinal (%)</i>
Ureia	1:350	1:1700	- 1,1
Creatinina	1:10	1:60	- 2,1
Glicose	1:1	1:5	- 3,7
Albumina	5:1	1:1	- 1,1
NaCl	1:200	1:1000	- 4,9
KCl	1:70	1:400	- 3,8
$\text{CaCl}_2$	1:4	1:20	0,3
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	1:30	1:150	- 1,2
Propanona	2:1	1:3	1,1
Ácido acético	1:10	1:50	- 0,8

\* Proporção ácido úrico:concomitante

Os concomitantes usualmente presentes na urina em proporções pelo menos 5 vezes maiores que as esperadas em amostras de urina não causaram interferência significativa nas análises (variação  $\leq 5\%$ ). Pequenas variações dos sinais observadas ocorreram provavelmente devido à alteração da força iônica das soluções, que pode afetar o desenvolvimento da reação<sup>66</sup>, nos casos em que foram utilizados compostos iônicos, como  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . O efeito de ácidos orgânicos e de espécies com grupos cetônicos em sua estrutura foi avaliado, considerando o ácido acético e propanona como modelos.

O ácido ascórbico (AA) está presente na urina de indivíduos saudáveis e com dieta regular, sem ingestão de medicamentos contendo vitamina C<sup>49</sup>, em concentrações aproximadamente 5 vezes menores que o ácido úrico. Com a ingestão de altas quantidades de ácido ascórbico ( $>1,0$  g), a concentração desta espécie na urina é de  $1,0$  mmol/24 h, pois grande parte do ácido ascórbico ingerido é convertido a  $\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$  no organismo<sup>2</sup>. O ácido ascórbico apresenta potencial de redução similar ao do ácido úrico<sup>57</sup> e pode causar interferência em procedimentos baseados em reações de oxirredução. No procedimento desenvolvido, a presença de ácido ascórbico na mesma concentração de ácido úrico ( $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ ), aumentou o sinal analítico em 50%, como é apresentado na Figura 30. Como o ácido ascórbico está usualmente presente na urina, algumas estratégias foram avaliadas para eliminar a interferência desta espécie, explorando a baixa estabilidade do ânion ascorbato em meio alcalino. A Tabela 7 apresenta o efeito sobre o sinal analítico da adição de NaOH ( $60 \text{ mmol L}^{-1}$ ) à solução contendo ácido úrico e ácido ascórbico em concentrações de  $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ , após diferentes intervalos de tempo da adição da base.





**Figura 30.** Sinais transientes referentes ao branco (A), solução de ácido úrico  $35 \mu\text{mol L}^{-1}$  (B) e com adição de ácido ascórbico à solução de ácido úrico na proporção 1:1 (C).

**Tabela 7** - Variação do sinal analítico referente a soluções contendo ácido úrico ( $35 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) com diferentes concentrações de ácido ascórbico, após adição de NaOH  $60 \text{ mmol L}^{-1}$ .

<i>Proporção</i> <i>AU:AA</i> *	<i>Tempo (min)</i>	<i>Variação (%)</i>
	5	1,9
1:1	10	0,4
	15	0
1:1,5	10	7,5
	20	7,4
	30	2,8
1:2	10	17
	20	17
	30	13

\* Proporção ácido úrico:ácido ascórbico

A adição NaOH 60 mmol L<sup>-1</sup> eliminou a interferência do ácido ascórbico na proporção ácido úrico:ácido ascórbico de 1:1, após 5 minutos da adição da base. Após 30 minutos, 50 μmol L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico foi eliminado e com concentrações até 70 μmol L<sup>-1</sup> a eliminação não foi efetiva mesmo após 30 minutos da adição de NaOH.

O aquecimento das soluções a 50°C foi avaliado para favorecer a degradação do ácido ascórbico em meio alcalino em concentrações 5 vezes maiores (175 μmol L<sup>-1</sup>) que a de ácido úrico. Após 5, 10 e 15 minutos de aquecimento, a eliminação de ácido ascórbico não foi completa, sendo observada uma variação do sinal de *ca.* 60% nos 3 intervalos de tempo de aquecimento. Provavelmente, uma fração do O<sub>2</sub> dissolvido foi consumido durante a oxidação do ácido ascórbico e pelo aquecimento, não sendo esta estratégia efetiva para proporções maiores que 1:1.

Uma estratégia que também foi avaliada consiste em borbulhar O<sub>2</sub> na solução, à temperatura ambiente, para que houvesse uma constante saturação do gás no meio, favorecendo a oxidação do ácido ascórbico. Esta estratégia, embora explorada para a eliminação desta espécie interferente na determinação de ciclamato em adoçantes<sup>70</sup>, não foi bem sucedida para eliminar concentrações mais elevadas de ácido ascórbico (175 μmol L<sup>-1</sup>).

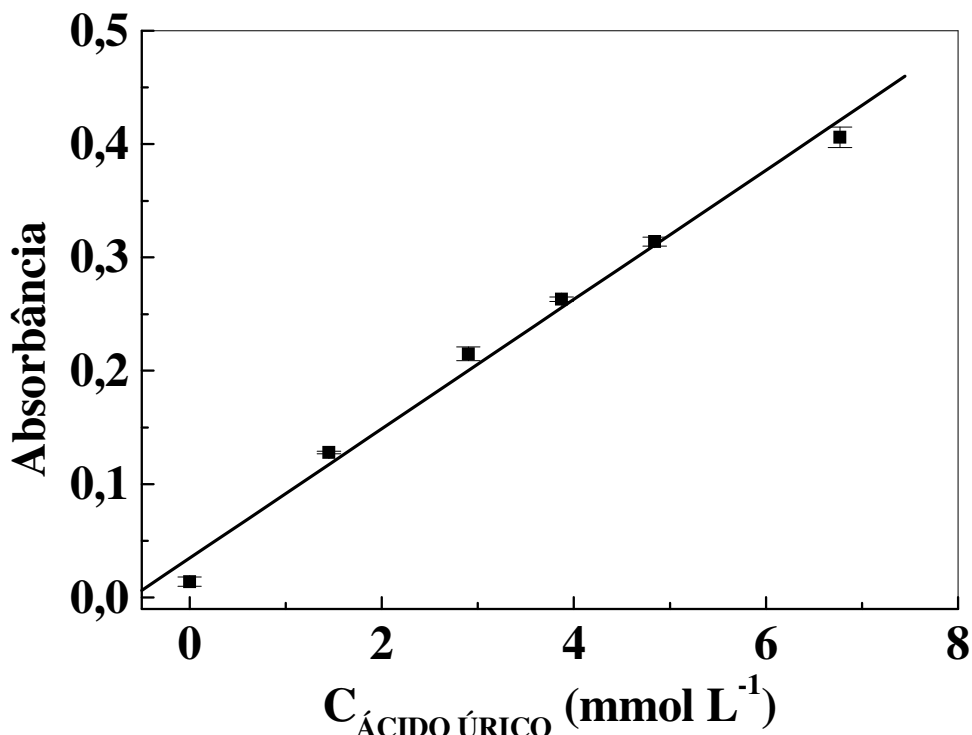
Contudo, a interferência do ácido ascórbico não deve ser um inconveniente na determinação de ácido úrico pelo procedimento desenvolvido, devido às baixas concentrações desta espécie na urina de indivíduos que mantêm uma dieta regular. No caso de indivíduos que ingerem vitamina C em quantidades maiores, a adição de NaOH pode ser realizada para eliminar a interferência desta espécie. A informação sobre a utilização de medicamentos pelo paciente é obtida antes da realização de exames clínicos como parte do procedimento de pré-coleta de amostra<sup>2</sup>. O ácido ascórbico é também um inconveniente para os procedimentos enzimáticos para a determinação de ácido úrico em amostras biológicas. As instruções do *kit* enzimático para ácido úrico recomendam que a ingestão de ácido ascórbico seja interrompida

em até 12 horas antes da coleta da amostra de urina. No caso deste procedimento, a presença de ácido ascórbico pode gerar falso negativo porque esta espécie consome o  $H_2O_2$  que seria quantificado pela formação da quininoimina.

### **3.7 Diluição em linha da amostra para a determinação direta de ácido úrico**

O diagrama de fluxos foi reconfigurado (Figura 9) para que a diluição em linha da amostra fosse realizada, explorando as potencialidades das microbombas para o gerenciamento preciso de pequenos volumes de solução e a estratégia de reamostragem na zona dispersa<sup>33</sup>.

A inserção da amostra no reator  $B_1$  foi realizada com a aplicação de 1 pulso à microbomba  $P_1$  (correspondente a 11  $\mu$ L de solução) e a dispersão foi realizada pela interação com a solução transportadora. Em seguida, uma fração da zona de amostra dispersa foi reamostrada e misturada aos reagentes no reator  $B_2$ . Primeiramente, todos os parâmetros foram mantidos como otimizados anteriormente e uma tentativa de diluir 100 vezes a amostra em linha foi realizada. A Figura 31 apresenta uma curva analítica obtida com soluções de ácido úrico 100 vezes mais concentradas que as empregadas nas análises com o sistema da Figura 8. Foram empregados 765  $\mu$ L de  $NH_4OH$  (17 pulsos de  $P_4$ ) para dispersão e selecionados 90  $\mu$ L da zona dispersa (2 pulsos de  $P_4$ ) para cada ciclo de amostragem.

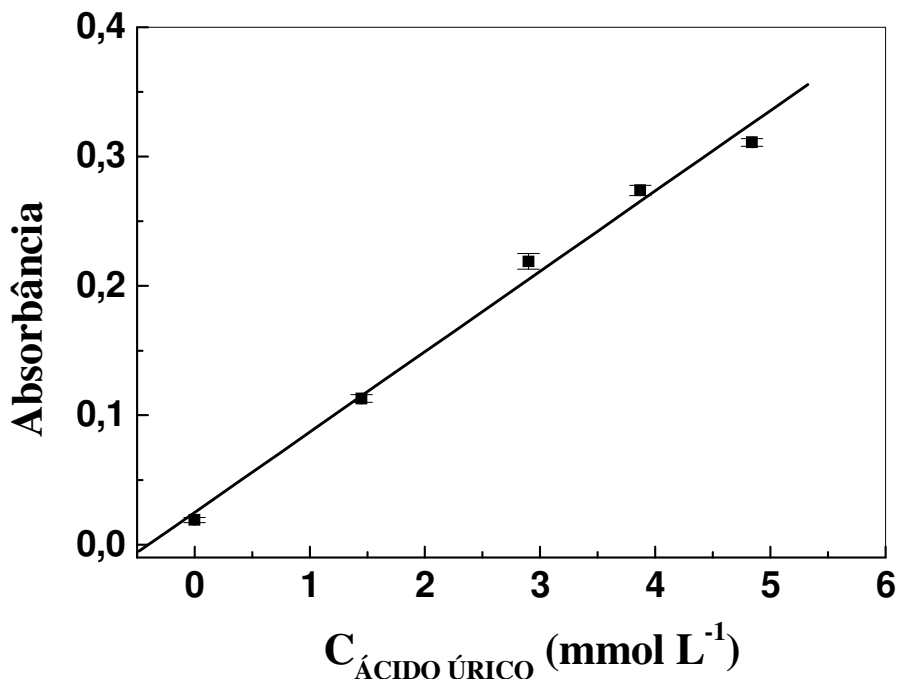


**Figura 31.** Curva analítica empregando sistema de análises em fluxo com diluição em linha da amostra por reamostragem na zona dispersa, empregando 1 pulso da amostra, 17 pulsos de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para dispersão. Os demais parâmetros foram mantidos com os valores previamente otimizados.

Com concentrações a partir de  $7,5 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido úrico, a perda de linearidade foi muito acentuada, fazendo com que esta concentração fosse o limite da curva analítica (Figura 31). A equação da reta obtida foi  $A = (0,057 \pm 0,003) C_{\text{AU}} + (0,034 \pm 0,011)$ ,  $r = 0,994$ . Comparando os coeficientes angulares das curvas analíticas onde é empregada a diluição manual ( $6300 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e a diluição em linha ( $57 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), observa-se que diluição de aproximadamente 100 vezes foi alcançada.

Entretanto, o sinal analítico obtido para a maior concentração de ácido úrico foi aproximadamente 0,4. Na tentativa de se obter melhor linearidade dos pontos da reta, alguns parâmetros foram reavaliados. Primeiramente, as concentrações dos reagentes foram aumentadas em duas vezes ( $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de BQA) para averiguar se a

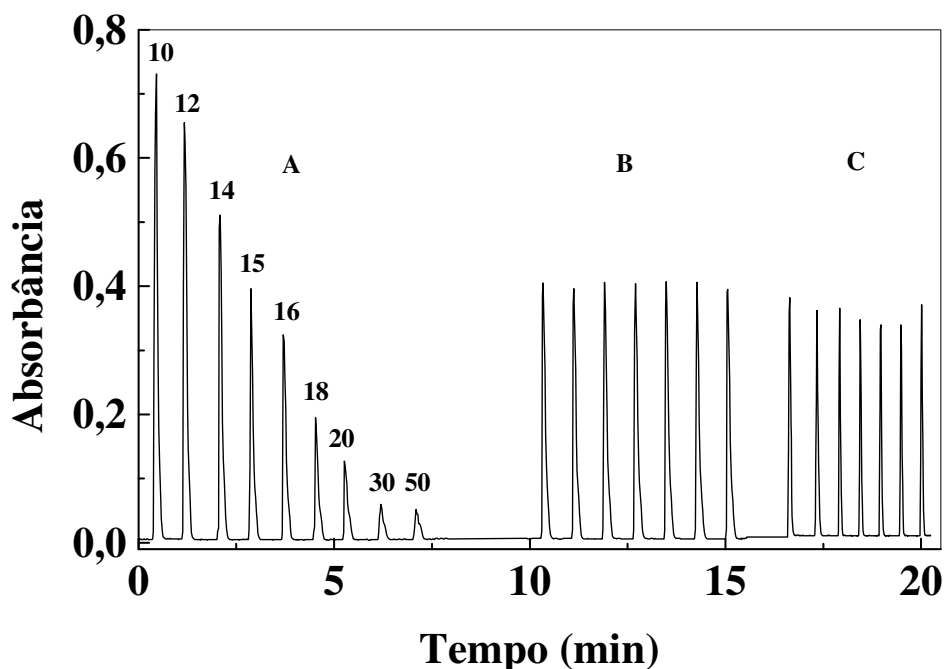
perda da linearidade ocorria devido à falta de reagentes. A curva analítica obtida está apresentada na Figura 32.



**Figura 32.** Curva analítica empregando sistema de análises em fluxo com diluição em linha da amostra por reamostragem na zona dispersa, empregando 1 pulso da amostra, 17 pulsos de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para dispersão e concentrações dos reagentes  $\text{CuSO}_4$  e BQA iguais a 4,0 e 10  $\text{mmol L}^{-1}$ . Os demais parâmetros foram mantidos com os valores previamente otimizados.

Os parâmetros do sistema utilizados para a construção da curva analítica da Figura 32 foram os definidos no estudo anterior de diluição em linha da amostra. A equação da reta obtida foi  $A = (0,062 \pm 0,003) C_{\text{AU}}' + (0,025 \pm 0,011)$ ,  $r = 0,995$ , em que  $C_{\text{AU}}'$  é a concentração de ácido úrico em  $\text{mmol L}^{-1}$ . Comparando os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas (Figuras 31 e 32), não houve variação significativa da sensibilidade com o aumento da concentração dos reagentes  $\text{CuSO}_4$  e BQA. Uma melhora na linearidade também não foi observada, indicando que a amostra ainda está em excesso em relação aos reagentes.

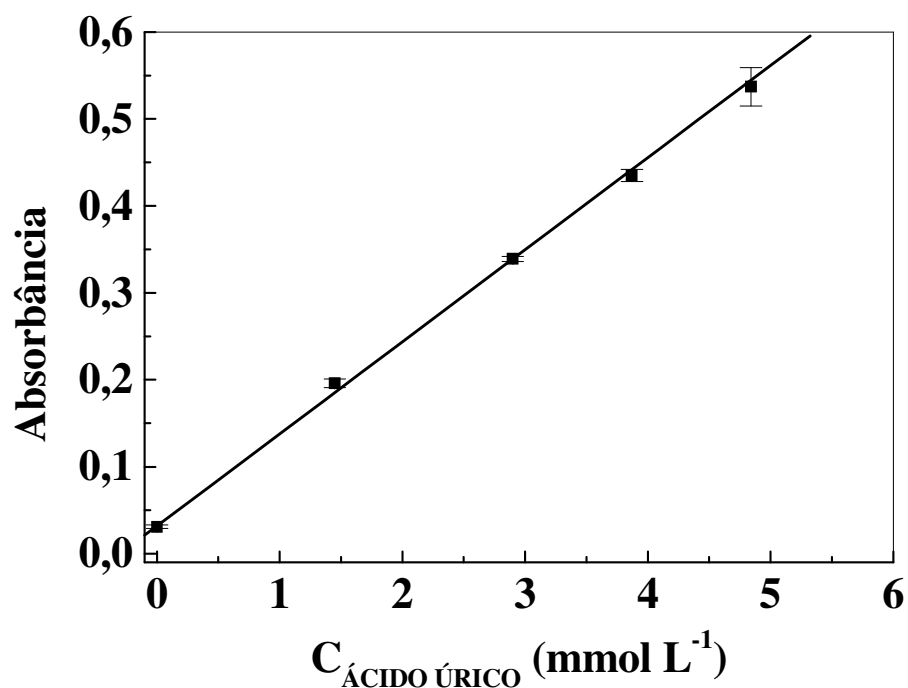
O volume de solução transportadora para dispersão, número de ciclos de amostragem e volume dos reagentes foram novamente otimizados, considerando o sinal analítico para uma solução de ácido úrico  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , para que melhores sensibilidade e faixa de resposta linear fossem obtidas. A melhor condição foi observada com o emprego de 15 pulsos de  $P_4$  para dispersão, 2 pulsos da amostra dispersa e 5 pulsos de cada um dos reagentes, em 3 ciclos de amostragem. A Figura 33 apresenta a variação do sinal em função da fração volumétrica selecionada da amostra dispersa, empregando solução de ácido úrico  $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , assim como a repetibilidade ( $n=7$ ). Nesses experimentos, foi utilizada uma microbomba com volume nominal de  $60 \mu\text{L}$  ( $P_4$ ) e frequências de atuação de 3 e 5 Hz, que correspondem às vazões de  $150 \mu\text{L s}^{-1}$  e  $169 \mu\text{L s}^{-1}$ , respectivamente.



**Figura 33.** Sinais transientes obtidos com diferentes frações da zona de amostra dispersa ( $90 \mu\text{L}$ , 3 ciclos de amostragem), utilizando o sistema em fluxo para diluição em linha da amostra. Os números sobre os sinais indicam o número de pulsos aplicados à microbomba  $P_4$  para dispersão da amostra (A). A repetibilidade foi avaliada com 7 medidas utilizando 15 pulsos de  $P_4$  para a dispersão da amostra com frequências de atuação das microbombas iguais a 3 (B) e 5 Hz (C).

Os coeficientes de variação das replicatas da Figura 33 foram estimados em 1,2 e 4,0% para as frequências 3 e 5 Hz, respectivamente. Com o aumento da frequência, o intervalo de tempo no qual o solenoide de uma microbomba com maior volume nominal (*e.g.* 60  $\mu\text{L}$ ) permanece energizado pode ser insuficiente para que sua via interna seja totalmente preenchida com a solução, afetando a precisão do volume dispensado. Isto pode ser verificado considerando que o aumento de 67% na frequência da microbomba (de 3 para 5 Hz) aumenta em 13% a vazão da solução (de 150 a 169  $\mu\text{L s}^{-1}$ ). Este parâmetro é crítico para a diluição em linha da amostra, pois mínimas variações do volume da solução transportadora dispensada pela micro-bomba P<sub>4</sub> implicam em selecionar uma fração diferente da zona de amostra dispersa e, conseqüentemente, em outro valor de coeficiente de dispersão. Para microbombas com volumes nominais menores, o intervalo necessário para o ciclo de atuação é menor e a frequência de 5 Hz pode ser utilizada sem afetar a precisão do volume de solução dispensado. Portanto, frequência de atuação de 3 Hz foi selecionada para a microbomba P<sub>4</sub> para realizar a diluição em linha da amostra durante as etapas de dispersão e transporte. A diminuição da frequência de amostragem não foi significativa, sendo 110 e 95  $\text{h}^{-1}$  para as frequências de 5 e 3 Hz de P<sub>4</sub>, respectivamente (Figura 33).

A curva analítica da Figura 34 é regida pela equação  $A = (0,105 \pm 0,001) + (0,032 \pm 0,003)$ ,  $r = 0,999$ . A sensibilidade aumentou em 45% em relação à curva apresentada na Figura 30. Por análise, foram consumidos 60  $\mu\text{g}$  de  $\text{CuSO}_4$ , 380  $\mu\text{g}$  de BQA, 4,3 mg de  $\text{NH}_4\text{Ac}$  e 2,7 mg de  $\text{NH}_4\text{OH}$ , gerando 4,2 mL de resíduos.



**Figura 34.** Curva analítica empregando sistema de análises em fluxo com diluição em linha da amostra por reamostragem na zona dispersa, empregando 1 pulso da amostra, 15 pulsos de  $\text{NH}_4\text{OH}$  para dispersão, 2 pulsos de  $\text{P}_4$  para a reamostragem e 5 pulsos de cada reagente, com 3 ciclos de amostragem. Os demais parâmetros foram mantidos com os valores previamente otimizados.

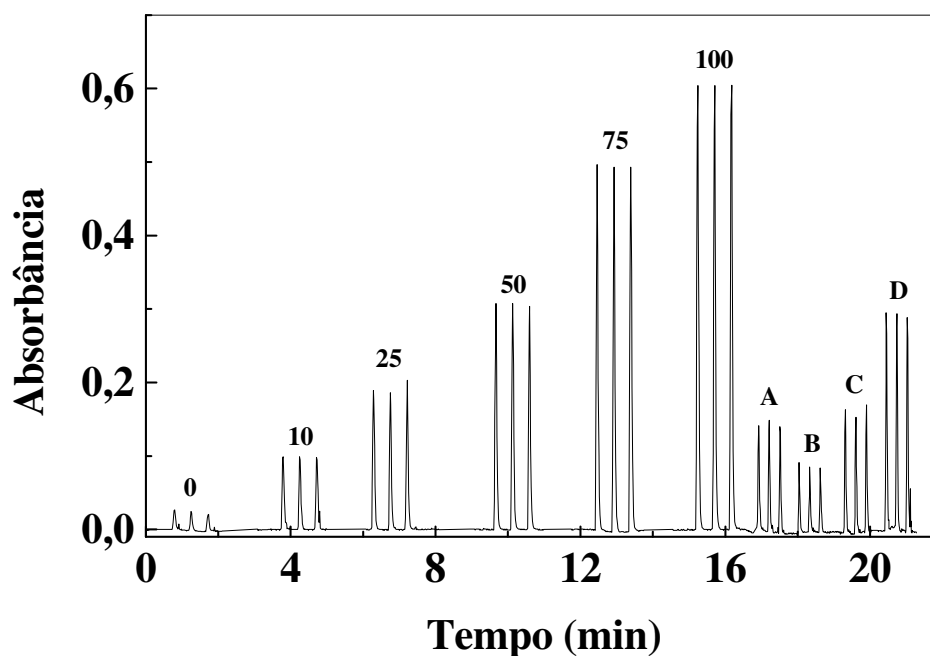
Comparado com sistema de análises em fluxo com válvulas solenoide e detecção amperométrica<sup>58</sup> que também explora a diluição da amostra em linha por reamostragem na zona dispersa, o procedimento desenvolvido apresentou frequência de amostragem comparável ( $100 \text{ h}^{-1}$ ), mas menor consumo de amostra por análise. As dificuldades do emprego de detecção amperométrica para determinação de ácido úrico em urina já foram discutidas anteriormente.



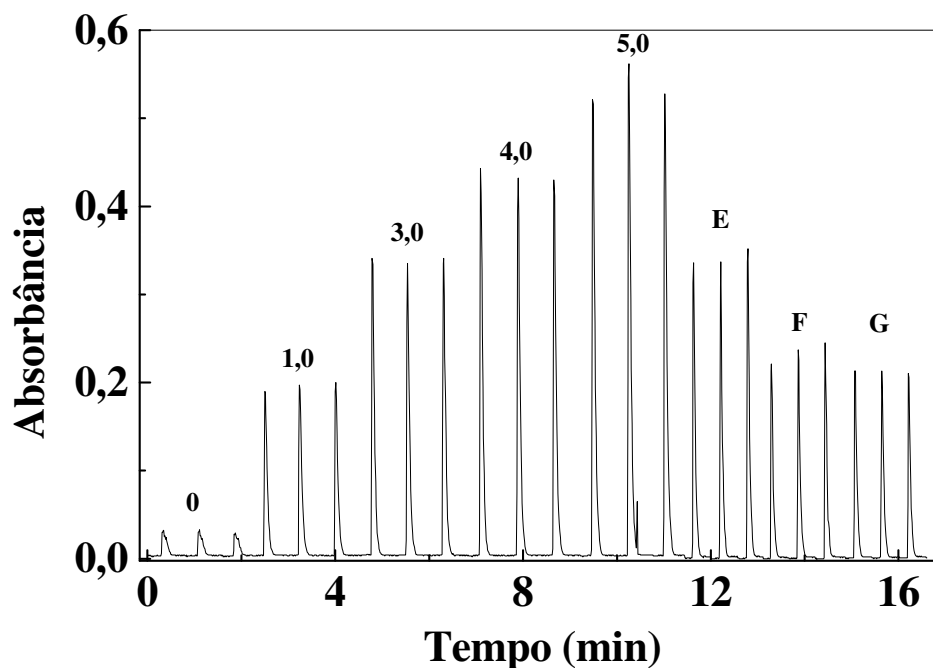
### 3.8 Comparação com procedimento de referência

Os resultados das análises de 7 amostras de urina pelo procedimento desenvolvido foram comparados com o procedimento enzimático de referência, utilizando um *kit* disponível comercialmente para a determinação de ácido úrico. Este procedimento é baseado na quantificação do  $H_2O_2$  gerado na oxidação enzimática do ácido úrico pelo  $O_2$  na presença da uricase, utilizando o ácido 3,5-diclorohidroxibenzenossulfônico, 4-aminoantipirina e peroxidase em tampão fosfato com  $pH = 7,5^{55}$ , como apresentado nas equações 3 e 4.

As amostras A – D foram analisadas com o sistema apresentado na Figura 8, após diluição manual de 100 vezes (Figura 35) e as amostras E – G foram analisadas com diluição em linha da amostra (Figura 36). Nenhum tratamento das amostras foi empregado previamente às análises. A Tabela 8 apresenta os resultados da comparação entre os procedimentos.



**Figura 35.** Sinais transientes obtidos para a construção da curva analítica e para a análise das amostras (A – D), empregando o sistema em fluxo apresentado na Figura 8, após diluição manual. Os números indicam as concentrações de ácido úrico em  $\mu\text{mol L}^{-1}$



**Figura 36.** Sinais transientes obtidos para a construção da curva analítica e para a análise direta das amostras (E – G), com o sistema em fluxo apresentado na Figura 9. Os números indicam as concentrações de ácido úrico em  $\text{mmol L}^{-1}$ .

**Tabela 8** - Valores das concentrações e incertezas obtidas na determinação de ácido úrico em amostras de urina pelos procedimentos proposto e de referência.

Amostra	Ácido Úrico ( $\text{g L}^{-1}$ )	
	Procedimento proposto	Procedimento de referência <sup>55</sup>
A	$0,351 \pm 0,018$	$0,365 \pm 0,013$
B	$0,193 \pm 0,005$	$0,187 \pm 0,012$
C	$0,409 \pm 0,011$	$0,393 \pm 0,020$
D	$0,754 \pm 0,006$	$0,737 \pm 0,071$
E	$0,495 \pm 0,012$	$0,467 \pm 0,017$
F	$0,329 \pm 0,005$	$0,306 \pm 0,009$
G	$0,290 \pm 0,006$	$0,281 \pm 0,005$

Os resultados obtidos nas análises das amostras com ambas as configurações do procedimento desenvolvido (Tabela 8) foram concordantes com os obtidos pelo procedimento de referência, com nível de confiança de 95%. A alcalinização das amostras de urina é necessária antes da diluição de dez vezes para a execução do procedimento enzimático, para eliminação da interferência de ácido ascórbico, que consome  $H_2O_2$ , gerando erros negativos. O menor grau de diluição da amostra torna este procedimento mais suscetível a efeitos de matriz e de espécies interferentes, como o ácido ascórbico. As instruções do *kit* enzimático recomendam suspender a ingestão de suplementos que contêm vitamina C por, pelo menos, 12 horas antes da coleta da amostra.

4

*Conclusões*

Procedimentos mecanizados que apresentam alta frequência de amostragem, baixo consumo de reagentes e mínima geração de resíduos são altamente requisitados em laboratórios de análises clínicas, devido à grande demanda por análises e à necessidade de minimizar a geração de resíduos biológicos. O procedimento proposto permite que 150 determinações sejam realizadas por hora, consumindo pequenas quantidades de reagentes (da ordem de microgramas por determinação). O procedimento com diluição em linha da amostra permite 100 determinações por hora, eliminando a cansativa etapa de diluição manual, evitando erros sistemáticos nas análises. O procedimento de diluição em linha não prejudica a precisão das análises (coeficientes de variação estimados em 1,2% em ambos os procedimentos). O custo por determinação foi inferior a R\$0,05.

Uma vez que o ácido úrico apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, medidas foram adotadas para solubilizá-lo mais facilmente, como a adição de base ou aquecimento. As soluções estoque preparadas com a dissolução do ácido úrico em água aquecida a 50°C apresentam estabilidade por 3 meses sob refrigeração. A estabilidade das soluções é mais baixa em meio contendo altas concentrações de base (0,4 mol L<sup>-1</sup>). A utilização de mistura etanol:água mostrou-se ineficiente para solubilizar o ácido úrico.

A formação do sal insolúvel Cu(BQA) foi um dos pontos críticos a serem superados no procedimento desenvolvido. O emprego de acetato de amônio como tampão e de hidróxido de amônio como solução transportadora evitou a formação do precipitado durante as etapas de amostragem e de transporte da zona de amostra e a consequente deriva da linha base.

As características analíticas demonstram as potencialidades do sistema de análises em fluxo com microbombas solenoide para a determinação de ácido úrico em amostras de urina. O alto grau de diluição da amostra contribuiu para minimizar os efeitos de matriz, como pôde ser concluído dos resultados obtidos no estudo de adição e recuperação do analito. Espécies concomitantes usualmente presentes na urina não causaram interferência significativa no

procedimento desenvolvido em concentrações pelo menos 5 vezes maiores que as esperadas nas amostras. A alcalinização das amostras foi eficiente para eliminar a interferência de ácido ascórbico, mesmo na urina de pacientes que consomem suplementos contendo esta vitamina. Os resultados das análises de amostras de urina obtidos com o procedimento desenvolvido foram concordantes (95% de confiança) com aqueles obtidos com o procedimento enzimático. Além disso, o procedimento proposto não emprega reagentes instáveis como o procedimento enzimático. Todas estas características indicam que o procedimento desenvolvido pode ser empregado como uma alternativa para a determinação de ácido úrico em análises de rotina de amostra de urina.

5

# *Referências*

- 1) BURTS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Fundamentals of clinical chemistry**. 6a ed. Saint Louis: Saunders Elsevier, 2008. 952 p.
- 2) HENRY, J. B. **Clinical diagnosis and management by laboratory methods**. 20a ed. Filadélfia: W. B. Saunders, 2001. 1512 p.
- 3) ABOUL-ENEIN, H. Y. **Separation techniques in clinical chemistry**. 10a ed. Nova Iorque: Marcel Decker, 2003. 522 p.
- 4) SKEGGS, L. T. An automatic method for colorimetric analysis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 28, p. 311-322, 1957.
- 5) RILEY, C.; ROCKS, B. F.; SHERWOOD, R. A. Flow injection analysis in clinical chemistry. **Talanta**, v. 71, p. 879-888, 1984.
- 6) ANALISADOR totalmente automático para química clínica, turbidimetria e ISE. Itabira: In Vitro Diagnóstica, 2009. Disponível em:  
<<http://www.invitro.com.br/principal/equipamentos/A5.htm>>. Acesso em 30 jul. 2009.
- 7) HOLT, C.; COWLEY, D. M.; CHALMERS, A. H. Rapid estimation of urinary citrate by use of centrifugal analyzer. **Clinical Chemistry**, v. 31, p. 779-780, 1985.
- 8) IOB, A.; MOTTOLA, H. A. Continuous-flow analysis for uric acid in biological fluids with immobilized uricase in a closed-loop system. **Analytical Chemistry**, v. 52, p. 2332-2336, 1980.
- 9) KAPLAN, L. A.; PESCE, A. J. **Clinical chemistry: principles, analysis, correlation**. 3a ed. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. 1211 p.
- 10) RÜZICKA, J.; HANSEN, E. H. Flow injection analyses. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 78, p.145-157, 1975.
- 11) ROCKS, B.; RILEY, C. Flow injection analysis: a new approach to quantitative measurements in clinical chemistry. **Clinical Chemistry**, 26, p. 409-421, 1982.



- 12) REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, A. M. A análise química por injeção em fluxo. **Química Nova**, n. 1, p. 82-91, 1989.
- 13) KARLBERG, B.; PACEY, G. E. **Flow injection analysis. A practical guide.** 1a ed. Amsterdã: Elsevier, 1989. 372 p.
- 14) REIS, B. F.; JACINTHO, A. O.; MORTATTI, J.; KRUG, F. J.; ZAGATTO, E. A. G.; BERGAMIN-FILHO, H.; PESSEDA, L. C. R. Zone-sampling processes in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 123, p. 221-228, 1981.
- 15) HANSEN, E. H.; MIRÓ, M. How flow-injection analysis (FIA) over the past 25 years has changed our way of performing chemical analyses. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 26, p. 18-26, 2007.
- 16) MIRÓ, M.; CERDÁ, V.; ESTELA, J. M. Multisyringe flow injection analysis: characterization and applications. **Trends in Analytical Chemistry**, v.21, p. 199-210, 2002.
- 17) MATOS, R.C.; GUTZ, I. G. R.; ANGNES, L.; FONTENELE, R. S.; PEDROTTI, J. J. Propulsor pneumático versátil e isento de pulsação para sistemas de análises em fluxo. **Química Nova**, v. 24, p. 795-798, 2001.
- 18) ANDRADE, J. C.; FERREIRA, M.; BACCAN, N. Sistema gravitacional de alimentação de líquidos com vazão constante para uso em análises por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 9, p. 123-128, 1986.
- 19) VIEIRA, J. A.; RAIMUNDO J., I. M.; REIS, B. F. Turbidimetric determination of sulphate employing gravity flow-based systems. **Analytica Chimica Acta**, v. 428, p. 75-81, 2001.
- 20) LAPA, R. A. S.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, B. F.; SANTOS, J. L. M.; ZAGATTO, E. A. G. Multi-pumping in flow analysis: concepts, instrumentation, potentialities. **Analytica Chimica Acta**, v. 466, 125-132, 2002.

- 21) REIS, B. F.; BERGAMIN-FILHO, H. Evolução dos injetores empregados em sistemas de análises por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 16, p. 570-573, 1993.
- 22) ROCHA, F. R. P.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S.; SANTOS, J. L. M. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 468, p. 119-131, 2002.
- 23) LIMA, J. L. F. C.; SANTOS, J. L. M.; DIAS, A. C. B.; RIBEIRO, M. F. T., ZAGATTO, E. A. G. Multi-pumping flow systems: an automation tool. **Talanta**, v. 64, p. 1091-1098, 2004.
- 24) REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; ZAGATTO, E. A. G.; LIMA, J. L. F. C.; LAPA, R. A. S. Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 293 p. 129-138, 1994.
- 25) DIAS, A. C. B.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; QUINTELLA, M. C.; LIMA, A. M. V.; ZAGATTO, E. A. G. A critical comparison of analytical flow systems exploiting streamlined and pulsed flows. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 1303-1310, 2007.
- 26) ROCHA, F. R. P.; NÓBREGA, J. A. Efeito Schlieren em sistemas de análise por injeção em fluxo. **Química Nova**, v. 19, 636-640, 1996.
- 27) RÓDENAS-TORRALBA, E.; MORALES-RUBIO, A.; GUARDIA, M. Determination of phenols in waters using micro-pumped multicommutation and spectrophotometric detection: an automated alternative to the standard procedure. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 383, p. 138-144, 2005.
- 28) MELCHERT, W. R.; ROCHA, F. R. P. An improved procedure for flow-based turbidimetric sulphate determination based on a liquid core waveguide and pulsed flows. **Analytica Chimica Acta**, v. 616, p. 56-62, 2008.

- 29) LIMA, J. L. F. C.; SÁ, S. M. O.; SANTOS, J. L. M.; ZAGATTO, E. A. G. Multi-pumping flow system for spectrophotometric determination of dipyrone in pharmaceutical preparations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 1011-1017, 2003.
- 30) DIAS, A. C. B.; SANTOS, J. L. M.; LIMA, J. L. F. C.; ZAGATTO, E. A. G. Multi-pumping flow system for spectrophotometric determination of bromohexine. **Analytica Chimica Acta**, v. 499, p. 107-113, 2003.
- 31) ROCHA, F. R. P.; RÓDENAS-TORRALBA, E.; MORALES-RUBIO, A.; GUARDIA, M. A clean method for flow injection spectrophotometric determination of cyclamate in table sweeteners. **Analytica Chimica Acta**, v. 547, p. 204-208, 2005.
- 32) PIRES, C. K.; LAVORANTE, A. F.; MARCONI, L. M. T.; MENESES, S. R. P.; ZAGATTO, E. A. G. A multi-pumping flow system for chemiluminometric determination of ascorbic acid in powdered materials for preparation of fruit juices. **Microchemical Journal**, v. 83, p. 70-74, 2006.
- 33) ROCHA, F. R. P.; INFANTE, C. M. C.; MELCHERT, W. R. A multi-purpose flow system based on multicommutation. **Spectroscopy Letters**, v. 39, p. 651-658, 2006.
- 34) KEAY, P. J.; WANG, Y. Applications of flow injection analysis to analytical biotechnology. **Analytical Biotechnology**, v. 15, p. 76-81, 1997.
- 35) RUZICKA, J.; HANSEN, E. H. Retro-review of flow-injection analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, p. 390-393, 2008.
- 36) SAKAI, T.; OHTA, H.; OHNO, N.; IMAI, J. Routine assay of creatinine in newborn baby urine by spectrophotometric flow-injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 308, p. 446-450, 1995.

- 37) ZHAO, Y.; BAEYENS, W. R. G.; ZHANG, X. R.; CALOKERINOS, A. C.; NAKASHIMA, K.; DER-VEKEN, G.; VAN-OVERBEKE, A. Chemiluminescence determination of tiopronin and its metabolite 2-mercaptopropionic acid in human urine by HPLC coupled with flow injection. **Chromatographia**, v. 44, p. 31-36, 1997.
- 38) BAADENHULJSEN, H.; JACOBS, H. E. H. S. Determination of total CO<sub>2</sub> in plasma by automated flow injection analysis. **Clinical Chemistry**, v. 25, p. 443-445, 1979.
- 39) TYSON, J. F.; SUNDIN, N. G.; HANNA, C. P.; MCINTOSH, S. A. Determination of Se in urine by flow injection hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometry with in-atomizer trapping. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 52, p. 1773-1781, 1997.
- 40) LENARCZUCK, T.; WENCEL, D.; GLAB, S.; KONCKI, R. Prussian blue-based optical glucose biosensor in flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 447, p. 23-32, 2001.
- 41) CAVICCHIOLI, A; GUTZ, I. G. R. O uso da radiação ultravioleta para o pré-tratamento de amostras em análise inorgânica. **Química Nova**, v. 26, p. 913-921, 2003.
- 42) CRESPÓN-ROMERO, R. M.; YEBRA-BIURRUN, M. C. Determination of trace metals in urine with an on-line ultrasound-assisted digestion system combined with a flow injection preconcentration manifold coupled to flame atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 609, p. 184-191, 2008.
- 43) ARAÚJO, A. N.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, B. F.; ZAGATTO, E. A. G. Multicommutation in flow analysis. Part 3. Spectrophotometric kinetic determination of creatinine in urine exploiting a novel zone sampling approach. **Analytica Chimica Acta**, v. 310, p. 447-452, 1995.
- 44) PASCU, M. B.; ARCHILLA, A. R.; BURGUERA, J. L.; BURGUERA, M.; RONDÓN, C.; CARRERO, P. Flow injection on-line dilution for zinc determination in human saliva with electrothermal atomic absorption spectrometry detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 600, p. 214-220, 2007.

- 45) BERG, J. M ; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5a ed. Nova Iorque: W. H. Freeman, 2002. 894 p.
- 46) MONTGOMERY, R. **Biochemistry: a case-oriented approach**. 6a ed. Saint Louis: Mosby, 1996. 683 p.
- 47) SMITH, R. C.; GORE, J. Z.; MCKEE, M.; HARGIS, H. The first dissociation constant of uric acid. **Microchemical Journal**, v. 38, p. 118-124, 1988.
- 48) YAMAMOTO, T.; MORIWAKI, Y.; TAKAHASHI, S. Effect of ethanol on metabolism of purine bases (hypoxanthine, xanthine and uric acid). **Clinica Chimica Acta**, v. 356, p. 35-57, 2005.
- 49) BISHOP, M. L.; ENGELKIRK, J. L. D.; FODY, E. P. **Clinical chemistry: principles, procedures, correlations**. 3a ed. Filadélfia: Lippincott, 1996. 773p.
- 50) KIM, K. Y.; SCHUMACHER, H. R.; HUNSCHE, E.; WERTHEIMER, A. I.; KONG, S. X. A literature review of the epidemiology and treatment of acute gout. **Clinical Therapeutics**, v. 25, p. 1593-1617, 2003.
- 51) SHOUT, J. T.; CASKEY, C. T. The Lesch-Nyhan syndrome: clinical, molecular and genetic aspects. **Trends in Genetics**, v. 4, p. 175-178, 1998.
- 52) SRINIVASAN, S.; KALAISELVI, P.; SAKTHIVEL, R.; PRAGASAM, V.; MUTHU, V.; VARALAKSHMI, V. Uric Acid: an abettor or protector in calcium oxalate urolithiasis? Biochemical study in stone formers. **Clinica Chimica Acta**, v. 353, p. 45-51, 2005.
- 53) KAWASHIMA, T.; RECHNITZ, G.A. Potenciometric enzyme electrode for uric acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 83, p. 9-17, 1976.
- 54) FEICHTMEIER, T. V.; WRENN, H. T. Direct determination of uric acid using uricase. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 25, p. 833-839, 1955.

- 55) FOSSATI, P.; PRENCIPE, L.; BERTI, G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid / 4-aminophenazone chromogenic reagent system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. **Clinical Chemistry**, v. 26, p. 227-231, 1980.
- 56) HAUSEN, A.; FUCHS, D.; KÖING, K.; WACTHER, H. Quantitation of uric acid by reversed-phase liquid chromatography. **Clinical Chemistry**, v. 27, p. 1455-1456, 1981.
- 57) GARCIA, M. B. Q.; LIMA, J. L. F. C.; SILVA, M. L.; SOUSA, J. P. Automatic determination of uric acid in urine in a FIA system with tubular amperometric detector. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 22, p. 249-262, 2004.
- 58) SILVA, M. L. S.; GARCIA, M. B. Q.; LIMA, J. L. F. C.; SANTOS, J. L. M.; BARRADO, E. Multicommutated flow system with amperometric detection. Determination of uric acid in urine. **Electroanalysis**, v. 23, p. 2156-2162, 2005.
- 59) PILEGGI, V.J.; GIORGIO, J. D.; WYBENGA, D. R. An one-tube serum uric acid method using phosphotungstic acid as protein precipitant and color reagent. **Clinica Chimica Acta**, v. 37, p. 141-149, 1972.
- 60) ARAÚJO, A. N.; CATITA, J. A. M.; LIMA, J. L. F. C. Kinetic determination of uric acid in urine based on single-line flow system with multi-site detection. **Analytical Sciences**, v. 14, p. 809-813, 1998.
- 61) YAMAGUCHI, T.; HASEGAWA, K.; KAMINO, S.; MIYACHI, K.; TOMINAGA, H.; FUJITA, Y. Spectrophotometric determination of uric acid based on fading of *o*-hydroxyhydroquinonephtalein-palladium(II)-hexadecyltrimethylammonium complex. **Analytical Sciences**, v. 23, p. 223-226, 2007.
- 62) SMITH, P. K.; KROHN, R. I.; HERMANSON, G. T.; MALLIA, A. K.; GARTNER, F. H.; PROVENZANO, M. D.; FUJIMOTO, E. K.; GOEKE, N. M.; OLSON, B. J.; KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, p.76-85, 1985.

- 63) MOYA, H. D.; DANTONI, P.; ROCHA, F. R. P.; COICHEV, N. A multicommuted flow-system for spectrophotometric determination of tannin exploiting the Cu(I)/BCA complex formation. **Microchemical Journal**, v. 88, p. 21-25, 2008.
- 64) DUTT, V. V. S. E.; MOTTOLA, H. A. Determination of uric acid at the microgram level by a kinetic procedure based on a “pseudo-induction” period. **Analytical Chemistry**, v. 46, p. 1777-1781, 1974.
- 65) VOGEL, A.I. **Química analítica qualitativa**. 5a ed. Mestre Jou: São Paulo, 1981, 665p.
- 66) HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 6a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005. 876 p.
- 67) ZAGATTO, E. A. G.; ARRUDA, M. A. Z.; JACINTHO, A. O.; MATTOS, I. L. Compensation of the Schlieren effect in flow-injection analysis by using dual-wavelength spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 234, p. 153-160, 1990.
- 68) SOUSA, C. A. M.; LESSA, I. S.; LEBOREIRO, O. Concentração de proteínas na urina de indivíduos normais. **Revista da Saúde Pública**, n. 7, p. 405-408, 1973.
- 69) YILMAZ, G.; YILMAZ, F. M.; HAKLIGÖR, A.; YÜCEL, D. Are preservatives necessary in 24-hour urine measurements? **Clinical Biochemistry**, v. 41, p. 899-901, 2008.
- 70) GOUVEIA, S. T.; FATIBELLO-FILHO, O.; NÓBREGA, J. A. Flow injection spectrophotometric determination of cyclamate in low calorie soft drinks and sweeteners **Analyst**, v. 120, p. 2009-2012, 1995.

---