



IPG Politécnico
|da|Guarda
Polytechnic
of Guarda

RELATÓRIO DE ESTÁGIO

Licenciatura em Farmácia

Sarah Alexandra Pais Pereira

janeiro | 2016





Escola Superior de Saúde
Instituto Politécnico da Guarda

RELATÓRIO DE ESTÁGIO PROFISSIONAL I

SARAH ALEXNDRA PAIS PEREIRA

RELATÓRIO PARA OBTENÇÃO DE GRAU DE LICENCIADO EM FARMÁCIA



Escola Superior de Saúde
Instituto Politécnico da Guarda

RELATÓRIO DE ESTÁGIO PROFISSIONAL I

ESTÁGIO EM INVESTIGAÇÃO

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO (FFUP)

SARAH ALEXANDRA PAIS PEREIRA

SUPERVISOR: DR.^a MARIA LÚCIA FERREIRA SARAIVA

ORIENTADOR: PROF. MIGUEL PEDRO JANUÁRIO PESSANHA

janeiro | 2016

SIGLAS

BIL – Biocatálise e Líquidos Iónicos do inglês “Biocatalysis and Ionic Liquids”

Br – Bromo

D – Dispersão

DCQ – Departamento de Ciências Químicas

DMSO – Dimetilsufóxido

EC – Comissão Enzimática do inglês “Enzyme Commission”

ESS – Escola Superior de Saúde

FFUP – Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

FIA – Análise por injeção em fluxo do inglês “Flow Injection Analysis”

IF – Intensidade de fluorescência

IPG – Instituto Politécnico da Guarda

LI – Líquidos Iónicos

LQA – Laboratório de Química Aplicada

NAM – N-Acetil-metionina

PTFE – Politetrafluoretileno

PVC – Cloreto de Polivinilo do inglês “Polyvinyl chloride”

RPM – Rotações por minuto

RSD – Desvio- padrão relativo do inglês “Relative Standard Deviation”

SIA – Análise por injeção sequencial do inglês “Sequential Injection Analysis”

T – Temperatura

TF – Técnico de Farmácia

UC – Unidade Curricular

ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

μL – microlitros

μm – micrómetros

cm – centímetros

cm³ – centímetros cúbicos

g – grama

min – minutos

mL – mililitros

mm – milímetros

nm – nanómetros

s – segundos

AGRADECIMENTOS

Finalizada mais uma etapa do meu percurso académico quero agradecer a todos aqueles que contribuíram para o meu sucesso. Ao Professor Doutor André Araújo pela oportunidade de realizar este estágio na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; ao meu orientador Professor Doutor Miguel Pessanha pelo apoio e pela disponibilidade demonstrada; à minha supervisora Professora Doutora Lúcia Saraiva por todos os conhecimentos transmitidos e por toda a afetividade que sempre demonstrou desde a minha integração até ao momento final do estágio; à Doutora Marieta por estar sempre presente nos momentos mais difíceis e se ter tornado numa referência para mim; à Dr.^a Ana Azevedo pela partilha de conhecimentos e pelo contributo no desenvolvimento do projeto; a todos os professores e demais intervenientes no Curso de Farmácia – 1º ciclo, por todas as aprendizagens, partilhas e momentos que complementaram a minha formação profissional.

PENSAMENTO

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

RESUMO

A automatização dos métodos químicos, recorrendo às técnicas de fluxo, possibilita o desenvolvimento de metodologias analíticas, mais eficientes e seguras, minimizando a intervenção do operador e consequentes erros associados à manipulação das amostras.

Inicialmente foi realizado um estudo quer no sistema FIA, quer no sistema SIA dos diversos parâmetros que influenciam o desenvolvimento de uma reação química, como por exemplo: os caudais, volumes de amostra, comprimento e configuração de reatores.

Seguidamente, e cumprindo o objetivo principal deste trabalho, foi avaliada a atividade enzimática da enzima Acilase I, ensaio automatizado pela primeira vez.

A enzima Acilase I catalisa a desacetilação da N-acetilmetionina (NAM), resultando a metionina. Este aminoácido é especificamente indispensável para o início da tradução. A enzima Acilase I encontra-se presente em numerosos tecidos humanos, tornando-se importante avaliar a sua atividade devido a esta desempenhar um papel nos processos de bioativação de xenobióticos, bem como nas funções fisiológicas.

Experimentalmente, através da produção deste aminoácido e promovendo a sua ligação ao reagente fluorimétrico, a fluoescamina, o composto final foi medido por fluorimetria a um comprimento de onda de excitação e emissão de 393nm e 478nm, respetivamente. A avaliação da atividade da enzima foi efetuada através da medição da intensidade de fluorescência (IF) do composto final.

A metodologia adotada foi o sistema "Análise por Injeção Sequencial (SIA)". Após otimização dos parâmetros físicos e químicos, o processo de avaliação de atividade enzimática da enzima em estudo apresenta um desvio padrão relativo de 4,8%, partindo da análise repetida (n=8) de uma solução de enzima de concentração 24,25U/L, confirmando-se a aplicabilidade deste sistema na avaliação da atividade da enzima em concentrações distintas.

Relativamente ao limite de deteção e de quantificação da enzima estudada, pôde concluir-se que é possível detetar um sinal analítico diferente do sinal de branco para concentrações de enzima $\geq 1,76$ U/L, e que é possível quantificar uma concentração relativamente baixa da enzima, para concentrações $\geq 5,87$ U/L.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema básico de uma montagem FIA. P: dispositivo de propulsão (bomba peristáltica); VI: válvula de injeção; C: ponto de confluência; TR: tubo reator; D: detetor; E: esgoto; T: solução de transporte; R: solução reagente.	19
Figura 2 - Esquema de difusão axial e radial.	20
Figura 3 - Esquema básico de uma montagem SIA. T: solução transportadora; P: dispositivo de propulsão/aspiração (bomba peristáltica); VS: válvula seletora; TA: tubo de armazenamento; TR: tubo reator; R: solução reagente; A: amostra; D: detetor; E: esgoto.....	22
Figura 4 - Estrutura química do azul de bromotimol	23
Figura 5 - Reação enzimática catalisada pela Acilase I utilizando como substrato a N-acetil metionina, originando a metionina.	24
Figura 6 - Estrutura química da fluorescamina	25
Figura 7 – Componentes do sistema SIA utilizado na avaliação da atividade da enzima Acilase I.....	28
Figura 8 - Câmara de mistura	30
Figura 9 - Programa de controlo do sistema SIA com válvula A/FIA Crison	31

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Cálculo da dispersão. D - Dispersão; c_o - concentração inicial; c_f – concentração final; Abs_o – Absorvância inicial; Abs_f – Absorvância final.....	34
---	----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Caudais dos tubos de impulsão	33
Tabela 2 - Resultados dos estudos realizados em sistema FIA.	35
Tabela 3 - Resultados dos estudos realizados em sistema SIA.	36
Tabela 4 - Ciclo analítico definido para o procedimento final	45

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1- Caudais dos tubos de impulsão.....	33
Gráfico 2 - Dispersão em sistema FIA variando o caudal da solução transportadora.....	36
Gráfico 3 - Dispersão em sistema SIA variando o caudal da solução transportadora.....	36
Gráfico 4 - Dispersão em sistema FIA variando o volume de amostra.....	37
Gráfico 5 - Dispersão em sistema SIA variando o volume de amostra.....	37
Gráfico 6 - Dispersão em sistema FIA variando o comprimento do reator.....	37
Gráfico 7 - Dispersão em sistema SIA variando o comprimento do reator.....	37
Gráfico 8 - Dispersão em sistema FIA variando a configuração do reator.....	37
Gráfico 9 - Dispersão em sistema SIA variando a configuração do reator.....	37
Gráfico 10 - Ensaios preliminares em modo discreto da reação enzimática.....	39
Gráfico 11 - Sinal analítico com a diluição de quatro vezes da solução preparada inicialmente.....	39
Gráfico 12 - Variação dos volumes de aspiração da solução de enzima Acilase I.....	42
Gráfico 13 - Variação dos volumes de aspiração da solução do substrato N-acetilmetionina...	42
Gráfico 14 - Variação dos volumes de propulsão da Acilase I e NAM para a câmara de mistura.....	43
Gráfico 15 - Variação do tempo de espera na câmara de mistura das soluções de Acilase I e NAM.....	43
Gráfico 16 - Variação dos volumes de aspiração da solução de fluorescamina.....	44
Gráfico 17 - Curva de calibração obtida nas condições finais da enzima Acilase I.....	45

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
2. FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO (FFUP)	16
2.1. DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS (DCQ)	16
2.2. LABORATÓRIO DE QUÍMICA APLICADA (LQA).....	17
2.3. INSTALAÇÕES DE USO GERAL.....	17
2.4. HORÁRIO DE FUNCIONAMENTO	18
3. TÉCNICAS DE FLUXO	19
3.1. DEFINIÇÃO	19
3.2. ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)	19
3.3. ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL (SIA).....	21
3.4. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES	26
4.2. EQUIPAMENTO	27
4.3. COMPONENTES DO SISTEMA DE FLUXO	28
4.3.1. Dispositivos de aspiração/propulsão	28
4.3.2. Dispositivo de seleção de fluidos	29
4.3.3. Outros componentes da montagem do sistema	30
4.3.4. Controlo informático do sistema	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. ESTUDO DE PARÂMETROS DOS SISTEMAS DE FLUXO QUE INFLUENCIAM O DESENVOLVIMENTO DE UMA REAÇÃO QUÍMICA	32
5.1.1. Calibração dos tubos de impulsão	32
5.1.2. Cálculo da dispersão nos sistemas de fluxo	33
5.1.3. Estudo dos caudais, dos volumes de amostra, do comprimento e da configuração do reator em FIA e SIA	34
5.1.4. Sobreposição de zonas em SIA	38
5.2. AUTOMATIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACILASE I.....	38
5.2.1. Ensaio preliminares em modo discreto	39
5.3. OTIMIZAÇÃO DO PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DO SISTEMA	41
5.3.1. Variação do volume de aspiração da solução de enzima Acilase I	42
5.3.2. Variação do volume de aspiração da solução de NAM	42

5.3.3.	Varição do tempo de envio das soluções de Acilase I e NAM para a câmara de mistura.....	43
5.3.4.	Varição do tempo de reação na câmara de mistura.....	43
5.3.5.	Varição do volume de aspiração da fluorescamina.....	44
5.4.	PROCEDIMENTO ANALÍTICO FINAL.....	44
5.5.	CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO SISTEMA.....	45
5.	CONCLUSÃO.....	47
6.	BIBLIOGRAFIA.....	48
ANEXOS.....		50
Anexo A- Registo obtido no estudo de sobreposição de zonas variando o caudal e o volume de amostra.....		51
Anexo B - Registo obtido no estudo de sobreposição de zonas variando a presença de reator.....		52

1. INTRODUÇÃO

O presente relatório foi realizado no âmbito da unidade curricular (UC) Estágio Profissional I, inserida no 1º semestre do 4º ano, do plano de estudos do Curso de Farmácia - 1º Ciclo, da Escola Superior de Saúde (ESS) do Instituto Politécnico da Guarda (IPG). Este estágio foi realizado na área de investigação, no Laboratório de Química Aplicada (LQA) pertencente ao Departamento de Ciências Químicas (DCQ), da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto (FFUP), tendo decorrido entre 5 de outubro de 2015 e 15 de janeiro de 2016, perfazendo um total de 490 horas.

O referido estágio teve a orientação do professor Miguel Pessanha da ESS e supervisão da Dr.^a Maria Lúcia Saraiva.

O Estágio Profissional I é um estágio de integração à vida profissional, objeto de avaliação e que visa sobretudo a adaptação e completa autonomia no desempenho das diferentes funções do Técnico de Farmácia (TF). Contudo, pretende-se com este estágio que o estudante adquira capacidade científica e técnica na realização de atividades subjacentes à profissão de TF, no enquadramento das várias áreas de intervenção profissional; aplique os princípios éticos e deontológicos subjacentes à profissão; desenvolva e avalie planos de intervenção adequadamente integrados numa equipa multidisciplinar e responda aos desafios profissionais com inovação, criatividade e flexibilidade [1].

Este estágio teve como principais objetivos a familiarização com os sistemas de análise em fluxo e a automatização de uma reação química.

Para a realização deste trabalho de investigação foi elaborado um plano de atividades que envolveu:

- Preparação de soluções após a realização dos cálculos necessários, procedendo à seleção do material e da técnica de preparação a utilizar;
- Aprendizagem dos fundamentos teóricos de métodos de análise em fluxo;
- Utilização da técnica de análise por injeção por injeção em fluxo e de análise por injeção sequencial a nível laboratorial: montagem deste tipo de sistemas recorrendo a diferentes componentes;
- Estudo dos parâmetros que afetam os resultados obtidos, através da avaliação do valor de dispersão obtida;

- Implementação de um caso prático num sistema de análise por injeção sequencial e otimização de parâmetros químicos e físicos da montagem que condicionam o resultado obtido.

A elaboração do relatório teve por base o trabalho desenvolvido em laboratório durante o período de estágio, bem como a pesquisa e análise de artigos científicos sobre o tema em estudo.

2. FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO (FFUP)

A FFUP é uma das mais antigas faculdades da Universidade do Porto e a mais antiga Faculdade de Farmácia de Portugal, tendo sido fundada em 1921.

É uma instituição de educação, investigação e desenvolvimento, comprometida com a excelência na formação na área das Ciências Farmacêuticas, sendo também um centro de criação, transmissão e difusão da cultura, da ciência e da tecnologia noutros domínios das ciências da saúde e das ciências químico-biológicas. Tem a seu cargo um Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, diversos cursos de Mestrado de 2º ciclo, programas de Doutoramento e um curso de Pós-Graduação de Especialização em Cuidados Farmacêuticos, colaborando também com a Licenciatura em Ciências da Nutrição.

Em termos geográficos, a FFUP situa-se na Rua Jorge Viterbo Ferreira, N°213, 4050-313, Porto, junto ao Palácio de Cristal.

Relativamente à sua organização, esta encontra-se dividida em dois edifícios, sendo a mesma organizada em serviços e departamentos. Relativamente aos seus serviços é provida de: uma biblioteca, um gabinete de apoio a alunos, um gabinete de relações exteriores, um serviço de gestão académica e expediente e um gabinete de apoio aos órgãos de gestão. Quanto aos departamentos, estes dividem-se em três grupos: Departamento de Ciências Químicas (DCQ), Departamento de Ciências Biológicas e o Departamento de Ciências do Medicamentos [2].

2.1. DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS (DCQ)

O DCQ é uma unidade funcional da FFUP que integra 4 laboratórios diferentes: o Laboratório de Bromatologia e Hidrologia; o Laboratório de Farmacognosia; o Laboratório de Química Aplicada e o Laboratório de Química Orgânica e Farmacêutica, sendo os mesmos organizados pela afinidade das áreas de ensino da química no âmbito dos cursos que são lecionados na mesma. Nesta área, compete ainda a este departamento assegurar e apoiar as atividades de investigação científica e desenvolvimento tecnológico, bem como a difusão dos resultados obtidos.

A formação de jovens investigadores realiza-se pela integração nos vários projetos de investigação a decorrer nos diferentes laboratórios, no entanto a atividade de investigação

desenvolvida pelos membros do DCQ envolve, também parcerias com outros grupos de investigação nacionais e estrangeiros.

É no DCQ que se integra o Laboratório de Química Aplicada (LQA).

2.2. LABORATÓRIO DE QUÍMICA APLICADA (LQA)

O LQA tem como responsável o Professor Doutor Rui Alexandre Santos Lapa.

Neste laboratório, decorrem investigações ao nível da Biocatálise e Líquidos Iónicos (BIL, do inglês "Biocatalysis and Ionic Liquids"), integrado no Grupo de Análises Bioquímicas, Ambientais e Industriais (GABAI), um grupo de pesquisa prestigiado a que este laboratório pertence [2]. O GABAI tem como responsável a Professora Doutora Maria de La Salette de Freitas Reis Rodrigues.

O BIL tem-se focado principalmente no estudo e aplicação da biocatálise em meios aquosos e não convencionais [líquidos iónicos (LI's), agregados lipídicos], e na avaliação de LI's quer ao nível da sua toxicidade quer para aplicações farmacêuticas. Os métodos usualmente utilizados, quer discretos quer em fluxo englobam técnicas convencionais, como a fluorimetria e a espectrofotometria.

2.3. INSTALAÇÕES DE USO GERAL

Para além dos laboratórios destinados a cada grupo de investigadores, consoante a sua área de investigação, existem também salas de uso geral como é o caso da sala de pesagem e da sala dos reagentes.

Na sala de pesagem encontra-se a balança analítica.

Na sala de reagentes encontram-se armazenados, em prateleiras identificadas por ordem alfabética, os reagentes que todos os grupos de investigadores podem utilizar. Nos frigoríficos ou no congelador encontram-se os reagentes termolábeis de uso comum. É também nesta sala que se encontra um eléctrodo de pH e um banho de ultra-sons, assim como contentores onde são rejeitados resíduos halogenados, não halogenados e metais pesados.

Neste laboratório existem também uma sala climatizada onde se encontram aparelhos como leitores de microplacas, espectrofotómetros, espectrofluorímetros, entre outros.

2.4. HORÁRIO DE FUNCIONAMENTO

O LQA não tem um horário de funcionamento estabelecido, mas normalmente está em funcionamento das 9 às 18h, durante os dias úteis. É ainda possível os investigadores adaptarem o seu horário consoante o trabalho que solicitam desenvolver.

3. TÉCNICAS DE FLUXO

3.1. DEFINIÇÃO

As técnicas de fluxo assentam na introdução de uma alíquota de amostra num fluxo transportador, onde ocorre posteriormente o contacto com um ou mais reagentes. Deste processo, resultará uma zona reacional que será encaminhada para um sistema de deteção, originando um sinal analítico, cuja intensidade é relacionada com as propriedades físicas e químicas da solução analisada.

3.2. ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

A análise por injeção em fluxo (FIA, do inglês “Flow Injection Analysis”) baseia-se na injeção de uma alíquota de amostra líquida num fluido transportador não segmentado com movimento contínuo. Desta forma, à medida que a amostra é misturada com os reagentes na corrente de fluxo, gera-se um gradiente de concentração, quer por reação química ou dispersão física, baseando-se a metodologia no controlo da dispersão da alíquota de amostra, no fluxo transportador [3]. O detetor regista continuamente a absorvância ou outro parâmetro físico, à medida que se altera como resultado da passagem da amostra através da célula de fluxo [4].

Um sistema FIA é constituído normalmente por um dispositivo de propulsão, uma válvula injetora, cujo *loop* determina o volume de amostra a injetar, uma porção de tubo reator onde ocorre a reação química e um dispositivo detetor onde é monitorizado o produto formado com o analito a determinar, tal como representado na figura 1.

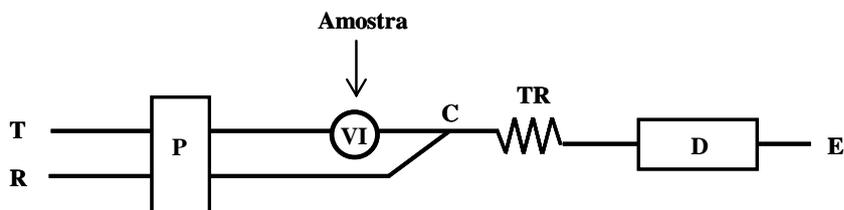


Figura 1 - Esquema básico de uma montagem FIA. P: dispositivo de propulsão (bomba peristáltica); VI: válvula de injeção; C: ponto de confluência; TR: tubo reator; D: detetor; E: esgoto; T: solução de transporte; R: solução reagente. Adaptado de: [5]

O sinal analítico num sistema FIA é um sinal constante enquanto a solução transportadora atravessa o detetor e transiente quando a amostra dispersa passa através do detetor. É habitualmente registado na forma de uma curva gaussiana distorcida, devido à formação de um gradiente de concentração durante o transporte da amostra injetada até ao detetor [3].

A característica mais utilizada deste sinal analítico é a altura do pico, que corresponde à distância entre a linha de base e o ponto máximo do sinal. Esse valor apresenta uma relação de proporcionalidade com a concentração em analito da amostra analisada.

Quando a amostra é inserida no fluxo transportador, sob a forma de um segmento não disperso, o grau de dispersão da zona de amostra no transportador é condicionado, entre outros fatores, pelo tempo durante o qual se verificam os diferentes processos de transporte. Inicialmente predomina o transporte por convexão em condições de fluxo laminar. O perfil de velocidade das partículas da zona de amostra é tipicamente parabólico. As partículas que se encontram em contacto com as paredes do tubo ficam praticamente imobilizadas enquanto, a velocidade das que se situam no centro do tubo é dupla da velocidade média de fluxo. Criam-se gradientes de concentração o que origina fenómenos de difusão [4].

O transporte por difusão faz-se sentir de uma forma radial, resultante dos gradientes de concentração no sentido perpendicular em relação à direção do fluxo, ou de uma forma axial devido às diferenças de concentração verificadas ao longo da zona de amostra. A difusão radial, no entanto, contribui de uma forma mais significativa para a diluição da amostra. Ao impelir as partículas adjacentes às paredes do tubo para o centro deste e vice-versa, contrabalança o efeito da dispersão axial, impedindo assim a contaminação mútua entre sucessivas amostras.

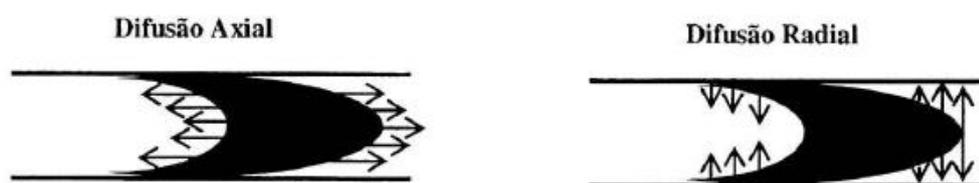


Figura 2 - Esquema de difusão axial e radial. Adaptado de: [6]

Uma zona de amostra dispersa é composta por uma sucessão de perfis de concentrações na direção radial e axial. Estes perfis de concentração refletem-se na forma do sinal analítico registado. O sinal FIA apresenta um aspeto característico, com uma rápida subida quando a amostra atinge o detetor, e um retorno mais lento até atingir a linha de base. Numa situação extrema, de predominância da difusão radial em relação à axial, o sinal analítico tenderia para uma curva gaussiana [3].

Os sistemas FIA podem ser manipulados por forma a alterar a dispersão. Ao variar as velocidades de fluxo do líquido transportador, o diâmetro interno, o comprimento dos tubos, ou ao alterar o volume de amostra, modifica-se a dispersão [7].

A técnica FIA envolve a utilização de montagens simples e de baixo custo, que exibem elevada versatilidade e flexibilidade, adaptando-se a determinações específicas. É de ressaltar que esta técnica não implica obrigatoriamente a informatização das montagens. Estas vantagens, associadas ao facto de a análise requerer pequenos volumes de amostra e permitir a deteção em condições de ausência de equilíbrio físico e químico, justificam a larga utilização da técnica FIA na automatização de procedimentos analíticos nas mais diversas áreas [3].

As principais desvantagens da técnica FIA consistem no elevado consumo de reagentes, ocasionado pela circulação contínua dos mesmos nas montagens, e na necessidade de reconfigurar os sistemas de forma a adaptá-los a diferentes determinações analíticas [3].

3.3. ANÁLISE POR INJEÇÃO SEQUENCIAL (SIA)

A análise por injeção sequencial (SIA, do inglês “Sequential Injection Analysis”) baseia-se na aspiração sequencial de volumes precisos de amostra e reagente, a partir de uma válvula seletora para um tubo de armazenamento que após inversão do sentido de fluxo, são propulsionados para o tubo reator e seguidamente monitorizados no detetor. No sistema SIA verifica-se a sobreposição reprodutível das zonas de amostra e reagentes, através da conjugação de períodos de paragem e mudanças de sentido do escoamento [8].

A mistura das diferentes zonas aspiradas sequencialmente depende dos parâmetros operacionais da própria montagem e afeta a extensão da dispersão sofrida pela zona reacional. Neste tipo de sistemas, a dispersão está igualmente relacionada, com os processos de transporte por convecção, que ocorrem com o escoamento, e de difusão molecular nas interfaces de contacto das zonas adjacentes, que afetam a sua interpenetração [9].

Considerando que o escoamento é predominantemente laminar, um segmento inserido no sistema vai estar inicialmente sujeito a um perfil parabólico de velocidades, sendo favorecidos os gradientes de concentração responsáveis pela difusão radial e axial. A inversão do sentido do escoamento ocasiona uma diminuição da dispersão axial do segmento, originando-se um perfil de concentrações relativamente simétrico, que leva à obtenção de um sinal analítico de forma aproximadamente gaussiana, por passagem pelo detetor [9].

Contrariamente ao sistema FIA, na montagem SIA, depois da inversão do sentido do fluxo, a sobreposição das zonas de amostra e reagentes adjacentes não deixa de ser apenas

parcial. Este facto constitui uma das limitações deste tipo de técnica, uma vez que apesar da possibilidade de se aspirar sequencialmente um maior número de reagentes, existe uma limitação quanto ao número de zonas que podem ser misturadas por inversão do fluxo, num reator tubular. Contudo, a técnica SIA, devido à sua enorme versatilidade e controlo por computador, apresenta características que facilitam a implementação de procedimentos analíticos complexos sem reconfiguração física da montagem [10].

Um sistema SIA é constituído por um dispositivo propulsor, uma válvula seletora de fluidos, um sistema detetor, um tubo de armazenamento, que liga o dispositivo propulsor à válvula seletora de fluidos e por um tubo reator, que liga a válvula seletora de fluidos ao sistema detetor, tal como representado na figura 3.

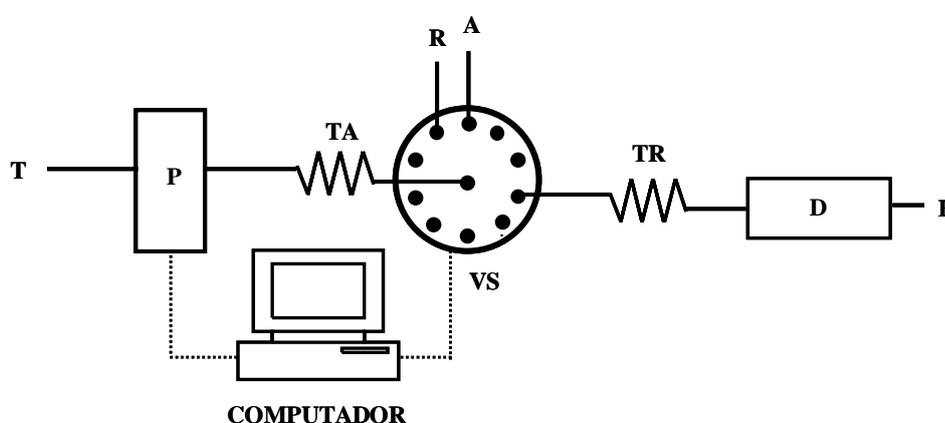


Figura 3 - Esquema básico de uma montagem SIA. T: solução transportadora; P: dispositivo de propulsão/aspiração (bomba peristáltica); VS: válvula seletora; TA: tubo de armazenamento; TR: tubo reator; R: solução reagente; A: amostra; D: detetor; E: esgoto. Adaptado de: [11]

A circulação dos fluidos no sistema ocorre partindo do orifício central da válvula que se encontra ligado ao tubo de armazenamento, sendo que este mesmo orifício se pode conectar a cada um dos orifícios laterais por rotação elétrica da válvula.

A montagem do sistema SIA é controlada por computador, de forma que o dispositivo de propulsão e a válvula seletora funcionem de modo sincronizado, possibilitando a definição do volume, do sentido e velocidade de escoamento das diversas soluções. Os volumes são definidos pelo caudal e tempo de aspiração ou propulsão, pelo que o dispositivo de propulsão deve facultar movimentos precisos de início, paragem e inversão do sentido do fluxo, que garantam que a aspiração e propulsão das soluções seja reproduzível [10].

Numa montagem SIA é essencial garantir que o comprimento do tubo de armazenamento que liga a válvula seletora ao dispositivo de propulsão, seja suficiente para impedir a contaminação da solução transportadora com as soluções aspiradas [12].

O sistema SIA constitui uma solução para a necessidade de simplificar os sistemas, no sentido de incrementar a sua versatilidade analítica, ao mesmo tempo que permite uma

independência do conhecimento empírico do utilizador. O seu modo de funcionamento, baseado em inversões do sentido de fluxo, associado ao modo de operar da válvula seletora de fluidos, possibilita que se realizem em linha, não só diferentes reações químicas, mas todo o tipo de pré-tratamento de amostras. Características como a robustez, a fiabilidade, a estabilidade a longo prazo e a rotina de manutenção espaçada, viabilizam um aumento de automação dos módulos analíticos considerados importantes atributos da metodologia a implementar [8].

3.4. ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

A automatização dos métodos químicos, recorrendo às técnicas de fluxo, possibilita o desenvolvimento de metodologias analíticas, mais eficientes e seguras, minimizando a intervenção do operador e os consequentes erros associados à manipulação das amostras.

O objetivo final do trabalho é a realização de uma reação química, de um modo automático, recorrendo a técnicas de fluxo. Este tipo de técnica/metodologia exige um período de aprendizagem, não só do ponto de vista teórico, como do ponto de vista prático. Assim, numa fase inicial do trabalho, o objetivo foi desenvolver competências e adquirir conhecimento sobre o funcionamento dos sistemas de fluxo. Nesse sentido, a primeira fase envolveu trabalho laboratorial com um sistema FIA – a primeira geração das técnicas de fluxo contínuo e posteriormente com um sistema SIA, a segunda geração das técnicas de fluxo.

Em ambos os casos, é importante perceber como estes sistemas são constituídos e como podem ser construídos e alterados a qualquer momento pelo operador, uma vez que são compostos por diversos módulos.

Numa primeira fase, e de forma a apreender a importância dos diferentes parâmetros do sistema no desenvolvimento de uma reação química foram realizados diferentes ensaios tendo por base a utilização de um corante, o azul de bromotimol.

O azul de bromotimol é um indicador de pH orgânico sintético, adquirindo a cor amarela em meios ácidos e azul em meios básicos. A pH neutro adquire a cor verde. [13] A sua fórmula química é $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$, estando a sua estrutura química representada na figura 4.

A sua estrutura química é constituída por dois monoterpenos fenólicos, mais conhecido por timol (rodeados a azul), que contem um átomo de bromo (Br) unido ao anel aromático na posição orto ao grupo metilo e um anel benzénico ligado a um éster sulfónico cíclico (rodeado a verde) [14]

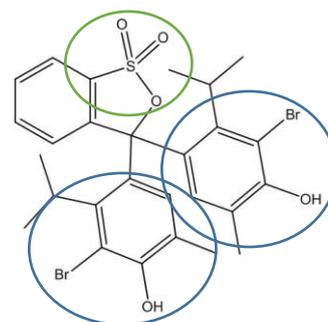


Figura 4 - Estrutura química do azul de bromotimol

O comprimento de onda onde há uma maior absorção de luz por parte do azul de bromotimol é 610nm, tendo sido este o comprimento de onda utilizado no estudo dos parâmetros que influenciam os resultados de uma reação química (ponto 5.1 do presente relatório).

Após esta primeira fase, e seguindo o principal objetivo do trabalho laboratorial foi efetuada a implementação num sistema SIA, da avaliação da atividade enzimática da enzima Acilase I, ensaio automatizado pela primeira vez.

A Acilase I é uma enzima expressa em inúmeros tecidos humanos, como por exemplo o cérebro, fígado e rins [15]. Avaliar a atividade desta enzima é bastante relevante pois desempenha um papel nos processos de desintoxicação e/ou bioativação de xenobióticos. Ao nível do fígado, a atividade desta enzima tem sido usada para avaliar a presença de disfunção hepática [16]; nos rins, os níveis reduzidos desta enzima podem ser consideradas como um marcador tumoral contudo ainda não existem muitas informações acerca das condições fisiológicas desta enzima [17]. Por último, a nível cerebral quando se verifica uma deficiência na enzima Acilase I, esta é representada com características neurológicas como atraso psicomotor, bem como convulsões febris. É também característico que indivíduos que apresentem elevado número de aminoácidos N-acetilados na urina sofram de uma atividade fortemente diminuída por parte desta enzima [18].

Desta forma, neste trabalho laboratorial, foi utilizada a Acilase I de origem porcina (EC 3.5.1.14). A reação enzimática encontra-se descrita na figura seguinte (figura 5):

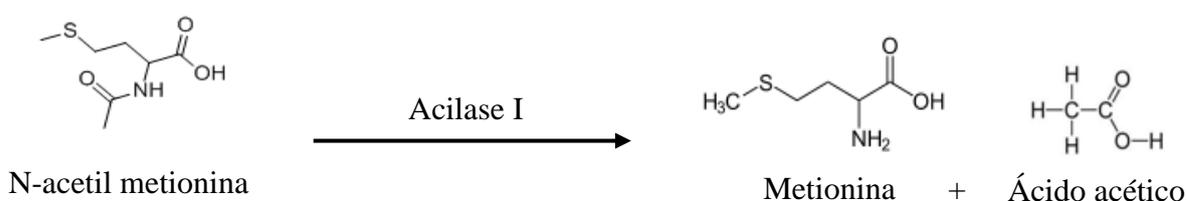


Figura 5 - Reação enzimática catalisada pela Acilase I utilizando como substrato a N-acetil metionina, originando a metionina e ácido acético.

A metionina resulta de uma reação enzimática, sendo a N-acetil-metionina (NAM) o precursor desta reação. A N-acetil-metionina é eficazmente desacetilada pela Acilase I.

A metionina é um aminoácido essencial que contém enxofre (S). Este aminoácido é especificamente indispensável para o início da tradução [19]. A metionina pode também ser intracelularmente convertida em S-adenosilmetionina sendo este o principal dador biológico do grupo metilo em mamíferos ou pode ser convertida em cisteína que é o reagente limitante na produção da maior quantidade do antioxidante celular, a glutatona [15].

Para quantificar o teor em metionina produzido recorreu-se a um reagente fluorimétrico, a fluorescamina, representada na figura 6. Este é um composto não fluorescente que quando reage com aminas primárias forma pirrolinonas de tipo II que, após a sua formação, emite forte fluorescência entre os comprimentos de onda de 475nm a 490nm, com excitação nos 390nm [20].

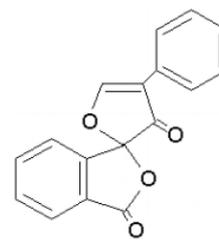


Figura 6 - Estrutura química da fluorescamina

O composto resultante da ligação da metionina com a fluorescamina é passível de ser medido por fluorescência a um comprimento de onda de excitação de 393nm e a um comprimento de onda de emissão de 478nm.

Esta metodologia pretende associar as potencialidades das técnicas de fluxo com as da técnica fluorimétrica que permite obter determinações com elevada sensibilidade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

As diversas soluções utilizadas foram preparadas com recurso a água ultrapura com resistividade superior a 18 MΩ cm, proveniente de um sistema de purificação Milipore RG, constituído por um conjunto de resinas de leito misto QPack2-CPMQ004D2 e um filtro de partículas 0,45µm Milipak 40 Gamma gold.

Com recurso a material de vidro de classe A ou equivalente, devidamente lavado, procedeu-se à preparação das soluções concentradas, por pesagem rigorosa do reagente sólido na balança analítica e a respetiva dissolução, em solvente adequado.

Por sua vez, as soluções padrão foram preparadas com diluição rigorosa das soluções mãe, com recurso a pipetas automáticas Gilson, calibradas regularmente com água, de pontas de plástico descartáveis, modelos P20, P100, P1000 e P5000 de volume variável e com capacidades máximas respetivas de 20, 100, 1000, 5000 µL. Relativamente aos reagentes líquidos, a preparação das respetivas soluções mais concentradas foi efetuada por diluição direta a partir do reagente, assim como as soluções mais diluídas que eram obtidas por diluição rigorosa da solução mais concentrada.

Para a preparação do tampão fosfato 0,1 mol/L, pH=8,0 e pH=7 recorreu-se ao hidrogenofosfato disódico (Na₂HPO₄) Sigma-Aldrich e dihidrogenofosfato de sódio (NaH₂PO₄) da Sigma-Aldrich. A N-acetil – L-metionina foi fornecida pela Sigma-Aldrich, bem como a enzima Acilase I de origem porcina e a fluorescamina.

A solução de N-acetil – L-metionina (Sigma-Aldrich) a 100mM foi preparada com uma massa de 0,478g para 25mL de tampão fosfato a pH 7.

A solução de fluorescamina (Sigma-Aldrich) foi preparada partindo de uma massa de 0,0025g, tendo sido esta mesma massa diluída em 50µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Desta solução foram retirados 40µL, que foram adicionados a 3460µL de DMSO, e fez-se até ao volume de 10mL com água ultrapura (c=0,2mg/mL). Posteriormente à sua preparação, esta solução de 10mL foi borbulhada em azoto para remoção do oxigénio, uma vez que este degrada a fluorescamina, diminuindo a sua atividade.

A solução de Acilase I (tipo II com origem em fígado de porco, EC 3.5.1.14; Sigma-Aldrich) foi preparada partindo de uma massa de 0,001g, sendo posteriormente dissolvida em 10mL de tampão fosfato a pH 7. Esta solução tem de ser conservada no congelador a -20°C.

Das soluções preparadas, destaca-se que as de fluorescamina e da enzima acilase I foram sempre preparadas diariamente.

4.2. EQUIPAMENTOS

Para a pesagem dos diferentes reagentes e respeitando a precisão necessária, recorreu-se à balança analítica Mettler Toledo AG285 (precisão de 2×10^{-5} g) ou a uma balança Kern 440-35N (precisão de 1×10^{-2} g).

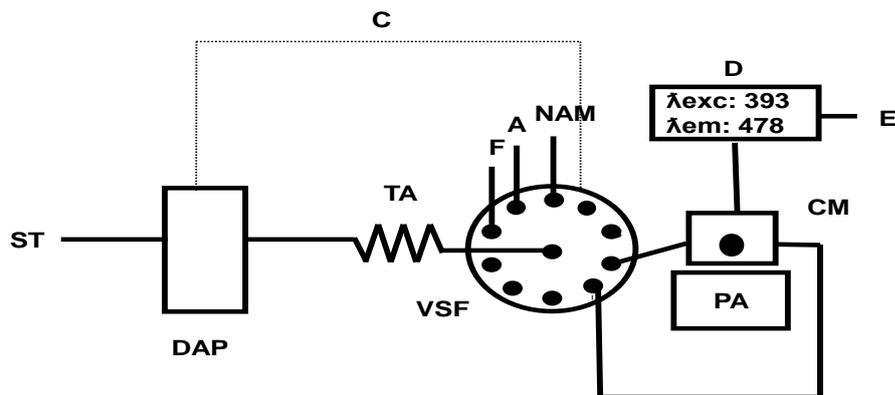
Para os ajustes de pH requeridos recorreu-se a um milivoltímetro de alta impedância de entrada, da marca Crison Instruments modelo GLP 22 acoplado a um eléctrodo de vidro combinado de Ag/AgCl da mesma marca e modelo 52-02. A calibração do eléctrodo combinado era realizada com recurso aos padrões comerciais disponíveis: pH = 4,00 (Riedel-de-Haën, 33543), pH = 7,00 (Riedel-de-Haën, 33546) e pH = 9,00 (Merck, 9889).

Com vista a efetuar os ensaios utilizou-se um fluorímetro da marca Jasco®, modelo FP-2020 Plus, equipado com uma célula de fluxo de 16 μ L, usando uma atenuação de 32 e um ganho de 1000.

De forma a proceder à realização dos ensaios que avaliam a influência dos parâmetros nos resultados utilizou-se um espectrofotómetro ultravioleta-visível da marca Jenway®, modelo 6300.

A válvula utilizada no estudo dos parâmetros que influenciam o desenvolvimento de uma reação química no sistema FIA é da marca Rheodyne®, modelo 5020.

4.3. COMPONENTES DO SISTEMA DE FLUXO



Esquema 1 - Sistema SIA. ST- Solução transportadora; DAP- Dispositivo de aspiração e propulsão; TA- Tubo de armazenamento; VSF- Válvula seletora de fluídos; C- Computador; NAM-N-acetilmetionina; A-Acilase I; F- Fluorescamina; PA- Placa de agitação; CM- Câmara de mistura; D- Detetor fluorimétrico e E- Esgoto.

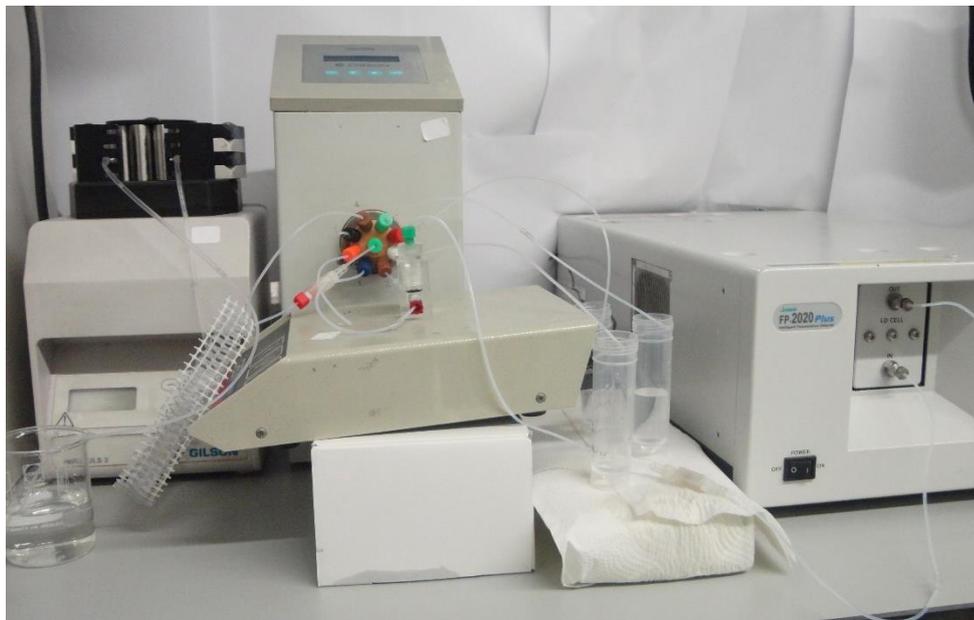


Figura 7 – Componentes do sistema SIA utilizado na avaliação da atividade da enzima Acilase I

4.3.1. Dispositivos de aspiração/propulsão

O sistema desenvolvido, representado no esquema 1, possuía uma bomba peristáltica de quatro canais modelo Miniplus 3 da marca Gilson como dispositivo de aspiração/propulsão. Este dispositivo era controlado por computador, nomeadamente no que se refere ao início e paragem do funcionamento e ao sentido e velocidade de rotação da mesma.

A bomba peristáltica vinha equipada com tubos de PVC, cuja substituição era concretizada quando se verificavam alterações do caudal, perda de elasticidade e/ ou aumento da amplitude dos pulsos. A seleção do diâmetro interno destes tubos era efetuada contemplando a velocidade de rotação da bomba peristáltica e atendendo a fatores como o caudal de propulsão pretendido e os volumes de soluções a aspirar.

Com vista a proceder à avaliação dos caudais de aspiração e propulsão que os tubos de impulsão, de distintos diâmetros internos permitiam, efetuava-se a pesagem da massa de água aspirada ou propulsionada num determinado intervalo de tempo, estabelecendo diferentes velocidades de rotação da bomba peristáltica, como demonstrado no ponto 3.1.1 do presente relatório. Assim, avaliava-se a relação entre a velocidade de rotação da bomba e o tempo, ou seja, o caudal, que permitia definir, em termos de tempo, os volumes a aspirar ou propulsionar.

4.3.2. Dispositivo de seleção de fluidos

O componente principal de todo o sistema era a válvula seletora de fluídos de oito portas e de rotação bidirecional (rotação completa em quatro segundos), sendo adotado o percurso mais rápido. Esta válvula, da marca Crison, era o componente ao qual estavam ligados todos os elementos do sistema, como são exemplo os reatores e detetores, sendo, simultaneamente, o elemento responsável pela distribuição de todas as soluções pelo sistema e o primeiro elemento do sistema a estar em contacto com os reagentes.

Das diversas portas, destaca-se a porta central que possibilitava a ligação entre o tubo de armazenamento e todos os outros canais das portas periféricas. Por sua vez, as portas periféricas permitiam a entrada de amostras e reagentes nos sistemas, assim como, uma delas, era a porta usada para estabelecer a ligação ao detetor.

Na montagem do sistema deve ter-se em conta alguns elementos no que diz respeito à válvula seletora de fluídos: atender ao facto de que o número de portas periféricas poder condicionar o número de operações que podem ser realizadas, o facto do sentido de rotação da válvula ser selecionado por forma a corresponder ao menor percurso entre duas portas sequenciais, assim como considerar que a presença de várias portas sem finalidade pode originar uma diminuição no ritmo de amostragem.

Para minimizar o tempo de cada ciclo analítico, atendia-se à rotação bidirecional da válvula e ao tempo de rotação completa para distribuir os dispositivos e as soluções pelas diferentes portas secundárias da válvula seletora.

4.3.3. Outros componentes da montagem do sistema

Para proceder à ligação entre os diferentes componentes do sistema recorreu-se a tubos de Politetrafluoretileno (PTFE), da marca Omnifit, com um diâmetro interno de 0,8mm.

No sistema, esta tubagem tinha duas configurações: linear e em figuras de oito (obtidas entrelaçando tubo, em formas de oito consecutivas, numa rede plástica de tamanho variável). Recorria-se à configuração em figuras de oito no tubo de armazenamento, de forma a diminuir o transporte laminar das soluções ao longo do tempo do percurso e intensificar o transporte radial.

Ainda como componente do sistema de montagem, foi necessário recorrer a uma câmara de mistura de Perspex® (Figura 8), com agitação mecânica, de volume interno regulável, através do ajuste da posição de uma peça móvel no topo da mesma, apresentando um volume máximo de 350 μ L. Apresenta uma cavidade cilíndrica, perfurada na base em dois pontos diametralmente opostos, bem como no centro da peça móvel formando um canal para o exterior da câmara. Esta era colocada sobre um agitador magnético que promovia a rotação de uma barra magnética (comprimento de 6 mm e largura de 3mm) colocada no seu interior. Nesta montagem, dois dos canais encontravam-se ligados à válvula, emergindo o líquido em direção ao detetor pelo canal situado no topo da mesma.



Figura 8 - Câmara de mistura

4.3.4. Controlo informático do sistema

O controlo, a atuação automática e sincronizada dos dispositivos de aspiração/propulsão e do dispositivo seletor de fluídos é possível devido à sua interligação com um computador, que possuía um cartão de interface Advantech PCL 711B. Desta forma, através de um programa

elaborado em Microsoft Quickbasic 4.5 (implementado em ambiente DOS), era possível comandar a porta da válvula seletora a que se visava aceder, o tempo de permanência nessa posição, a velocidade e o sentido de rotação da bomba peristáltica. Deste modo, era possível pôr em prática uma sequência de etapas necessárias a uma determinação e à sua repetição de um modo pré-programado. A progressão de cada ciclo analítico era visualizada no ecrã, tal como figura 9.

PROGRAMA DE CONTROLO DO SISTEMA SIA COM VÁLVULA A/FIA CRISON

Posição (1-8) Tempo (s) Caudal (0-45) Sentido (a/b) POSIÇÃO (1-2) SENTIDO (a/b)

mudar posição (s/n):

limpar quadro (s/n):

alterar dados? (s/n)

número de repetições por ciclo:

tempo posição

ciclo

Figura 9 - Programa de controlo do sistema SIA com válvula A/FIA Crison

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. ESTUDO DE PARÂMETROS DOS SISTEMAS DE FLUXO QUE INFLUENCIAM O DESENVOLVIMENTO DE UMA REAÇÃO QUÍMICA

Esta fase teve como objetivo a familiarização com o funcionamento dos sistemas de fluxo. Para isso foi avaliado numa primeira fase o modo de funcionamento do sistema de propulsão, no que diz respeito à utilização dos tubos de impulsão. Posteriormente foram efetuados estudos sobre a resposta de um sistema FIA e de um sistema SIA, quando os valores definidos para diferentes componentes do sistema (caudais, volumes de amostra, comprimento e forma do reator) são alterados. Para isso foram calculados os valores de dispersão obtidos, no interior dos sistemas, e observadas as diferenças de resultados entre eles.

5.1.1. Calibração dos tubos de impulsão

O caudal das soluções aspiradas/bombeadas depende da velocidade de rotação selecionada e, igualmente, do diâmetro interno do tubo de impulsão utilizado. Os tubos de impulsão eram de cloreto de polivinilo (PVC, do acrónimo em inglês “Polyvinyl chloride”), de 1,02mm (tubo código branco-branco) ou 1,30mm (tubo código cinzento-cinzento) de diâmetro interno. A escolha do diâmetro interno do tubo de impulsão era efetuada tendo em conta o caudal de propulsão pretendido e os volumes de solução a aspirar. Os tubos eram substituídos logo que se detetavam sinais de mau funcionamento tais como alterações do caudal, perda de elasticidade ou aumento do número de pulsos.

A calibração dos tubos de impulsão era efetuada por cálculo da variação de volume aspirado ou impulsionado, por pesagem [4]. A diferença obtida após pesagem de um gobelé com água, previamente tarado, sujeito a aspirações ou propulsões a partir da válvula seletora, permitia estabelecer uma relação entre tempo e caudal, que permitia a definição dos volumes, a aspirar ou propulsionar, em termos de tempo. Este procedimento foi realizado sempre que

necessário. O funcionamento da bomba peristáltica era controlado por computador, em termos de sentido e velocidade da rotação e início/ paragem de funcionamento.

Tabela 1 - Caudais dos tubos de impulsão

Rpm	Caudal (mL min ⁻¹)	
	cinza-cinza	branco-branco
3	0,45544	0,20104
5	0,75392	0,48168
10	1,51292	0,95534
15	2,2777	1,4412
20	2,97688	1,9011
30	4,44266	2,8088
40	5,9083	3,7327

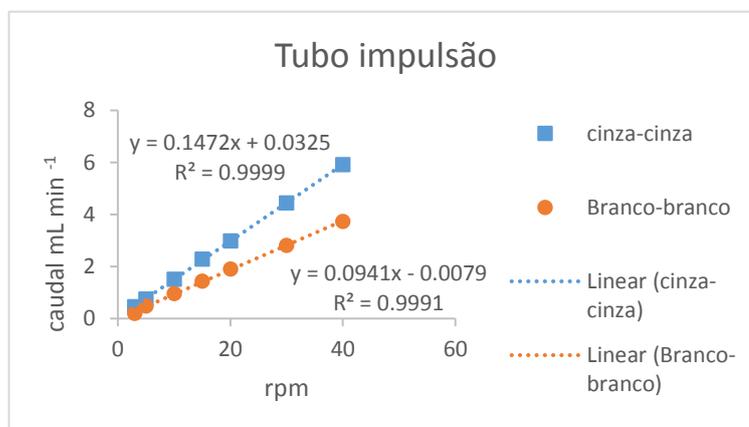


Gráfico 1- Caudais dos tubos de impulsão

Dos dois tubos de impulsão analisados (Tabela 1), foi decidido prosseguir com o tubo de 1,30mm de diâmetro interno (cinza-cinza), pois ao apresentar um diâmetro interno maior e, tendo em conta os volumes a avaliar nos ensaios, a seguir demonstrados, permite uma economia de tempo. Analisando a equação da reta azul do gráfico 1 (cinza-cinza), foi possível determinar os caudais, bem como as respetivas rotações por minutos (rpm), correspondentes.

5.1.2. Cálculo da dispersão nos sistemas de fluxo

Para se proceder ao cálculo da dispersão (D), deve inicialmente determinar-se a absorvância do corante a usar como amostra sem sofrer a diluição do transportador. Foi necessário utilizar uma solução de concentração bastante elevada dado os graus de dispersão obtidos no interior dos sistemas. Como esta solução saturava o detetor foi realizada uma diluição da solução a metade. A absorvância do azul de bromotimol após a diluição é de 1,296. Como este foi diluído duas vezes, considerou-se para o cálculo da dispersão o valor de absorvância de 2,592. Este valor representa a absorvância do azul de bromotimol concentrado, ou seja, o utilizado em todos os ensaios a seguir descritos.

O cálculo da dispersão obtida pela amostra nas diferentes condições estudadas (caudal, volume de amostra, comprimento do reator e conformação do reator) foi efetuado através da seguinte fórmula [9]:

$$D = \frac{c_o}{c_f} = \frac{Abs_o}{Abs_f}$$

Equação 1 – Cálculo da dispersão. D - Dispersão; c_o - concentração inicial; c_f – concentração final; Abs_o – Absorvância inicial; Abs_f – Absorvância final

Tendo por base a fórmula anteriormente definida, construíram-se os gráficos 2 a 9 para cada fator em estudo, em que se relaciona a variação de absorvância com a dispersão obtida. Uma vez que existe uma relação linear entre a absorvância obtida e as alturas dos picos obtidos, era utilizada a média das alturas dos sinais analíticos para determinar a absorvância média para cada parâmetro, considerando que a folha de registo do espectrofotómetro apresenta 20cm de comprimento, correspondendo a este valor uma unidade de absorvância.

5.1.3. Estudo dos caudais, dos volumes de amostra, do comprimento e da configuração do reator em FIA e SIA

De forma a avaliar os diversos parâmetros dos sistemas de fluxo que influenciam o desenvolvimento de uma reação química, foram estudadas as variações dos caudais, do volume de amostra e dos comprimentos e configuração dos reatores, verificando os efeitos dos mesmos sobre a absorvância e a dispersão do sinal analítico.

Relativamente ao estudo dos caudais no sistema FIA e SIA, este foi realizado com um volume de amostra de 100 μ L e com um comprimento de reator igual a 60cm. No que respeita ao sistema SIA relativo a este estudo, foram usadas as mesmas condições e foi estabelecido um caudal de aspiração de 1mL/min. O caudal de bombeamento foi alterado ao longo do estudo, tendo sido testados os caudais de 0,5mL/min; 1 ml/min; 1,5ml/min e 2mL/min.

Quanto ao estudo dos volumes de amostra, no sistema FIA foi definido o caudal de 1mL/min e um comprimento de reator igual a 60cm. No sistema FIA, o volume da amostra depende do comprimento do *loop*. O diâmetro interno do *loop* utilizado é 0,8mm, sendo que 1cm do *loop* corresponde a 0,005cm³ (5 μ L). Como a 1cm de tubo corresponde um volume interno de 5 μ L, então um tubo de 20cm de comprimento tem um volume interno de 100 μ L. Desta forma, pode concluir-se que quando maior o tamanho do *loop* maior será o volume de amostra.

O estudo dos volumes da amostra no sistema SIA foi realizado com um caudal de aspiração de 1mL/min. Para cada volume propulsionado foi calculado o tempo de aspiração. Sabendo que 1mL/min corresponde a 1000 μ L/60s foi calculado o tempo para cada volume a

estudar. Ou seja, para 50 μ L é necessário aspirar 3 segundos de amostra, para 75 μ L são necessários 4,5 segundos e assim sucessivamente. Neste ensaio, o caudal de bombeamento é igual para todos os volumes, assumindo o caudal de 1mL/min. Também foi adicionado ao sistema SIA um reator com 60cm de comprimento.

O estudo do comprimento do reator em FIA foi realizado com um caudal de 1mL/min, e com um volume de amostra igual a 50 μ L. O comprimento do reator foi alterado ao longo do estudo, tendo sido utilizados reatores com 20cm; 30cm; 50cm; 60cm; 100cm; 150cm e 200cm. No sistema SIA, o estudo do comprimento do reator foi realizado com um volume de amostra de 50 μ l, tendo sido definido o caudal de aspiração e de propulsão de 1 mL/min.

Tanto no sistema FIA como no sistema SIA, o estudo da configuração do reator foi realizado com um volume de amostra de 50 μ L e com um comprimento do reator igual a 60cm, sendo o caudal definido como 1mL/min.

As tabelas 2 e 3, representadas de seguida, demonstram todos os dados através dos quais foram calculados os valores de dispersão, apresentados no gráfico, em cada um dos parâmetros estudados, respetivo a cada sistema de fluxo.

Tabela 2- Resultados dos estudos realizados em sistema FIA.

		Sinal analítico (valor médio das alturas em cm)	Sinal analítico (valor médio em unidade de absorvância)
Estudo dos caudais	0,5mL min ⁻¹	10,20	0,510
	1 mL min ⁻¹	11,22	0,561
	1,5mL min ⁻¹	18,59	0,929
	2mL min ⁻¹	10,90	1,090
Estudo dos volumes de amostra	50 μ L	7,59	0,379
	75 μ L	11,24	0,562
	100 μ L	6,42	0,642
	150 μ L	10,02	1,002
	200 μ L	12,54	1,254
Estudo do tamanho do reator	20cm	9,00	0,450
	30cm	8,38	0,419
	50cm	8,34	0,417
	60cm	7,12	0,356
	100cm	6,46	0,323
	150cm	5,25	0,262
	200cm	3,18	0,159
Estudo da configuração do reator	Figuras de 8	7,56	0,378
	Elítico	7,10	0,355
	Linear	6,39	0,319

Tabela 3 - Resultados dos estudos realizados em sistema SIA.

		Sinal analítico (valor médio das alturas em cm)	Sinal analítico (valor médio em unidade de absorvância)
Estudo dos caudais	0,5mL min ⁻¹	7,97	0,398
	1 mL min ⁻¹	8,53	0,427
	1,5mL min ⁻¹	12,27	0,613
	2mL min ⁻¹	16,27	0,813
Estudo dos volumes de amostra	50μL	1,53	0,077
	75μL	2,50	0,125
	100μL	3,52	0,175
	150μL	6,57	0,328
	200μL	8,88	0,444
Estudo do tamanho do reator	20cm	2,98	0,149
	30cm	2,02	0,101
	50cm	1,65	0,082
	60cm	1,63	0,082
	100cm	1,08	0,054
	150cm	0,93	0,046
	200cm	0,68	0,034
Estudo da configuração do reator	Figuras de 8	0,92	0,046
	Elítico	0,60	0,030
	Linear	0,47	0,023

Para completar os dados referidos anteriormente, de seguida serão apresentados os gráficos que relacionam as médias das absorvâncias e os valores de dispersão dos respetivos estudos dos dois sistemas de fluxo (Gráficos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9).

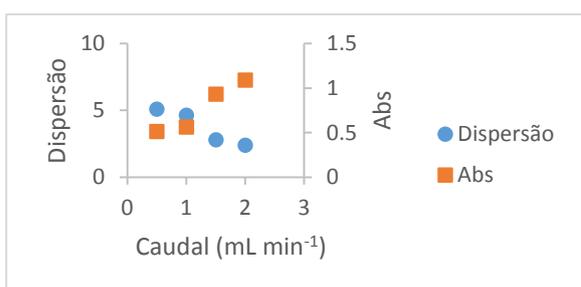


Gráfico 2 - Dispersão em sistema FIA variando o caudal da solução transportadora

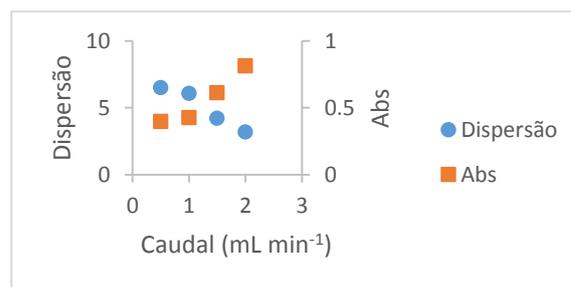


Gráfico 3 - Dispersão em sistema SIA variando o caudal da solução transportadora

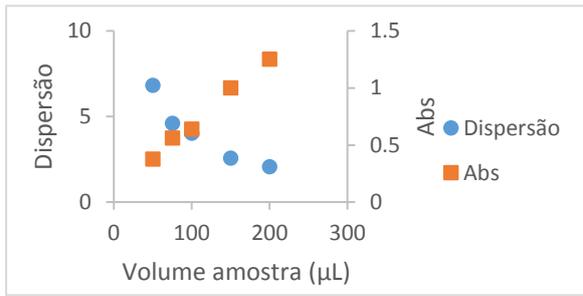


Gráfico 4 - Dispersão em sistema FIA variando o volume da amostra

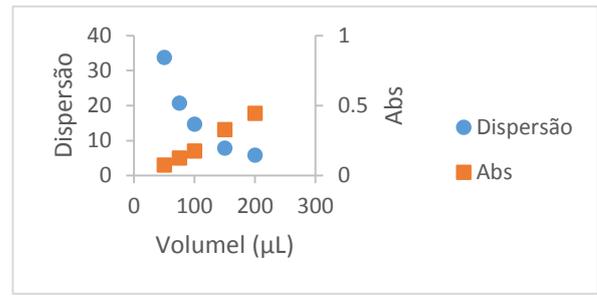


Gráfico 5 - Dispersão em sistema SIA variando o volume da amostra

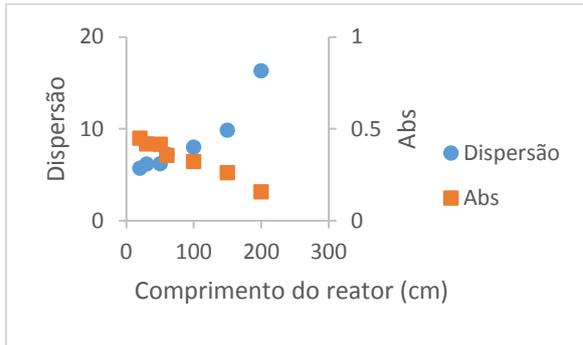


Gráfico 6 - Dispersão em sistema FIA variando o comprimento do reator

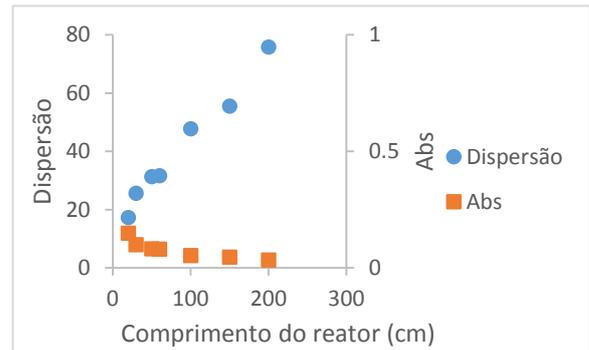


Gráfico 7 - Dispersão em sistema SIA variando o comprimento do reator

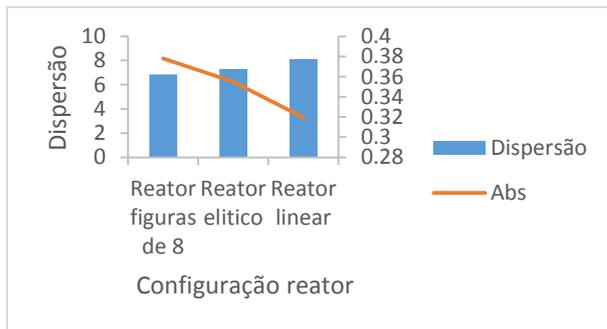


Gráfico 8 - Dispersão em sistema FIA variando a configuração do reator

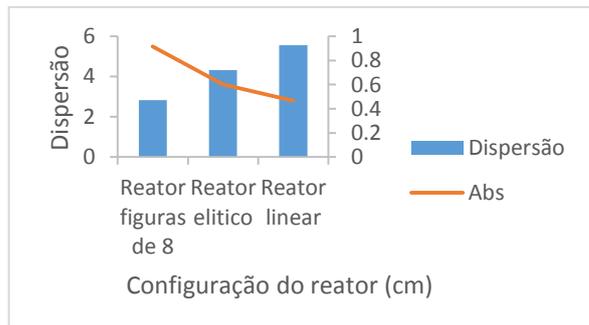


Gráfico 9 - Dispersão em sistema SIA variando a configuração do reator

Após a análise dos gráficos 2, 3, 4 e 5 é possível verificar que com o aumento do caudal e do volume de amostra há um aumento de absorvância, e consequentemente uma diminuição da dispersão. A zona de corante que se dilui no transportador é menor em qualquer um dos casos.

Relativamente aos gráficos 6 e 7 verifica-se uma situação inversa. Com o aumento do comprimento do reator, o percurso até ao detetor é superior e consequentemente a diluição do corante é maior o que origina um aumento do valor da dispersão. Relativamente ao gráfico 8 e 9, quando se altera a configuração do reator, do figuras de 8 até ao reator linear há um aumento da absorvância, o que acontece com os reatores em que o líquido ao fluir através destes é

forçado a mudar de sentido (figuras de 8 e elítico) o que intensifica a contribuição da dispersão radial, e minimiza a dispersão axial e conseqüentemente a diluição do corante.

Tendo em conta as tabelas e os gráficos acima representados, é possível concluir que, a variação dos caudais, do volume de amostra e do comprimento e configuração do reator, tanto no sistema FIA como no sistema SIA, as conclusões finais são idênticas apesar de os valores de dispersão em SIA serem relativamente superiores aos do sistema FIA pois neste caso verifica-se uma inversão de fluxo da zona de corante, que é aspirado num sentido e propulsionado para o detetor no sentido oposto.

5.1.4. Sobreposição de zonas em SIA

O estudo da sobreposição de zonas é essencial para garantir a implementação efetiva e a rentabilização máxima de uma montagem SIA [10].

O grau de sobreposição de duas zonas adjacentes num sistema SIA pode ser avaliado por aspiração alternada de uma solução corada em substituição do reagente e da amostra, registando-se o sinal correspondente dos gradientes de concentração e sobrepondo-os no mesmo gráfico. No estudo da sobreposição de zonas em SIA, foram estudados três fatores que poderiam influenciar o valor de absorvância final: a variação do caudal em direção ao detetor (0,5 e 2 mL/min), o volume das zonas de reagentes e amostras aspiradas (100, 200 e 300 μ L) e a presença de um reator no sistema.

No que diz respeito à variação do caudal e ao volume das soluções, foi possível verificar que aumentando o caudal e o volume de reagentes e amostra, a zona de sobreposição diminui (Anexo A).

Por outro lado, ao adicionar um reator de 60cm ao sistema, com diferentes volumes de amostra e reagente, a zona de sobreposição não se altera (Anexo B).

5.2. AUTOMATIZAÇÃO DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA ACILASE I

Nesta secção são apresentados os estudos prévios efetuados em modo discreto e todas as otimizações que conduziram ao sistema SIA desenvolvido para a determinação da atividade da acilase I, no que se refere aos parâmetros físico-químicos e a caracterização analítica.

5.2.1. Ensaios preliminares em modo discreto

Primeiramente procedeu-se a estudos prévios, em modo discreto manual que permitissem testar o desenvolvimento da reação.

Avaliou-se numa primeira fase os comprimentos de onda de absorção e emissão de fluorescência máximos para o produto formado entre a metionina e a fluoescamina. Avaliou-se também se os reagentes utilizados apresentavam fluorescência aos comprimentos de onda do produto da reação.

Após verificar que a metionina se ligava eficazmente à fluoescamina e atendendo ao conhecimento dos comprimentos de onda de emissão e de excitação, prosseguiu-se ao estudo da reação enzimática, catalisada pela acilase I de origem porcina (54,1 U/mL).

Após alguns estudos em que se variaram os volumes, as concentrações das soluções e os tempos de reação (por forma a obter um sinal de fluorescência elevado; com o menor consumo de reagentes e de tempo), foi definido um protocolo a ser transferido para o sistema SIA. Foram adicionados, no interior de um *ependorf*, 500 μ L de enzima acilase I de origem porcina, 500 μ L de tampão fosfato pH 8 e 200 μ L de NAM. Esperou-se cerca de 10 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 500 μ L de fluoescamina e procedeu-se à leitura no fluorímetro, estando representados no gráfico 10 os sinais analíticos obtidos. Foi necessário diluir quatro vezes a solução preparada inicialmente para conseguir obter o sinal analítico pretendido, tal como representado no gráfico 11.

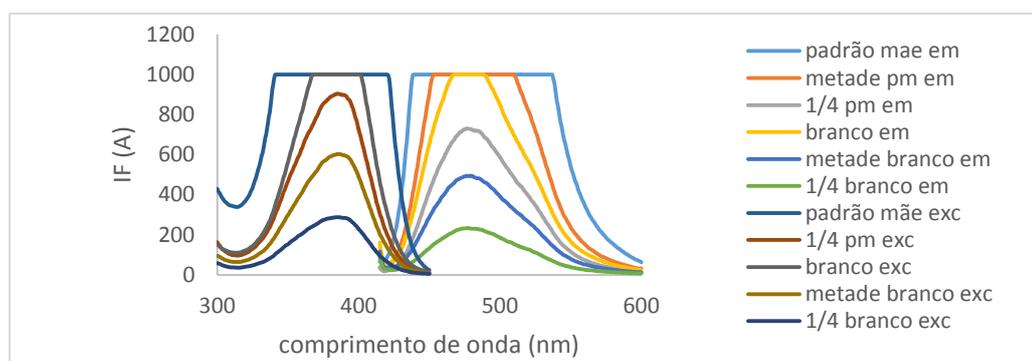


Gráfico 10 - Ensaios preliminares em modo discreto da reação enzimática.

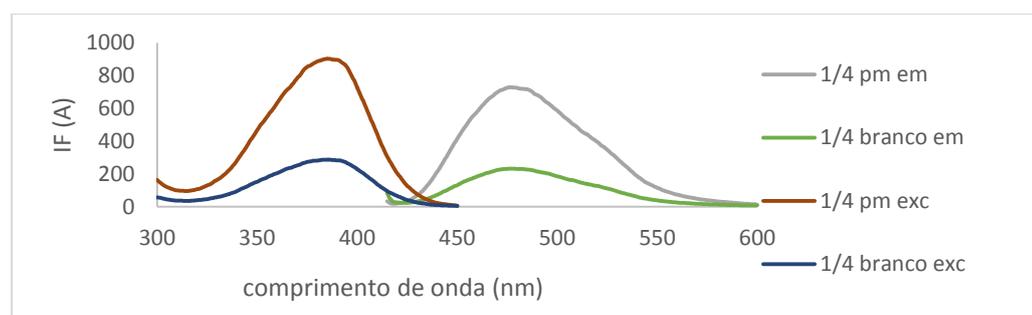


Gráfico 11 - Sinal analítico com a diluição de quatro vezes a solução preparada inicialmente

Relativamente às concentrações de enzima e NAM utilizadas nos ensaios anteriores, estabeleceram-se essas mesmas concentrações (54,1U/mL e 100mM, respetivamente) pois permitiram um sinal analítico mensurável sem que ocorresse a saturação do detetor.

Apesar de se encontrar descrita a temperatura ótima a que a enzima Acilase I de origem porcina reage com a NAM [21], também foram avaliadas outras temperaturas durante os ensaios preliminares. Foram testadas: a temperatura ambiente, 25°C, (descrita como a temperatura mais propícia para ocorrer a reação química), 37°C (descrita como a temperatura do organismo humano) e 45°C (para analisar se a enzima a esta temperatura desnaturava). Após a análise dos resultados foi possível confirmar que a temperatura ótima da enzima era 25°C (temperatura ambiente).

Ainda durante a realização dos ensaios em modo discreto, foi estimado o tempo necessário para que a reação enzimática ocorresse. Para tal, foram realizados ensaios com um tempo de espera de 5, 10, 20 e 30 minutos. No *ependorf* apenas foram adicionados a solução de enzima, de NAM e do tampão fosfato a pH 8, nas mesmas proporções que as referidas anteriormente. De seguida, e após a passagem do tempo de espera, procedia-se à adição no *ependorf* da fluorescamina e posteriormente à leitura no fluorímetro. Foi possível concluir que com o aumento do tempo o sinal aumentava, embora essa subida fosse mais moderada a partir dos 10 minutos. Na passagem para o sistema SIA e como compromisso entre o sinal analítico e a intensidade de fluorescência foi assumido 5 minuto de tempo de espera.

Por último, foi avaliado qual o pH mais favorável para a enzima Acilase I de origem porcina. Como descrito, o pH mais utilizado e o que é considerado mais adequado a esta enzima é o pH 7,4 [22]. No entanto, segundo Böhlen, Stein e Udenfriend [20], verifica-se que a reação entre a fluorescamina e os aminoácidos ou proteínas requerem geralmente pH entre 8,5-9,5. No entanto, e tendo em conta o pH ótimo da enzima e para a reação da fluorescamina com a metionina (aminoácido), fez-se um estudo de forma a verificar o pH mais adequado para ambos. Esse mesmo estudo demonstrou que o pH mais favorável, sem prejudicar a ação da enzima nem a ligação da metionina à fluorescamina é o pH 8, daí ter sido adotado esse pH para a solução transportadora.

5.3. OTIMIZAÇÃO DO PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DO SISTEMA

Considerando os estudos efetuados em modo discreto, estabeleceu-se como configuração base que o sistema SIA apresentava entre a válvula seletora de fluídos e o detetor, uma câmara de mistura que permitia a mistura eficiente numa primeira fase, entre a enzima e a NAM e posteriormente entre a metionina formada e a fluorescamina. Foi também testada a possibilidade de colocar a câmara numa porta lateral da válvula, mas verificou-se que além do ciclo analítico se tornar extremamente complicado e moroso, a intensidade de fluorescência obtida era menor.

No sistema SIA, o desempenho do sistema é afetado pela eficiência da mistura amostra/reagente e pela homogeneização da zona de reação. Estes aspetos são, maioritariamente determinados pela sequência de aspiração da amostra e dos reagentes para o tubo de armazenamento, determinando a zona que vai suportar um maior grau de dispersão [23]. Relativamente à ordem de aspiração da NAM e da enzima, definiu-se que deveria ser aspirada primeiro a enzima e posteriormente a NAM pois originava uma diluição menor da solução de NAM no envio para a câmara, promovendo um aumento da sensibilidade do método. Se fosse aspirada primeiro a solução de NAM, antes de esta entrar na câmara, a NAM sofria uma diluição superior porque o percurso até entrar na câmara é maior. Para além disto, tendo em conta os volumes de ambas e o tempo de envio para a câmara, iria entrar uma pequena quantidade de NAM para dentro da câmara, devido ao facto de a câmara de mistura não comportar o volume total das duas alíquotas, originando um sinal analítico mais baixo.

No desenvolvimento deste novo método para a avaliação da atividade da enzima Acilase I, foram testados e otimizados vários parâmetros: a concentração da enzima, o tempo de reação e o volume de reagentes.

Segundo o ciclo analítico descrito no ponto 5.4 do presente relatório, realizou-se o estudo da variação dos volumes de aspiração e/ou propulsão dos diferentes reagentes intervenientes na reação química em estudo.

Os resultados para estes parâmetros são apresentados de seguida, de acordo com a ordem cronológica pela qual foram estudados. Serão referidas as condições usadas para estudar cada um dos parâmetros. O tempo de envio para o detetor, da zona de amostra/reagentes com diferentes volumes, foi determinado experimentalmente e escolhido o que oferecia um maior sinal analítico.

A partir do momento em que um parâmetro foi otimizado, a sua condição ótima passou a ser utilizada em todos os ensaios realizados posteriormente.

5.3.1. Variação do volume de aspiração da solução de enzima Acilase I

Inicialmente, estudou-se a variação do volume de aspiração da solução de enzima Acilase I, tendo sido realizados ensaios com tempos de aspiração de 6, 8 e 10 segundos, que correspondem a 100 μ L; 133 μ L e 167 μ L, respetivamente.

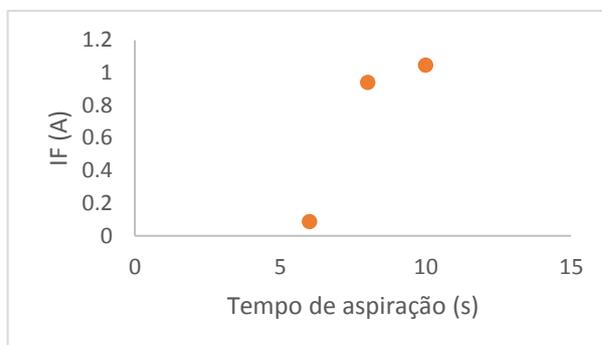


Gráfico 12 - Variação dos volumes de aspiração da solução de enzima Acilase I

Segundo o gráfico 12, o tempo de aspiração selecionado foi de 10 segundos como compromisso entre o consumo de enzima e o valor de intensidade de fluorescência, a qual se aproximava já de um *plateau*, correspondente a um excesso de enzima para o substrato.

5.3.2. Variação do volume de aspiração da solução de NAM

Seguidamente, observou-se a variação do volume de aspiração da solução do substrato NAM, onde foram realizados ensaios com tempos de aspiração de 8, 10 e 12 segundos, que correspondem a 133 μ L; 167 μ L e 200 μ L, respetivamente.

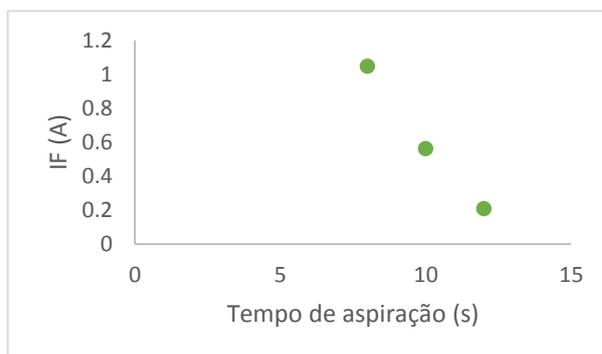


Gráfico 13 – Variação dos volumes de aspiração da solução do substrato N-acetilmetionina.

Segundo o gráfico 13, com o aumento do tempo de aspiração verificava-se uma diminuição do sinal analítico. De facto, e devido ao volume da câmara, há medida que se aumentava o volume de NAM a enviar para a câmara diminui-se o teor de enzima que entra na câmara de mistura antes do momento da paragem. A proporção entre a quantidade de enzima e NAM vai diminuindo e conseqüentemente a IF também. Desta forma, o aumento de volumes não contribuía para um aumento da concentração do produto formado.

5.3.3. Variação do tempo de envio das soluções de Acilase I e NAM para a câmara de mistura

Posteriormente, avaliou-se o tempo de envio das soluções de Acilase I e NAM para a câmara de mistura, testando 11, 12 e 13 segundos.

Segundo o gráfico 14, o tempo de propulsão para a câmara de mistura que promove a entrada suficiente de ambas as soluções na mesma, de forma a originar uma IF melhor são os 12 segundos, tendo sido esse o tempo de propulsão adotado.

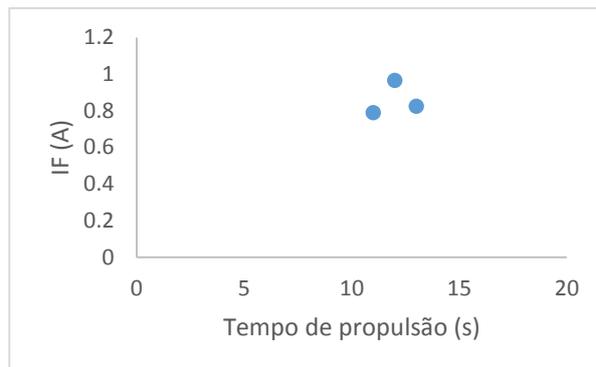


Gráfico 14- Variação dos volumes de propulsão da Acilase I e NAM para a câmara de mistura.

5.3.4. Variação do tempo de reação na câmara de mistura

Seguidamente, realizou-se um estudo relativo ao tempo de espera na câmara de mistura das soluções Acilase I e NAM. Foram testados os seguintes tempos: 3, 5, 8 e 10 minutos.

Segundo o gráfico 15, o tempo de espera na câmara mais vantajoso seria os 8 minutos, no entanto, o que foi definido para a realização dos ensaios seguidamente descritos

foram os 5 minutos. De forma a sustentar a decisão tomada pode referir-se o ritmo de determinação de cada um dos ciclos analíticos com alteração do tempo de paragem na câmara de mistura. O ritmo de determinação é o número de ciclos analíticos por hora. Quando definimos 5 minutos como tempo de espera na câmara de mistura, o ritmo de determinação é de 6,8 ciclos por hora; quando definimos 8 minutos, o ritmo de determinação é de 5 ciclos por hora e o ritmo de determinação de 10 minutos é 4,3 ciclos por hora.

Por forma a não estender demasiado o tempo necessário para efetuar a determinação da atividade da enzima, optou-se por um compromisso entre a sensibilidade e tempo despendido em cada ensaio.

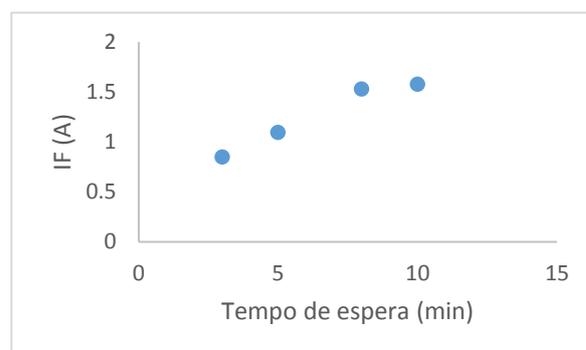


Gráfico 15 – Variação do tempo de espera na câmara de mistura das soluções de Acilase I e NAM

5.3.5. Variação do volume de aspiração da fluorescamina

Já realizados os ensaios anteriores, decidiu-se analisar o volume de fluorescamina a aspirar. Foram testados os seguintes tempos: 15, 20, 25 e 30 segundos.

Tendo em conta o gráfico 16, foi selecionado o tempo de 25 segundos que corresponde a um volume de fluorescamina de 417 μ L. Este volume era, posteriormente

enviado para a câmara de mistura, em direção ao detetor. Para volumes superiores, o produto da reação química (entre a fluorescamina e a metionina) não originava aumento de sinal.

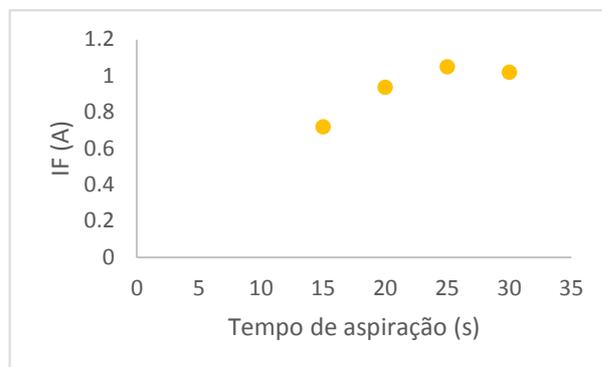


Gráfico 16- Variação dos volumes de aspiração da solução de fluorescamina.

5.4. PROCEDIMENTO ANALÍTICO FINAL

O sistema SIA otimizado integrava os elementos presentes no esquema 1 e o ciclo analítico otimizado é seguidamente descrito.

De notar que, no início de cada dia, toda a tubagem da montagem, bem como o detetor, eram preenchidas com solução transportadora (tampão fosfato pH 8).

O ciclo analítico descrito seguidamente (tabela 10), era iniciado com a aspiração de cerca de 167 μ L da solução de enzima Acilase I (passo 1) e 133 μ L da solução de NAM (passo 2). Estas duas soluções eram aspiradas para o tubo de armazenamento. Posteriormente eram enviados para a câmara de mistura em 12 segundos (passo 3) e permaneciam na mesma durante 300 segundos (5 minutos) (passo 4). Durante estes 5 minutos, aspiravam-se 417 μ L da solução de fluorescamina (passo 5). Após os 300 segundos totais de espera, propulsionava-se durante 100 segundos a fluorescamina, através da câmara de mistura (passo 6) e mais 100 segundos (com caudal 2mL/min) através da outra entrada lateral da câmara por onde foram impulsionados a NAM e a enzima (passo 7). De salientar que todas as etapas do ciclo foram realizadas a um caudal de 1mL/min, exceto a última referida.

No final do ciclo analítico, todas as ligações à câmara se encontravam preenchidas apenas com solução tampão.

Tabela 5- Ciclo analítico definido para o procedimento final

Passo	Posição	Volume (µL)	Tempo (s)	Fluxo (mL/min)	Direção	Evento
1	4	167	10	1	Aspiração	Acilase I
2	3	133	8	1	Aspiração	NAM
3	1	200	12	1	Propulsão	Propulsão para câmara de mistura
4	1	0	275	0	Paragem	Fluxo parado na câmara de mistura
5	5	417	25	1	Aspiração	Fluorescamina
6	2	1667	100	1	Propulsão	Propulsão para o detetor
7	1	1333	100	2	Propulsão	Propulsão para o detetor

5.5. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS DO SISTEMA

Após a otimização dos parâmetros físicos e químicos, foi realizada a determinação das características analíticas do sistema desenvolvido.

A otimização das montagens era feita, tendo em conta diversos parâmetros, como a sensibilidade, a precisão, o limite de deteção, o limite de quantificação e o limite superior de resposta linear. Todos estes fatores influenciavam as escolhas efetuadas durante a otimização dos sistemas, a qual era realizada pelo método univariante. Assim, consistia em fazer variar, num determinado intervalo, um único parâmetro a otimizar, mantendo todos os outros fixos. O intervalo de concentrações, em que existe uma relação linear entre as concentrações do analito e a IF, foi definido através do traçado de uma curva de calibração, com soluções padrão de concentrações crescentes da enzima Acilase I, tendo-se registado as alterações de sinal no gráfico 17.

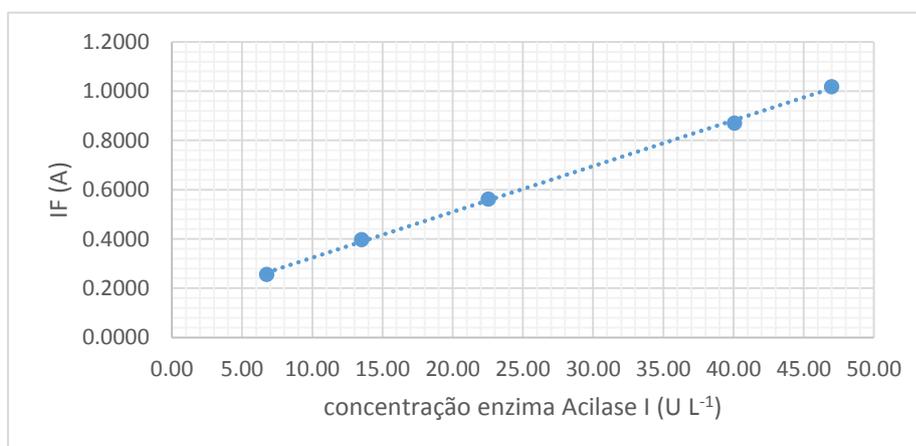


Gráfico 17- Curva de calibração obtida nas condições finais da enzima Acilase I.

Através da curva de calibração apresentada, foi possível obter-se uma equação da reta $IF=(0,018\pm 0,001) \text{ Conc acilase (U L}^{-1}) + (0,14\pm 0,03)$, com limites de confiança de 95% para a ordenada na origem e para o declive, com um r^2 de 0,999.

O limite de detecção era considerado como a concentração que proporciona um sinal no instrumento, significativamente diferente do sinal de uma amostra de branco ou sinal de fundo [24]. Na prática, isto traduz-se pela concentração de analito que proporciona um sinal igual ao sinal de branco mais 3 vezes o desvio padrão do branco [25] ou ao valor da ordenada na origem mais 3 vezes Sy/x [24]. O limite de quantificação é considerado como o limite mais baixo para determinações quantitativas precisas, em oposição à detecção qualitativa [24]. Este limite é calculado, na prática, usando o valor médio do branco, adicionado de dez vezes o valor do seu desvio padrão [25], ou a soma do valor da ordenada na origem, com 10 vezes Sy/x .

Neste trabalho foi utilizado o valor de Sy/x . O limite de detecção foi calculado interpolando na curva de calibração o valor da IF correspondente ao valor da ordenada na origem com a adição de três vezes o Sy/x . O limite de quantificação foi obtido por interpolação na curva de calibração, do valor de IF correspondente ao valor da ordenada na origem somando dez vezes o Sy/x . O limite de detecção obtido foi de 1,76 U/L e o limite de quantificação obtido foi de 5,87 U/L. Com base nestes resultados, podemos definir o intervalo de linearidade de 5,87U/L (limite de quantificação) a 47U/L (concentração máxima de Acilase I testada).

A repetibilidade da metodologia foi avaliada em termos de desvio padrão relativo (RSD, do inglês “Relative Standard Deviation”), expresso em percentagem. Para testar a repetibilidade deste método, foi utilizada uma solução de enzima Acilase I com uma concentração de 24,25 U/L. Para esta concentração, fizeram-se oito ciclos e a IF obtida em cada um deles foi interpolada na curva de calibração de forma a obter a concentração correspondente. Em seguida, foram calculadas a média (24,25U/L) e o desvio padrão (1,17) das concentrações e com esses valores, foi possível de se determinar o RSD. Foi calculado um RSD de 4,8%, a partir da análise repetida (n=8) da solução de concentração 24,25U/L em enzima Acilase I. Desta forma, verificou-se uma boa repetibilidade do sistema e confirmou-se a sua aplicabilidade na avaliação da atividade da enzima em concentrações distintas.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos substanciam a utilidade e a fiabilidade do procedimento automático desenvolvido como uma alternativa robusta aos procedimentos discretos habitualmente utilizados, para efetuar estudos de reações enzimáticas.

Tendo como base os estudos realizados inicialmente, relativos aos parâmetros dos sistemas de fluxo que influenciam o desenvolvimento de uma reação química, foi possível comprovar que existem fatores que interferem com os resultados. Desta forma, foi possível ajustar os diversos componentes do sistema de modo a otimizar o mesmo e a promover a realização do objetivo principal do trabalho laboratorial em questão.

Em termos de resultados, pode concluir-se que é possível avaliar a atividade da enzima através do sistema SIA (após a realização das devidas otimizações do sistema).

A metodologia desenvolvida é automática e económica, incorporando equipamentos relativamente simples, com um consumo reduzido de reagentes e baixa produção de efluentes o que contribui para a diminuição dos custos operacionais associados à análise propriamente dita, bem como os relacionados com o tratamento dos efluentes produzidos.

Relativamente ao limite de deteção e de quantificação da enzima estudada, pôde concluir-se que é possível detetar um sinal analítico diferente do valor da ordenada na origem para concentrações de enzima $\geq 1,76$ U/L, e que é possível quantificar uma concentração relativamente baixa da enzima, para concentrações $\geq 5,87$ U/L.

Relativamente à sua repetibilidade e tendo em conta o RSD calculado (4,8% partindo da análise repetida $n=8$ da solução de concentração 24,25U/L de enzima Acilase I), confirma-se a aplicabilidade do sistema na avaliação da atividade da enzima em concentrações distintas.

Assim, o método proposto constitui uma ferramenta importante para a automatização de procedimentos enzimáticos, diminuindo a probabilidade de introdução de erros por parte do operador, bem como pela rentabilização do tempo e do volume de amostras e reagentes a utilizar. É ainda de realçar que as montagens SIA estão geralmente associadas a elevada versatilidade, associada à sua adaptação a diversas determinações apenas por alteração dos parâmetros do sistema controláveis por processador e à eficiente utilização das soluções, permitindo uma diminuição do consumo de reagentes (e, conseqüentemente, uma minimização de resíduos). Este facto permite antever a possibilidade de alargamento da aplicabilidade dos sistemas desenvolvidos.

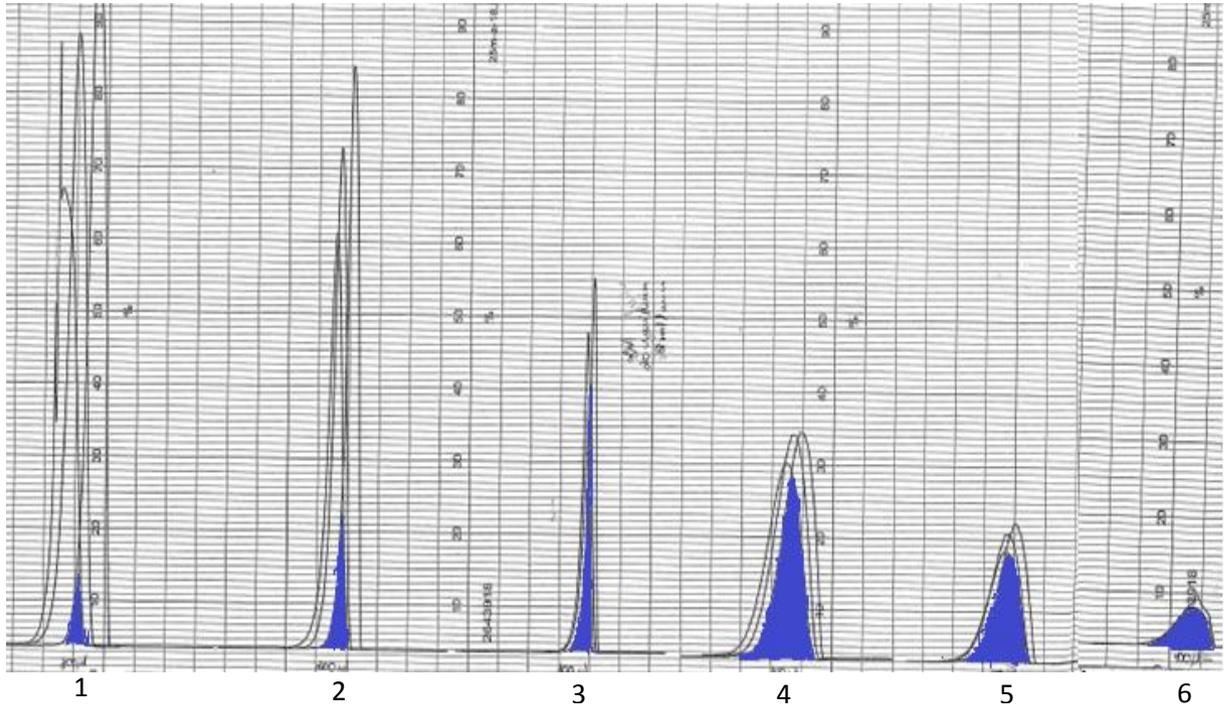
6. BIBLIOGRAFIA

1. ESSG, *Plano de Estágio Profissional I*. 2016.
2. FFUP. 2015 [citado em 20 de novembro de 2015]; Retirado de: www.ffup.pt.
3. Ruzicka, J. and E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis*. 2 ed. 1988, Nova York: Wiley.
4. Valcarcel, M. and M.D.L.d. Castro, *Flow Injection Analysis, Principles and Applications*. 1987, Chichester: Ellis Horwood.
5. Ruzicka, J., *The second coming of flow-injection analysis*. *Analytica Chimica Acta*, 1992. **261**(1-2): p. 3-10.
6. Trojanowicz, M., *Flow Injection Analysis: Instrumentation and Applications*. 2000, River Edge: World Scientific.
7. Martinez-Calatayud, J., *Flow Injection Analysis of Pharmaceuticals: Automation in the Laboratory*. 1996, Londres: Taylor & Francis.
8. Ruzicka, J.; Marshall, G. *Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays* *Analytica Chimica Acta*, 1990. **237**: p. 329-343.
9. Staden, J.; Botha, A. *South African Journal of Chemistry*, 1998. **51**: p. 100.
10. Gübeli, T.; Christian, G.; Ruzicka, J. *Fundamentals of Sinusoidal Flow Sequential Injection Spectrophotometry*. *Analytical Chemistry*, 1991. **63**: p. 2407.
11. Christian, G. D.; Ruzicka, J., *Exploiting stopped-flow injection methods for quantitative chemical assays*. *Analytica Chimica Acta*, 1992. **261**(1-2): p. 11-21.
12. Ruzicka, J.; Gübeli, T. *Analytical Chemistry*, 1991. **63**: p. 1680.
13. Soares, M. *Titulação ácido-base e formação de solução-tampão*. . 2013 [citado em 25 de novembro de 2015]; Retirado de: www.olimpiadascientificas.com.
14. Cruz, N., Cavalheiro, A.; Carli, E., *Avaliação do azul de bromotimol como poluente persistente em meio aquoso sob fotólise ultravioleta*. *Anais da 4ª Jornada Científica da UEMS/Naviraí*, 2014.
15. Smith, T.; Ghandour, M.; Woodd, P. *Detection of N-acetyl methionine in human and murine brain and neuronal and glial derived cell lines*. . *Journal of Neurochemistry*, 2011. **118**: p. 187-194.
16. Story, S.; Grunden, A. Adams, M. *Characterization of an Aminoacylase from the Hyperthermophilic Archaeon Pyrococcus furiosus*. *Journal of Bacteriology*, 2001. **183**: p. 4259-4268.

17. Durand, A.; Giardina, T.; Villard, C.; Roussel, A.; Puigserver, A.; Perrier, J. *Rat kidney acylase I: further characterisation and mutation studies on the involvement of Glu 147 in the catalytic process*. *Biochimie*, 2003. **85**: p. 953-962.
18. Sommer, A.; Christensen, E.; Schwenger, S.; Seul, R.; Haas, D.; Olbrich, H.; Omran, H.; Sass, J. The molecular basis of aminoacylase 1 deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 2011.
19. Rodionov, D. *Subsystem: Methionine metabolism*.
20. Böhlen, P.; Stein, S.; Udenfriend, S., *Studies on the reaction of fluorescamine with primary amines*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1974. **163**: p. 390-399.
21. Stödeman, M.; Schwarz, F. *Temperature dependence of the kinetics of the acylase hydrolysis reaction by differential stopped flow microcalorimetry*. *Analytical Biochemistry*, 2003. **321**: p. 1-7.
22. Uttamsingh, V.; Keller, D.; Anders, M. *Acylase I-Catalyzed Deacetylation of N-Acetyl-L-cysteine and S-Alkyl-N-acetyl-L-cysteines*. *Chemical Research in Toxicology* 1998. **11**: p. 800-809.
23. Cunha, E.; Pinto, P.; Carvalho, J. Saraiva, L. *Automated carboxylesterase assay for the evaluation of ionic liquids' human toxicity*. *Journal of Hazardous Materials* 2013. **244-245**: p. 563-569.
24. Miller, J.; Miller, J. *Estatística para Química Analítica*. 2 ed. 1993, Addison-Wesley Ibroamerican, S. A: Wilmington.
25. IUPAC. *Analytical Chemistry*, 1976. **48**: p. 2294.

ANEXOS

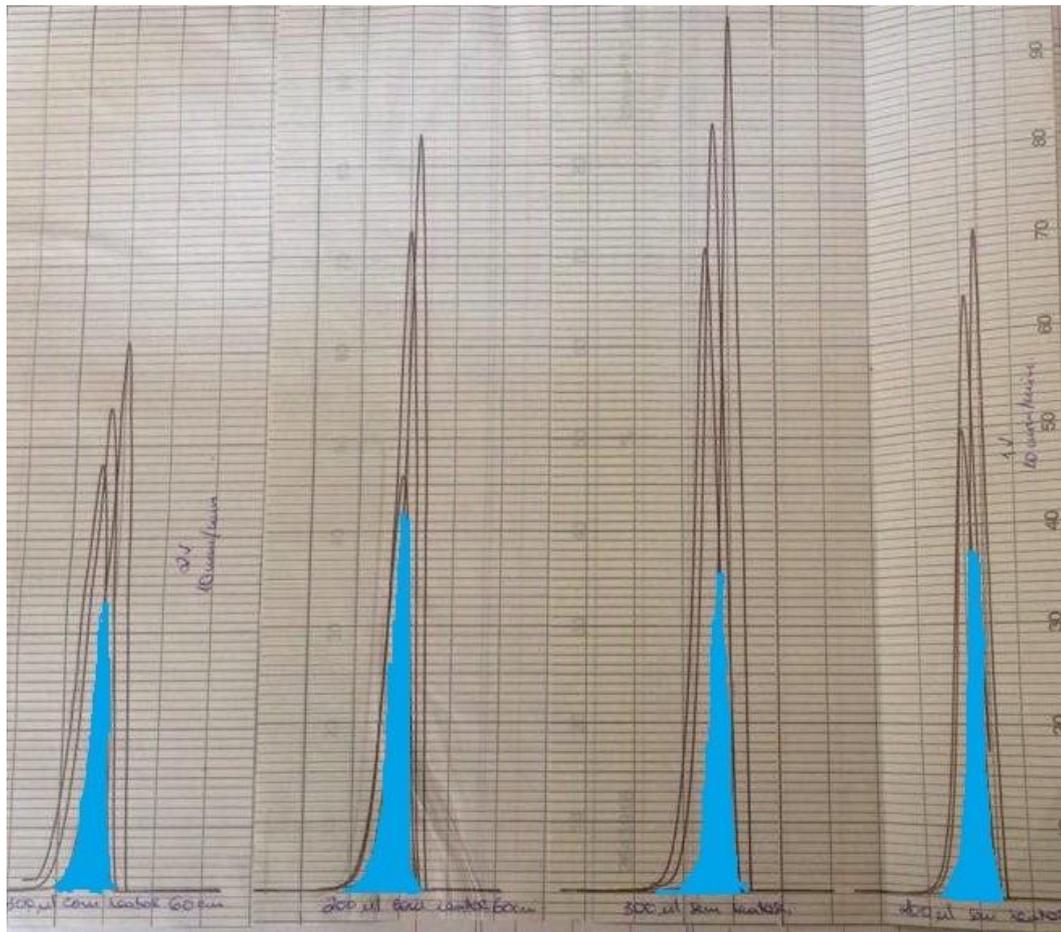
Anexo A- Registo obtido no estudo de sobreposição de zonas variando o caudal e o volume de amostra



Legenda do gráfico:

- 1) Volume aspirado - 300 μ L
Caudal de propulsão – 2mL/min
- 2) Volume aspirado - 200 μ L
Caudal de propulsão – 2mL/min
- 3) Volume aspirado - 100 μ L
Caudal de propulsão – 2mL/min
- 4) Volume aspirado - 300 μ L
Caudal de propulsão – 0,5mL/min
- 5) Volume aspirado - 200 μ L
Caudal de propulsão – 0,5mL/min
- 6) Volume aspirado - 100 μ L
Caudal de propulsão – 0,5mL/min

Anexo B - Registo obtido no estudo de sobreposição de zonas variando a presença de reator.



1

2

3

4

Legenda do gráfico:

- 1) Volume aspirado: 300µL
Com reator de 60 cm
- 2) Volume aspirado: 200µL
Com reator de 60 cm
- 3) Volume aspirado: 300µL
Sem reator de 60 cm
- 4) Volume aspirado: 200µL
Sem reator de 60 cm