



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

KIONNYS NOVAES ROCHA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE LACTATO EM SUOR EMPREGANDO ELETROFORESE
CAPILAR COM DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA SEM CONTATO**

CAMPINAS

2024

KIONNYS NOVAES ROCHA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
DETERMINAÇÃO DE LACTATO EM SUOR EMPREGANDO ELETROFORESE
CAPILAR COM DETECÇÃO CONDUTOMÉTRICA SEM CONTATO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Química na área de Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Dosil Pereira de Jesus

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pelo aluno Kionnys Novaes Rocha e orientada pelo prof. Dr. Dosil Pereira de Jesus

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

OI4d Rocha, Kionnys Novaes, 1991-
Desenvolvimento e validação de método analítico para determinação de lactato em suor empregando eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato / Kionnys Novaes Rocha. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: Dosil Pereira de Jesus.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Eletroforese capilar. I. Jesus, Dosil Pereira de, 1974-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Development and validation of an analytical method for lactate determination in sweat using capillary electrophoresis with non-contact conductometric detection

Palavras-chave em inglês:

Capillary electrophoresis

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Dosil Pereira de Jesus [Orientador]

Ana Valéria Colnaghi Simionato

Marcos Augusto Leal de Oliveira

Data de defesa: 21-02-2024

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-1879-1424>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3005118555941696>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Dosil Pereira de Jesus (Orientador)

Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato (Universidade Estadual de
Campinas)

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira (Universidade Federal de Juiz de
Fora)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação de mestrado defendida pelo aluno Kionnys Novaes Rocha, aprovada pela comissão julgadora em 21 de fevereiro de 2024.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela sua graça e misericórdia que tem me sustentado durante a etapa do mestrado, e tem renovado minhas forças, motivo pelo qual cheguei até aqui.

À minha família, em especial a minha esposa, Larissa Rocha, pela companhia, apoio e compreensão nos momentos de ausência. À minha mãe, Nelcina, pelos ensinamentos mais preciosos que aprendi: generosidade, honestidade e esforço. À minha sogra, Maria Luiza, pelo carinho e apoio em minhas conquistas.

Ao Prof. Dr. Dosil Pereira de Jesus pela dedicação e paciência para me orientar durante a realização deste trabalho. Além disso, pelos ensinamentos importantes para minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. José Alberto Fracassi da Silva pela sua grande contribuição em disponibilizar o equipamento CE-C⁴D e ensinamentos sobre eletroforese capilar durante suas aulas e conversas no laboratório.

À Prof^a. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato pelos preciosos momentos durante suas aulas sobre eletroforese capilar.

Aos amigos do Grupo de Eletroforese e Microsistemas de Análise (GEM) pelo apoio e momentos de descontração.

À FAPEMA pela bolsa de mestrado concedida (Processo BM-06214/22).

À FAPESP pelo auxílio financeiro na aquisição de equipamentos fundamentais para o desenvolvimento do projeto.

Ao INCT de Bioanálítica pelo apoio financeiro ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Porque dele, e por ele, e para
ele, são todas as coisas; Glória,
pois, a ele eternamente. Amém.

Romanos 11:36 (ARA)

RESUMO

Esta dissertação apresenta o desenvolvimento e figuras de mérito de validação de um método analítico, empregando Eletroforese Capilar de Zona (do inglês, Capillary Zone Electrophoresis CZE) com detecção condutométrica sem contato (do inglês, Capacitively-Coupled Contactless Conductivity Detectors - C⁴D), para a determinação de lactato em suor. As separações eletroforéticas foram conduzidas empregando coluna capilar de sílica fundida, com comprimento total de 50 cm (42 cm efetivo) e diâmetro interno de 50 µm. O eletrólito de corrida foi composto por ácido morfolino-etano-sulfônico (MES) e Histidina (His) em concentração equimolar de 10 mmol L⁻¹. Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) na concentração de 0,2 mmol L⁻¹ foi adicionado ao eletrólito de corrida, como inversor de fluxo eletrosmótico. Na validação do método, os parâmetros analisados foram linearidade, seletividade, efeito matriz, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. Nesta validação, amostras de suor artificial e suor humano foram utilizadas. A viabilidade do método proposto ficou evidenciada pela boa linearidade ($R^2 = 0,9979$) e valores aceitáveis de recuperação (97 a 118 %). A concentração original de lactato determinada na amostra de suor artificial foi $(8,6 \pm 0,1)$ mmol L⁻¹ e na amostra real (36 ± 1) mmol L⁻¹. A diferença entre os coeficientes angulares das curvas analíticas, obtidas pelos métodos de calibração externa em solvente e por superposição de matriz, foi de - 0,35 %, indicando que não houve efeito matriz. Os limites de detecção e quantificação foram 3,1 e 10,3 µmol L⁻¹, respectivamente. Pela primeira vez foi demonstrada o desenvolvimento e validação de um método analítico empregando CZE-C⁴D para a determinação de lactato em suor. Desta forma, o método proposto apresenta um potencial significativo para aplicações, tanto na área de estudos esportivos e fisiológicos, quanto na medicina diagnóstica.

ABSTRACT

This dissertation describes the development and validation of an analytical method using Capillary Zone Electrophoresis (CZE) with capacitively-coupled contactless conductivity detection (C⁴D) to determine lactate in sweat. Separations were conducted using a fused silica capillary column with a total length of 50 cm (42 cm effective) and an internal diameter of 50 μm . The background electrolyte was composed of 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) and Histidine (His) at an equimolar concentration of 10 mmol L^{-1} . Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) at a concentration of 0.2 mmol L^{-1} was added to the background electrolyte as an electroosmotic flow inverter. In the validation, the assessed parameters included linearity, selectivity, matrix effect, accuracy, precision, limit of detection, and limit of quantification. The validation of the method was performed using artificial and human sweat samples. The feasibility of the proposed method was demonstrated by the good linearity ($R^2 = 0.9979$) and acceptable recovery values (97 to 118%) obtained. The original lactate concentration determined in the artificial sweat sample was $(8.6 \pm 0.1) \text{ mmol L}^{-1}$, and in the real sample, it was $(36 \pm 1) \text{ mmol L}^{-1}$. The difference between the angular coefficients between the calibration curves, obtained by the external calibration methods in solvent and matrix match, was -0.35%, indicating the absence of matrix effect. The detection and quantification limits were 3.1 and 10.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. For the first time, the development and validation of an analytical method employing CE-C⁴D for lactate determination in sweat were demonstrated. Thus, the proposed method shows significant potential for applications in sports, physiology, and diagnostic medicine studies.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama com os principais componentes de um equipamento de CE. Fonte: Da Silva, 2010.....	18
Figura 2. Representação de como ocorre o fluxo eletrosmótico dentro do capilar (Autoria própria, 2023)	20
Figura 3. Representação de inversão do fluxo eletrosmótico com adição do surfactante CTAB (Autoria própria, 2023).....	21
Figura 4. Diagrama esquemático da C4D. Adaptado da referência ²⁸	28
Figura 5. Foto do equipamento de CE-C4D utilizado.	33
Figura 6. Eletroferograma de uma solução de ácido láctico (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Condições experimentais: BGE MES/His 10 mmol L^{-1} , CTAB 0,2 mmol L^{-1} a pH 6,1. Tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade (50 s e 10 cm), potencial de separação de -25 kV, capilar de sílica 50 cm (42 cm efetivo) de comprimento e 50 μm de diâmetro interno, detecção C ⁴ D operando em 510 kHz e 3V de amplitude....	37
Figura 7. Eletroferograma de uma solução de lactato de lítio (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Condições experimentais: BGE MES/His 10 mmol L^{-1} e CTAB 0,2 mmol L^{-1} a pH 6,1. Tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade (50 s e 10 cm), potencial de separação de -25 kV, capilar de sílica 50 cm (42 cm efetivo) de comprimento e 50 μm de diâmetro interno, detecção C ⁴ D operando em 510 kHz e 3V de amplitude....	38
Figura 8. Eletroferograma de solução de lactato de lítio (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e cloreto (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Condições de separação como na Fig. 7	38
Figura 9. Curva analítica para lactato (0 a 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) obtida com as condições de separação como na Fig. 7.....	39
Figura 10. Eletroferograma de uma solução de lactato de sódio (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Condições experimentais: BGE: MES/His 10 mmol L^{-1} e CTAB 0,2 mmol L^{-1} a pH 6,0. Tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade (50 s e 10 cm), potencial de separação de -20 kV, capilar de sílica 50 cm (42 cm efetivo) de comprimento e 50 μm de diâmetro interno, detecção C ⁴ D operando em 510 kHz e 3V de amplitude....	40
Figura 11. Eletroferograma de solução de lactato de sódio (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$), formiato (200 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e Fosfato (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Condições experimentais: BGE MES/His 10 mmol L^{-1} e CTAB 0,2 mmol L^{-1} a pH 6,0. Tempo de injeção hidrodinâmica por	

gravidade (50 s e 10 cm), potencial de separação de -20 kV, capilar de sílica 50 cm (42 cm efetivo) de comprimento e 50 µm de diâmetro interno, detecção C ⁴ D operando em 510 kHz e 3V de amplitude.....	41
Figura 12. Eletroferograma da amostra de suor artificial diluída 1:100. Condições de separação como na Fig. 11.....	42
Figura 13. Eletroferograma da amostra de suor humano diluída 1:100. Mesma condições experimentais da Figura 11.	43
Figura 14. Eletroferograma da amostra de suor artificial diluída 1:100 com adição de 200 µmol L ⁻¹ de formiato (padrão interno). Condições de separação como na Fig. 12	44
Figura 15. Eletroferograma da amostra de suor humano diluída 1:100 com adição de 200 µmol L ⁻¹ de formiato (padrão interno).	44
Figura 16. Curva analítica obtida pela razão entre as áreas dos picos de lactato e formiato (200 µmol L ⁻¹).	46
Figura 17. Gráfico de resíduos obtido a partir da curva analítica da figura 16.....	47
Figura 18. Curvas analíticas obtidas pela razão entre as áreas dos picos de lactato e formiato (padrão interno), por adição de padrão na amostra e no solvente (calibração externa).	48
Figura 19. Eletroferogramas da amostra de suor artificial diluída 100 vezes. (A) sem e com adição de lactato (B) 4,0 (C) 8,0 (D) 12,0 mmol L ⁻¹ . Condições de separação como na Figura 14. Picos (1) brometo (2) cloreto (3) formiato (4) acetato (5) lactato.	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Principais componentes e suas concentrações médias em suor humano ³³	22
Tabela 2. Parâmetros analíticos do método CE-C ⁴ D para a determinação do lactato no suor artificial	45
Tabela 3. : Resultados do efeito de matriz para curvas analíticas por método de adição de padrão e calibração externa.....	49
Tabela 4. Porcentagem de recuperação (média ± DP) de lactato em amostras fortificadas analisadas pelo método proposto (n=3).....	50

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 1: Lei de Coulomb	19
Equação 2: Mobilidade eletroforética	19
Equação 3: Mobilidade eletroforética para partículas esféricas	19
Equação 4: Fluxo eletrosmótico	20
Equação 5: Teste de hipótese de linearidade (a priori)	33
Equação 6: Efeito de matriz	34
Equação 7: Teste F	34
Equação 8: Teste t de Student	34
Equação 9: Teste de recuperação	35
Equação 10: Limite de Detecção	35
Equação 11: Limite de Quantificação	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

CZE	eletroforese capilar de zona ou solução livre
MECK	cromatografia eletrocinética micelar
CIEF	eletroforese capilar por focalização isoeétrica,
CGE	eletroforese capilar de gel
CITP	isotacoforese capilar
CEC	eletrocromatografia capilar
FAT	fonte de alta tensão
UV-vis	absorção de radiação na região do ultravioleta e visível
LIF	fluorescência induzida por laser
MS	espectrometria de massas
ICP-OES	espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente.
EOF	fluxo eletrosmótico
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
LDH	lactato desidrogenase
ATP	adenosina trifosfato
NAD⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo
CE-C⁴D	eletroforese capilar com detecção condutométrica sem contato acoplada capacitivamente
P.A	pureza analítica,
MES	ácido morfolino-etano-sulfônico monohidratado
His	Histidina
GEM	Grupo de Pesquisa em Eletroforese e Microsistemas de Análise
BGE	Eletólito de corrida

ANVISA

Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

EM

Efeito matriz

RDC

Resolução da diretoria colegiada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Fundamentos da Eletroforese Capilar	16
1.1.1 Instrumentação	17
1.1.2 Mobilidade eletroforética	18
1.1.3 Fluxo Eletrosmótico	19
1.2 Suor humano	21
1.3 Lactato	24
1.4 Eletroforese capilar em análise de suor	25
1.5 Detecção condutométrica sem contato	27
2 OBJETIVOS	30
2.1 Geral	30
2.2 Específicos	30
3 PARTE EXPERIMENTAL	31
3.1 Reagentes	31
3.2 Preparo das Soluções–Padrão.....	31
3.3 Preparo do Eletrólito de corrida.....	31
3.4 Condicionamento do capilar	32
3.5 Instrumentação de CE	32
3.6 Validação do método	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
4.1 Otimização da Separação por CE	36
4.2 Validação do método analítico	45
5 CONCLUSÕES	52
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fundamentos da Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar teve início com o trabalho do bioquímico sueco Arne Tiselius na década de 1930. Usando a eletroforese, ele demonstrou a separação de proteínas do plasma sanguíneo em um tubo de quartzo em formato de “U”. Esse trabalho pioneiro lhe rendeu o prêmio Nobel de 1948, sendo que nas décadas seguintes a técnica evoluiu significativamente.^{1,2}

Em 1967, Stellan Hjertén, demonstrou separações eletroforéticas em um tubo de vidro (300 µm de diâmetro) e empregando detecção por absorção de radiação ultravioleta (UV). Apesar de outros pesquisadores terem conduzido eletroforese em tubo, só a partir de 1981 que esta estratégia se popularizou com o trabalho de Jorgenson e Luckacs. Usando tubos capilares, com diâmetro interno menor que 100 µm, estes pesquisadores demonstraram um significativo aumento na eficiência de separação, principalmente devido à redução dos efeitos de aquecimento (efeito Joule) gerados, quando altas tensões (campo elétrico) são aplicados.³

A eletroforese capilar (CE) é um método de separação baseado na diferença de velocidade de migração de espécies carregadas em uma solução de eletrólito, contida em uma coluna capilar, através da qual há um campo elétrico de corrente contínua aplicado.^{4,5} As técnicas de eletroforese estão fundamentadas no mesmo princípio, entretanto com mecanismos de separação distintos. Desta forma, a CE pode ser dividida nas seguintes modalidades: eletroforese capilar de zona ou solução livre (CZE), cromatografia eletrocinética micelar (MECK), eletroforese capilar por focalização isoeletrica (CIEF), eletroforese capilar de gel (CGE), isotacoforese (CITP) e a eletrocromatografia (CEC).⁶ Dentre estas técnicas de eletromigração em capilares, a CZE é a modalidade mais utilizada, devido à facilidade de implementação e otimização das condições de separação. É realizada em um capilar preenchido com um eletrólito (geralmente com capacidade tamponante) no qual, sob um campo elétrico, os analitos migram em zonas com distintas mobilidades. Em um modo convencional da CZE, os cátions são detectados primeiro, por migrarem na mesma direção do fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês electroosmotic flow), depois as espécies neutras e por último os ânions, se possuírem mobilidade menor que a do EOF. Os compostos neutros não são

separados nessa modalidade, uma vez que não possuem mobilidade eletroforética, sendo arrastados pelo EOF.⁷

As características gerais da CE são: curto tempo de análise, alta eficiência e resolução, baixos volumes empregados de eletrólito e amostra, além do alto grau de automação. Além disso, várias classes de compostos em diferentes matrizes podem ser analisadas – desde íons inorgânicos pequenos até macromoléculas.

1.1.1 Instrumentação

Um aspecto interessante a ser considerado na CE é a simplicidade da instrumentação. O sistema básico (Fig. 1) consiste em uma fonte de alta tensão (FAT), um capilar mergulhado em dois reservatórios contendo o eletrólito, eletrodos inertes (comumente platina) para conexão com a FAT e um detector, posicionado em um determinado ponto do capilar. A FAT é usada para propiciar o alto campo elétrico ao longo do capilar. Estas fontes podem ser operadas à voltagem constante, com valores de até 30 kV, ou à corrente constante, com valores de até 300 mA. O detector por absorção de radiação na região do ultravioleta e visível (UV-vis) é o mais empregado, devido à sua disponibilidade em equipamentos comerciais. Sistemas de detecção baseados em fluorescência, fluorescência induzida por laser (LIF) e espectrometria de massas (MS) também podem ser encontrados comercialmente. Vários tipos de acoplamento com sistemas de detecção têm sido aplicados em CE, como, por exemplo, amperométrico, voltamétrico, condutométrico, índice de refração, absorbância termo-óptica, Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES), dentre outros.⁸

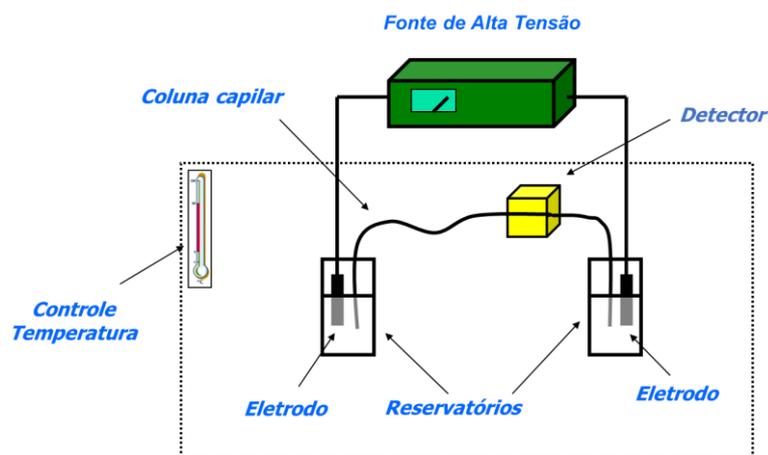


Figura 1. Diagrama com os principais componentes de um equipamento de CE. Fonte: Da Silva, 2010.

Para a introdução de amostra em CE, os modos de injeção hidrodinâmica e eletrocinética são os mais empregados. A injeção hidrodinâmica é a mais utilizada em equipamentos de CE comerciais e consiste na introdução da amostra no capilar aplicando-se uma pressão hidrostática. Geralmente, uma extremidade do capilar é imersa em um reservatório contendo a amostra, e a outra extremidade permanece no reservatório de eletrólito. Durante a injeção, o reservatório com a amostra é pressurizado, levando à introdução no capilar de um volume da ordem de nanolitros da amostra. Esta pressão hidrostática pode ser também obtida pelo efeito da gravidade, elevando-se o reservatório de amostra, durante a injeção, levando ao fluxo hidrodinâmico de solução pelo efeito de sifonamento.^{8,9}

Na injeção eletrocinética, uma voltagem (campo elétrico) é aplicada durante a injeção para proporcionar a migração dos analitos para o interior do capilar.^{9,10} Embora a injeção eletrocinética seja mais simples para ser realizada, esta modalidade está sujeita a influência da condutividade da amostra e pode não ser representativa, devido à diferença de mobilidade dos analitos.

1.1.2 Mobilidade eletroforética

A mobilidade eletroforética (μ_e) é uma constante física relacionada ao movimento de partículas carregadas em um fluido, quando submetido a um campo elétrico. A μ_e é específica para cada íon, sendo fundamental nos processos de separações em CE. A μ_e é regida pela Lei de Coulomb, que estabelece a relação

entre força, carga e distância em um campo elétrico, como indicado na seguinte Equação:

$$F = qE \quad \text{Equação 1}$$

Onde: F é a força elétrica; q a carga da partícula; e E é a intensidade do campo elétrico.

Na prática, μ_e é frequentemente usada para descrever o movimento das partículas carregadas e é definida como a velocidade média da partícula por unidade de campo elétrico:

$$\mu_e = \frac{U}{E} \quad \text{Equação 2}$$

Onde U = velocidade média da partícula; E = intensidade do campo elétrico.

Nesse caso, para partículas esféricas a μ_e pode ser determinada por meio da seguinte equação:

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad \text{Equação 3}$$

Onde: q é a carga do íon, η é a viscosidade do meio, e r o raio iônico.

Dessa forma podemos perceber que a μ_e de uma partícula é proporcional à sua razão carga/raio. Importante ressaltar que o raio em questão é o solvatado, que é por sua vez a camada de íons de carga oposta que se aglomeram ao redor da partícula.^{9,11}

1.1.3 Fluxo Eletrosmótico

O fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês electroosmotic flow) é um fenômeno observado na eletroforese capilar, que ocorre devido à interação entre a solução e a superfície interna do capilar. Quando um campo elétrico é aplicado tangencialmente à superfície do capilar, os grupos silanóis presentes na sílica fundida, que estão ionizados em contato com o meio aquoso, conferem uma carga negativa à superfície do capilar. Isso resulta em forças elétricas que causam um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta, arrastando consigo moléculas de água e induzindo o fluxo da solução como um todo em direção ao cátodo (pólo negativo). Os íons positivos são atraídos fortemente pela camada interna do capilar, formando uma camada fixa. Outros íons positivos presentes na solução ainda são atraídos pela camada interna carregada negativamente, porém com menos intensidade, pois também sofre repulsão da camada fixa.^{11,12} Essa camada de cátions que não está

aderida fortemente a camada interna, é chamada de camada móvel ou difusa. As camadas fixas e difusas são separadas por um plano imaginário, que pode ser denominado de plano de cisalhamento. Quando é aplicado o potencial, forças elétricas causam um movimento unilateral, fazendo com que os cátions “livres” na solução sejam arrastados em direção ao cátodo, juntamente com outras espécies (Figura 2). Esse movimento é denominado de fluxo eletrosmótico. Sua velocidade pode ser determinada pela seguinte equação:

$$V_{EOF} = (\epsilon \zeta / \eta) E \quad \text{Equação 4}$$

Onde:

V_{EOF} é a velocidade do fluxo eletrosmótico;

ϵ é a constante dielétrica;

ζ é o Potencial Zeta;

η é a viscosidade da solução;

E é o campo elétrico.

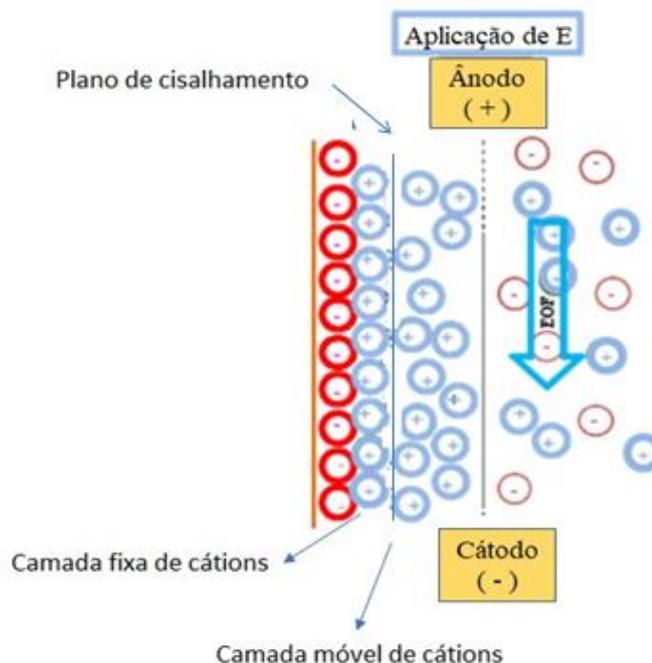


Figura 2. Representação de como ocorre o fluxo eletrosmótico normal dentro do capilar. Fonte: Simionato, 2023 (Adaptado).

O EOF em determinadas separações de íons pode ser importante para garantir uma maior resolução dos analitos através do capilar, além disso pode permitir uma separação eletroforética mais rápida. O controle adequado do EOF é essencial para otimizar as condições de separação e contribuir para a resolução da técnica.¹²

Com intuito de separar ânions, é possível inverter a direção do EOF adicionando-se um surfactante catiônico ao eletrólito de corrida, fazendo com que a superfície do capilar adquira carga positiva, e inverta a direção do EOF. O surfactante mais empregado é o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), que tem uma cabeça polar carregada positivamente e uma cauda apolar. A cabeça polar interage com as cargas negativas (devidas aos grupos silanóis) da parede interna do capilar. Já a cauda apolar interage com a cauda de outras moléculas do mesmo surfactante¹⁰⁻¹², como pode ser observado na Figura 3.

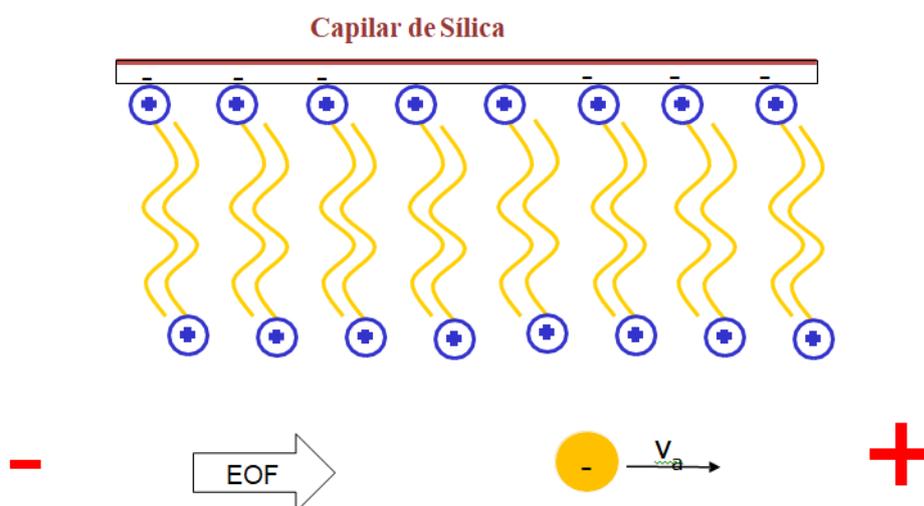


Figura 3. Representação de inversão do fluxo eletrosmótico com adição do surfactante CTAB. Fonte: Autoria própria, 2023.

1.2 Suor humano

No corpo humano, há presença de dois tipos principais de glândulas sudoríparas, denominadas de apócrinas e écrinas. As glândulas apócrinas são consideradas como vestígios evolutivos das glândulas odoríferas encontradas em mamíferos. Apesar de serem maiores, suas funções não estão ligadas a regulação da temperatura e estão limitadas a certas regiões do corpo, especificamente nas axilas e na genitália externa. Essas glândulas liberam um fluido turvo composto por

água, proteínas, lipídios e precursores de odor, sendo essencial uma variante específica de DNA, o ABCC11, para a produção do odor, sendo mais ativas durante a puberdade. Em contraste, as glândulas écrinas são pequenas, porém numerosas, com milhões distribuídas por toda a pele humana e abrindo-se diretamente na superfície cutânea. Essas glândulas desempenham um papel crucial na regulação da temperatura corporal, principalmente liberando água e eletrólitos.¹³⁻¹⁶

O suor é um fluido biológico com faixa de pH 4,0 a 6,8. A composição majoritária é de água, porém apresenta vários eletrólitos, como sódio, cloreto, potássio, aminoácidos, proteínas etc. A Tabela 1 mostra a composição e a concentração média de algumas das principais substâncias presentes no suor humano.

Tabela 1. Principais componentes e suas concentrações médias em suor humano ¹⁶

Componente	Concentração (mmol/L)
Cl ⁻	23
Na ⁺	31
K ⁺	6,1
Ca ²⁺	5,2
Mg ²⁺	0,82
NH ₄ ⁺	5,2
HCO ₃ ⁻	3
PO ₄ ³⁻	0,31
Lactato	14
Ureia	10
Glicose	0,17

A amostragem de suor em análise clínicas possui vantagens pelo caráter não invasivo comparado a outros fluidos biológicos, como o sangue. Esta vantagem é interessante, principalmente em pessoas hemofílicas, neonatos ou idosos. É um fluido com boa estabilidade, evitando que alguns analitos degradem. Outra vantagem é em relação ao preparo da amostra, geralmente apenas uma simples diluição é necessária para ser introduzida em instrumentos analíticos.^{17,18}

Apesar destas vantagens, o suor é pouco explorado, para fins analíticos, devido a alguns desafios impostos, como a possibilidade de contaminação pela superfície da pele, o que pode afetar a pureza da amostra, mistura de suor

excretado em períodos diferentes (antigo e novo), baixas taxas de produção do fluido, o que pode dificultar a coleta em volumes adequados para análises. Canais ativos de analitos na glândula sudorípara écrina podem distorcer as concentrações de alguns analitos em relação às concentrações observadas no sangue.¹⁹⁻²²

Em relação às formas de coleta do suor, podem ser destacados o método clássico por iontoforese por pilocarpina, que foi desenvolvida por Gibson e Cooke.²³ E o método que emprega o sistema de coleta por um dispositivo comercial chamado macroduct®.²¹

Na coleta usando iontoforese por pilocarpina, a liberação de suor é estimulada por meio de eletrodos de cobre. O processo de estímulo do suor por pilocarpina envolve a impregnação da área (geralmente o braço ou a perna) com este composto, acompanhado por uma corrente elétrica de baixa intensidade (2,5-3,0 mA) por um curto período de tempo (cerca de 5 minutos).²² A pilocarpina é um alcaloide que estimula as glândulas sudoríparas, aumentando a produção de suor. Esse método é usado para obter um volume suficiente de suor para análise. A amostra coletada pode ser usada para diagnóstico de doenças, monitoramento de drogas e outras aplicações clínicas.²²

Em se tratando do Macroduct, é um dispositivo comercial utilizado para coletar suor para análises, especialmente no contexto do diagnóstico da fibrose cística (CF). Ele é usado logo após a iontoforese, fixado com auxílio de uma pulseira. Consiste em um disco côncavo de material plástico com um orifício central. O orifício é conectado a um cateter de plástico, onde o suor é armazenado.²³

Esses desafios de amostragem destacam a complexidade de usar o suor e a necessidade de superar essas limitações para sua aplicação efetiva em análises clínicas e tecnologias de sensores “vestíveis”. Alguns desses desafios podem ser resolvidos com inovações tecnológicas, avanços em estimulação do suor, eficiência na coleta de amostras, e sensores compactos, enquanto outros são desafios fundamentais que exigem soluções indiretas e complexas. Uma das soluções para o desafio da possibilidade de contaminação da superfície da pele é o uso de dispositivos integrados ou patches que colocam sensores ou coletam suor diretamente contra a pele. Essa abordagem resolve o problema da contaminação, uma vez que os sensores ou dispositivos de coleta ficam em contato direto com a pele, evitando a contaminação externa. Para o desafio da mistura de suor antigo e

novo, é importante minimizar o volume morto entre o dispositivo e a pele para reduzir o tempo que o suor fica estagnado na pele e, assim, diminuir a contaminação.^{21,22}

1.3 Lactato

Lactato é um metabólito resultante da glicólise e um marcador químico do metabolismo anaeróbico. É formado a partir do piruvato por meio da ação da enzima lactato desidrogenase (LDH)²⁴ e é encontrado em fluidos biológicos, tais como sangue, suor e urina.

A fisiologia do lactato está intimamente ligada ao metabolismo do ácido láctico, um composto orgânico que desempenha um papel crucial no corpo humano. O lactato é um íon que deriva do ácido láctico, que, por sua vez, é produzido durante processos metabólicos, principalmente através da glicólise.²⁵ O processo de produção de lactato geralmente ocorre no citoplasma celular, mais especificamente durante a glicólise. A glicólise é a via metabólica que quebra a glicose em piruvato, gerando ATP (adenosina trifosfato) no processo.²⁶ Durante a glicólise, uma molécula de glicose é quebrada em duas moléculas de piruvato. Esse processo é anaeróbico, o que significa que não requer oxigênio. Em condições normais, na presença de oxigênio suficiente, o piruvato é transportado para a mitocôndria, onde entra no ciclo do ácido cítrico (ciclo de Krebs) e, eventualmente, na cadeia respiratória para produzir mais ATP.^{25,26} No entanto, em situações de demanda energética intensa ou quando a oferta de oxigênio é limitada, o piruvato é convertido em lactato através da ação da enzima lactato desidrogenase (LDH). Isso ocorre como um mecanismo para regenerar NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleotídeo), permitindo que a glicólise continue a gerar ATP.²⁷

O lactato não é apenas um subproduto indesejado, mas também pode ser uma fonte de energia valiosa em certos tecidos e órgãos, como o coração e os músculos esqueléticos. O lactato também está envolvido no ciclo lactato-alanina, que permite o transporte de lactato produzido nos músculos esqueléticos para o fígado, onde pode ser convertido novamente em glicose (neoglicogênese) e devolvido aos músculos para ser utilizado como fonte de energia. O lactato também desempenha um papel na regulação do pH intracelular e sanguíneo. Em condições

de esforço intenso, o acúmulo de íons de hidrogênio (acidificação) pode ocorrer, levando à acidose. O lactato ajuda a neutralizar parte desse excesso de ácido.²⁷

A concentração de lactato no suor humano varia de 1 a 25 mmol L⁻¹ em pessoas saudáveis.^{28,29} Seu monitoramento em análises clínicas pode indicar doenças cardiovasculares, como por exemplo isquemia, hipoxemia, dentre outras³⁰. Outro fator importante no monitoramento da concentração de lactato está relacionado ao controle de diabetes.³¹⁻³³ Na medicina esportiva, sua concentração no sangue geralmente é monitorada como forma de adaptação ao treinamento, com intuito de avaliar o nível máximo de desempenho dos atletas.³⁴⁻³⁷

Os métodos analíticos mais empregados para a determinação rotineira de lactato em amostras biológicas são baseados em reações enzimáticas, espectrofotometria e cromatografia de alta eficiência líquida.^{29,38} No entanto, também são encontrados outros métodos empregando CE^{39,40} e sensores eletroquímicos.³⁸ Recentemente, a determinação de lactato em suor vem sendo bastante explorada, empregando-se sensores eletroquímicos “vestíveis”.⁴¹⁻⁴³

Atualmente, a forma mais utilizada para a determinação de lactato durante uma sessão de treinamento por atletas é por meio de analisadores portáteis de lactato, que são equipados com tiras de sensor descartáveis e estão disponíveis comercialmente. O intuito é determinar a concentração de lactato no sangue, o qual é retirado por meio de uma picada no dedo ou punção do lóbulo da orelha.⁴⁴⁻⁴⁶ No entanto, este método é invasivo, implica em riscos de infecções para o indivíduo. Além disso, durante a coleta de sangue por meio da picada no dedo, do ponto de vista analítico, pode ocorrer contaminação na amostra com o suor, fornecendo valores elevados na concentração de lactato.⁴⁷ Dessa forma, o suor pode ser uma excelente matriz alternativa para o monitoramento não invasivo de lactato.

1.4 Eletroforese capilar em análise de suor

Dentre os desafios em analisar amostras biológicas empregando CE, incluem a complexidade das matrizes, devido à presença de proteínas, lipídios, açúcares e outras biomoléculas, o que pode resultar em uma diminuição na reprodutibilidade do tempo de migração e na eficiência dos picos. Desta forma, as amostras biológicas frequentemente requerem tratamento adequado antes de serem introduzidas nos equipamentos de CE.⁴⁸ Métodos clássicos de tratamento de amostras, como

extração/microextração, extração líquido-líquido, precipitação acompanhada de centrifugação, ultrafiltração e eletrodialise, são frequentemente utilizados para remover as proteínas e outras interferências das amostras. No entanto, esses métodos podem ser demorados, caros e envolver o uso de volumes grandes de amostra, solventes orgânicos e instrumentação adicional. Além disso, eles geralmente não podem ser integrados online com a CE. Portanto, a superação desses desafios é essencial para a análise bem-sucedida de íons inorgânicos e orgânicos em amostras biológicas utilizando CE.⁴⁸⁻⁵¹ Entretanto, o suor possui uma matriz menos complexa, simplificando o preparo de amostras que muitas vezes se resume a uma simples diluição em água.

CE com detecção eletroquímica foi empregada na determinação de piruvato em suor humano.⁵² Além disso, vários cátions inorgânicos, como NH_4^+ , K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , aminas e aminoácidos foram determinados por CE com detecção UV-vis.⁵³ Terasawa et al. analisaram os principais constituintes catiônicos inorgânicos do suor por CE. Os autores sugeriram o método para detectar potássio e sódio nesta amostra. Como a detecção UV direta não proporcionava a sensibilidade necessária, a detecção indireta empregando imidazol, como cromóforo, foi usada.⁵⁴ Em outro estudo, um método foi desenvolvido para a determinação de taurina em formulações farmacêuticas (microemulsão) e em meios biológicos como o suor. O sistema CE com detecção amperométrica pulsada na coluna final revelou-se um método interessante em comparação com a detecção UV e por fluorescência, pela sua simplicidade e rapidez.²²

Percebe-se na literatura que há poucos trabalhos, envolvendo análise de suor por CE, sendo que a maioria são relacionados à determinação de cloreto, com objetivo de diagnosticar a fibrose cística.^{55,48,49,56} No entanto, a CE é uma técnica analítica interessante para a determinação de lactato em suor, uma vez que se trata de uma espécie iônica. Embora sejam encontrados na literatura vários trabalhos de determinação de lactato por CE em diversas amostras, principalmente em matrizes biológicas^{29,30}, a determinação de lactato em suor empregando esta técnica ainda não foi reportada na literatura. Esta aplicação é bastante promissora, uma vez que amostras de suor são coletadas em pequenas quantidades e a CE possibilitaria análises rápidas, com baixo custo, alta eficiência de separação e alta

compatibilidade com os princípios da química verde, devido à pequena quantidade de resíduos gerados.

1.5 Detecção condutométrica sem contato

Em 1998, os pesquisadores Zeeman et al. e Fracassi et al., em grupos de pesquisas independentes, introduziram a disposição de eletrodos axiais, posicionados externamente à coluna capilar para detecção condutométrica sem contato em CE. Esta configuração foi um marco importante no desenvolvimento da técnica, pois a construção dessas células de detecção é muito mais simples do que as convencionais, uma vez que os eletrodos não precisam ter a escala e alinhamento com os diâmetros internos dos capilares de separação, que frequentemente são inferiores a 50 μm .⁵⁷ Esta estratégia, chamada de detecção condutométrica sem contato (C^4D , do inglês capacitively-coupled contactless conductivity detection)⁵⁸ vem sendo amplamente utilizada em CE. Na C^4D , um sinal senoidal de alta frequência (centenas de kHz) é aplicado entre dois eletrodos tubulares que envolvem a coluna capilar, como é mostrado na Figura 4. Estes eletrodos juntamente com a parede do capilar e a solução de eletrólito comportam-se como capacitores. A alta frequência do sinal aplicado reduz a impedância destes capacitores, de maneira que a corrente alternada que flui entre os eletrodos depende da condutividade do eletrólito no interior do capilar. Desta forma, variações na condutividade do eletrólito de corrida podem ser detectadas sem que os eletrodos entrem em contato direto com a solução. A C^4D apresenta a vantagem de possibilitar a detecção de espécies que apresentam ausência ou baixa absorção de radiação (UV-vis), como é o caso dos íons lactato. Além disso, é uma técnica de detecção de baixo custo e simples, que pode ser facilmente implementada em sistemas de eletroforese capilar, cromatografia líquida e microfluídica, por exemplo. A ausência de contato físico direto entre os eletrodos e a solução evita reações adversas e permite maior liberdade na geometria da célula de detecção.^{40,57}

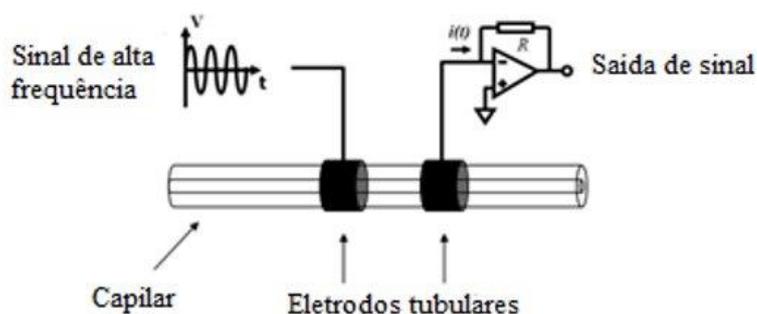


Figura 4. Diagrama esquemático da C⁴D. Adaptado da referência ²⁹.

A CE-C⁴D é ideal para detecção direta de íons sem a necessidade de derivatização dos analitos, o que é especialmente vantajoso em comparação com outros métodos de detecção, como a detecção UV-vis, que requer a presença de moléculas com grupos cromóforos no eletrólito de corrida para obtenção de uma detecção indireta. Várias aplicações são encontradas na literatura, em que a C⁴D possibilitou a detecção direta de analitos em amostras biológicas, sem a necessidade de otimização complicada dos eletrólitos de corrida para a determinação simultânea de cátions e ânions.⁵⁸⁻⁶⁹

Silva et al. abordaram a utilização de ácido acético (HAc) como parte do eletrólito de corrida para a determinação de íons inorgânicos em fluidos biológicos por CE-C⁴D. Foi realizada eletroextração em membrana para determinar vestígios de metais em amostras de urina, água potável e água do mar.⁶⁶ Dosedělová et al. analisaram saliva para determinação de bicarbonato, fosfato e outros ânions por meio da CE-C⁴D. O eletrólito otimizado foi composto de ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico 10 mmol L⁻¹, arginina 20 mmol L⁻¹ e brometo de cetiltrimetilamônio 30 μmol L⁻¹, pH 8,95.⁶⁷ Um procedimento utilizando CE e uma minicélula para C⁴D acoplada à extração em fase sólida foi usado para determinar metabólitos de citrato e oxalato na urina. Uma boa reprodutibilidade foi alcançada por meio do uso desta técnica. O eletrólito era composto de 10% de MeOH (pH 5,82), 10 mmol L⁻¹ de MES, 10 mmol L⁻¹ de HIS e 50 mmol L⁻¹ de CTAB. O tempo de separação foi em torno de 4 min.⁶⁸ Alhusban et al. apresentaram um estudo da formação de lactato em culturas celulares usando injeção sequencial com CE-C⁴D. O eletrólito otimizado foi constituído de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) e ácido N-ciclohexil-2-

aminoetanossulfônico (CHES) recém-preparados com concentrações de 30 mmol L⁻¹, pH 8,4. Para o revestimento do capilar foi adicionado 0,025% (m/v) de polieletrólito catiônico poli(etilenimina) (PEI).⁶⁹ Tũma et al. demonstraram a separação e detecção de 28 aminoácidos biogênicos empregando capilares curtos. O tempo de análise não excedeu 6 minutos, com limites de detecção entre 0,1 e 1,7 µmol L⁻¹. Como a maioria dos aminoácidos não produz sinais para detecção espectrofotométrica (UV-vis) ou de fluorescência, o C⁴D foi ideal nessa investigação.⁷⁰ Muitos outros estudos de análise de aminoácidos em fluidos biológicos por CE-C⁴D são relatados na literatura.⁷¹⁻⁷⁵

2 OBJETIVOS

2.1 Geral:

Desenvolver e validar um método eletroforético inédito, simples e rápido para monitoramento da concentração de lactato em suor humano, com potencial para aplicações em diagnósticos ou estudos de fisiologia do esporte.

2.2 Específicos

- Otimizar parâmetros eletroforéticos para separação de íons presentes em suor;
- Otimizar o método eletroforético para a quantificação de íons lactato em suor;
- Validar o método analítico desenvolvido para determinação de lactato em suor.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

Hidróxido de sódio e ácido clorídrico foram obtidos da Labsynth (Diadema, SP, Brasil). Brometo de cetiltrimetil amônio (CTAB), ácido láctico (90 % m/m), lactato de sódio, formiato de sódio, fosfato de sódio, lactato de lítio e ácido morfolino-etano-sulfônico (MES) monohidratado e Histidina (His) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Steinheim, Nordrhein Westfalen, Alemanha). Água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação Direct- Q3 UV (Millipore, Molsheim, Alsácia, França). Suor artificial (Artificial Eccrine Perspiration) pH 6,8, foi adquirido da empresa Biochemazone (Edmonton, Canadá). A amostra de suor humano (1 mL) foi obtida comercialmente da Innovative Research (Novi, MI). Todos os reagentes utilizados eram de grau de pureza analítica (PA), com exceção do ácido láctico que foi utilizado para os testes preliminares.

3.2 Preparo das Soluções–Padrão

A partir da dissolução em água ultrapura dos respectivos reagentes sólidos, foram preparadas soluções padrão estoque individuais de lactato de sódio, lactato de lítio, formiato de sódio, ácido láctico e CTAB, na concentração de 10 mmol L^{-1} , cada. As demais soluções de trabalho foram preparadas a partir da diluição das soluções-padrão estoque, utilizando água ultrapura.

3.3 Preparo do Eletrólito de corrida

A composição do eletrólito de corrida, foi escolhida com base no trabalho de Pormsila et al.⁷⁵ com algumas adaptações, especificamente na concentração de CTAB, que ao invés de $0,070 \text{ mmol L}^{-1}$ utilizou-se $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$. O BGE foi diariamente preparado a partir dos reagentes sólidos MES e His, que foram pesados e dissolvidos em água ultrapura em quantidades equimolares (10 mmol L^{-1}), na presença de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de CTAB, resultando em pH 6,1.

3.4 Condicionamento do capilar

Uma coluna capilar de sílica fundida foi utilizada e para garantir a reprodutibilidade das condições da superfície da sílica, antes de iniciar a primeira corrida do dia, a parede interna do capilar era lavada (flush) sequencialmente com solução de HCl 1 mol L⁻¹ (10 min), água ultrapura (2 min), solução de NaOH 1 mol L⁻¹ (10 min), água ultrapura (2 min) e eletrólito de corrida (10 min). Após a última corrida do dia, um condicionamento final era realizado pela passagem sequencial de soluções de HCl 1 mol L⁻¹ (10 min), água ultrapura (5 min) e ar para secagem da coluna capilar para fins de armazenamento.

3.5 Instrumentação de CE

Os experimentos de separação eletroforética foram realizados em um equipamento de CE (Fig. 5) que foi montado no Grupo de Pesquisa em Eletroforese e Microsistemas de Análise (GEM) do Instituto de Química/UNICAMP (IQ-Unicamp) e que estava alocado no laboratório de ensino do IQ-Unicamp para experimentos didáticos. Este equipamento possui uma fonte de alta tensão que pode aplicar até 30 kV (positivo ou negativo) de potencial de separação. A injeção de amostra é hidrodinâmica por gravidade, ou seja, um sistema eleva, por um determinado tempo, o reservatório de amostra em relação ao outro reservatório de BGE, causando a injeção de amostra na coluna capilar por sifonamento. Foi empregada a detecção C⁴D, a qual faz uso de um gerador de funções para aplicar o sinal senoidal de excitação de alta frequência do detector. Um software implementado em Labview permite selecionar o potencial de separação e o tempo de injeção de amostra, além de monitorar e registrar a corrente elétrica e o sinal do C⁴D.

As condições experimentais otimizadas foram tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade de 50 s, eletrólito de corrida composto por MES/His 10 mmol L⁻¹ e CTAB 0,2 mmol L⁻¹, potencial de separação de -20 kV, capilar com 50 cm (42 cm efetivo) de comprimento e 50 µm de diâmetro interno, detecção C⁴D operando em 510 kHz e 3V de amplitude.

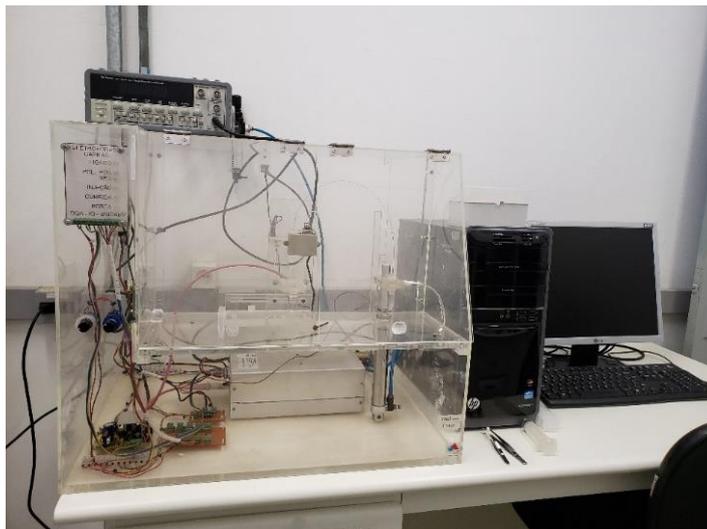


Figura 5. Foto do equipamento de CE-C⁴D utilizado.

3.6 Validação do método analítico

Para validação do método CE-C⁴D proposto, foi adotado o protocolo da ANVISA, especificamente a Resolução N^o 166, de 24 de julho de 2017⁷⁶, que dispõe sobre a validação de métodos analíticos em insumos farmacêuticos, medicamentos e produtos biológicos. Os parâmetros analisados foram linearidade, seletividade, efeito matriz, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. A validação foi realizada com amostras de suor artificial e real (humano), sendo que para a amostra real apenas o teste de adição e recuperação foi considerado devido ao volume limitado de amostra adquirido (1 mL).

A linearidade na faixa de concentrações de 50 a 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$ foi avaliada levando-se em consideração o coeficiente de determinação (R^2) e o teste de hipótese de linearidade (a priori), que consiste em comparar os desvios padrão residual, $S_{y,x}$ com o desvio padrão dos valores y_{ij} em relação suas médias, de acordo com a seguinte equação⁷⁷:

$$\hat{F} = \frac{s_{y,x}^2}{s_y^2} = \frac{\sum_{i=1}^p m_i (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2 / (p-2)}{\sum_{i=1}^p \sum_{j=h}^{m_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2 / (m-p)} \quad \text{Equação 5}$$

Em que m_i é o número de medidas repetidas nos pontos (p) de calibração;

$\sum_{i=1}^p m_i = m$; normalmente $m_1 = m_2 = \dots = m_p$, e $p \cdot m_i = m$). O teste é feito comparando-se o resultado da Equação 5 ($F_{calculado}$) com $F_{\alpha, gl1=p-2, gl2=m-p}$ ($F_{critico}$).

O efeito de matriz foi avaliado comparando-se estatisticamente os coeficientes angulares das curvas analíticas obtidas com o padrão analítico em solvente (calibração externa) e com a amostra fortificada (método de adição de padrão).

A curva analítica por calibração externa foi obtida a partir da diluição da solução estoque de 10 mmol L⁻¹ de lactato, nas concentrações de 50, 100, 150, 200 e 250 μmol L⁻¹, preparadas em triplicata, cada. Já as soluções empregadas para obtenção da curva pelo método de adição de padrão, foram obtidas adicionando-se, na amostra de suor artificial diluída (1:100), volumes adequados da solução estoque de lactato, de maneira a obter a faixa de concentração de lactato de 50 a 250 μmol L⁻¹. Para as duas curvas, utilizou-se o padrão interno formiato na concentração de 200 μmol L⁻¹, através da adição de volumes adequadas de sua solução estoque 10 mmol L⁻¹. As razões entre as áreas dos picos de cada concentração do lactato e formiato foram empregadas para plotar as curvas analíticas. Os valores de efeito matriz (EM) foram calculados de acordo com a seguinte Equação:⁷⁸

$$EM = (bm - bs)x100/bs \quad \text{Equação 6}$$

Onde: bm = coeficiente angular da curva obtida por adição de padrão , bs = coeficiente angular da curva obtida por calibração externa.

Além disso, foi determinado o teste F (Fischer-Snedecor) pela Equação 7, em que o valor de F calculado (Fcal) é encontrado pela razão entre as variâncias dos coeficientes angulares das curvas analíticas por adição de padrão e externa.

$$Fcal = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad \text{Equação 7}$$

Em que S_1^2 e S_2^2 são as variâncias dos coeficientes angulares por adição de padrão e calibração externa, respectivamente.

Já o teste t de Student, foi calculado pela Equação 8:

$$tcal = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\left(\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}\right)}} \quad \text{Equação 8}$$

Sendo que, $\bar{x}_1 - \bar{x}_2$ são as médias dos coeficientes angulares das duas curvas analíticas, e n_1 e n_2 , número de pontos de dados de cada uma.

A exatidão foi avaliada por testes de recuperação das amostras fortificadas pela adição de lactato em três níveis de concentrações (4,0, 8,0 e 12,0 mmol L⁻¹), em triplicata cada. As porcentagens de recuperação foram calculadas de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(C_1 - C_2)}{C_3} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Sendo: C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada

C_3 = Concentração adicionada na fortificação

A precisão intra-dia foi avaliada por meio das determinações de lactato na amostra de suor artificial, em seis réplicas. A precisão inter-dia foi avaliada pela determinação do analito na amostra em três dias diferentes. O limite de detecção (LOD, do inglês limit of detection) e limite de quantificação (LOQ, do inglês limit of quantification) foram determinados utilizando o eletroferograma para a menor concentração da faixa linear (50 $\mu\text{mol L}^{-1}$), por meio da relação sinal-ruído. O LOD foi calculado com base na Equação 10:

$$LOD = \frac{C}{\left(\frac{h}{3S}\right)} \quad \text{Equação 10}$$

Sendo, C = concentração; h = altura do pico; S = desvio padrão do ruído da linha de base.

Já o limite de quantificação foi calculado de acordo com a Equação:

$$LOQ = LOD \times 3,33 \quad \text{Equação 11}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Otimização da Separação por CE

Antes da aquisição de um reagente padrão de lactato com alto grau de pureza, para o desenvolvimento do método de separação, inicialmente realizou-se testes preliminares com uma solução de ácido láctico (90% m/m). Esses testes foram realizados primeiramente apenas com uma solução padrão de ácido láctico diluída na concentração de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. Posteriormente, avaliou-se a separação eletroforética na presença de outros compostos, selecionados de acordo com a composição típica do suor humano. Esses testes foram importantes para avaliar o eletrólito de corrida em relação à detectabilidade e seletividade da separação entre o lactato e os íons que poderiam estar presentes em amostras de suor humano.

O ácido láctico possui um pKa de 3,86, então foi necessário utilizar um eletrólito de corrida com pH acima deste pKa para que os ânions lactato prevalecessem. O eletrólito contendo MES/His 10 mmol L^{-1} e CTAB $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ (pH 6,1), demonstrou-se adequado como pode ser observado no eletroferograma na Figura 6. O pico negativo é um marcador do EOF e corresponde a zona de água na amostra. Um fator importante na escolha desse eletrólito é sua baixa condutividade, uma vez que na detecção C^4D quanto maior a diferença de mobilidade eletroforética entre os íons do eletrólito e dos analitos, maior a detectabilidade.

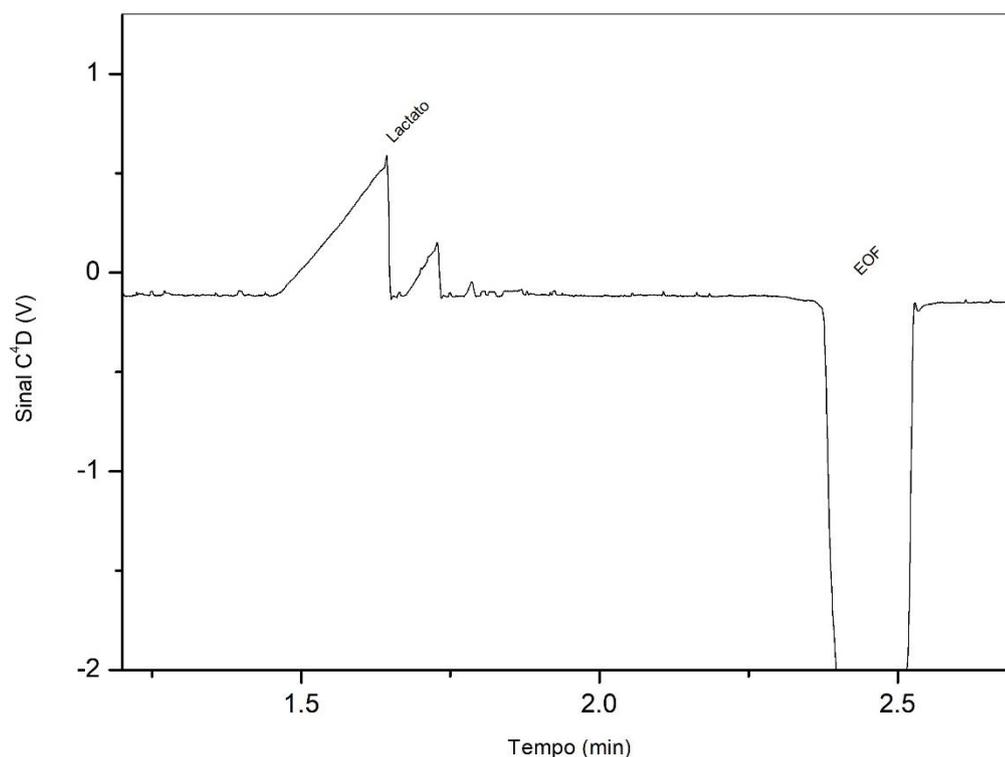


Figura 6. Eletroferograma de uma solução de ácido láctico ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições experimentais: Eletrólito: MES/His 10 mmol L^{-1} , CTAB $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ a pH 6,1. Tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade (50 s e 10 cm), potencial de separação de -25 kV , capilar de sílica 50 cm (42 cm efetivo) de comprimento e $50 \mu\text{m}$ de diâmetro interno, detector C⁴D operando em 510 kHz e 3V de amplitude.

A solução de ácido láctico utilizado não apresentava grau de pureza adequado ($\sim 90\%$), o que pode explicar o surgimento de mais de um pico no eletroferograma (Figura 6), tendo em vista a repetição desse fato em várias outras corridas.

Posteriormente, realizou-se testes com o lactato de lítio $200 \mu\text{mol L}^{-1}$, como pode ser observado nos eletroferogramas nas Figuras 7 e 8. Além do lactato, íons cloreto foram adicionados ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) na amostra (Fig. 8), para avaliar a seletividade da separação, uma vez que seria esperada uma concentração elevada deste ânion em suor.

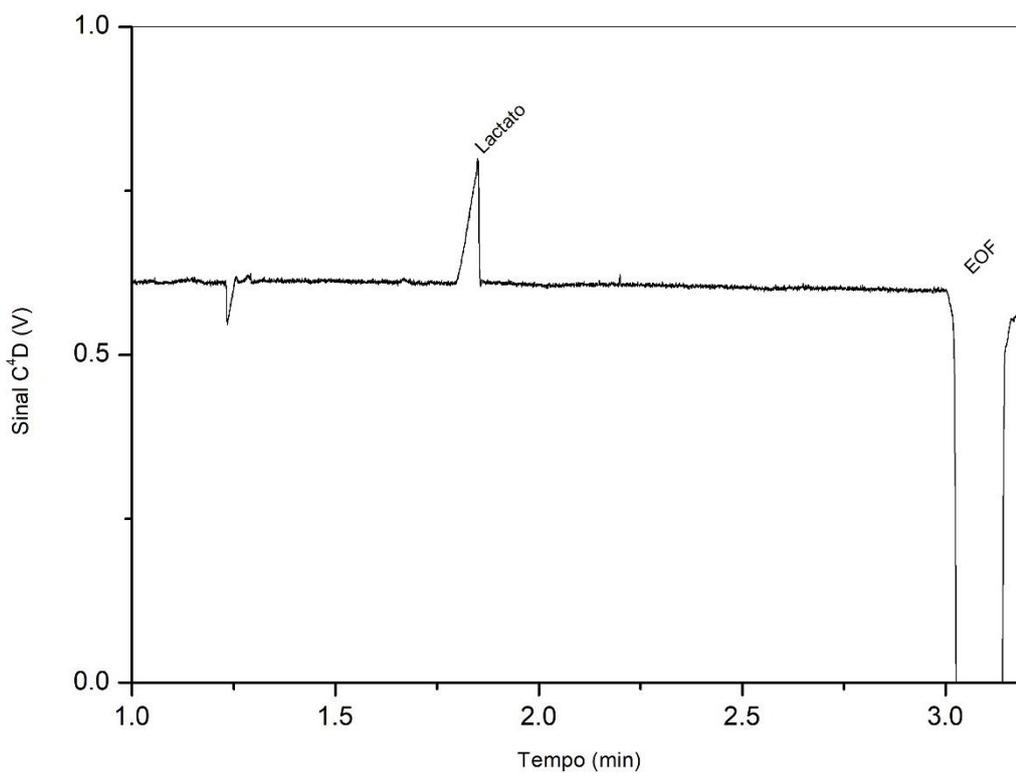


Figura 7. Eletroferograma de uma solução de lactato de lítio ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições experimentais: BGE MES/His 10 mmol L^{-1} e CTAB $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ a pH 6,1. Tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade (50 s e 10 cm), potencial de separação de -25 kV , capilar de sílica 50 cm (42 cm efetivo) de comprimento e $50 \mu\text{m}$ de diâmetro interno, detecção C⁴D operando em 510 kHz e 3V de amplitude.

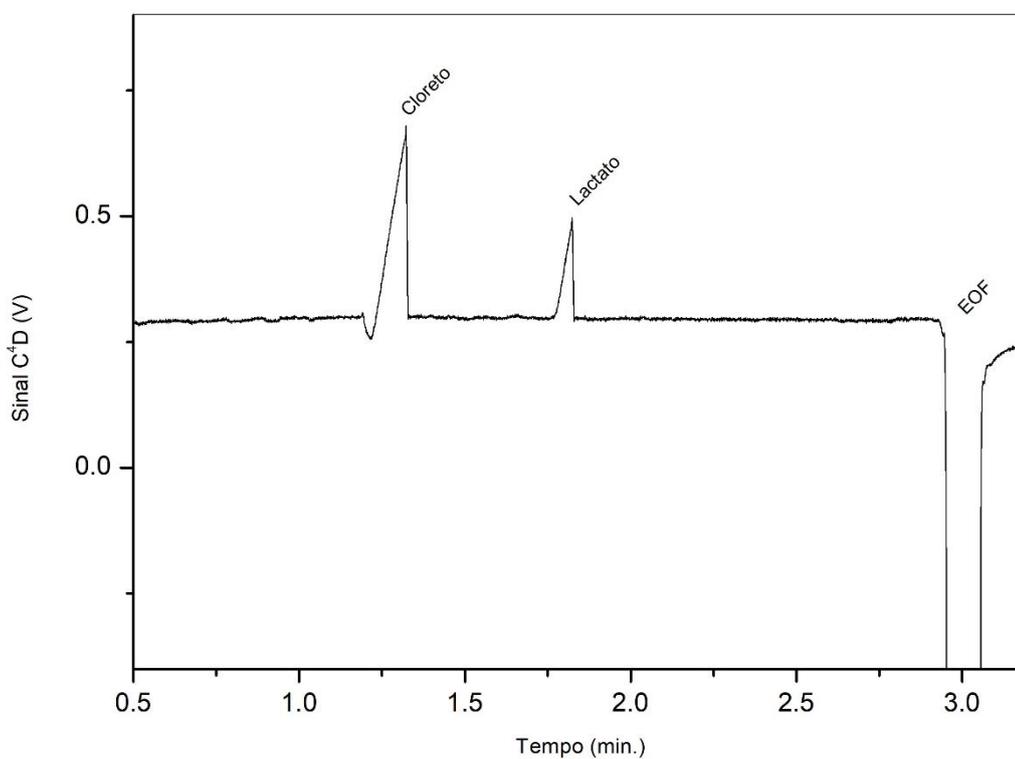


Figura 8. Eletroferograma de solução de lactato de lítio ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) e cloreto ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições de separação como na Fig. 7

De acordo com os eletroferogramas das Figuras 7 e 8, pode-se constatar que os picos eram bem definidos e com boa resolução. Além disso, boa linearidade de resposta foi obtida, ratificada pela curva analítica, apresentada na Figura 9, cujo coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9996.

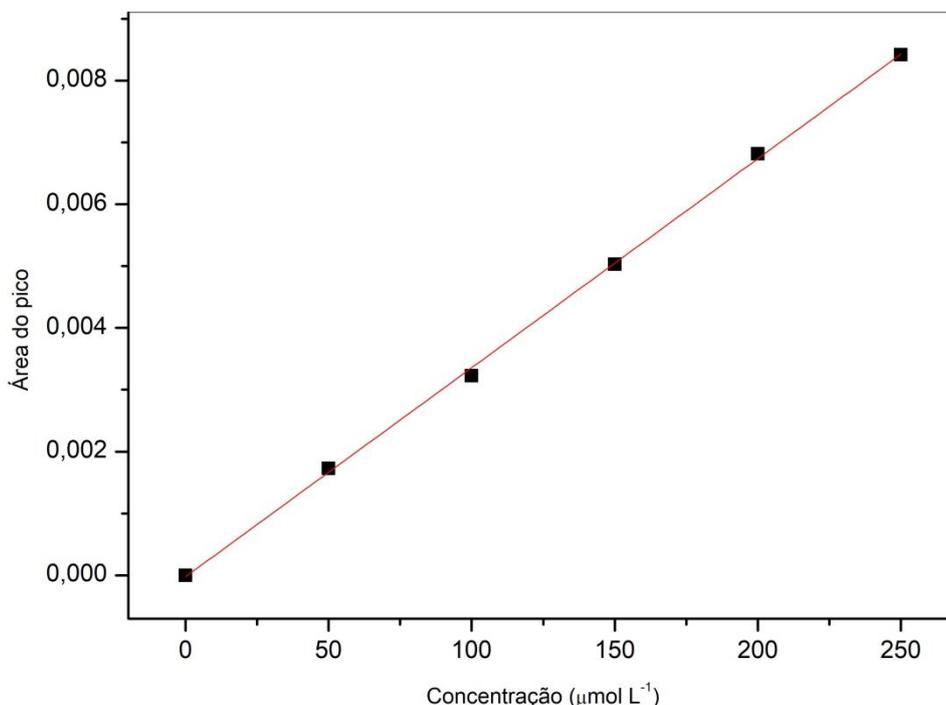


Figura 9. Curva analítica para lactato (0 a 250 $\mu\text{mol L}^{-1}$) obtida com as condições de separação como na Fig. 7.

Apesar dos bons resultados obtidos com o lactato de lítio, este reagente é menos disponível que o lactato de sódio e tem custo maior e, por isso, optou-se por utilizar o último (pureza maior que 99%) como reagente padrão. Os eletroferogramas obtidos com soluções de lactato de sódio são apresentados nas Figuras 10 e 11. Nelas podem ser observadas também um pico de sistema⁷⁹, que foi atribuído à presença de íons brometo provenientes do CTAB adicionado (como inversor EOF) ao eletrólito de corrida.

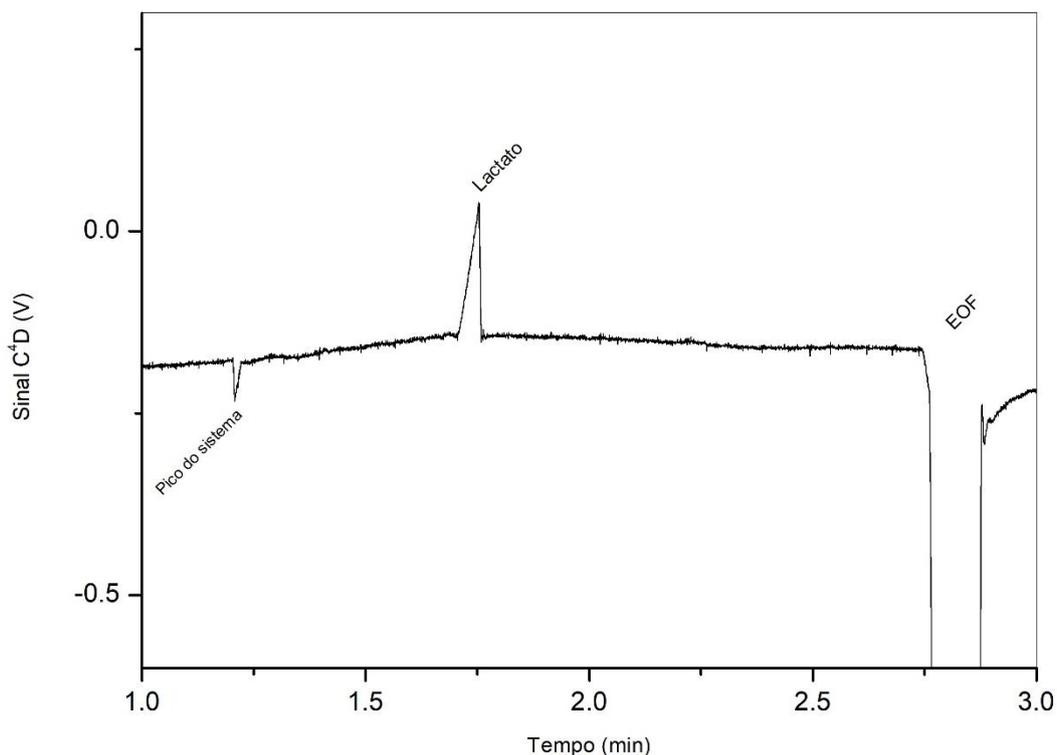


Figura 10. Eletroferograma de uma solução de lactato de sódio ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições experimentais: BGE: MES/His 10 mmol L^{-1} e CTAB $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ a pH 6,0. Tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade (50 s e 10 cm), potencial de separação de -20 kV, capilar de sílica 50 cm (42 cm efetivo) de comprimento e $50 \mu\text{m}$ de diâmetro interno, detecção C^4D operando em 510 kHz e 3V de amplitude.

Com intuito de corrigir os efeitos de variações nas injeções de amostra e melhorar a precisão instrumental, foram pesquisados reagentes que poderiam ser utilizados como padrão interno. Foram selecionados alguns compostos aniônicos (ciclamato, formiato, propionato, salicilato e tartarato) para serem avaliados como candidatos a padrão interno, por meio de simulação no software PeakMaster 5.1⁸⁰. Estes compostos foram considerados ausentes no suor humano e tinham uma mobilidade eletroforética próxima àquela do lactato. No entanto, a avaliação experimental demonstrou que a maioria deles apresentava baixa detectabilidade ou co-migração com outros íons presentes no suor artificial. Apenas o íon formiato demonstrou ser adequado para utilização como padrão interno, uma vez que apresentava um tempo de migração próximo do lactato e ausência de sobreposição de picos, como pode ser observado nas Figuras 11 e 12. A concentração de formiato de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ foi considerada adequada para ser adicionada, como padrão interno, às soluções padrão e às amostras.

Durante as simulações com PeakMaster constatou-se que, para o eletrólito empregado, o fosfato possuía mobilidade eletroforética próxima à do lactato, o que poderia ser uma interferência no método analítico proposto. Entretanto, para concentrações de até $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ de fosfato, não foram detectados picos para este ânion, como pode ser observado na Figura 11. É importante destacar que foram feitas comparações das áreas do pico do lactato na presença com e na ausência de íons fosfato. Desta forma, tendo como base a concentração máxima de fosfato geralmente presente no suor ²⁸, em torno de 1 mmol L^{-1} , uma diluição adequada da amostra seria suficiente para evitar interferência de fosfato.

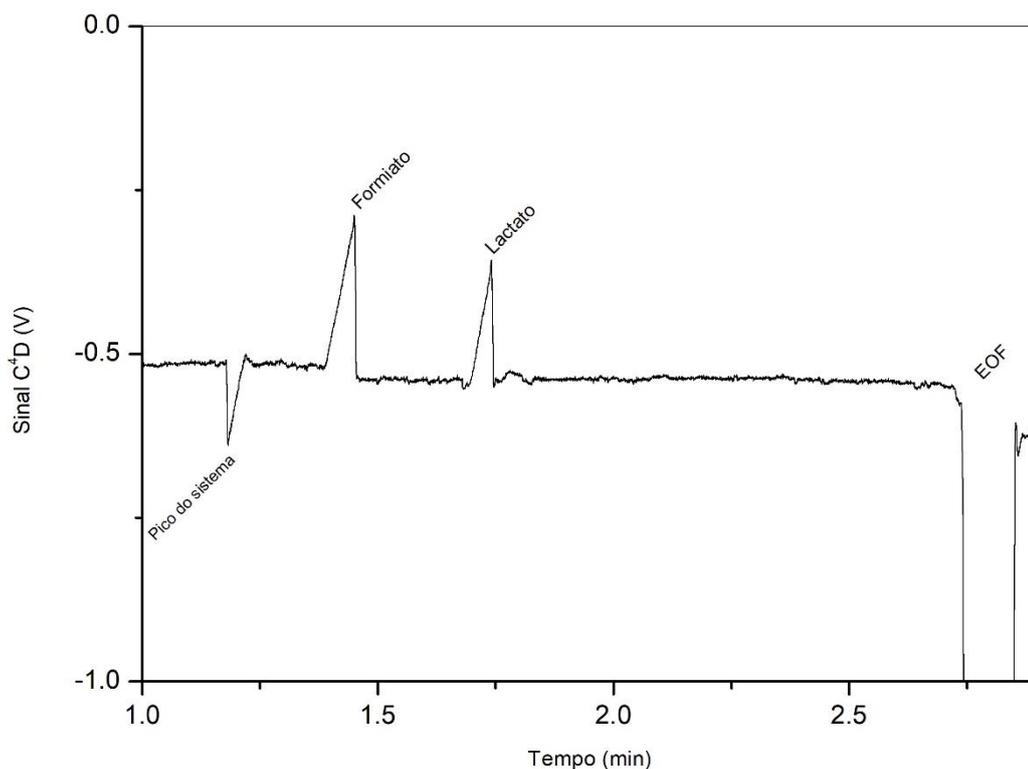


Figura 11. Eletroferograma de solução de lactato de sódio ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$), formiato ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$) e Fosfato ($50 \mu\text{mol L}^{-1}$). Condições experimentais: BGE MES/His 10 mmol L^{-1} e CTAB $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ a pH 6,0. Tempo de injeção hidrodinâmica por gravidade (50 s e 10 cm), potencial de separação de -20 kV, capilar de sílica 50 cm (42 cm efetivo) de comprimento e $50 \mu\text{m}$ de diâmetro interno, detecção C^4D operando em 510 kHz e 3V de amplitude.

Como a amostra de suor artificial era composta por vários íons com diferentes concentrações, foi necessária uma diluição adequada para evitar a sobreposição de picos e garantir a detecção e quantificação do lactato. Para alcançar este objetivo,

considerou-se mais adequada uma diluição de 100 vezes. As Figuras 12 e 13 mostram os eletroferogramas para as amostras de suor artificial e real (humano), respectivamente, diluída nessa proporção.

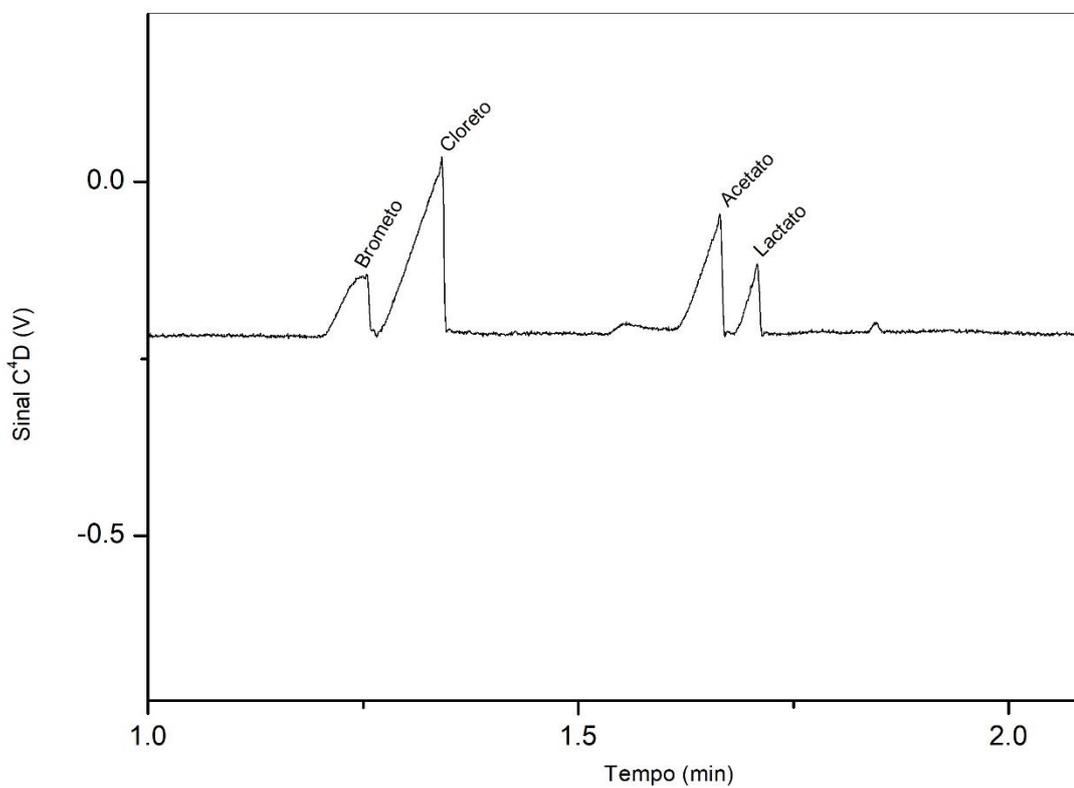


Figura 12. Eletroferograma da amostra de suor artificial diluída 1:100. Condições de separação como na Fig. 11.

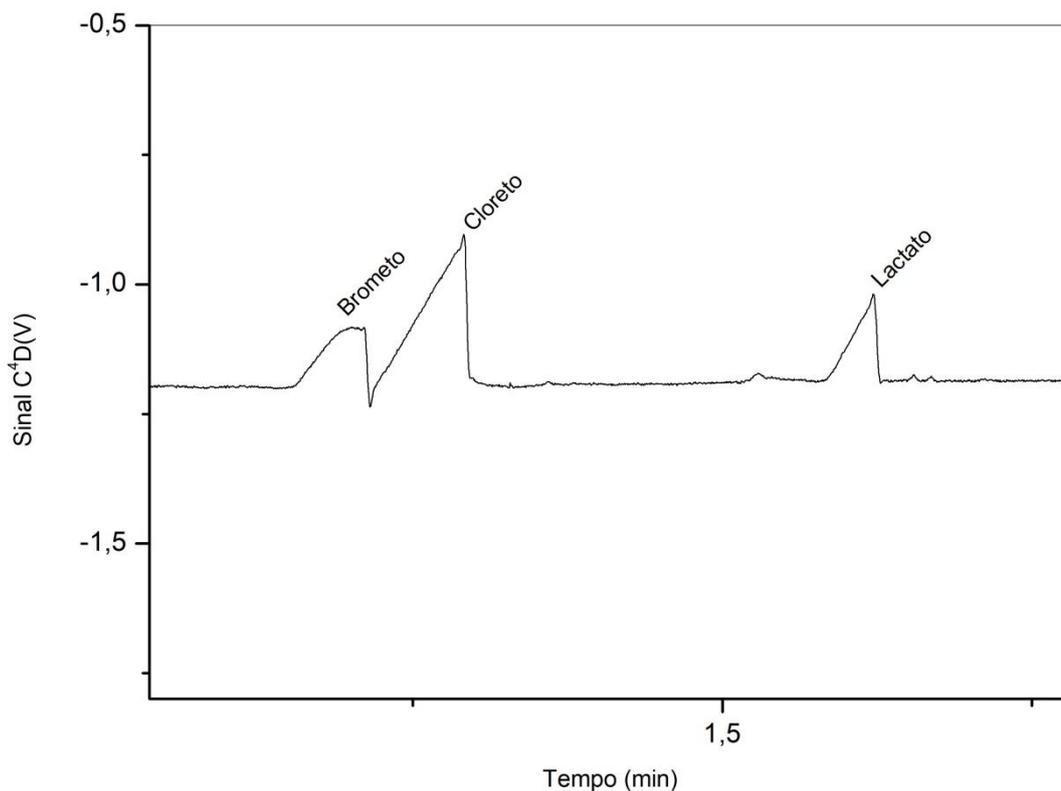


Figura 13. Eletroferograma da amostra de suor humano diluída 1:100. Mesma condições experimentais da Figura 11.

As separações foram obtidas em menos de 2 min com boa resolução dos picos dos principais íons presentes em ambas as amostras. Os eletroferogramas apresentaram algumas diferenças, sendo a principal que o pico do acetato na amostra de suor humano é muito pequeno.

Posteriormente, com o intuito de observar se haveria co-migração do formiato (padrão interno) com outro componente da amostra, foi feita a adição de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de formiato às amostras de suor diluídas em 1:100. Observando os eletroferogramas das Figuras 14 e 15 é possível constatar a ausência de co-migração envolvendo o pico do padrão interno.

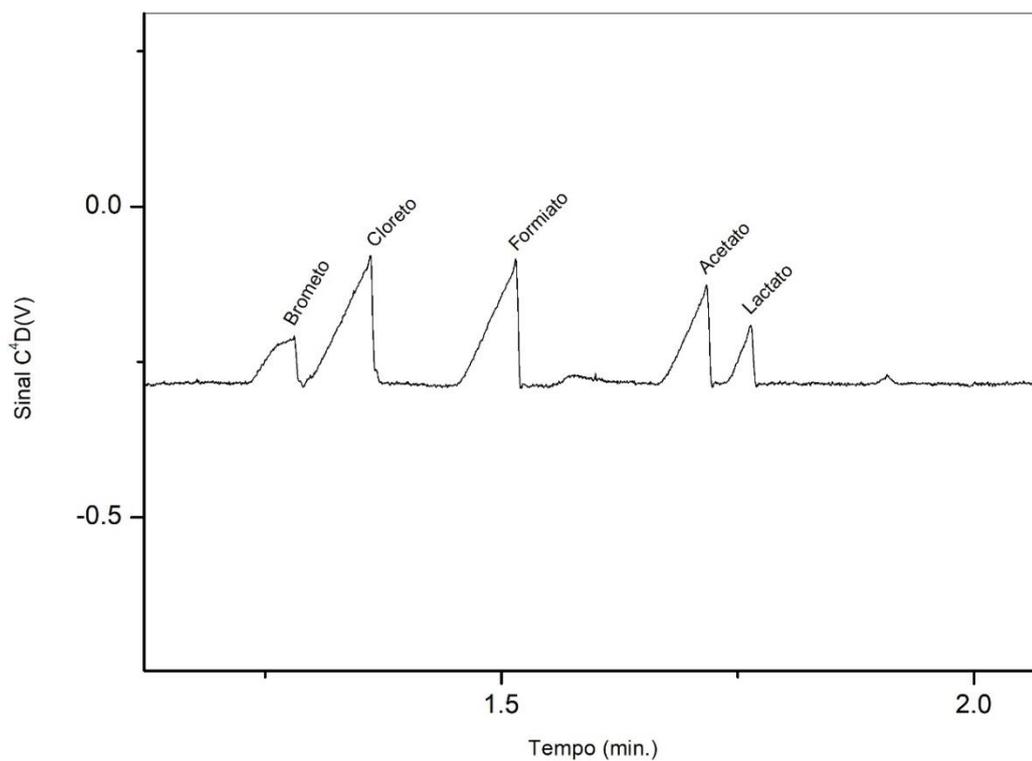


Figura 14. Eletroferograma da amostra de suor artificial diluída 1:100 com adição de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de formiato (padrão interno). Condições de separação como na Fig. 12

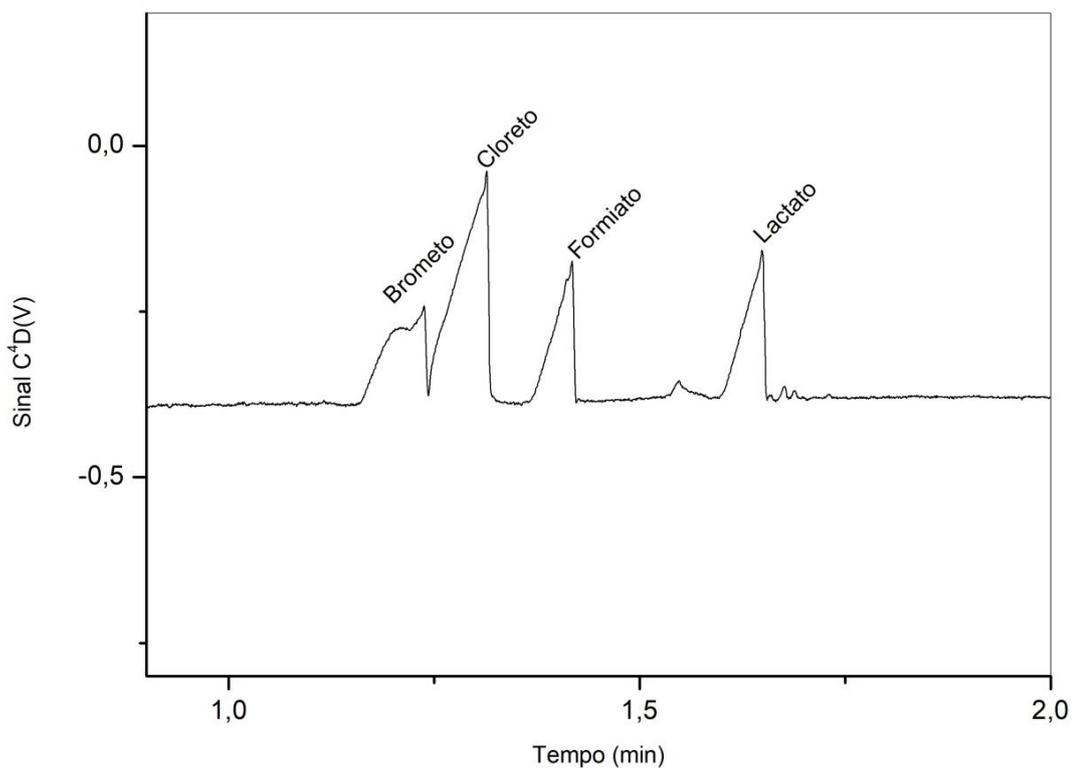


Figura 15. Eletroferograma da amostra de suor humano diluída 1:100 com adição de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de formiato (padrão interno). Condições de separação como na Fig. 12

4.2 Validação do método

Foram avaliados os parâmetros de adequação do sistema e dos principais parâmetros analíticos, a fim de verificar a viabilidade e confiabilidade do método proposto. A Tabela 2 sumariza alguns dos principais parâmetros avaliados na validação. O desvio padrão do tempo de migração para o lactato foi de 1,2 %, demonstrando uma boa repetibilidade. Como esperado em uma separação por CE, uma boa eficiência de separação foi obtida, expressa pelo elevado número de pratos por metro de coluna capilar.

Tabela 2. Parâmetros analíticos do método CE-C⁴D para a determinação do lactato no suor artificial

Parâmetros Analíticos	
Tempo de migração (min) ^a	1,67 ± 0,02
N/m ^b	184.356
Equação de regressão	$y = 2,9 \cdot 10^{-3} x - 1,2 \cdot 10^{-2}$
Faixa linear de calibração (µmol L ⁻¹)	50-250
Coefficiente angular	$(2,9 \pm 0,09) \times 10^{-3}$
Coefficiente linear	$(1,2 \pm 1) 10^{-2}$
Coefficiente de determinação (R ²)	0,9979
Lack of fit	P-value = 0,0747 F-value = 2,412
LOD (µmol L ⁻¹)	3,1
LOQ (µmol L ⁻¹)	10,3
Precisão intradia (n = 6) (%)	1,49
Precisão interdia (n = 3) (%)	7,08

^a Média ± desvio padrão para 7 repetições consecutivas

^b Número de pratos por metro;

A linearidade da curva analítica foi validada considerando o coeficiente de determinação ($R^2 = 0,9979$), uma vez que quanto mais próximo de 1,0 menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais, melhor o ajuste e menor o erro associado. No teste de hipótese de linearidade, a um nível de confiança de 95%, $p - 2 = 4$ e $m - p = 12$, o $F_{calculado}$ foi igual a 2,412 e $F_{crítico}$ igual a 3,260. Isso

significa que há linearidade significativa, pois o $F_{calculado} < F_{critico}$. A curva analítica está representada na Figura 16 e o gráfico de resíduos Figura 17.

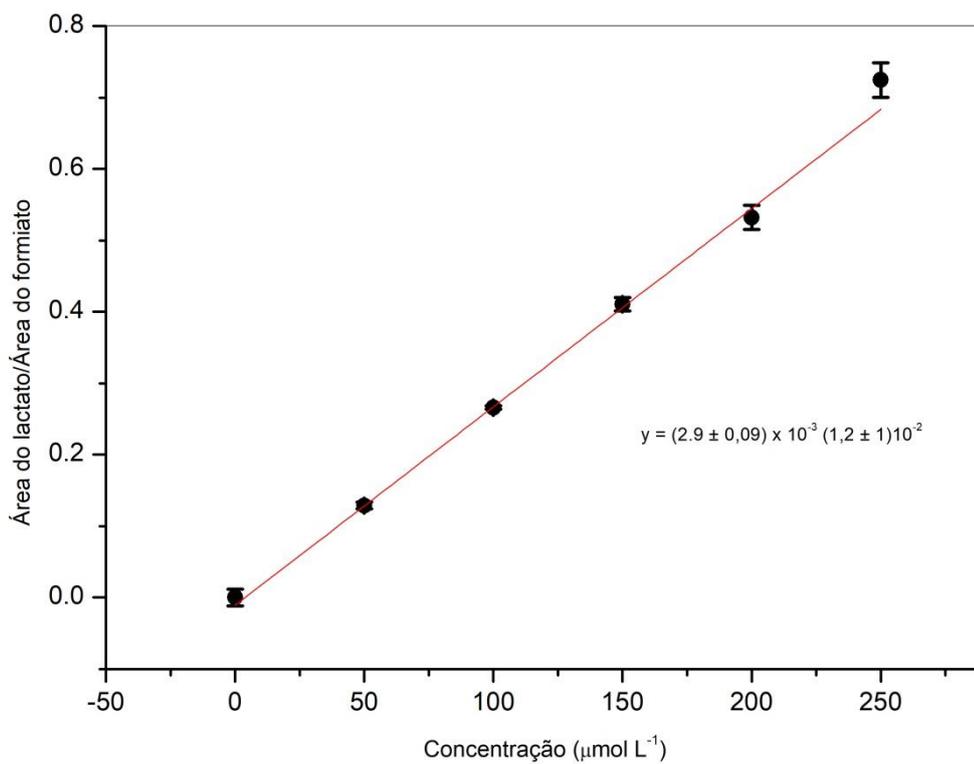


Figura 16. Curva analítica obtida pela razão entre as áreas dos picos de lactato e formiato ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$).

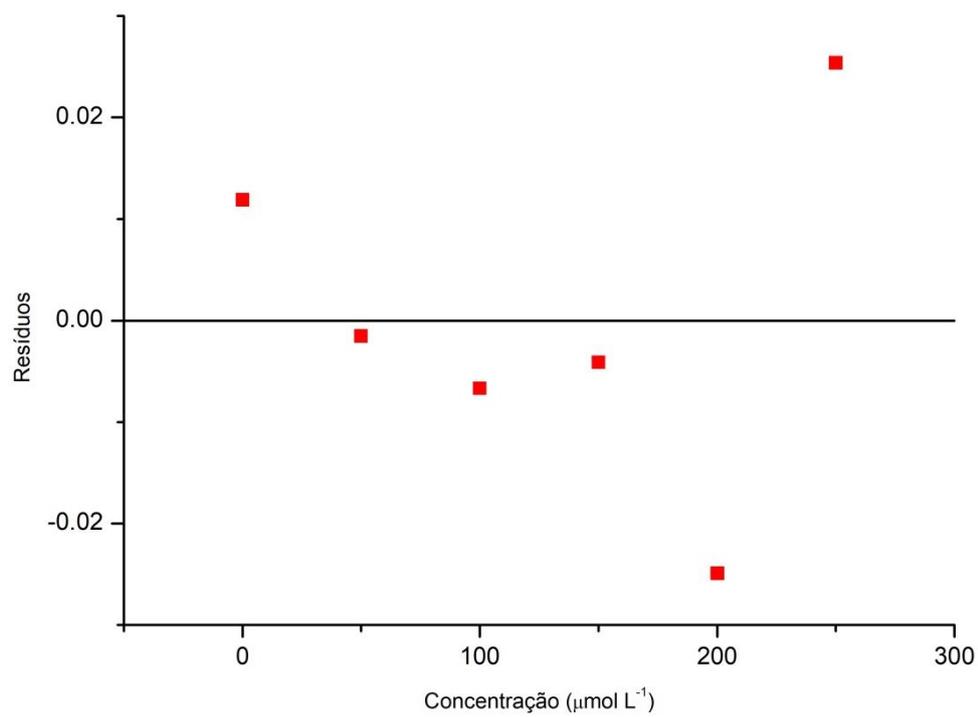


Figura 17. Gráfico de resíduos obtido a partir da curva analítica da figura 16.

O efeito de matriz foi avaliado e as curvas analíticas obtidas na calibração externa e com adição de padrão estão representadas na Figura 18.

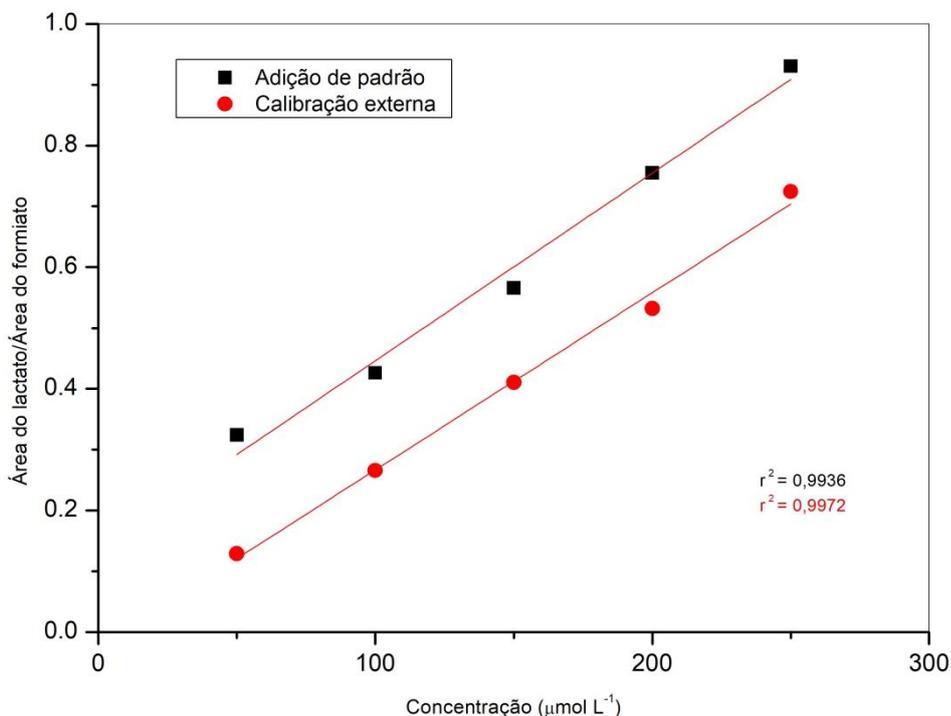


Figura 18. Curvas analíticas obtidas pela razão entre as áreas dos picos de lactato e formiato (padrão interno), por adição de padrão na amostra e no solvente (calibração externa).

De acordo com a equação do efeito matriz (EM), a diferença entre os coeficientes angulares foi de - 0,35 %. Isso significa que não houve efeito matriz, pois a diferença entre os coeficientes angulares das curvas analíticas está dentro do intervalo aceitável, $-10\% < EM < 10\%$.³² Além disso, a RDC³¹ estabelece que, antes da aplicação do teste t, é importante que as variâncias sejam comparadas por meio do teste F, pois o método de cálculo do teste t vai depender da igualdade ou não dessas variâncias. Portanto, primeiramente foi feito o Teste F e, posteriormente o teste t, com 5 e 6 graus de liberdade, respectivamente. Foram avaliados a um nível de 95% de confiança.

A Tabela 3 mostra os resultados do teste de efeito de matriz para determinação de lactato .

Tabela 3. : Resultados do efeito de matriz para curvas analíticas por método de adição de padrão e calibração externa.

Método de calibração externa ^a			Método por adição de padrão ^b			Diferença entre as inclinações (%) ^c	Teste -t ^d
Coeficiente angular (x 10 ³)	Média (x 10 ³)	DP (x 10 ³)	Coeficiente angular (x 10 ³)	Média (x 10 ³)	DP (x10 ³)		
2,80			2,97				
2,88			3,15				
2,69	2,86	0,14	2,67	2,87	0,36	- 0,35	t _{cal} (0,053) < t _{tab} (2,45)
3,09			3,34				
2,79			2,73				
2,91			2,35				

^a curva analíticas do lactato em solvente

^b curvas analíticas para o lactato no suor artificial.

^c diferença relativa (%) entre as médias dos coeficientes angulares das curvas analíticas no solvente e na amostra de suor artificial.

^d nível de significância de 95 %

DP: desvio padrão

Para o teste F, o valor tabelado (F_{tab}) é 5,05 e calculado (F_{cal}) 6,86. Nesse caso, como o F_{cal} > F_{tab}, considera-se a hipótese em que as variâncias são estatisticamente diferentes, possibilitando a aplicação do teste t. Posteriormente foi determinado o teste t, sendo o valor calculado igual a 0,053 e o tabelado 2,45. Portanto, o t_{cal} < t_{tab}, indicando que não há diferença significativa entre os coeficientes angulares, e conseqüentemente sem efeito de matriz. Nesse sentido, as quantificações foram realizadas por meio de calibração externa.

Embora a RDC 166/2017 não estabeleça valores de precisão intradia e interdia, os valores obtidos (Tabela 2) foram menores que 5% e 10%,

respectivamente, podendo ser considerados aceitáveis para fins de análises quantitativas.

A concentração original de lactato na amostra de suor artificial foi determinada pelo método CE-C⁴D como $(8,6 \pm 0,1)$ mmol L⁻¹ e na amostra real (36 ± 1) mmol L⁻¹. A exatidão do método foi avaliada por testes de recuperação realizados em três níveis de concentração de lactato, e os resultados estão resumidos na Tabela 4. Os valores de recuperação variaram de 97 a 118%, dentro da faixa (80 - 120%) recomendada pela RDC 166/2017.

Tabela 4. Porcentagem de recuperação (média \pm DP) de lactato em amostras fortificadas analisadas pelo método proposto (n=3).

Amostra	C ₁ (mmol L ⁻¹)	C ₂ (mmol L ⁻¹)	Recuperação (%)
Suor artificial	4,00	3,88	97 \pm 14
	8,00	8,24	103 \pm 14
	12,00	13,20	110 \pm 2
Suor humano	4,00	4,40	110 \pm 2
	8,00	9,20	115 \pm 4
	12,00	14,16	118 \pm 2

C₁ = Concentração adicionada (mmol L⁻¹)

C₂ = Concentração média encontrada (mmol L⁻¹)

A Figura 19 mostra os eletroferogramas das amostras de suor artificial antes e depois da fortificação com lactato em três níveis de concentração.

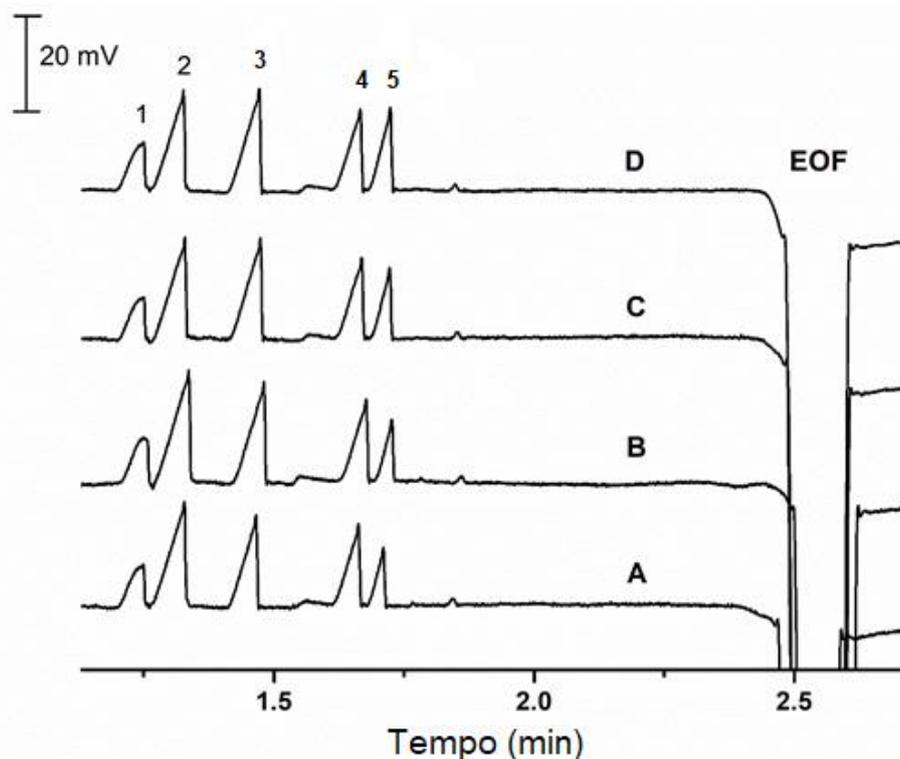


Figura 19. Eletroferogramas da amostra de suor artificial diluída 100 vezes. (A) sem e com adição de lactato (B) 4,0 (C) 8,0 (D) 12,0 mmol L⁻¹. Condições de separação como na Figura 14. Picos (1) brometo (2) cloreto (3) formiato (4) acetato (5) lactato.

Não foram encontrados na literatura outros métodos analíticos para determinação de lactato no suor utilizando CE, particularmente com C⁴D. No entanto, o método proposto, quando comparado com métodos eletroquímicos⁸¹, biossensor enzimático⁸², cromatografia²⁹ e colorimétricos⁸³⁻⁸⁵, apresentou LOD e LOQ semelhantes ou melhores. Além disso, o método CE-C⁴D é mais simples de efetuar, exigindo apenas uma simples diluição da amostra. Acreditamos que o método proposto pode ser aplicado em estudos fisiológicos e desempenho esportivo visando determinar concentrações de íons lactato em suor e, pode ser adaptado para análises de outros íons presentes nesta matriz. Os resultados referentes a essa dissertação foram publicados na revista *Electrophoresis*.⁸⁶

5 CONCLUSÕES

O método analítico proposto, empregando CE-C⁴D, é inédito e demonstrou ser simples, rápido e confiável para a determinação de lactato em suor artificial e humano. A CE-C⁴D demonstrou ser uma técnica promissora para este tipo de análise, devido ao baixo volume de amostra requerido e a possibilidade de detecção direta do lactato, cuja detecção espectrofotométrica é limitada pela baixa absorção na região do UV-Vis.

Os resultados obtidos são de grande relevância, considerando o papel crucial do lactato como um indicador metabólico e sua relação com o desempenho físico, bem como com a saúde e o diagnóstico de certas doenças. Desta forma, o método CE-C⁴D apresenta um potencial significativo para aplicações futuras, tanto na área de estudos esportivos e fisiológicos, quanto na medicina diagnóstica. Além disso, o método proposto pode ser utilizado ou adaptado para a determinação de outros íons em suor. Acredita-se que este trabalho contribua para a disseminação e utilização da CE como uma ferramenta analítica no monitoramento metabólico não invasivo e no diagnóstico de condições clínicas relacionadas a quantificação de íons lactato.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Tiselius, A. The Moving-Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins. Transactions of the Faraday Society, p. 44-54, 1930.
- (2) Tiselius, A. A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures. Transactions of the Faraday Society, 524, p. 134-142, 1937.
- (3) Hjérten, S. Free zone electrophoresis. Chromatogr. Rev. p. 86-92, 1967.
- (4) Tavares, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. Química Nova. p. 173–181, 1996.
- (5) Tavares, M. F.M. Mecanismos de Separação Em Eletroforese Capilar. Química Nova. p. 493–511, 1997.
- (6) Vaza, F. A. S; De Oliveira, C. L. M; De Oliveira, M. A. L. Fundamentos de Eletroforese Capilar: Uma Abordagem Por Animações. Química Nova. p. 732–737, 2015.
- (7) Martin, N. H: Zone electrophoresis, some basic considerations in design. The Analyst. p. 89-94, 1959.
- (8) Gas,B. Sanger, C. Muijselaar, P. High performance capillary electrophoresis., 2009.
- (9) LI, S. F. Y., “Capillary Electrophoresis. Principles, Practice and Applications”. J Chrom Libr, 1992.
- (10) Baker, D. R. Capillary Electrophoresis. John Wiley & Sons. New York. , p. 128-132, 1995.
- (11) Da Silva, J.A.F;Coltro, W.K.T;Carrilho, E;Tavares, M.F.M., Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares, Quim. Nova. p. 740–744, 2007.
- (12) Schwer, C; Kenndler, E. Electrophoresis in fused-silica capillaries: the influence of organic solvents on the electroosmotic velocity and the .zeta. potential. Anal. Chem. p.1801–1807,1991.
- (13) Saga, K. Structure and function of human sweat glands studied with histochemistry and cytochemistry. Prog. Histochem. Cytochem. p. 323–386,2002.
- (14) Sato, K. Pharmacology and function of the myoepithelial cell in the eccrine sweat gland. Experientia.p. 631–633,1977.

- (15) Sato, K., et al. Biology of sweat glands and their disorders. I. Normal sweat gland function. *J. Am. Acad. Dermatol.* p. 537–563, 1989.
- (16) Harvey, C. J.; Lebouf, R. F.; Stefaniak, A. B. Formulation and stability of a novel artificial human sweat under conditions of storage and use. *Toxicology in Vitro.* p. 1790–1796, 2010.
- (17) Mena-Bravo, A., De Castro, L., J. Sweat: A sample with limited present applications and promising future in metabolomics. *Pharm. Biomédica. Anal.* p. 139–47, 2014.
- (18) Derler, S. Gerhardt, L., Tribol, C. Tribology of Skin: Review and Analysis of Experimental Results for the Friction Coefficient of Human Skin. *Lett.* , p. 1–27, 2012.
- (19) Hou, L. et al. Artificial microfluidic skin for in vitro perspiration simulation and testing. *Lab. Chip.*, p. 1868-1875, 2013.
- (20) Heikenfeld, J. et al. Non-invasive Analyte Access and Sensing through Eccrine Sweat: Challenges and Outlook. *Electroanalysis*, p. 1242-1249, 2016.
- (21) Desax, M.C. et al. Nanoduct® sweat testing for rapid diagnosis in newborns, infants and children with cystic fibrosis. *Eur. J. Pediatrics.*, p. 299-304, 2007.
- (22) Da Silva, D.L.P. et al. Development of capillary electrophoresis methods for quantitative determination of taurine in vehicle system and biological media *Electrophoresis*, v. 27. p. 2330-2337, 2006.
- (23) Gibson, L.E; Cooke, R.E. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics*.v. 23.p.545-549, 1959.
- (24) Luo, T.-T. et al. Monitor for lactate in perspiration. *The Journal of Physiological Sciences*, v. 71.p. 26, 2021.
- (25) Kruse J. A, Carlson R. W. Lactate metabolism. *Crit Care Clinics* 1987; 5 (4):p. 725–746, 1987.
- (26) Guyton A. C, Hall J. E. Metabolism of carbohydrates, and formation of adenosine triphosphate. *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia, PA: WB Saunders; 2000, p. 772–780.
- (27) Poole, R. C, Halestrap, A. P. Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol.* v. 264: p.761–782, 1993.

- (28) Zhu, C. et.al. A Dual-Functional Polyaniline Film-Based Flexible Electrochemical Sensor for the Detection of pH and Lactate in Sweat of the Human Body. *Talanta*, v. 242, p.1-9, 2022.
- (29) Biagi, S.; Ghimenti, S.; Onor, M.; Bramanti, E. Simultaneous Determination of Lactate and Pyruvate in Human Sweat Using Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography: A Non invasive Approach. *Biomedical Chromatography*, v. 11, p. 1408–1415, 2012.
- (30) Ewaschuk, B.J. et.al. Metabolic acidosis: separation methods and biological relevance of organic acids and lactic acid enantiomers. *Journal of Chromatography B*, v. 781,, p. 39–56,2002.
- (31) Talasniemi, J. P. et al. Analytical investigation: Assay of d-lactate in diabetic plasma and urine. *Clinical Biochemistry*. v. 41,p. 1099–1103, 2008a.
- (32) Faude, O; Kindermann, W; Meyer, T. Lactate Threshold Concepts. *Sports Medicine*.v. 39,p. 469–490, 2009.
- (33) Talasniemi, J. P. et al. Analytical investigation: Assay of d-lactate in diabetic plasma and urine. *Clinical Biochemistry*, v. 41, p. 1099–1103,2008b.
- (34) Gaesser, G.A; Poole, D.C. Blood lactate during exercise: time course of training adaptation in humans *Int. J. sports Med.*, v.9, p. 284-288, 1988.
- (35) Freund, H; Oyono-Enguelle, S. The effect of supramaximal exercise on the recovery kinetics of lactate *Schweiz Z Sportmed*, v. 39, p. 65-76, 1991.
- (36) Noy, G.A; Buckle, A.L.J; Alberti, K.G.M.M. Continuous monitoring in vivo of blood glucose, lactate, alanine and 3-hydroxybutyrate *Clin. Chim. Acta*, v. 89 p. 135-144, 1978.
- (37) Mitsubayashi, K; Suzuki, M; Tamiya, E. I. Karube Analysis of metabolites in sweat as a measure of physical condition *Anal. Chim. Acta*, v 289, p. 27-34, 1994.
- (38) Lowinsohn, D; Bertotti, M. Desenvolvimento de Um Sensor Para Análise de Lactato Em Amostras Alimentares e Biológicas, São Paulo, 2007.

- (39) Bertaso, A; De Palo, E. F; Cirielli, V; Tagliaro, F. Lactate Determination in Human Vitreous Humour by Capillary Electrophoresis and Time of Death Investigation. *Electrophoresis*. v. 41, 2020.
- (40) Kubáň, P. et.al. Sub-Minute Analysis of Lactate from a Single Blood Drop Using Capillary Electrophoresis with Contactless Conductivity Detection in Monitoring of Athlete Performance. *Molecules* v. 26,2021.
- (41) van Hoovels, K. et.al. Can Wearable Sweat Lactate Sensors Contribute to Sports Physiology? *ACS Sensors*. American Chemical Society October v. 22, p. 3496–3508, 2021.
- (42) Jia, W.et. al. Electrochemical Tattoo Biosensors for Real-Time Noninvasive Lactate Monitoring in Human Perspiration. *Analytical Chemistry* 2013, v. 85,p. 6553–6560, 2013.
- (43) Saha, T. et.al. Osmotically Enabled Wearable Patch for Sweat Harvesting and Lactate Quantification. *Micromachines*. v.12. p.1-7,2021.
- (44) Śliwowski, R. et.al. Wiecek Changes in the anaerobic threshold in an annual cycle of sport training of young soccer players. *Biol. sport*, v. 30, p. 137-143, 2013.
- (45) Tanner, R.K; Fuller, K.L; Ross, M.L.R. Evaluation of three portable blood lactate analysers: lactate pro, lactate scout and lactate plus *Eur. J. Appl. Physiology*, v. 109, p. 551-559, 2010.
- (46) Bonaventura, J.M. et. al. Reliability and accuracy of six hand-held blood lactate analysers. *J. Sports Sci. Med.*, v. 14, p. 203-214, 2015.
- (47) Onor, M. et al. Potentiometric sensor for noninvasive lactate determination in human sweat. *Analytica Chimica Acta*, v. 989, p. 80–87, 2017.
- (48) Mathiapparanam S, et al. Rapid chloride and bicarbonate determination by capillary electrophoresis for confirmatory testing of cystic fibrosis infants with volume-limited sweat specimens. *Journal of Cystic Fibrosis*. p. 66–72, 2023.

- (49) Galli, V; García, A; Saavedra, L; Barbas, C. Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples. *Electrophoresis*. v. 24. p.1951–1981,2023.
- (50) Snow, N.H. Solid-phase micro-extraction of drugs from biological matrices. *J Chromatogr A*.v. 885.p.445–455, 2000.
- (51) Pedersen-Bjergaard, S, Rasmussen K.E, Grønhaug H. T. Liquid–liquid extraction procedures for sample enrichment in capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A*.v.902. p. 91–105, 2000.
- (52) Jin, Mingliang et al. Direct electrochemical determination of pyruvate in human sweat by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 22,p. 2793-2796, 2001.
- (53) Hirokawa, T. et.al. Simultaneous monitoring of inorganic cations, amines and amino acids in human sweat by capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*. v. 581, p. 83–88, 2007.
- (54) Terasawa, J.et al. Quantitative determination of K⁺, NH₄⁺, Na⁺, Ca²⁺ and Mg²⁺ cations in secreted human sweat by capillary zone electrophoresis. *Bunseki Kagaku*.v.50. p. 813-817,2001.
- (55) Dubot, P. et.al. Sweat Chloride Quantification Using Capillary Electrophoresis. *Practical Laboratory Medicine*. v. 13, 2019.
- (56) Hirokawa, T. et. al. Simultaneous Monitoring of Inorganic Cations, Amines and Amino Acids in Human Sweat by Capillary Electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*. v. 581.p.83–88, 2007.
- (57) Fracassi Da S, J. A.; Guzman, N.; Do Lago, C. L. Contactless Conductivity Detection for Capillary Electrophoresis Hardware Improvements and Optimization of the Input-Signal Amplitude and Frequency. *Journal of Chromatography A*. v. 942, p. 249-258, 2002.
- (58) Wan Q.J et al.. Determination of major inorganic ions in blood serum and urine by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Anal Chim Acta*. v. 525.p.11–16,2004.

- (59) Da Silva J. A. F; Ricelli,N.L, Carvalho, A.Z; Do Lago, C.L. Improved separation of IA and IIA metal cations in matrices with high sodium concentration by capillary electrophoresis with contactless conductometric detection. *J Brazil Chem Soc.* v. 14: p.265–268,2003.
- (60) Tůma, P; Samcová, E; Duška, F. Determination of ammonia, creatinine and inorganic cations in urine using CE with contactless conductivity detection. *J Sep Sci.*v. 31.p. 2260–2264,2008.
- (61) Kubáň, P; Hauser, P.C. Evaluation of microchip capillary electrophoresis with external contactless conductivity detection for the determination of major inorganic ions and lithium in serum and urine samples. *Lab Chip.*v. 8. p.1829-1836
- (62) Strieglerová, L; Kubáň, P; Boček, P. Rapid and simple pretreatment of human body fluids using electromembrane extraction across supported liquid membrane for capillary electrophoretic determination of lithium. *Electrophoresis.*v.32: p.1182–1189,2011
- (63) Doan, T.K.O et al.. Analysis of inorganic cations in biological samples by the combination of micro-electrodialysis and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *Electrophoresis.*v.32.p.464–471,2011.
- (64) Kiplagat, I.K.et al.Use of disposable open tubular ion exchange pre-columns for in-line clean-up of serum and plasma samples prior to capillary electrophoretic analysis of inorganic cations. *J Chromatogr A.*v.1218.p.856–859,2011.
- (65) Mori, M.et al. Capillary ion electrophoresis–capacitively coupled contactless conductivity detection of inorganic cations in human saliva on a polyvinyl alcohol-coated capillary. *Anal Bioanal Chem.*v. 402. p.2425–2430,2012.
- (66) Silva, M.et al.Electromembrane extraction and capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection: multi-extraction capabilities to

analyses trace metals from saline samples. *Electrophoresis*. v.39. p.2152–2159,2018.

(67) Dosedělová, V.et al. Analysis of bicarbonate, phosphate and other anions in saliva by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection in diagnostics of gastroesophageal reflux disease. *Electrophoresis*.v. 41.p.116–122,2019.

(68) Zhao S.et al. Determination of oxalate and citrate in urine by capillary electrophoresis using solid-phase extraction and capacitively coupled contactless conductivity based on an improved mini-cell. *J Sep Sci*.v.41.p.2623–2631,2018.

(69) Alhusban, A.A.et al. Automated online monitoring of lactate and pyruvate in tamoxifen resistant MCF-7 cells using sequential-injection capillary electrophoresis with contactless conductivity detection (SI-CE-C4D) and correlation with MCT1 and MCT4 genes expression. *J Liquid Chromatogr Relat Technol*.v. 45.p.18–27,2022.

(70) Tůma,P. Rapid monitoring of arrays of amino acids in clinical samples using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *J Sep Sci*.v.33.p.2394–2401,2010.

(71) Coufal P.et al. Separation of twenty underivatized essential amino acids by capillary zone electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*.v. 24: p.671–677,2003.

(72) Tůma, P; Samcová, E; Andělová, K. Determination of free amino acids and related compounds in amniotic fluid by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *J Chromatogr B*.v. 839: p.12–18,2006.

(73) Samcová, E; Tůma, P. Determination of proteinogenic amino acids in human plasma by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electroanalysis*.v.18: p.152–157,2006.

- (74) Strieglerová, L; Kubáň, P; Boček, P. Electromembrane extraction of amino acids from body fluids followed by capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection. *J Chromatogr A*.v.1218.p.6248–6255, 2011.
- (75) Pormsila, W. et al. Quantification of plasma lactate concentrations using capillary electrophoresis with contactless conductivity detection. *Electrophoresis*, v. 32, n. 8, p. 884–889, 2011.
- (76) BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resolução de Diretoria Colegiada. RDC nº166/2017, de 24 de julho de 2017.
- (77) Dos Santos, D. M. et al. Matrix Effect on Butyltin Analysis of Sediments and Fish Tissues by GC-PFPD. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 24,p. 998-1005, 2013.
- (78) Neto, B. B; Pimentel, M. F; Araújo, M. C. V. Recomendações para calibração em química analítica - parte i. Fundamentos e calibração com um componente (calibração univariada). *Química Nova*, v. 25 , p. 856 – 865, 2002.
- (79) Gaš, B; Kenndler, E. System zones in capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, v. 25, p. 3901–3912, 2004.
- (80) Jaroš, M; Hruška, V; Štědrý, M; Zusková, I; Gaš, B. Eigenmobilities in background electrolytes for capillary zone electrophoresis: IV. Computer program PeakMaster. *Electrophoresis*. v. 25. p 3080–3085, 2004.
- (81) Bilbao, E. et.al. Electrochemical Sweat Sensors. *Chemosensors*, v.11, p. 244, 2023.
- (82) Promphet, N. et. al. Non-invasive textile based colorimetric sensor for the simultaneous detection of sweat pH and lactate. *Talanta*, v.192, p. 424 - 430, 2019.

(83) Kuşbaz, A. et.al. Lactate detection by colorimetric measurement in real human sweat by microfluidic-based biosensor on flexible substrate. *Journal of the Textile Institute*. v.110, p. 1725–1732, 2019.

(84) Kim, H. et.al. Colorimetric Sensing of Lactate in Human Sweat Using Polyaniline Nanoparticles-Based Sensor Platform and Colorimeter. *Biosensors (Basel)*, v. 12. p. 248, 2022.

(85) Yüzer, E. et.al. Smartphone embedded deep learning approach for highly accurate and automated colorimetric lactate analysis in sweat. *Sens Actuators B Chem*, v. 371. 2022.

(86) Rocha, K. N; Da Silva, J. A. F; De Jesus, D. P. Capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection (C⁴D) for rapid and simple determination of lactate in sweat. *Electrophoresis*, p. 1-8, 2023.