

Determinação de melatonina em medicamentos utilizando um sensor microfluídico em papel

Ana Julia Aparecida Ramos

Lais Canniatti Brazaca, Eduardo Luis Rossini

Emanuel Carrilho

Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo

ana.juliaramos@usp.br

Objetivos

Desenvolver um sensor microfluídico em papel (μ PAD) para a determinação de melatonina (MLT) em medicamentos.

Métodos e Procedimentos

Os procedimentos experimentais foram divididos em quatro etapas: *i*) Construção do sensor em papel, *ii*) otimização da reação, *iii*) preparo de amostras e, *iv*) aquisição e tratamento de dados.

Construção do sensor em papel: Cortou-se círculos (*spots*) com auxílio de uma cortadora a laser (Laser600, Combat Laser, Kawai, especificações do corte: *Power* 13, *Speed* 50), no qual o desenho destes foi realizado no próprio *software* da máquina. Os *spots* foram lavados com água três vezes após o corte, para retirada de possíveis produtos de combustão das fibras de celulose. Em seguida foram colados em uma folha sulfite com o auxílio de uma fita dupla face para fixação e manuseio.

Otimização da reação: A reação envolve o reagente “VUS”, uma solução que contém p-DMAB (p-dimetilaminobenzaldeído) 0,1 M e FeCl_3 (cloreto de ferro III) 0,01 M na proporção 4:1. Ambos foram preparados em soluções ácidas, sendo p-DAMB 1 HCl:1 Etanol, e FeCl_3 3 H_2SO_4 : 5 H_2O . Aplicou-se 8 μL de solução de reagente diretamente nos *spots* e aguardou-se 40 min para a próxima etapa. Após esse período foi aplicado 5 μL de solução de melatonina e observou-se a formação de cor por 40 min para posterior aquisição de dados (Figura 1).¹ A otimização envolveu o

comparativo do procedimento de preparo do reagente de modo padrão (conforme a publicação)¹ versus a remoção de componentes ácidos.

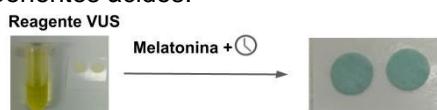


Figura 1: Reação entre o reagente “VUS” e MLT sobre a plataforma microfluídica em papel.

Preparo de amostras: As soluções padrão de melatonina foram preparadas em etanol. Já para as amostras sólidas seguiu-se os seguintes passos: *i*) Maceração (dez comprimidos para a obtenção da massa média 404 mg,), *ii*) Ajuste de volume para 5 mL de etanol, *iii*) Banho de ultrassom por 5 min (Especificações: Marca Cole-Parmer, modelo 8891,) *iv*) Diluição para concentração de interesse (80 mg L^{-1}) e *v*) centrifugação a 5000 rpm por 10 min, utilizou-se o sobrenadante para análise. Para amostras líquidas tomou-se 200 μL para o preparo de soluções estoques, seguida do uso de agitador vórtex.

Aquisição de dados: Após as reações colorimétricas nos *spots*, imagens digitais foram obtidas em aparelhos celulares. A obtenção dos dados envolve a análise colorimétrica das imagens pelo espaço de cores RGB. Utilizou-se um aplicativo de *smartphone* “Color Grab”, para registro da intensidade do canal R (vermelho, *red*) em cada *spot* seguido da correlação destes com a curva analítica, obtida da mesma forma.

Resultados

Construiu-se uma curva analítica com soluções padrão de melatonina nas concentrações de 30 mg L^{-1} a 300 mg L^{-1} (Figura 2). O método desenvolvido foi validado com amostras de medicamentos sólido e líquido adquiridos em farmácia local (Tabela 1), além de aspectos como a recuperação (Tabela 2) e precisão, levando em conta o desvio padrão das medidas.

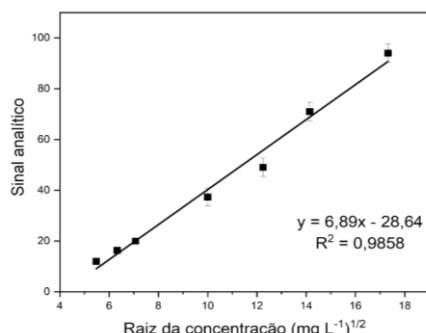


Figura 2. Curva analítica construída através de amostras padrão de melatonina. O sinal analítico é definido como a intensidade do canal R referente ao branco analítico, subtraída da intensidade do padrão. Fonte: Autoria própria.

Tabela 1. Desempenho inicial do sensor construído. na determinação de melatonina em medicamentos.

DP: desvio padrão. Fonte: Autoria própria.

Medicamento	Teor mg MLT ($\pm \text{DP}$)	Teor esperado (vide rótulo)
Sólido	$0,19 \pm 0,02$	
Líquido	$0,17 \pm 0,01$	0,21

Tabela 2. Análise de recuperação. A quantidade de padrão adicionada segue uma relação de 50% e 100% a mais de padrão de acordo com a concentração esperada da amostra. Fonte: Autoria própria.

Medicamento	MLT adicionada (mg L^{-1})	Recuperação (%) $\pm \text{DP} (%)$
Sólido	40	$75\% \pm 0,2$
Líquido		$99\% \pm 0,2$
Sólido	80	$89\% \pm 0,0$
Líquido		$140\% \pm 0,1$

Realizou-se um teste de especificidade com os interferentes da amostra líquida (vide rótulo), suas concentrações foram determinadas de modo a replicar da melhor maneira possível a amostra (glicerol: 4% em volume, ácido cítrico 1000 mg L^{-1} , mentol: 4% em volume), porém,

as variações de sinal foram muito pequenas (<5%) para ser considerados interferentes.

Tabela 2. Análise de interferentes para a amostra líquida. Fonte: Autoria própria.

Veículos	Variação de sinal com base em amostras fortificadas com MLT 105 mg L^{-1}	Variação de sinal com base na interação VUS + veículo
Glicerol	4%	-2%
Ác. cítrico	0%	0%
Mentol	3%	4%

O método desenvolvido apresenta potencial para a determinação de melatonina em remédios, porém precisa de ajustes. Verificou-se possíveis otimizações como a redução de componentes ácidos do reagente (retirou-se HCl e H_2O). Verificou-se um aumento considerável (37%) na sensibilidade (Figura 3) para uma curva de padrões de melatonina.

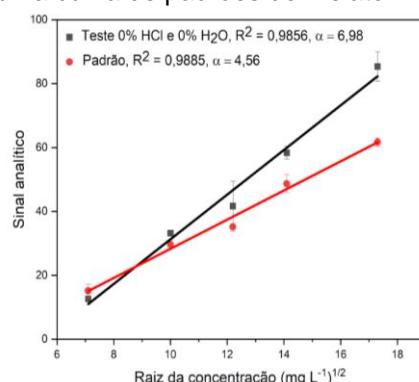


Figura 3: Curvas analíticas obtidas após as modificações dos reagentes. Fonte: Autoria própria.

Conclusões

A reação escolhida e os procedimentos de otimização realizados possibilitaram a criação de uma plataforma para um sensor em papel que quantifica e detecta MLT em soluções padrão de maneira satisfatória, porém, para o desempenho do mesmo em amostras reais, ainda se faz necessário a continuidade da pesquisa.

Referências Bibliográficas

- GAZY, A. A. et al. Colorimetric and spectrofluorimetric methods for the determination of melatonin in tablets and serum. Spectroscopy Letters, v. 31, n. 1, p. 177–197, 1998.