

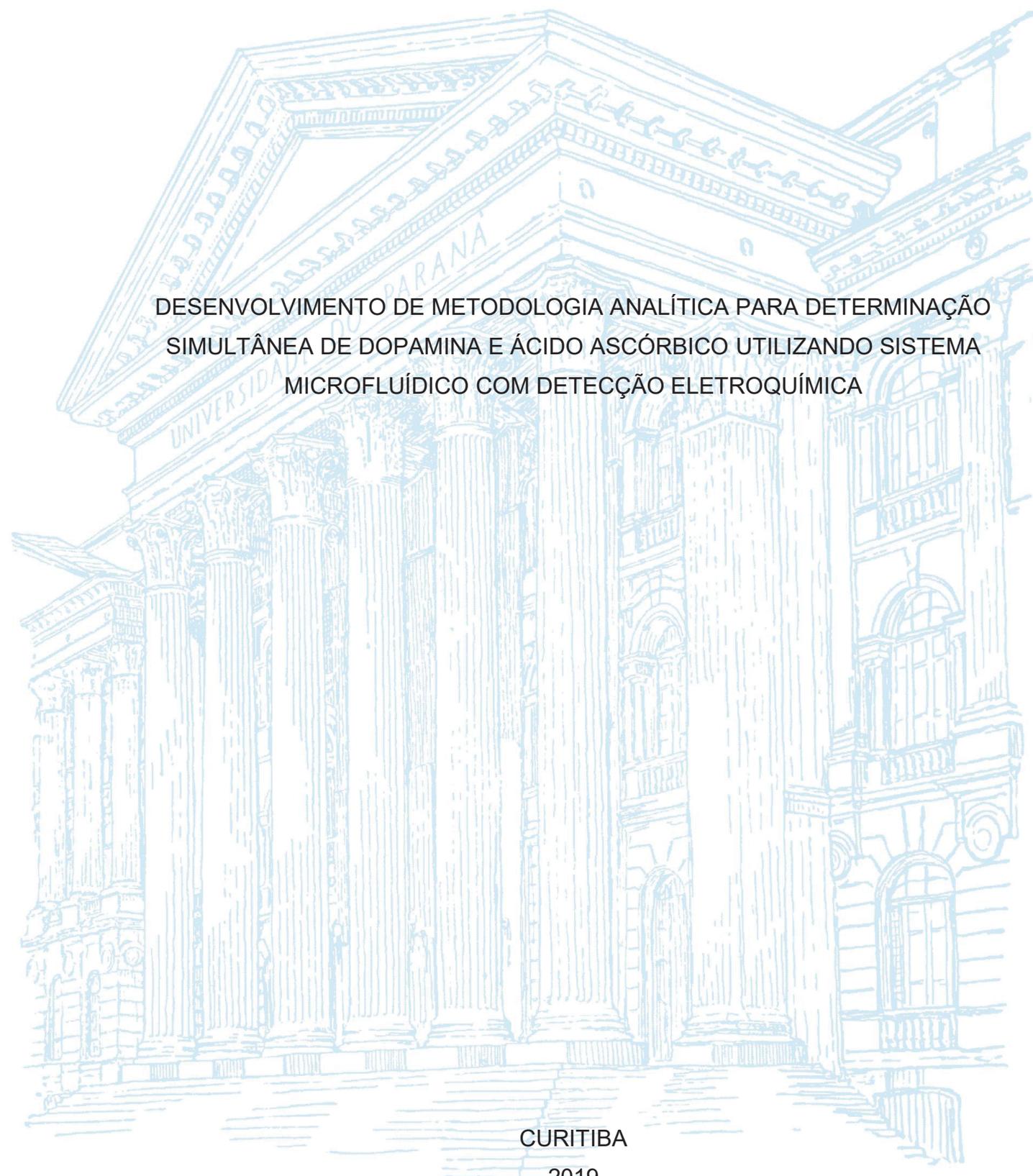
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VANESSA WOSGRAU DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO  
SIMULTÂNEA DE DOPAMINA E ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO SISTEMA  
MICROFLUÍDICO COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA

CURITIBA

2019



VANESSA WOSGRAU DOS SANTOS

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO  
SIMULTÂNEA DE DOPAMINA E ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO SISTEMA  
MICROFLUÍDICO COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino-Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

---

S237d Santos, Vanessa Wosgrau dos  
Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação simultânea de dopamina e ácido ascórbico utilizando sistema microfluídico com detecção eletroquímica [recurso eletrônico] / Vanessa Wosgrau dos Santos – Curitiba, 2019.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino Júnior  
Coorientador: Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini

1. Dopamina. 2. Ácido ascórbico. 3. Dispositivos fluidicos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Marcolino Júnior, Luiz Humberto. III. Bergamini, Márcio Fernando. IV. Título.

CDD: 615.1901

---

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA -  
40001016026P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **VANESSA WOSGRAU DOS SANTOS** intitulada: **DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE DOPAMINA E ÁCIDO ASCÓRBICO UTILIZANDO SISTEMA MICROFLUÍDICO COM DETECÇÃO ELETROQUÍMICA**, sob orientação do Prof. Dr. LUIZ HUMBERTO MARCOLINO JUNIOR, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 31 de Outubro de 2019.



LUIZ HUMBERTO MARCOLINO JUNIOR

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



GINBERTO ABATE

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



DEONIR AGUSTINI

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Humberto Marcolino-Júnior, e meu coorientador Prof. Dr. Márcio Fernando Bergamini, por toda a ajuda e orientação desde o meu estágio obrigatório da graduação, realizado no LabSenSe até o final do mestrado.

Ao Programa de pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná, por toda a estrutura disponibilizada.

Ao Prof. Dr. Gilberto Abate e ao Dr. Deonir Agustini pelas valiosas contribuições feitas no meu exame de qualificação, e por aceitarem me avaliar novamente na defesa da dissertação de mestrado.

À minha família pelo apoio e compreensão nos momentos mais difíceis da jornada.

Ao meu noivo, Thiago Marena, por estar sempre presente e me ajudar muito.

Aos meus amigos que acompanharam de perto minha trajetória e sempre torceram por mim.

Aos amigos do LabSenSe, que sempre me ajudaram em tudo que precisei, tanto no dia-a-dia do laboratório quanto em questões relacionadas às disciplinas, experimentos e documentos do mestrado, em especial à Cristiane Kalinke.

Ao Grupo Educacional Bom Jesus, pela flexibilidade que me proporcionou, fazendo possível conciliar o trabalho e o mestrado.

## RESUMO

Neste trabalho foi proposta uma metodologia para determinação simultânea de ácido ascórbico (AA) e dopamina (DA) utilizando a técnica amperometria de múltiplos pulsos (MPA) e um dispositivo microfluídico ( $\mu$ TED). As duas substâncias são eletroativas, sendo que a reação de oxidação do AA é irreversível e a reação de oxidação da DA é reversível. Para determinar ácido ascórbico e dopamina simultaneamente por meio de técnicas eletroquímicas é preciso superar uma limitação: o fato de os potenciais de oxidação das duas substâncias serem muito próximos. A técnica MPA possui um diferencial em relação à amperometria convencional: a possibilidade de se aplicar mais de um potencial sobre uma mesma amostra que contenha mais de uma substância eletroativa, com potenciais redox diferentes. Na metodologia proposta, foi possível, a partir dos sinais de corrente gerados na redução da dopamina o-quinona, calcular um fator de correção para os sinais de oxidação do ácido ascórbico, sendo possível quantificar os dois analitos simultaneamente. A metodologia foi desenvolvida num dispositivo microfluídico impresso em impressora 3D, ao qual foram acoplados um eletrodo impresso e um canal microfluídico composto por fios têxteis. Os dispositivos microfluídicos trazem muitas vantagens como: possibilidade de portabilidade para uso em pontos de atendimento, alta sensibilidade e frequência analítica, baixo consumo de reagentes e amostra e geração de pouca quantidade de resíduos. O dispositivo se mostrou adequado à metodologia proposta. Foi possível, a partir de uma determinação simultânea de DA e AA, construir duas curvas analíticas, uma para cada analito, fazendo uso do fator de correção calculado. Os limites de detecção de DA e AA foram, respectivamente:  $1,54 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $5,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Foi realizado um estudo de interferentes que demonstrou que a presença de ácido úrico, glicose e cloreto de sódio não alteram significativamente as correntes de oxidação e redução dos analitos.

Palavras-chave: Dopamina. Ácido ascórbico. Determinação simultânea. Dispositivo microfluídico. Amperometria de múltiplos pulsos.

## ABSTRACT

In this work, a methodology for simultaneous determination of ascorbic acid (AA) and dopamine (DA) was proposed, using the multiple pulse amperometric technique (MPA) and a microfluidic device ( $\mu$ TED). DA and AA are electroactive, the oxidation reaction of AA is irreversible and the oxidation reaction of DA is reversible. To determine ascorbic acid and dopamine simultaneously by electrochemical techniques, one limitation must be overcome: the oxidation potential of the two substances are very close. The MPA technique has a differential compared to conventional amperometry: it is possible to apply more than one potential on the same sample that contains more than one electroactive substance, with different redox potentials. In the proposed methodology, it was possible, from the current signals generated in the reduction of dopamine o-quinone, to calculate a correction factor for the ascorbic acid oxidation signals, being possible to quantify both analytes. A methodology was developed in a microfluidic device printed on a 3D printer, to which were coupled a printed electrode and a microfluidic channel composed of textile wires. Microfluidic devices offer many advantages such as portability for point-of-care use, high sensitivity and analytical frequency, low reagent and sample consumption, and low residue generation. The device proved to be appropriate to the proposed methodology. It was possible, from a simultaneous analysis of DA and AA, to create two analytical curves, one for each analyte, using the calculated correction factor. The limits of detection for DA and AA were, respectively:  $1.54 \mu\text{mol L}^{-1}$  and  $5.13 \mu\text{mol L}^{-1}$ . An interferent study was performed that demonstrated the presence of uric acid, glucose and sodium chloride, which did not change the oxidation current and analyte reduction statistics.

Keywords: Dopamine. Ascorbic acid. Simultaneous determination. Microfluidic device. Multiple pulse amperometry.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – USO DE BIOMARCADORES.....	16
FIGURA 2 – REAÇÃO REVERSÍVEL DE OXIDAÇÃO DA DOPAMINA .....	19
FIGURA 3 – REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO.....	21
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DE VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DA DOPAMINA (DA), ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) E MISTURA DOS DOIS ANALITOS (AA+DA).....	23
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DE UM AMPEROGRAMA (CORRENTE ELÉTRICA EM FUNÇÃO DO TEMPO).....	25
FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DE UM AMPEROGRAMA (CORRENTE ELÉTRICA EM FUNÇÃO DO TEMPO) DE UMA ANÁLISE POR MPA COM APLICAÇÃO DE DOIS POTENCIAIS DIFERENTES.....	26
FIGURA 7 – AMPEROGRAMAS OBTIDOS NA MPA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CAFEÍNA, IBUPROFENO E PARACETAMOL.....	28
FIGURA 8 – SINAIS TRANSIENTES RELATIVOS À REDUÇÃO DA o-DQ E CURVA ANALÍTICA PARA DOPAMINA. ....	29
FIGURA 9 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO $\mu$ TED E SUAS DIMENSÕES, SENDO (1) RESERVATÓRIO DE ENTRADA; (2) RESERVATÓRIO DE SAÍDA; (3) REGIÃO DE DETECÇÃO; (4) PLACAS DE VIDRO EMPILHADAS; (5) ELETRODOS DE GRAFITE.....	31
FIGURA 10 - ELETRODO IMPRESSO UTILIZADO NA METODOLOGIA PROPOSTA ...	35
FIGURA 11 – ESTRUTURA DO $\mu$ TED UTILIZADO NO TRABALHO. ....	36
FIGURA 12 - DISPOSITIVO $\mu$ TED PRONTO PARA USO. CONECTOR DE ELETRODO IMPRESSO (A); ELETRODO IMPRESSO (B); REGIÃO DE DETECÇÃO (C); REGIÃO DO CANAL MICROFLUÍDICO ONDE É FEITA A INJEÇÃO (D); RESERVATÓRIO DE ENTRADA (E); RESERVATÓRIO DE SAIDA (F).37	
FIGURA 13 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA O AA (A) E DA (B) EM CONCENTRAÇÕES DE 1,0 mmol L <sup>-1</sup> EM TAMPÃO FOSFATO 0,10 mol L <sup>-1</sup> pH 4,0 E pH 7,0.....	44
FIGURA 14 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA DA E AA EM CONCENTRAÇÃO DE 0,10 mmol L <sup>-1</sup> , EM SOLUÇÃO DE H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,20 mol L <sup>-1</sup> .....	45

FIGURA 15 – ESTUDO DE POTENCIAIS DE OXIDAÇÃO DE DA E AA (A) E REDUÇÃO DA DOPAMINA O-QUINONA (B). ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSFATO PH 4,0. ....	47
FIGURA 16 - ESTUDO DE POTENCIAIS DE OXIDAÇÃO DE DA E AA (A) E REDUÇÃO DA o-DQ (B). ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSFATO pH 7,0. ....	47
FIGURA 17 - ESTUDO DE POTENCIAIS DE OXIDAÇÃO DE DA E AA (A) E REDUÇÃO DA o-DQ (B). ELETRÓLITO: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,20 mol L <sup>-1</sup> . ....	48
FIGURA 18 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO VOLUME DE INJEÇÃO NAS INTENSIDADES DE CORRENTES DE OXIDAÇÃO (A) E REDUÇÃO (B). ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSFATO pH 4,0. POTENCIAIS APLICADOS NA MPA: 0,4 E -0,1 V. ....	49
FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE PULSO NAS INTENSIDADES DE CORRENTES DE OXIDAÇÃO (A) E REDUÇÃO (B). ELETRÓLITO: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,20 mol L <sup>-1</sup> . POTENCIAIS APLICADOS NA MPA: 0,65 E -0,1 V. ....	51
FIGURA 20 - AMPEROGRAMAS OBTIDOS PARA DETERMINAÇÃO MPA EM pH 4,0. SOLUÇÕES ANALISADAS EM TRIPLICATA: DA 1,0 mmol L <sup>-1</sup> (DA); AA 1,0 mmol L <sup>-1</sup> (AA) E MISTURA DE DA E AA 1,0 mmol L <sup>-1</sup> (DA + AA) POTENCIAIS APLICADOS: 0,4 V (—) E -0,1 V (—).....	52
FIGURA 21 - AMPEROGRAMAS OBTIDOS PARA DETERMINAÇÃO MPA EM pH 7,0. SOLUÇÕES ANALISADAS EM TRIPLICATA: DA 1,0 mmol L <sup>-1</sup> (DA); AA 1,0 mmol L <sup>-1</sup> (AA) E MISTURA DE DA E AA 1,0 mmol L <sup>-1</sup> (DA + AA). POTENCIAIS APLICADOS: 0,4 V (—) E -0,1 V.....	53
FIGURA 22 – ANÁLISE POR MPA EM SOLUÇÃO 0,20 mol L <sup>-1</sup> DE H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . SOLUÇÕES ANALISADAS EM TRIPLICATA: DA 0,10 mmol L <sup>-1</sup> (DA); AA 0,10 mmol L <sup>-1</sup> (AA) E MISTURA DE DA E AA 0,10 mmol L <sup>-1</sup> (DA + AA). POTENCIAIS APLICADOS: 0,65 V (—) E -0,1 V (—).....	54
FIGURA 23 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE OXIDAÇÃO DE DA, AA E MISTURA EQUIMOLAR DOS DOIS ANALITOS, EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO pH DO TAMPÃO FOSFATO 0,10 mol L <sup>-1</sup> . POTENCIAIS APLICADOS: 0,4 V E -0,1 V.....	55
FIGURA 24 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE REDUÇÃO DE DA, E MISTURA EQUIMOLAR DOS DOIS ANALITOS, EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO pH	

	DO TAMPÃO FOSFATO 0,10 mol L <sup>-1</sup> . POTENCIAIS APLICADOS: 0,40 V E -0,10 V.....	56
FIGURA 25 -	AMPEROGRAMAS REFERENTES À ANALISE DE SOLUÇÕES DE DA (1,0 mmol L <sup>-1</sup> ) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AA. (A: 0,0; B: 0,1; C: 0,4; D: 0,7; E: 1,0 mmol L <sup>-1</sup> ). ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO FOSFATO pH 4,0. POTENCIAIS APLICADOS: 0,4 V (—) E -0,1 V (—)....	57
FIGURA 26 -	REAÇÃO ENTRE ÁCIDO ASCÓRBICO E DOPAMINA O-QUINONA. (AA: ÁCIDO ASCÓRBICO; DA: DOPAMINA; O-DQ: DOPAMINA O-QUINONA; DHA: ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO.).....	58
FIGURA 27 -	AMPEROGRAMAS (N=3) OBTIDOS APÓS ADIÇÕES DE DA 1,0 mmol L <sup>-1</sup> COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AA (A: 0,0; B: 0,25; C: 0,5; D: 0,75; E: 1,0; F: 1,25; G: 1,5; H: 1,75; I: 2,0 mmol L <sup>-1</sup> ). ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO FOSFATO pH 7,0. POTENCIAIS APLICADOS: 0,4 V E -0,1 V. ....	59
FIGURA 28 -	AMPEROGRAMAS OBTIDOS (N=3) APÓS ADIÇÕES DE SOLUÇÕES DE DA (0,10 mmol L <sup>-1</sup> ) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AA (A: 0,1; B: 0,2; C: 0,4; D: 0,6; E: 0,8; F: 1,0 mmol L <sup>-1</sup> ;. ELETRÓLITO SUPORTE: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,20 mol L <sup>-1</sup> . POTENCIAIS APLICADOS: 0,65 e -0,1 V.	59
FIGURA 29 -	AMPEROGRAMAS OBTIDOS (N=3) APÓS ADIÇÕES DE SOLUÇÕES DE DA (0,01 a 0,9 mmol L <sup>-1</sup> ). ELETRÓLITO SUPORTE: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,20 mol L <sup>-1</sup> . POTENCIAIS APLICADOS: 0,65 e -0,1 V. ....	61
FIGURA 30 -	AMPEROGRAMAS OBTIDOS (N=3) APÓS ADIÇÕES DE SOLUÇÕES DE DA E AA (0,01 a 0,9 mmol L <sup>-1</sup> ). ELETRÓLITO SUPORTE: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,20 mol L <sup>-1</sup> . POTENCIAIS APLICADOS: 0,65 e -0,1 V. ....	63
FIGURA 31 –	CURVAS ANALÍTICAS CONSTRUÍDAS PARA DA, AA E AA+DA.....	64
FIGURA 32 -	AMPEROGRAMAS OBTIDOS (N=3) APÓS ADIÇÕES DE SOLUÇÕES DE AA (0,01 a 0,9 mmol L <sup>-1</sup> ). ELETRÓLITO SUPORTE: H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,20 mol L <sup>-1</sup> . POTENCIAIS APLICADOS: 0,65 e -0,1 V. ....	66
FIGURA 33 –	COMPARAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PARA O ÁCIDO ASCÓRBICO.....	66
FIGURA 34 –	VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA MISTURAS DE DOPAMINA, ÁCIDO ASCÓRBICO E ÁCIDO ÚRICO EM CONCENTRAÇÃO DE 0,10 mmol L <sup>-1</sup> .....	67

FIGURA 35 – AMPEROGRAMAS OBTIDOS NA ANÁLISE DA SOLUÇÃO CONTROLE, NÍVEIS 1, 2 E 3 DE ÁCIDO ÚRICO (A); CORRENTES RELATIVAS DE OXIDAÇÃO (B) E REDUÇÃO (C).....	69
FIGURA 36 - AMPEROGRAMAS OBTIDOS NA ANÁLISE DA SOLUÇÃO CONTROLE, NÍVEIS 1, 2 E 3 DE GLICOSE (A); CORRENTES RELATIVAS DE OXIDAÇÃO (B) E REDUÇÃO (C).....	70
FIGURA 37 - AMPEROGRAMAS OBTIDOS NA ANÁLISE DA SOLUÇÃO CONTROLE, NÍVEIS 1, 2 E 3 DE CLORETO DE SÓDIO (A); CORRENTES RELATIVAS DE OXIDAÇÃO (B) E REDUÇÃO (C).....	71
FIGURA 38 – AMPEROGRAMA OBTIDO DA ANÁLISE POR MPA DE SEIS SOLUÇÕES DE DA+AA, EM ORDEM CRESCENTE DE CONCENTRAÇÃO (A), AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO SEM ADIÇÃO (B), AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO COM ADIÇÃO DE DA E AA EM TRÊS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO (C) E SOLUÇÕES DE DA+AA EM ORDEM DECRESCENTE DE CONCENTRAÇÃO (D).....	73
FIGURA 39 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS NO SENTIDO CRESCENTE E DECRESCENTE DE CONCENTRAÇÃO (OXIDAÇÃO) .....	74
FIGURA 40 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS NO SENTIDO CRESCENTE E DECRESCENTE DE CONCENTRAÇÃO (REDUÇÃO) .....	74

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – PONTOS DAS CURVAS ANALÍTICAS CONSTRUÍDAS. ....	41
TABELA 2 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE DA E AA ADICIONADOS À AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO.....	43
TABELA 3 – POTENCIAIS (EM VOLTS) DE PICO OBTIDOS NA VOLTAMETRIA CÍCLICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DOPAMINA EM CADA ELETRÓLITO TESTADO. ....	46
TABELA 4 – PARES DE POTENCIAIS ESCOLHIDOS (EM VOLTS) PARA A MPA PARA CADA ELETRÓLITO TESTADO.....	48
TABELA 5 – CÁLCULO DA RAZÃO ENTRE OS SINAIS CATÓDICO E ANÓDICO DA DOPAMINA. ....	61
TABELA 6 – VALORES DE CORRENTE PARA DOPAMINA E ÁCIDO ASCÓRBICO. ....	64
TABELA 7 – FIGURAS DE MÉRITO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA ÁCIDO ASCÓRBICO E DOPAMINA.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

DA	- Dopamina
AA	- Ácido ascórbico
UA	- Ácido úrico
o-DQ	- Dopamina o-quinona
MPA	- Amperometria de múltiplos pulsos
FIA	- Análise por injeção em fluxo
LOD	- Limite de detecção
LOQ	- Limite de quantificação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 BIOMARCADORES E NEUROTRANSMISSORES .....	16
1.2 DOPAMINA .....	17
1.3 ÁCIDO ASCÓRBICO.....	19
1.4 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DOPAMINA.....	21
1.5 AMPEROMETRIA MÚLTIPLOS PULSOS .....	25
1.6 MICROFLUÍDICA .....	30
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
3.1 SOLUÇÕES E AMOSTRA.....	34
3.2 ELETRODO IMPRESSO .....	34
3.3 SISTEMA MICROFLUÍDICO $\mu$ TED .....	35
3.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS .....	38
3.5 METODOLOGIA.....	38
3.5.1 COMPORTAMENTO VOLTAMÉTRICO DOS ANALITOS .....	38
3.5.2 ESTUDO DE POTENCIAIS .....	39
3.5.3 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS .....	39
3.5.3.1 Volume de injeção .....	39
3.5.3.2 Tempo de pulso .....	40
3.5.4 ESTUDOS PRELIMINARES COM O $\mu$ TED.....	40
3.5.5 ESTUDO DE PH DO TAMPÃO FOSFATO.....	40
3.5.6 ESTUDOS COM MISTURAS DE DOPAMINA E ÁCIDO ASCÓRBICO .....	41
3.5.7 ESTUDOS DE QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DOS ANALITOS .....	41
3.5.8 ESTUDOS DE INTERFERENTES.....	42
3.5.9 ESTUDOS COM AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO .....	43
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
4.1 ESTUDOS PRELIMINARES UTILIZANDO VOLTAMETRIA CÍCLICA .....	44
4.2 DEFINIÇÃO DE POTENCIAIS.....	46
4.3 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS .....	49
4.3.1 VOLUME DE INJEÇÃO .....	49

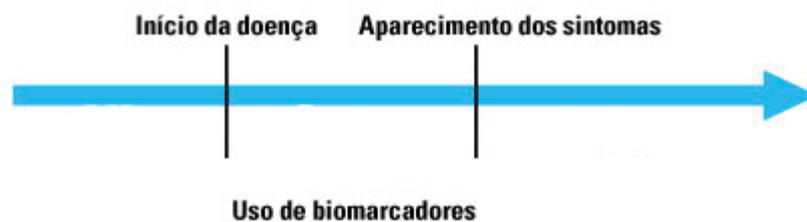
4.3.2 TEMPO DE PULSO.....	50
4.4 ESTUDOS PRELIMINARES COM O $\mu$ TED.....	51
4.5 ESTUDO DE PH DO TAMPÃO FOSFATO.....	55
4.6 ESTUDOS COM MISTURAS DE DOPAMINA E ÁCIDO ASCÓRBICO .....	57
4.7 ESTUDOS DE QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DOS ANALITOS .....	60
4.8 ESTUDOS DE INTERFERENTES.....	67
4.9 ESTUDOS COM AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO.....	72
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 BIOMARCADORES E NEUROTRANSMISSORES

Biomarcadores são espécies de interesse biológico utilizados no diagnóstico de doenças. Existem biomarcadores de diversos tipos, porém, os mais relevantes na área médica são os bioquímicos, como células, proteínas, hormônios e enzimas, que podem ser encontrados em diferentes fluidos corporais, tais como sangue, plasma sanguíneo, urina, lágrima, entre outros [1]. Os biomarcadores são utilizados para diagnóstico precoce de doenças, sendo de grande valor para a escolha do tratamento quando avaliados em conjunto com o histórico clínico do paciente. Após o diagnóstico, os biomarcadores continuam sendo úteis para controle do progresso da doença bem como da eficiência do tratamento [2]. A investigação de biomarcadores para diagnóstico de doenças é utilizada em diversas áreas da medicina, no diagnóstico de câncer, doenças neurológicas, cardiovasculares, entre outras [3].

FIGURA 1 – USO DE BIOMARCADORES



FONTE: Adaptado de Bahn et.al. [3]

Entre as espécies de interesse biológico estão também os neurotransmissores, substâncias químicas cuja função é transmitir informações entre os neurônios. A neurotransmissão é uma comunicação química desempenhada por moléculas pequenas, os neurotransmissores, que viajam pelo espaço sináptico para transmitir a informação desejada para outros neurônios. Essa função é importante nos sistemas nervoso, endócrino, central e periférico [4]. Os principais neurotransmissores incluem dopamina, acetilcolina, serotonina, epinefrina, noradrenalina, óxido nítrico, glutamato e triptamina. Os neurotransmissores

desempenham um papel importante em muitas funções cerebrais, incluindo comportamento e cognição. Eles regulam o aprendizado, sono, memória, consciência, humor e apetite [5].

Quando os neurotransmissores não desempenham adequadamente suas funções, ou estão presentes em quantidades anormais, são sinais de problemas mentais e algumas doenças graves, como a doença de Parkinson, Alzheimer e esquizofrenia. Portanto, o monitoramento das concentrações de vários neurotransmissores é de grande importância no estudo e diagnóstico de tais doenças mentais, uma vez que informações úteis para o diagnóstico de doenças podem ser obtidas a partir dos valores de concentração desses compostos em fluidos biológicos [6, 7].

O diagnóstico preciso e rápido de doenças graves é fundamental para fornecer o melhor tratamento e aumentar as chances de cura. Em países desenvolvidos, exames clínicos são realizados em laboratórios bem equipados e modernos. Porém, essa não é a realidade de países em desenvolvimento, em regiões que não dispõem de laboratórios bem equipados a uma distância alcançável [8].

Nesse contexto, a necessidade de procedimentos mais rápidos e práticos com a possibilidade de realização de exames clínicos essenciais em locais afastados e/ou pouco desenvolvidos utilizando medidores portáteis é uma demanda crescente nos últimos anos. Atualmente, as pesquisas caminham no sentido de possibilitar a ida do laboratório até a amostra, proporcionando rapidez na entrega de resultados, além de menor risco de contaminação das amostras, maior praticidade, menor custo, e facilidade no monitoramento constante de pacientes [1, 8].

## 1.2 DOPAMINA

A dopamina (3,4-dihidroxi-feniletilamina) é um dos mais importantes neurotransmissores da família das catecolaminas que desempenha funções essenciais no organismo dos mamíferos, nos sistemas nervoso, hormonal, cardiovascular e endócrino. Essa substância participa do controle de funções cognitivas, como estresse, comportamento e atenção, além de participar no controle das emoções no corpo humano [9]. Nos fluidos humanos e tecidos do cérebro, a

dopamina está presente na forma de um cátion orgânico [10]. A diminuição do nível de dopamina está diretamente associada à função motora não controlada [6].

A ação da dopamina depende de seus níveis gerais e de sua atividade concentrada no espaço extracelular do cérebro. O monitoramento *in vivo* de sua dinâmica de concentração no tecido neural é interessante para estudos dos mecanismos que controlam as concentrações de dopamina. A detecção *in vivo* em tempo real, sensível e seletiva da dopamina representa uma das tarefas mais desafiadoras da neurociência, e vários métodos vêm sendo desenvolvidos com este objetivo [11].

A dopamina é um biomarcador, uma vez que concentrações anormais dessa substância no organismo são indicativos de doenças neurológicas, como doença de Parkinson, Alzheimer e esquizofrenia, além de infecção por HIV e outras doenças [12-14].

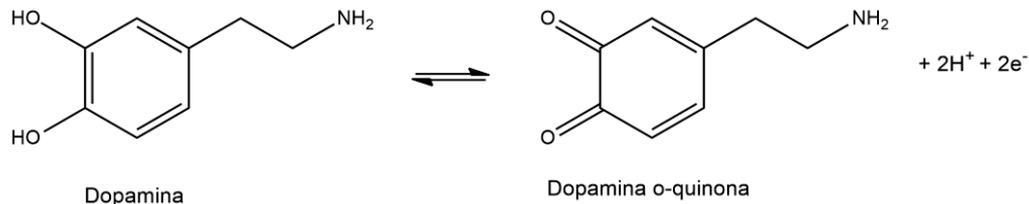
A utilização de dopamina como biomarcador para a doença de Parkinson é muito difundida. Metabólitos da dopamina no sangue, soro e líquido cefalorraquidiano são considerados os mais promissores [15].

A doença ou mal de Parkinson é uma doença degenerativa relacionada à idade que causa tremor e comprometimento motor, sendo a segunda doença degenerativa mais comum. Os neurônios transmissores de dopamina na área substância nigra (região do cérebro em que a dopamina é produzida) morrem, causando uma perda de neurônios secretores de dopamina nessa área. Como medicamento intravenoso, a dopamina influencia o sistema nervoso simpático, produzindo efeitos como aumento da frequência cardíaca e pressão arterial. Para o diagnóstico dessa doença, são necessárias determinações de dopamina em amostras biológicas, como o soro sanguíneo [16].

Existem inúmeros métodos de determinação de dopamina em amostras biológicas, entre eles métodos fluorimétricos [17], cromatográficos [4, 7], espectrofotométricos e de eletroforese capilar [18].

Entre os métodos mais comuns para determinação do biomarcador estão, ainda, os eletroquímicos, devido ao fato da dopamina ser eletroquimicamente ativa. A FIGURA 2 mostra a reação química de oxidação e redução da dopamina. A dopamina possui duas hidroxilas fenólicas facilmente oxidáveis. Assim, a oxidação ocorre por um processo que envolve transferência de dois elétrons, formando dopamina o-quinona, [19].

FIGURA 2 – REAÇÃO REVERSÍVEL DE OXIDAÇÃO DA DOPAMINA



FONTE: O autor (2019).

A dopamina o-quinona, por sua vez pode ser reduzida a dopamina, sendo, portanto, um processo redox reversível.

Recentemente, têm sido desenvolvidos vários trabalhos relacionados à determinação eletroquímica de dopamina em amostras de soro sanguíneo humano. Rahman e colaboradores desenvolveram um eletrodo de óxido de estanho dopado com flúor modificado com nanopartículas de grafeno para detecção simultânea de dopamina e ácido úrico em presença de ácido ascórbico em amostras de soro sanguíneo, e obtiveram um limite de detecção para dopamina de 0,22  $\mu\text{mol L}^{-1}$  [20].

Özcan e colaboradores desenvolveram um sensor eletroquímico descartável e de baixo custo constituído por um eletrodo à base de grafite modificado com polipirrol para determinação seletiva de dopamina em soro sanguíneo e amostras farmacêuticas. Foi obtido um limite de detecção de 0,0025  $\mu\text{mol L}^{-1}$  [21].

### 1.3 ÁCIDO ASCÓRBICO

O ácido ascórbico (vitamina C), um anti-oxidante importante da dieta humana, empregado na prevenção de resfriados e gripes, infertilidade, doenças mentais, escorbuto, doenças hepáticas, câncer e até AIDS.

O ácido ascórbico está presente em diversos alimentos, tais como em legumes, verduras e frutas (principalmente cítricas). Sua ingestão é indispensável, pois os humanos não possuem no organismo enzimas necessárias para sintetizar biologicamente essa vitamina. A ingestão diária recomendada (RDA, do inglês *Recommended Dietary Allowance*) para a vitamina C é de 75 e 90 mg por dia para mulheres e homens, respectivamente [22, 23].

A quantidade de ácido ascórbico em fluidos biológicos é associada a várias doenças, como doença de Parkinson, pedras no rim, diarreia, e vários tipos de câncer. Portanto, além de ser um importante componente da dieta humana e prevenir diversas doenças, o ácido ascórbico é um biomarcador, e sua quantificação em amostras biológicas é de grande importância para diagnóstico e controle de doenças [24].

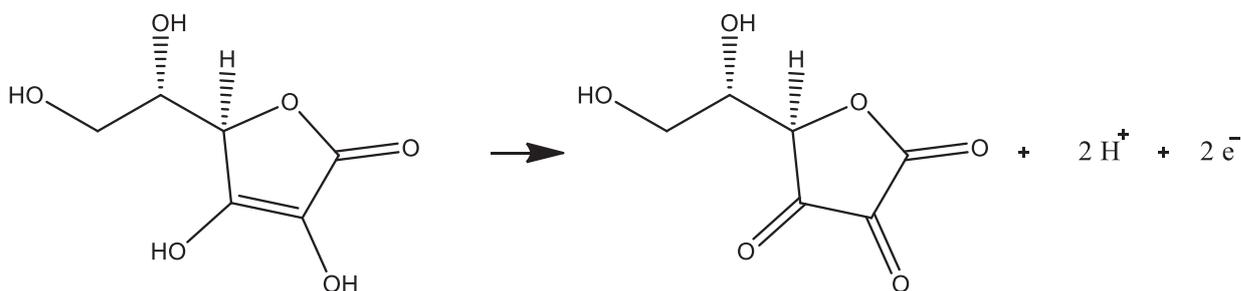
O ácido ascórbico desempenha funções vitais no corpo humano, fisiológicas e bioquímicas. Está associado com a regulação da expressão de genes e transcrição de mRNA, bem como atenuação do processo de envelhecimento e desenvolvimento de câncer. Além disso, o ácido ascórbico é um participante importante em diversos processos dos sistemas nervoso e endócrino [25].

O ácido ascórbico participa de diversos processos biológicos importantes do organismo humano, tanto metabólicos quanto fisiológicos, como na absorção de ferro, síntese de colágeno e hormônios e neutralização de radicais livres [12-14, 23].

Existem diversos métodos analíticos para determinação de ácido ascórbico, em duas vertentes: a determinação em produtos alimentícios (para controle de qualidade) e em amostras biológicas. Nesse sentido, diversos trabalhos relatam o uso de métodos de determinação por fluorimetria [26, 27], espectrometria [28], quimioluminescência [29], eletroforese capilar [30] e cromatografia [31, 32].

O ácido ascórbico, assim como a dopamina, é um composto eletroquimicamente ativo, sendo possível também para esse composto fazer uso de métodos eletroquímicos e desfrutar de suas vantagens já mencionadas. A oxidação do ácido L-ascórbico acontece facilmente envolvendo a liberação de dois elétrons e dois prótons, e formando o ácido L-dehidroascórbico, irreversivelmente [33]. A reação química envolvida está representada na FIGURA 3.

FIGURA 3 – REAÇÃO DE OXIDAÇÃO DO ÁCIDO ASCÓRBICO



FONTE: O autor (2019).

De fato, diversos métodos eletroquímicos de quantificação de ácido ascórbico em amostras biológicas como soro sanguíneo vêm sendo reportados na literatura. Asunción e colaboradores aplicaram um eletrodo de carbono modificado com nanopartículas de ouro para determinação eletroquímica de ácido ascórbico em amostras de soro sanguíneo [34].

Abellán-Llobregat e colaboradores desenvolveram um sensor eletroquímico portátil baseado em nanotubos de carbono modificados com ácido 4-aminobenzóico para a determinação eletroquímica simultânea de ácido ascórbico e ácido úrico em fluidos fisiológicos. O limite de detecção obtido para os analitos foi de  $0,65 \mu\text{mol L}^{-1}$  [35]. Este trabalho é um exemplo de outra tendência observada nas pesquisas envolvendo quantificação eletroquímica de biomarcadores em amostras biológicas: o desenvolvimento de dispositivos portáteis e de baixo custo.

#### 1.4 DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DOPAMINA

Conforme já comentado, é inegável a importância da quantificação de dopamina e ácido ascórbico em amostras biológicas. O fato de essas substâncias coexistirem em várias dessas amostras biológicas como fluido extracelular, soro sanguíneo, lágrimas e urina, e serem biomarcadores, torna essencial o desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos, de baixo custo e com possibilidade de portabilidade, capazes de realizar determinação simultânea destes analitos para fins de diagnóstico e controle de doenças [13].

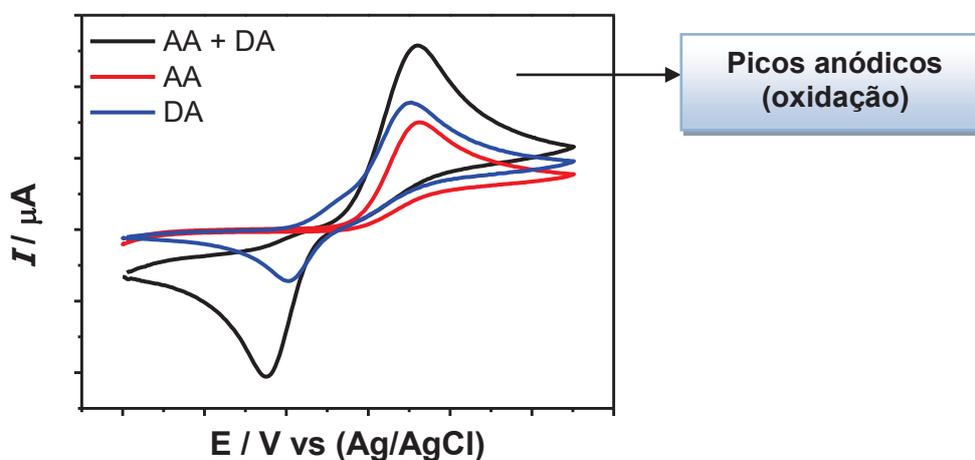
As técnicas eletroquímicas exploram propriedades eletroquímicas dos analitos, a partir de processos de oxidação e redução, e possuem algumas

vantagens com relação às demais técnicas, tais como simplicidade, baixo custo, possibilidade de portabilidade e alta sensibilidade [36-38]. Dopamina e ácido ascórbico são espécies eletroquimicamente ativas [39]. De fato, vários trabalhos na literatura reportam o desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para a determinação destes biomarcadores [40-42].

Existe, porém, um fator que dificulta a determinação simultânea desses dois analitos eletroquimicamente: a oxidação dos dois compostos acontece na mesma região de potencial, em torno de 600 mV (vs Ag/AgCl). Isso faz com que a determinação simultânea dos dois analitos seja dificultada quando eletrodos convencionais sem modificação são utilizados, sendo necessária uma etapa prévia de preparo de amostra para separação dos analitos ou modificação de eletrodo para posterior quantificação [12].

Na FIGURA 4 é representada uma comparação dos voltamogramas cíclicos da dopamina, do ácido ascórbico e de uma mistura das duas substâncias. Os voltamogramas mostram as intensidades de correntes geradas nos processos de oxidação/redução que acontecem com as substâncias em função do potencial aplicado. É possível perceber que, no voltamograma da mistura, o pico anódico é único, não sendo possível, a princípio distinguir a dopamina do ácido ascórbico, pelo fato de os processos de oxidação dos dois compostos acontecerem na mesma região de potencial. O pico anódico referente à mistura pode ser considerado como uma soma dos picos de ácido ascórbico e dopamina, separadamente.

FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO DE VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS DA DOPAMINA (DA), ÁCIDO ASCÓRBICO (AA) E MISTURA DOS DOIS ANALITOS (AA+DA).



Entre os trabalhos reportados na literatura, a estratégia mais utilizada para contornar essa dificuldade na determinação eletroquímica simultânea de dopamina e ácido ascórbico é a modificação de eletrodos, empregada com o objetivo de tornar possível a separação dos picos de oxidação do ácido ascórbico e da dopamina. Entre os tipos de materiais utilizados para modificação de eletrodos para esta determinação simultânea pode-se citar: nanotubos de carbono [43], nanopartículas metálicas [13, 44], polímeros condutores [45], polímeros de impressão molecular [46], e grafeno [47].

Chang e colaboradores prepararam um eletrodo modificado com grafeno, nanopartículas de ouro e  $\beta$ -ciclodextrina para determinar simultaneamente dopamina e ácido ascórbico. A modificação do eletrodo promoveu uma separação dos potenciais de pico anódico de ácido ascórbico e dopamina, permitindo determinar simultaneamente os dois analitos por voltametria de pulso diferencial. Foram obtidos limites de detecção de  $2 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $0,024 \mu\text{mol L}^{-1}$  para ácido ascórbico e dopamina, respectivamente [48].

Nanotubos de carbono também já foram utilizados na modificação de eletrodos para esse tipo de determinação simultânea, como no trabalho de Thirumalai e colaboradores, que utilizaram nanotubos de parede única para modificar um eletrodo de carbono vítreo. Utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial, foi possível separar os potenciais de pico de ácido ascórbico, dopamina e ácido úrico, permitindo quantificar os três analitos com limites de detecção de  $0,6 \text{ nmol L}^{-1}$ ,  $15 \text{ nmol L}^{-1}$ , e  $113 \text{ nmol L}^{-1}$ , respectivamente [43].

Já foram desenvolvidas várias metodologias de determinação simultânea de dopamina, ácido ascórbico e outros analitos em amostras de soro sanguíneo humano, como, por exemplo, no trabalho de Ghanbari e Bonyadi, que desenvolveram um eletrodo de carbono vítreo modificado com um nanocompósito poroso tridimensional de óxido de grafeno com nanofibras de polipirrol e heteroestruturas de óxido de zinco-óxido de cobre com junção p-n para determinação simultânea de ácido ascórbico, dopamina, paracetamol e triptofano. Estudos de voltametria cíclica mostraram a separação dos picos dos quatro analitos, permitindo sua determinação simultânea. Foram obtidos os seguintes limites de detecção:  $0,024 \mu\text{mol L}^{-1}$  para ácido ascórbico,  $0,012 \mu\text{mol L}^{-1}$  para dopamina;  $0,01 \mu\text{mol L}^{-1}$  para paracetamol e  $0,016 \mu\text{mol L}^{-1}$  para triptofano. A metodologia desenvolvida foi utilizada para determinação dessas espécies em amostras reais de soro sanguíneo [49].

Todos esses trabalhos apresentam metodologias de modificação de eletrodos que permitem separar os picos de oxidação da dopamina e ácido ascórbico. Bons resultados já foram alcançados, porém a etapa de modificação do eletrodo pode ser complicada, aumentando o tempo gasto e o custo da metodologia.

Não existem muitos trabalhos reportados que descrevam metodologias eletroquímicas de quantificação de dopamina e ácido ascórbico simultaneamente sem a necessidade de etapa prévia de separação de mistura ou modificação de eletrodos.

Kachosangi e Compton desenvolveram uma metodologia eletroanalítica para determinação simultânea de dopamina, serotonina e ácido ascórbico utilizando um eletrodo de grafite pirolítico plano não modificado. Foi possível separar os picos dos três analitos. Para esta metodologia foram obtidos limites de detecção de  $90 \text{ nmol L}^{-1}$ ,  $60 \text{ nmol L}^{-1}$  e  $200 \text{ nmol L}^{-1}$  para dopamina, serotonina e ácido ascórbico, respectivamente [50].

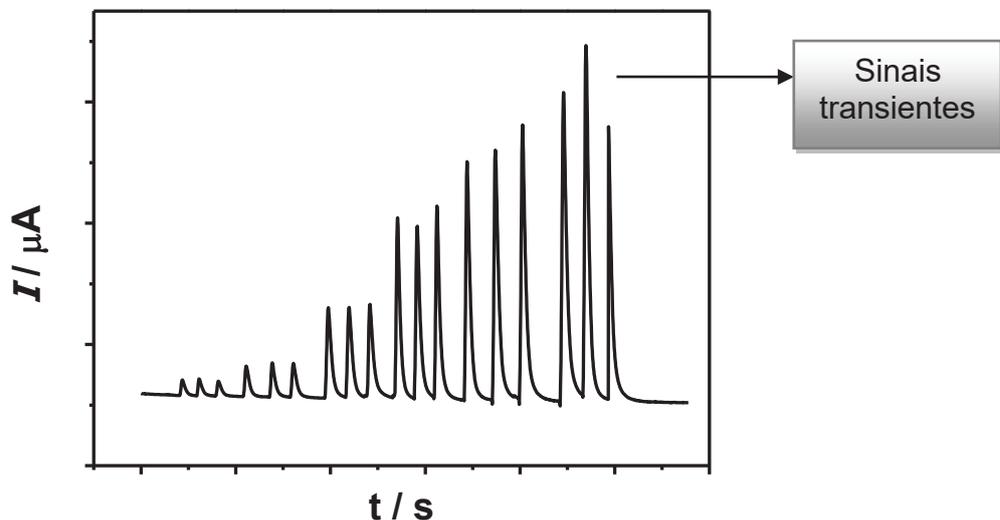
Gimenes e colaboradores utilizaram um eletrodo de carbono vítreo sem modificação para determinação de dopamina em presença de excesso de ácido ascórbico e foi possível de contornar o problema já mencionado relacionado à interferência do ácido ascórbico, porém foi realizada a quantificação apenas da dopamina. A metodologia aplicada neste trabalho fez uso de um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) utilizando a técnica de amperometria de múltiplos pulsos (MPA). Foi obtido um limite de detecção para dopamina de  $50 \text{ nmol L}^{-1}$ , na presença de excesso ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) de ácido ascórbico [51].

## 1.5 AMPEROMETRIA MÚLTIPLOS PULSOS

A amperometria com aplicação de múltiplos pulsos, a MPA (MPA, do inglês *Multiple Pulse Amperometry*) é uma técnica eletroquímica alternativa muito utilizada em análises por injeção em fluxo, aplicável para a análise de misturas de mais de um componente eletroativo, desde que tenham potenciais redox diferentes.

A amperometria envolve a medida da corrente elétrica gerada ao ser aplicado um potencial constante sobre o eletrodo de trabalho, que está em contato com uma solução contendo a espécie eletroativa. A intensidade da corrente é proporcional à concentração da espécie na solução analisada. Quando é aplicado um potencial fixo durante uma análise e são coletados valores de corrente, obtém-se um amperograma – corrente elétrica em função do tempo. A FIGURA 5 a seguir representa um amperograma genérico para um sistema hidrodinâmico.

FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO DE UM AMPEROGRAMA (CORRENTE ELÉTRICA EM FUNÇÃO DO TEMPO).



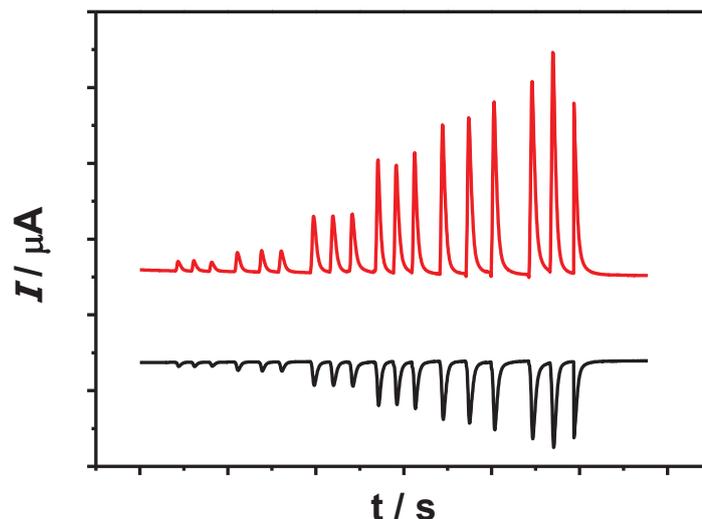
Fonte: o autor (2019)

Os sinais gerados são chamados de sinais transientes. A amperometria permite a aplicação de apenas um potencial fixo, que promove uma reação redox das substâncias eletroativas em solução que sejam susceptíveis ao potencial aplicado. Esse fato limita esta técnica para determinações simultâneas de mais de

um analito, uma vez que mais de uma espécie pode ser oxidada/ reduzida em um mesmo valor de potencial [52].

Para determinações simultâneas de mais de um analito, a MPA, quase sempre aliada a um sistema hidrodinâmico, é uma boa alternativa. Esta técnica permite a aplicação de mais de um potencial em sequência alternada (pulsos de duração definida) sobre apenas um eletrodo de trabalho, sendo possível a distinção de mais de um analito (com potenciais redox diferentes), através do monitoramento da corrente para cada potencial [53, 54]. Cada potencial aplicado na MPA gera um amperograma independente. Uma representação de um amperograma gerado pela aplicação de dois potenciais é apresentada na FIGURA 6.

FIGURA 6 - REPRESENTAÇÃO DE UM AMPEROGAMA (CORRENTE ELÉTRICA EM FUNÇÃO DO TEMPO) DE UMA ANÁLISE POR MPA COM APLICAÇÃO DE DOIS POTENCIAIS DIFERENTES.



Fonte: o autor (2019)

No exemplo representado na FIGURA 6, o amperograma em vermelho foi gerado a partir da oxidação de uma espécie química e o amperograma em preto foi gerado a partir da redução de uma espécie química, promovida pela aplicação de um potencial diferente daquele aplicado para oxidação. Os dois amperogramas são gerados ao mesmo tempo, uma vez que durante a análise os dois potenciais são aplicados em pulsos de duração definida antes da análise.

Outra vantagem considerável desta técnica está associada à determinação de espécies em amostras com interferentes eletroativos que podem afetar a

seletividade do método. A MPA permite a aplicação de até dez pulsos de potencial alternadamente, gerando até dez amperogramas independentes em apenas uma análise [36, 55].

Conforme mencionado, a técnica MPA é mais amplamente empregada em análises por injeção em fluxo (FIA), que consistem na dispersão da amostra em uma solução transportadora [39, 56]. Em relação às técnicas eletroquímicas estacionárias, as análises em fluxos apresentam algumas vantagens, como: maior frequência analítica e melhor resposta eletroquímica [57]. Na técnica de amperometria convencional, o eletrodo de trabalho é mantido constantemente num potencial adequado para promover a redução ou oxidação da espécie de interesse, e, na MPA, para a separação das espécies é aplicada uma alternância de pulsos de potencial [39].

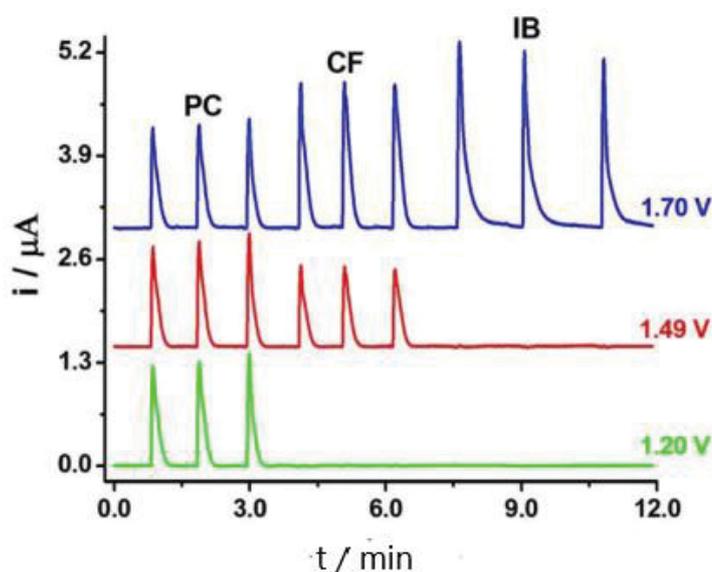
A MPA tem sido empregada recentemente na determinação simultânea de diferentes fármacos, como captopril e hidroclorotiazida [36], paracetamol e naproxeno [58], fenazopiridina, sulfametoxazol e trimetoprima [59], cafeína, ibuprofeno e paracetamol [55]. Além disso, esta técnica também é utilizada para quantificação de antioxidantes [60, 61], metabólitos biomarcadores, como a cotinina [57], além de corantes sintéticos, como o carmim índigo e vermelho *allura* [62].

Chaves e colaboradores [55] utilizaram a técnica MPA para determinação simultânea de três fármacos: cafeína, ibuprofeno e paracetamol, utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro. Foram aplicados quatro potenciais diferentes:

- 1,20 V por 70 ms: potencial capaz de oxidar o paracetamol;
- 1,49 V por 40 ms: potencial capaz de oxidar o paracetamol e a cafeína;
- 1,70 V por 70 ms: potencial capaz de oxidar os três compostos: paracetamol, cafeína e ibuprofeno;
- 1,80 V por 100 ms: potencial aplicado para limpeza do eletrodo.

Os amperogramas obtidos pelos autores são apresentados na FIGURA 7.

FIGURA 7 – AMPEROGRAMAS OBTIDOS NA MPA PARA DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DE CAFEÍNA, IBUPROFENO E PARACETAMOL



Fonte: adaptado de Chaves et.al. [55]

Considerando que o potencial de 1,70 V promove a oxidação das três espécies, o potencial 1,49 V promove a oxidação de paracetamol e cafeína e o potencial 1,20 V promove a oxidação apenas do paracetamol, foi possível realizar cálculos com a utilização de fatores de correção para calcular a concentração de cada uma das três substâncias na mistura.

Precisa-se considerar a determinação simultânea de dopamina e ácido ascórbico. A dopamina apresenta um processo de oxidação reversível, ou seja, pode sofrer oxidação a dopamina o-quinona. Este composto, por sua vez, pode ser novamente reduzido a dopamina. A equação que descreve tal processo está representada na FIGURA 2. Para promover a oxidação e redução deste composto, portanto, é necessária a aplicação de dois potenciais distintos.

O ácido ascórbico apresenta um processo de oxidação irreversível, ou seja, o ácido dehidroascórbico, produto da oxidação do composto não pode ser reduzido a ácido ascórbico. A equação que descreve essa reação de oxidação está representada na FIGURA 3.

Como já comentado, dopamina e ácido ascórbico sofrem oxidação da mesma região de potencial, portanto, no caso de uma solução contendo os dois analitos, seria necessário aplicar através da MPA, dois potenciais distintos: um deles para promover a oxidação de dopamina e ácido ascórbico e outro para promover a

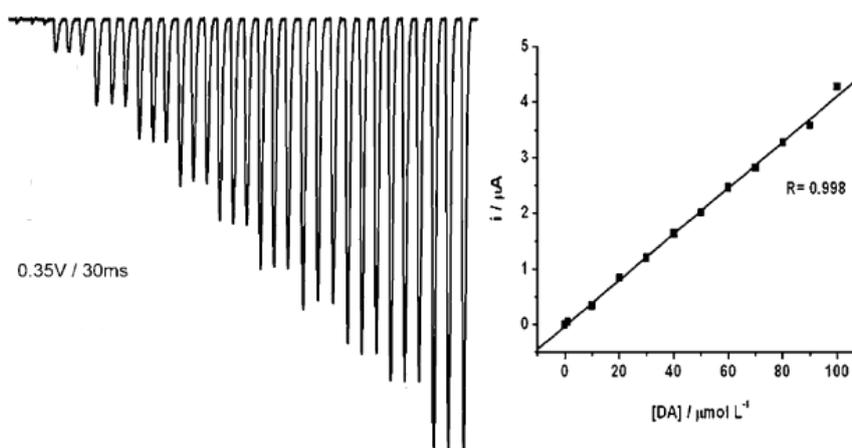
redução da dopamina o-quinona. Dessa maneira, seria possível realizar a determinação simultânea dos dois analitos explorando o fato de apenas a dopamina sofrer uma reação redox reversível.

No trabalho de Gimenes e colaboradores [51], em que foi realizada a quantificação de dopamina em presença de excesso de ácido ascórbico, a amperometria de múltiplos pulsos foi empregada em conjunto com um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA). A determinação da dopamina foi realizada de maneira indireta, a partir da redução da dopamina o-quinona. Foram aplicados três potenciais diferentes:

- 0,80 V por 700 ms: promoveu a oxidação de DA e AA;
- 0,35 V por 30 ms: promoveu a redução da o-DQ;
- 0,00 V por 500 ms: potencial para limpeza.

A partir dos sinais transientes gerados na redução da o-DQ, foi construída uma curva analítica para determinação de dopamina em presença de excesso de ácido ascórbico, conforme mostrado na FIGURA 8.

FIGURA 8 – SINAIS TRANSIENTES RELATIVOS À REDUÇÃO DA o-DQ E CURVA ANALÍTICA PARA DOPAMINA.



Fonte: Adaptado de Gimenes [51]

A amperometria de múltiplos pulsos, neste caso, foi empregada para oxidar a dopamina e posteriormente monitorar a sua redução, ou seja, consistiu na quantificação apenas de dopamina (em presença de ácido ascórbico).

Uma aplicação inovadora dessa técnica seria a determinação de ácido ascórbico e dopamina utilizando a técnica MPA, que, aliada às análises em fluxo permitem a separação e a eficiente determinação amperométrica de compostos. Contudo, as análises em fluxo possuem ainda a capacidade de miniaturização, o que possibilita a diminuição de reagentes, amostras, resíduos e também de energia, tornando o método analítico economicamente e ecologicamente viável [63].

## 1.6 MICROFLUÍDICA

Os sistemas microfluídicos surgiram nos anos 1970, e desde então vêm sendo cada vez mais utilizados em aplicações analíticas devido à sua portabilidade, baixo custo, baixo consumo e confiabilidade dos resultados [64]. Essas características se enquadram na necessidade já discutida de desenvolvimento de metodologias para quantificação de biomarcadores e com a possibilidade de portabilidade para exames clínicos em locais afastados e com pouca estrutura. Os estudos relacionados à microfluídica enfatizam a necessidade de praticidade, com ênfase na produção de dispositivos fáceis de usar e rápidos, para aplicação em pontos de atendimento. Os dispositivos microfluídicos vêm se tornando cada vez mais acessíveis a pessoas não especializadas, outra vantagem para utilização dos mesmos em pontos de atendimento [65].

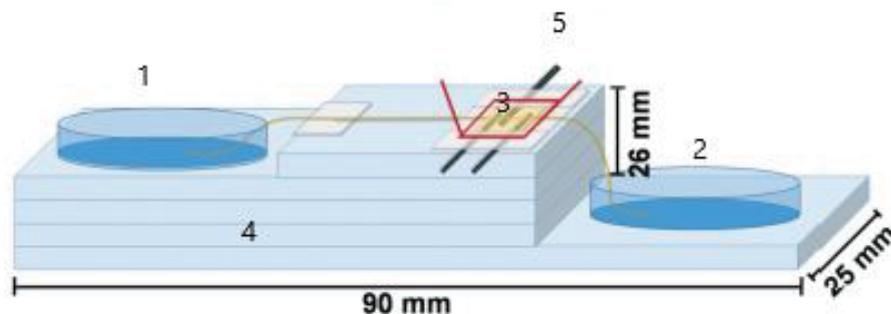
Os dispositivos à base de papel  $\mu$ PADs foram introduzidos em 2007. São construídos a partir de papel de celulose como substrato. Os canais microfluídicos desses dispositivos têm dimensões da ordem de milímetros e são muito eficientes quanto ao transporte de soluções através dos mesmos. Esses dispositivos são amplamente aplicados em determinações colorimétricas, eletroquímicas, fluorescência, entre outras [66]. Muitos trabalhos descrevem a construção de dispositivos microfluídicos baseados em papel ( $\mu$ PADs). Apesar de fornecerem bons resultados, esses dispositivos têm algumas limitações, tais como a necessidade de estabelecimento de barreiras hidrofóbicas para delimitar o canal microfluídico e a baixa resistência mecânica que dificulta a montagem desses dispositivos [54].

Para superar essas limitações apresentadas pelo papel, fios de algodão se apresentam como uma boa alternativa, por possuírem boa resistência mecânica, mesmo quando molhados, e eliminam a necessidade de estabelecimento de barreiras hidrofóbicas que delimitem o canal microfluídico. Além disso, nos fios o

transporte de líquidos ocorre espontaneamente por capilaridade [67]. A utilização de dispositivos microfluídicos em análises eletroquímicas é facilitada pelo fato da miniaturização não interferir na qualidade e na frequência analítica das análises [68].

Um bom exemplo é o dispositivo microfluídico baseado em fios têxteis ( $\mu$ TED), proposto por Agustini e colaboradores [54], que foi construído a partir de materiais de fácil acesso e baixo custo. Placas de vidro foram empilhadas constituindo a base do dispositivo. À base foram acoplados dois reservatórios, um de entrada onde é adicionada a solução transportadora e outro de saída, que funciona como o descarte das análises. Fios hidrofílicos constituíram o canal microfluídico, que foi preso pelas pontas aos reservatórios de entrada e saída com fita dupla-face. A solução se desloca por esse canal por ação da capilaridade. A região de detecção foi determinada e fixada com um pedaço retangular de gaze hidrofílica. Três grafites foram utilizados como eletrodos de referência, trabalho e contra-eletrodo. O custo estimado para construção de um dispositivo ficou em torno de 2 reais. A FIGURA 9 a seguir mostra uma representação do primeiro  $\mu$ TED construído.

FIGURA 9 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DO  $\mu$ TED E SUAS DIMENSÕES, SENDO (1) RESERVATÓRIO DE ENTRADA; (2) RESERVATÓRIO DE SAÍDA; (3) REGIÃO DE DETECÇÃO; (4) PLACAS DE VIDRO EMPILHADAS; (5) ELETRODOS DE GRAFITE.



Fonte: Adaptado de Agustini e colaboradores [54]

Neste mesmo trabalho, o desempenho analítico do dispositivo foi avaliado, através de uma determinação simultânea de acetaminofeno e diclorofenaco. Parâmetros experimentais relacionados ao dispositivo foram posteriormente otimizados e o mesmo passou a ser utilizado para diversas determinações dentro do grupo de pesquisa [67].

Ochiai e colaboradores [64] utilizaram o  $\mu$ TED em uma configuração muito similar à mostrada na FIGURA 9, porém acoplado ao dispositivo um eletrodo impresso no lugar dos três grafites. Nesse trabalho, foi realizada a determinação de estriol.

Uma nova versão do  $\mu$ TED, impresso em impressora 3D já foi utilizada pelo grupo de pesquisas em várias diferentes determinações: Oliveira e colaboradores aplicaram um eletrodo impresso de carbono modificado com nanotubos de carbono e íons níquel acoplado ao  $\mu$ TED para determinação de glicose em plasma sanguíneo [69]. Carneiro e colaboradores empregaram o dispositivo na determinação amperométrica de ácidos gálico e cafeico em amostras de vinho, acoplado ao dispositivo eletrodo impresso de carbono [70]. Caetano e colaboradores realizaram determinação de fenol em água de torneira utilizando um eletrodo impresso de carbono modificado com nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro acoplado ao  $\mu$ TED. O  $\mu$ TED foi aplicado, mais recentemente, por Kalinke e colaboradores na determinação de glicose com utilização de eletrodo de pasta de carbono modificada com biochar e eletrodo de referência e contra eletrodo de grafite [63]. Todas as essas aplicações do  $\mu$ TED mostram a versatilidade do dispositivo, que pode ser utilizado para várias determinações diferentes, com a utilização de eletrodos diferentes, bastando realizar as adaptações necessárias para cada caso.

Diante de todo o exposto, é marcante a necessidade de desenvolvimento de metodologias analíticas simples, de baixo custo e alta eficiência para quantificação de biomarcadores, como a dopamina e ácido ascórbico. Além disso, a determinação simultânea das duas substâncias tem sido muito estudada devido à sua grande aplicabilidade. A técnica MPA se mostra promissora para determinação eletroquímica simultânea de DA e AA. Paralelo a isso, é observado que o uso de dispositivos microfluídicos para realizar ensaios de diagnóstico tem aumentado [71]. Isso pode ser explicado pela capacidade de portabilidade dos mesmos, além de outras facilidades, como a utilização de volumes muito pequenos de amostra e reagentes (gerando poucos resíduos), análises rápidas e simples.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma metodologia analítica para a determinação eletroquímica simultânea de ácido ascórbico e dopamina em soro sanguíneo, empregando a técnica de amperometria de múltiplos pulsos, com um eletrodo impresso acoplado a um dispositivo microfluídico ( $\mu$ TED).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Montar um sistema microfluídico baseado em fios têxteis ( $\mu$ TED) adequado para a análise proposta, acoplar o eletrodo impresso e conectar o dispositivo a um potenciostato;
- Investigar e avaliar o comportamento voltamétrico dos analitos no eletrólito suporte;
- Avaliar o desempenho do sistema de detecção e da técnica proposta para a determinação simultânea dos dois analitos;
- Otimizar os parâmetros experimentais relacionados ao método analítico desenvolvido;
- Construir uma curva analítica e avaliar o desempenho analítico do método proposto;
- Realizar estudo de interferentes;
- Aplicar o método na determinação simultânea de dopamina e ácido ascórbico em amostra de soro sanguíneo

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 SOLUÇÕES E AMOSTRA

Foram utilizados os seguintes reagentes de grau analítico:

- Ácido L-ascórbico (Sigma Aldrich);
  - Fórmula molecular:  $C_6H_8O_6$
  - $pK_{a1} = 4,17$
  - Solúvel em água
- Cloridrato de dopamina (Sigma Aldrich);
  - Fórmula molecular:  $C_8H_{11}NO_2$
  - $pK_{a1} = 8,87$
- Fosfato de sódio dibásico anidro (Vetec);
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado (Vetec);
- Ácido sulfúrico P.A. (Alphatec);
- Ácido úrico  $\geq 99\%$  (Sigma Aldrich);
- Dextrose P.A – glucose anidra (Reagen);
- Cloreto de sódio P.A. (F.Maia);
- Soro sanguíneo humano de plasma tipo AB (Sigma Aldrich);

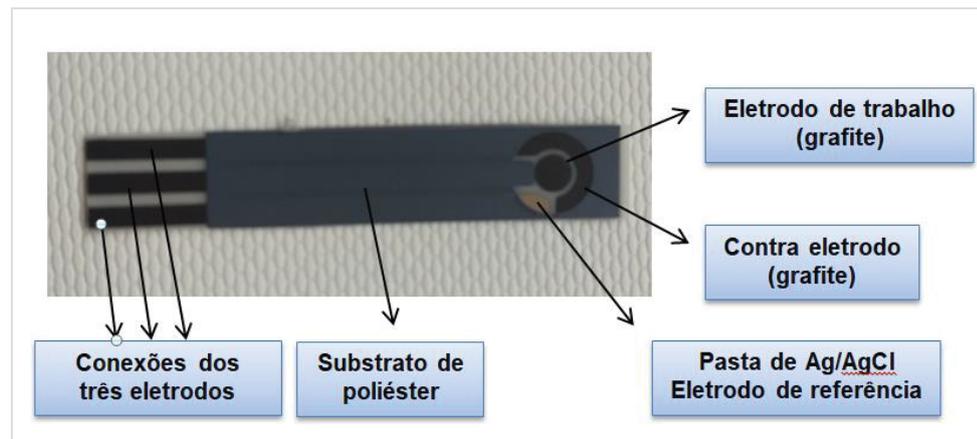
Como eletrólitos suporte foram utilizadas soluções de tampão fosfato 0,10 mol  $L^{-1}$  pH 4,0 e pH 7,0 e uma solução de  $H_2SO_4$  0,20 mol  $L^{-1}$ , de pH 2,0. As soluções de ácido ascórbico e dopamina foram preparadas em água deionizada e diluídas com eletrólito suporte. Todas as soluções foram preparadas com água deionizada em sistema Milli-Q (Direct-Q3, Millipore), com resistividade maior do que 18,2  $M\Omega$  cm.

#### 3.2 ELETRODO IMPRESSO

As análises foram feitas com eletrodos impressos (EIs), como os utilizados no trabalho de Ochiai e colaboradores [64]. Não foram realizadas modificações nas superfícies dos eletrodos, que eram constituídos de um eletrodo de trabalho e um contra-eletrodo de grafite, e um eletrodo de referência de Ag/AgCl. Os três eletrodos

em questão foram impressos num substrato de poliéster, sendo que os eletrodos de grafite foram feitos com a impressão de tinta de grafite, e o eletrodo de referência foi impresso com uma pasta de Ag/AgCl. Os eletrodos foram fabricados no Reino Unido e fornecidos ao LabSense pelo Prof. Dr. Craig Banks, da Manchester Metropolitan University. A FIGURA 10 mostra o eletrodo utilizado.

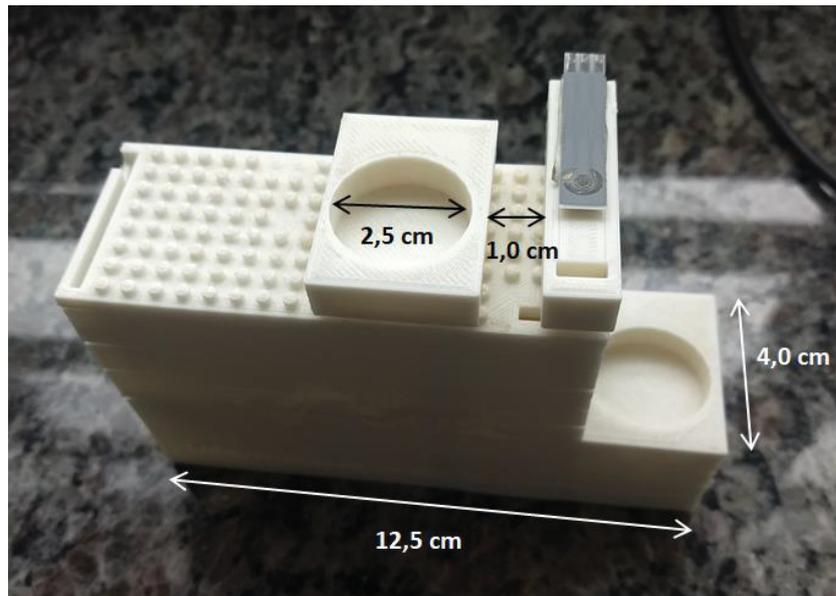
FIGURA 10 - ELETRODO IMPRESSO UTILIZADO NA METODOLOGIA PROPOSTA



Fonte: o autor (2019)

### 3.3 SISTEMA MICROFLUÍDICO $\mu$ TED

A estrutura do  $\mu$ TED já estava disponível no laboratório. Foi construída usando uma impressora 3D GTMax3D, modelo Graber i3 (Americana-SP, Brasil), sendo projetada com base nos dispositivos microfluídicos já utilizados pelo grupo de pesquisa. O material utilizado como substrato foi o polímero ABS (acrílico-butadieno-estireno). A FIGURA 11 mostra a estrutura impressa e suas dimensões, já com o eletrodo impresso acoplado.

FIGURA 11 – ESTRUTURA DO  $\mu$ TED UTILIZADO NO TRABALHO.

Fonte: o autor (2019)

A peça foi confeccionada com dois reservatórios (com capacidade de 3 mL cada): um de entrada e outro de saída, destinados ao eletrólito suporte (solução transportadora).

O canal foi constituído por 9 fios têxteis de algodão (retirados de gaze hidrofílica – marca: Cremer) alinhados paralelamente e fixados com fita dupla face nas extremidades. A quantidade de fios utilizados foi previamente otimizada por Agustini e colaboradores [67]. Quanto maior a quantidade de fios, mais estreitos são os sinais transientes obtidos na amperometria, além de proporcionar transporte mais rápido da amostra. Mais do que 9 fios causam uma diluição da amostra na região de detecção. A maneira como os fios são organizados também influencia: os sinais de maiores intensidades foram obtidos quando os fios são organizados paralelamente, sem ocorrer sobreposição entre os fios.

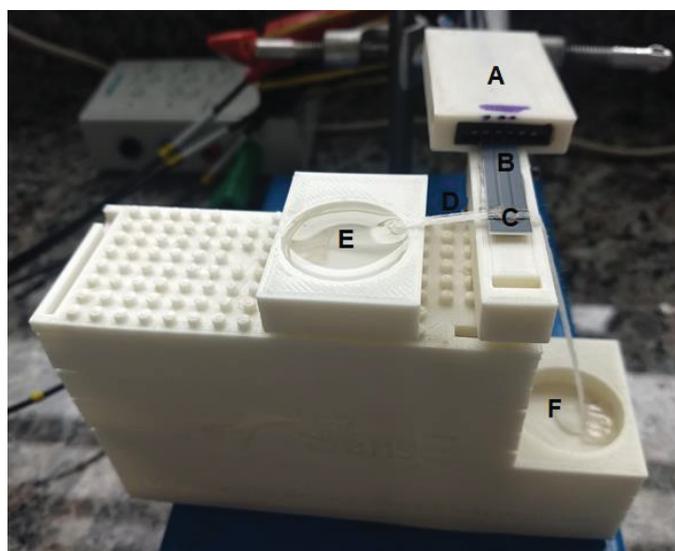
A fita dupla face foi utilizada para fixar o canal microfluídico pelas extremidades, desde o reservatório de entrada até o de saída, que se encontra em posição inferior ao de entrada. Entre os dois reservatórios, o eletrodo impresso foi posicionado e fixado, de maneira que os fios estivessem em contato com o mesmo, ou seja, que o canal microfluídico passasse sobre o conjunto de eletrodos (eletrodos de referência, de trabalho e contra eletrodo). O eletrólito adicionado ao reservatório de entrada era carregado pelos fios por ação da capilaridade e gravidade, até atingir o reservatório de saída (descarte). A capilaridade é a capacidade de um fluido de

percolar por um determinado meio (geralmente, tubos finos). Tal propriedade é resultado da tensão superficial dos fluidos e da sua interação com a superfície do material. Nesse caso, os fios têxteis utilizados são retirados de gaze hidrofílica, portanto a capilaridade é favorecida para soluções aquosas. A ação da gravidade contribui para aumentar a velocidade com que o líquido chega ao reservatório de saída, que se encontra em posição inferior ao de entrada.

Antes do contato com o eletrodo, há uma região em que os fios permanecem suspensos. Nesta região, aproximadamente a 0,5 cm anterior à região de detecção, foram realizadas as adições da solução contendo o analito, que era arrastado pelo eletrólito, passando constantemente pelos fios, e em seguida entrando em contato com o eletrodo, permitindo a determinação dos compostos. A otimização dos parâmetros relacionados ao  $\mu$ TED realizada por Agustini e colaboradores [67] demonstrou que realizar a injeção da amostra a uma distância muito grande da região de detecção causa uma diminuição nas correntes obtidas na amperometria, devido a uma maior dispersão da amostra antes de chegar ao eletrodo. Realizar a injeção a uma distância inferior a 0,5 cm também não é interessante, pois levam a problemas relacionados à repetibilidade das quantificações.

A FIGURA 12 a seguir mostra o dispositivo montado e pronto para uso, com a indicação de todas as regiões descritas.

FIGURA 12 - DISPOSITIVO  $\mu$ TED PRONTO PARA USO. CONECTOR DE ELETRODO IMPRESSO (A); ELETRODO IMPRESSO (B); REGIÃO DE DETECÇÃO (C); REGIÃO DO CANAL MICROFLUÍDICO ONDE É FEITA A INJEÇÃO (D); RESERVATÓRIO DE ENTRADA (E); RESERVATÓRIO DE SAÍDA (F).



Fonte: o autor (2019).

### 3.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Metrohm  $\mu$ Autolab Type III, com resolução de 3  $\mu$ V e medidas de corrente a partir de 10 nA. O potenciostato foi conectado ao eletrodo impresso (acoplado ao sistema microfluídico), e conectado a um computador para gerenciamento das análises através dos softwares GPES 4.9 e NOVA 1.10. As técnicas utilizadas foram: Amperometria de múltiplos pulsos (MPA) e voltametria cíclica. Os dados das análises foram tratados com o software OriginPro 8.

### 3.5 METODOLOGIA

#### 3.5.1 Comportamento voltamétrico dos analitos

O comportamento da dopamina e do ácido ascórbico foi avaliado em três eletrólitos suporte diferentes: tampões fosfato 0,10 mol L<sup>-1</sup> pH 4,0 e pH 7,0 e solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>.

Foram preparadas as seguintes soluções:

- Dopamina: 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato pH 4,0;
- Dopamina: 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato pH 7,0;
- Dopamina: 0,10 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>;
- Ácido ascórbico: 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato pH 4,0;
- Ácido ascórbico: 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato pH 7,0;
- Ácido ascórbico: 0,10 mmol L<sup>-1</sup> de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>;

Para essa análise, o canal microfluídico do  $\mu$ TED foi retirado, e uma gota de solução (2,0  $\mu$ L) foi posicionada sobre o eletrodo impresso com o auxílio de uma micropipeta. Foram realizadas varreduras de potencial em intervalo de -0,4 a 0,7 V, nas soluções preparadas em tampão fosfato. Os testes com solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte foram no intervalo de potencial de -0,4 a 1,0 V. A velocidade de varredura aplicada foi de 50 mV s<sup>-1</sup>.

### 3.5.2 Estudo de potenciais

Uma solução contendo dopamina e ácido ascórbico na concentração de 0,10 mmol L<sup>-1</sup> foi analisada através da técnica MPA, aplicando-se os vários potenciais a serem testados. Ao se variar os potenciais de oxidação, o potencial de redução foi mantido fixo. E, ao se variar os potenciais de redução, o potencial de oxidação foi mantido fixo.

Para os eletrólitos tampão fosfato pH 4,0 e pH 7,0 foram testados os potenciais de oxidação, mantendo-se o potencial de redução fixado em -0,10 V. Os potenciais de oxidação testados foram: 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30; 0,35; 0,40; 0,45; 0,50 V.

Em seguida, foram testados os potenciais de redução, mantendo-se o potencial de oxidação fixado em 0,40 V. Os potenciais testados foram: -0,30; -0,25; -0,20; -0,15; -0,10; -0,05; 0,0; 0,05 V.

Para o eletrólito H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>, os potenciais de oxidação estudados foram: 0,40; 0,50; 0,55; 0,60; 0,65; 0,70 V. Para este teste, o potencial de redução foi mantido fixo em -0,10 V. Os potenciais de redução testados foram: -0,15; -0,10; -0,05; 0,00; 0,05; 0,10; 0,15 V. Para este teste, o potencial de oxidação foi mantido fixo em 0,65 V.

### 3.5.3 Otimização de parâmetros experimentais

#### 3.5.3.1 Volume de injeção

Uma solução contendo 0,10 mmol L<sup>-1</sup> de DA e AA foi analisada por MPA, no dispositivo  $\mu$ TED, sendo aplicados os potenciais definidos no estudo de potenciais. A mesma solução foi analisada várias vezes, variando-se o volume de solução injetado (com micropipeta) próximo à região de detecção do  $\mu$ TED, a fim de se verificar qual é a tendência das intensidades de corrente em função do volume de solução analisado, que foi variado de 0,5 a 4,0  $\mu$ L, com incrementos de 0,5  $\mu$ L.

### 3.5.3.2 Tempo de pulso

Buscou-se, neste estudo, avaliar qual a influência do tempo de pulso nas intensidades de corrente geradas para os processos redox das espécies de interesse. Para isso, soluções contendo DA e AA em concentração de  $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  foram analisadas várias vezes, sendo variado o tempo de pulso (controlado pelo software), de 50 a 250 ms, com incrementos de 50 ms. O estudo não foi realizado em todos os eletrólitos, pois a composição do mesmo não tem influência nesta condição experimental.

### 3.5.4 Estudos preliminares com o $\mu\text{TED}$

Foram realizadas medidas amperométricas preliminares, empregando o  $\mu\text{TED}$ , de soluções de dopamina, ácido ascórbico, e mistura equimolar dos dois analitos, empregando os três eletrólitos: tampões fosfato pH 4,0 e 7,0, e  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ .

Para essas análises, os parâmetros já otimizados foram empregados: potenciais de oxidação e redução, volume de injeção e tempo de pulso.

O eletrólito (tampão fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  /  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi adicionado ao reservatório de entrada. Adições de  $2,0 \mu\text{L}$  da solução de análise (soluções de dopamina, ácido ascórbico e misturas dos dois analitos) foram realizadas sobre os fios, na região de adição a 5 milímetros da região de detecção (eletrodo impresso) [54]. Os potenciais de oxidação e redução definidos nos estudos de potenciais foram aplicados sequencialmente em pulsos de 200 ms de duração.

### 3.5.5 Estudo de pH do tampão fosfato

Foi realizada uma avaliação da variação de intensidade dos sinais anódicos e catódicos em função do pH do eletrólito. Três soluções foram analisadas por MPA, em triplicata, utilizando tampão fosfato em pH 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0:

- DA  $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ ;
- AA  $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ ;
- DA + AA  $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ .

### 3.5.6 Estudos com misturas de dopamina e ácido ascórbico

Foram analisadas por MPA soluções de dopamina de concentração 1,0 mmol L<sup>-1</sup> com concentrações crescentes de ácido ascórbico (0,0 (ausência) a 1,0 mmol L<sup>-1</sup>), visando verificar o comportamento das misturas de AA e DA, em eletrólito tampão fosfato pH 7,0 e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>.

### 3.5.7 Estudos de quantificação simultânea dos analitos

Com o objetivo de realizar a quantificação simultânea de dopamina e ácido ascórbico, três curvas diferentes foram construídas:

Curva 1: DA;

Curva 2: DA + AA;

Curva 3: AA.

Na TABELA 1, são relacionadas as concentrações do(s) analito(s) de cada ponto das curvas construídas.

TABELA 1 – PONTOS DAS CURVAS ANALÍTICAS CONSTRUÍDAS.

Ponto	Concentração (mol L <sup>-1</sup> )
1	5,0x10 <sup>-5</sup>
2	1,0x10 <sup>-4</sup>
3	3,0x10 <sup>-4</sup>
4	5,0x10 <sup>-4</sup>
5	7,0x10 <sup>-4</sup>
6	9,0x10 <sup>-4</sup>

A partir da quantificação dos sinais de oxidação e redução da curva 1, foi calculada uma relação entre os sinais de oxidação e redução desse composto. Em seguida, essa relação foi utilizada para construir uma curva para ácido ascórbico.

Todas as soluções foram analisadas por amperometria de múltiplos pulsos em triplicata. Posteriormente, foi possível a obtenção das figuras de mérito do método analítico.

### 3.5.8 Estudos de interferentes

Foi realizado um estudo de voltametria cíclica de misturas equimolares de dopamina (DA), ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (UA) para verificar o perfil eletroquímico desse importante interferente presente em misturas das espécies de interesse deste trabalho. Foram analisadas por voltametria cíclica as seguintes soluções:

- DA e AA em concentração de 0,10 mmol L<sup>-1</sup>: analitos solubilizados e diluídos em eletrólito H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>.
- DA, AA e UA em concentração de 0,10 mmol L<sup>-1</sup>: DA, AA e UA solubilizados e diluídos em eletrólito H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>;
- DA, AA e UA em concentração de 0,10 mmol L<sup>-1</sup>: DA, AA solubilizados e diluídos em eletrólito H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>; UA solubilizado em água e diluído em eletrólito H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>;
- DA, AA e UA em concentração de 0,10 mmol L<sup>-1</sup>: DA, AA solubilizados e diluídos em eletrólito H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>; UA solubilizado em NaOH 0,10 mol L<sup>-1</sup> e diluído em eletrólito H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>.

Em seguida, o efeito de três substâncias nas correntes geradas por MPA foi avaliado: ácido úrico, glicose e cloreto de sódio. Para cada possível interferente, analisou-se por MPA quatro soluções, com analitos e interferentes solubilizados e diluídos em eletrólito H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>:

- Controle - DA e AA em concentração de 0,10 mmol L<sup>-1</sup>.
- Nível 1 - DA e AA em concentração de 0,10 mmol L<sup>-1</sup>; Interferente em concentração de 0,01 mmol L<sup>-1</sup>.
- Nível 2 - DA e AA em concentração de 0,10 mmol L<sup>-1</sup>; Interferente em concentração de 0,10 mmol L<sup>-1</sup>.
- Nível 3 - DA e AA em concentração de 0,10 mmol L<sup>-1</sup>; Interferente em concentração de 1,0 mmol L<sup>-1</sup>.

### 3.5.9 Estudos com amostra de soro sanguíneo

Uma amostra de soro sanguíneo humano foi analisada através do método proposto. Uma curva analítica de dopamina e ácido ascórbico foi construída, utilizando as mesmas concentrações da etapa de estudos de quantificação simultânea dos analitos.

A amostra de soro sanguíneo foi diluída 2 vezes em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  e analisada sem qualquer adição de analito.

O soro sanguíneo humano possui concentração de DA e AA em torno de  $0,016$  e  $0,045 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente [72, 73]. Foram realizadas adições de DA e AA na amostra em três níveis de concentração. As adições foram realizadas de maneira que após a diluição, fossem obtidas as concentrações de DA e AA relacionadas na TABELA 2.

TABELA 2 - NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO DE DA E AA ADICIONADOS À AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO

Nível	DA ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	AA ( $\text{mmol L}^{-1}$ )
1	0,02	0,05
2	0,10	0,20
3	0,30	0,60

A análise por MPA foi realizada empregando-se todos os parâmetros experimentais já definidos e otimizados. A sequência de injeções no  $\mu\text{TED}$  foi a seguinte:

Pontos 1 a 6 (concentração de AA e DA crescente); amostra sem adição; amostra com adição (níveis 1, 2 e 3); Pontos 6 a 1 (concentração de AA e DA decrescente)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTUDOS PRELIMINARES UTILIZANDO VOLTAMETRIA CÍCLICA

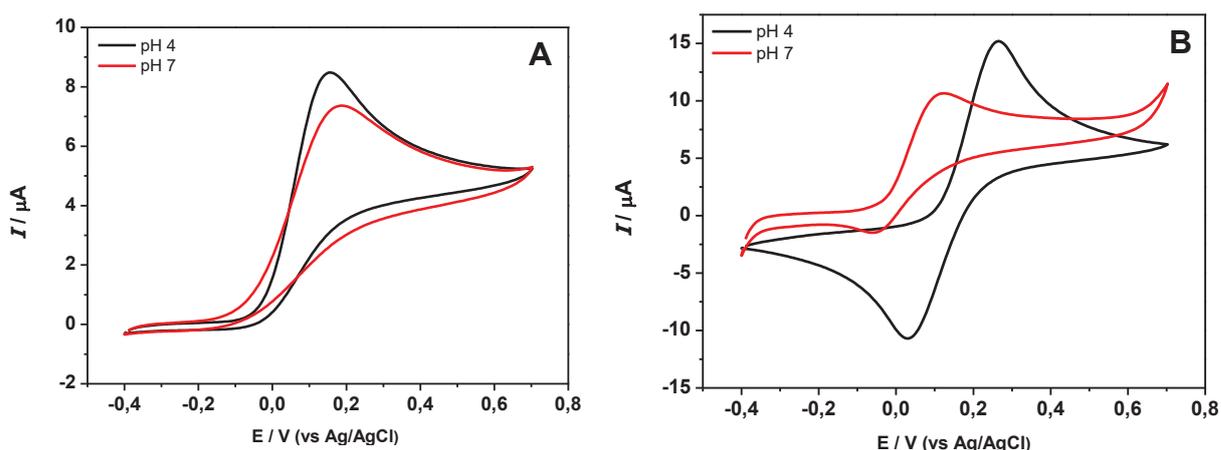
Verificou-se na literatura que para os métodos de quantificação eletroquímica de dopamina e ácido ascórbico são utilizadas soluções-tampão fosfato como eletrólito. Além disso, foram observados também bons resultados com a utilização de solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  como eletrólito em misturas de dopamina e ácido ascórbico [51].

Dessa maneira, foram escolhidos três eletrólitos a serem avaliados para a análise proposta: tampões fosfato  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 4,0 e pH 7,0, e solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ .

A fim de se avaliar o comportamento voltamétrico do ácido ascórbico e da dopamina separadamente, foram realizados estudos por voltametria cíclica dessas substâncias em cada eletrólito.

Na FIGURA 13 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para o ácido ascórbico (AA) e dopamina (DA), respectivamente, em concentrações de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ , em eletrólito suporte tampão fosfato, na região de potencial de  $-0,4$  a  $0,7 \text{ V}$ , com velocidade de varredura de  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

FIGURA 13 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA O AA (A) E DA (B) EM CONCENTRAÇÕES DE  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  EM TAMPÃO FOSFATO  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  pH 4,0 E pH 7,0.



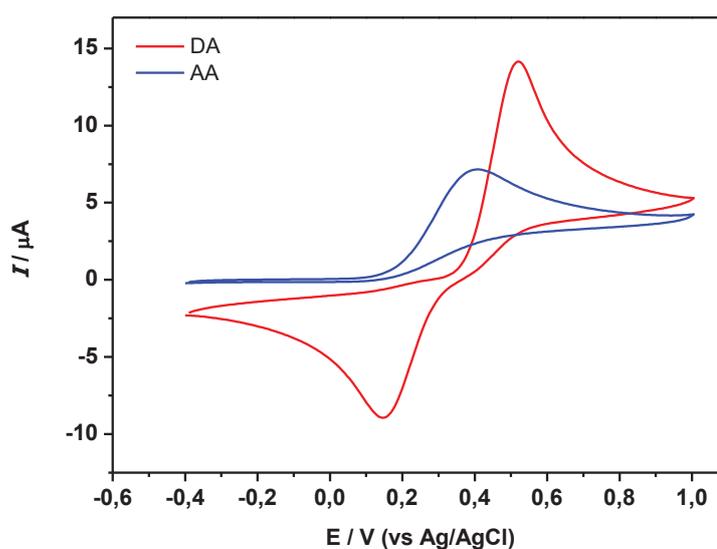
Comparando-se os voltamogramas obtidos em tampão fosfato pH 4,0 e 7,0, é possível observar que para as soluções avaliadas foram verificados processos redox bem definidos e correspondentes ao ácido ascórbico e a dopamina. No caso do ácido ascórbico, a aplicação de potencial promoveu a oxidação deste composto

ao ácido dehidroascórbico, gerando um pico anódico. É possível observar nos voltamogramas cíclicos da FIGURA 13-A, que o sinal de resposta apresentou potencial de pico em torno de 0,15 V para os dois valores de pH testados.

Os voltamogramas obtidos para a dopamina (FIGURA 13-B) apresentaram sinais reversíveis: anódico e catódico. O pico anódico refere-se à oxidação do composto a dopamina o-quinona, o que foi registrado em potencial de 0,29 V em solução de tampão fosfato pH 4,0 e de 0,11 V em pH 7,0. Esse deslocamento pode ter ocorrido devido ao fato da dopamina estar protonada em pH 4,0. Uma vez que o processo é reversível, a dopamina o-quinona é reduzida, gerando dopamina. Tal processo foi observado pelo pico catódico em potencial de 0,02 V em pH 4,0 e -0,05 V em pH 7,0.

Em seguida, o comportamento dos analitos foi avaliado numa solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20 mol  $\text{L}^{-1}$  como eletrólito suporte. Na FIGURA 14 são mostrados os voltamogramas cíclicos obtidos para o ácido ascórbico (AA) e dopamina (DA) em concentrações de 0,10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , respectivamente, na região de potencial de -0,4 a 1,0 V, com velocidade de varredura de 50  $\text{mV s}^{-1}$ .

FIGURA 14 - VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA DA E AA EM CONCENTRAÇÃO DE 0,10 mmol  $\text{L}^{-1}$ , EM SOLUÇÃO DE  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20 mol  $\text{L}^{-1}$ .



É possível observar, no voltamograma da dopamina, um potencial de pico (anódico) de 0,52 V, e potencial de pico catódico de 0,19 V. No voltamograma do ácido ascórbico, o potencial de pico anódico foi de 0,39 V.

A partir dos estudos de voltametria cíclica, foi realizado um estudo de potenciais, a fim de obter os potenciais ótimos a serem utilizados nas análises por MPA.

## 4.2 DEFINIÇÃO DE POTENCIAIS

Os perfis voltamétricos obtidos para os analitos foram utilizados como base para estabelecer, para cada eletrólito testado, as faixas de potenciais a serem avaliados, com o objetivo de definir um par de potenciais que promovam os processos redox do ácido ascórbico e da dopamina em soluções contendo os dois analitos simultaneamente.

A TABELA 3 a seguir apresenta os potenciais de pico catódicos e anódicos observados nas análises por voltametria cíclica para os processos redox de dopamina e ácido ascórbico.

TABELA 3 – POTENCIAIS (EM VOLTS) DE PICO OBTIDOS NA VOLTAMETRIA CÍCLICA DE ÁCIDO ASCÓRBICO E DOPAMINA EM CADA ELETRÓLITO TESTADO.

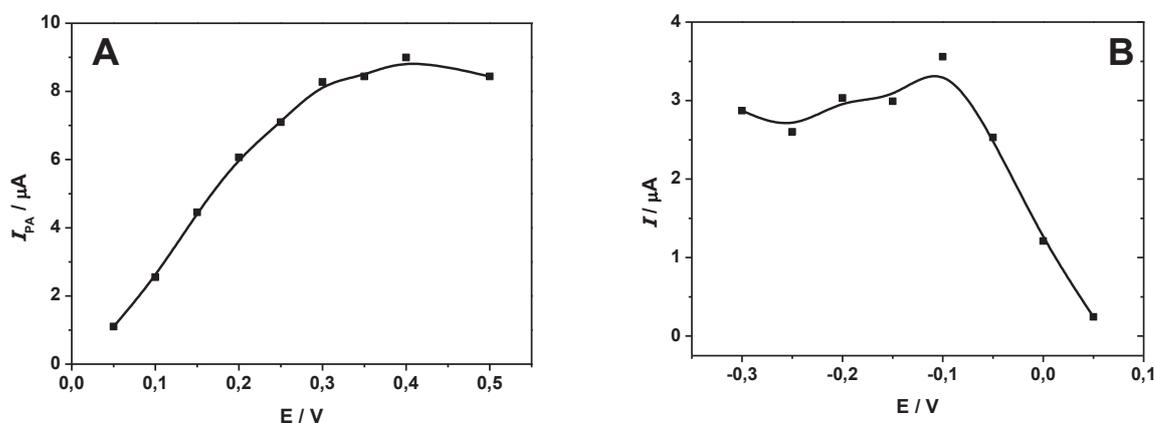
<b>ELETRÓLITO</b>	<b>FOSFATO pH 4,0</b>	<b>FOSFATO pH 7,0</b>	<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>
<b>PROCESSO REDOX</b>			
Ácido ascórbico - oxidação	0,15	0,15	0,39
Dopamina – oxidação	0,29	0,11	0,52
Dopamina o-quinona - redução	0,02	-0,05	0,19

Foram testados vários potenciais de oxidação e redução, e essa análise gerou, para cada eletrólito, um gráfico de intensidade de corrente *versus* potencial aplicado, sendo assim possível identificar os potenciais mais adequados para processos de oxidação e redução dos analitos, respectivamente.

Iniciou-se o estudo de potenciais com o eletrólito tampão fosfato pH 4,0. As correntes geradas na aplicação de cada potencial foram registradas. Os resultados dessa análise são mostrados na FIGURA 15-A

Em seguida, foram testados os potenciais de redução. A FIGURA 15-B apresenta os resultados obtidos para essa análise.

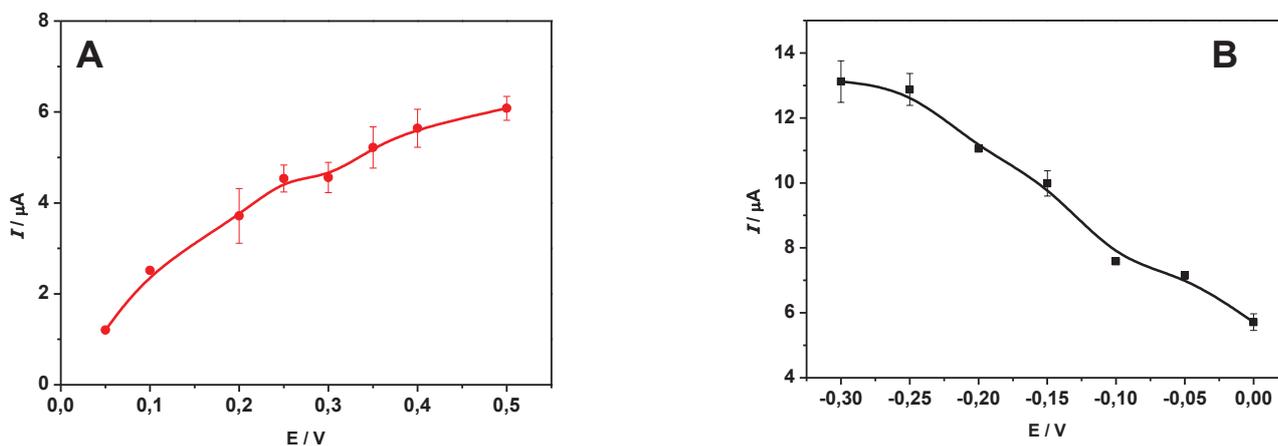
FIGURA 15 – ESTUDO DE POTENCIAIS DE OXIDAÇÃO DE DA E AA (A) E REDUÇÃO DA DOPAMINA O-QUINONA (B). ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSFATO PH 4,0.



Na FIGURA 15-A observa-se que o aumento do potencial é acompanhado por um aumento nas correntes geradas até 0,4 V, quando a corrente volta a cair. A FIGURA 15-B mostra que potenciais maiores que -0,1 V causam diminuição das correntes de redução geradas. Sendo assim, os maiores valores de corrente anódica e catódica, respectivamente, foram obtidos na aplicação dos seguintes potenciais: 0,4 e -0,1 V. Esses, portanto foram os potenciais aplicados na MPA para as próximas análises utilizando tampão fosfato pH 4,0 como eletrólito.

Em seguida, o mesmo procedimento foi seguido, porém utilizando tampão fosfato pH 7,0 como eletrólito. Os resultados obtidos para os potenciais de oxidação e redução, respectivamente, são apresentados na FIGURA 16.

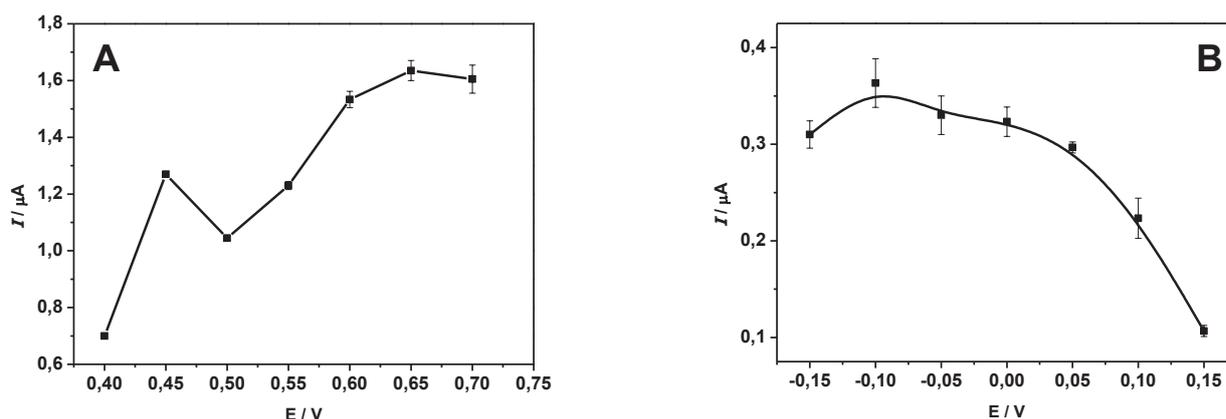
FIGURA 16 - ESTUDO DE POTENCIAIS DE OXIDAÇÃO DE DA E AA (A) E REDUÇÃO DA o-DQ (B). ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSFATO pH 7,0.



A análise da FIGURA 16-A revela que as maiores correntes obtidas a partir do potencial 0,4 V. Na FIGURA 16-B, observa-se que quanto mais negativos os potenciais, maiores os valores de corrente obtidos. Considerando o voltamograma cíclico da dopamina em tampão fosfato pH 7,0, observa-se que o potencial de -0,1 V é suficiente para promover a redução da dopamina o-quinona. Dessa maneira, foi possível utilizar o mesmo par de potenciais em tampão fosfato pH 4,0 e pH 7,0: 0,4 e -0,1 V.

O estudo de potenciais foi realizado também utilizando o eletrólito  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20 mol  $\text{L}^{-1}$ . Os resultados são apresentados na FIGURA 17.

FIGURA 17 - ESTUDO DE POTENCIAIS DE OXIDAÇÃO DE DA E AA (A) E REDUÇÃO DA o-DQ (B). ELETRÓLITO:  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20 mol  $\text{L}^{-1}$ .



Para o eletrólito  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20 mol  $\text{L}^{-1}$ , os potenciais que geraram as maiores correntes de oxidação e redução, respectivamente, foram: 0,65 e -0,10 V, sendo escolhidos para as próximas análises.

Os potenciais definidos para os processos de oxidação e redução em todos os eletrólitos estão relacionados na TABELA 4 a seguir.

TABELA 4 – PARES DE POTENCIAIS ESCOLHIDOS (EM VOLTS) PARA A MPA PARA CADA ELETRÓLITO TESTADO.

PROCESSO REDOX	ELETRÓLITO		
	FOSFATO pH 4,0	FOSFATO pH 7,0	$\text{H}_2\text{SO}_4$
Oxidação	0,40	0,40	0,65
Redução	-0,10	-0,10	-0,10

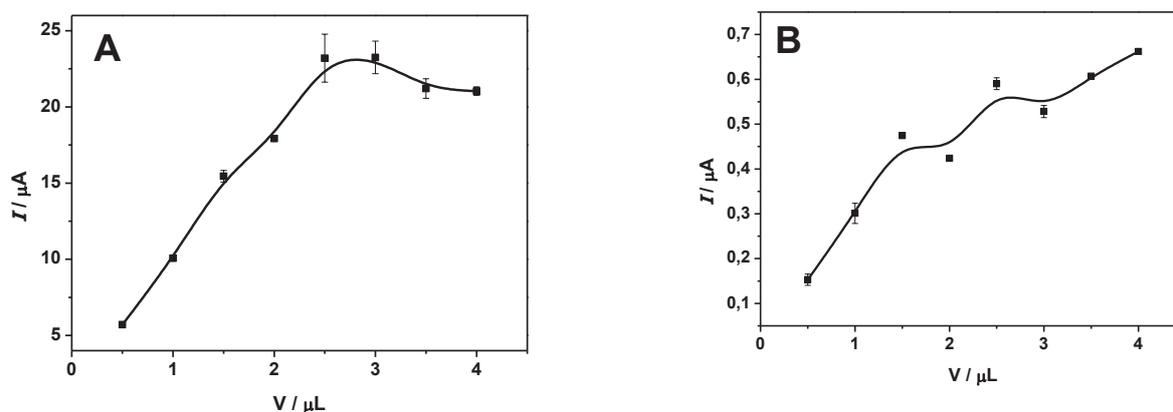
## 4.3 OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS EXPERIMENTAIS

### 4.3.1 Volume de injeção

O volume de solução (amostra ou solução padrão) injetado próximo à região de detecção do  $\mu$ TED foi variado a fim de se obter o volume ótimo para as próximas análises.

A FIGURA 18 mostra os resultados obtidos para o estudo realizado em tampão fosfato pH 4,0. Este estudo foi realizado em apenas um dos três eletrólitos testados no desenvolvimento da metodologia, pois a composição do eletrólito não é fator determinante nesse parâmetro, e sim o volume de solução adicionado que gera os maiores valores de corrente.

FIGURA 18 – AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO VOLUME DE INJEÇÃO NAS INTENSIDADES DE CORRENTES DE OXIDAÇÃO (A) E REDUÇÃO (B). ELETRÓLITO: TAMPÃO FOSFATO pH 4,0. POTENCIAIS APLICADOS NA MPA: 0,4 E -0,1 V.



É possível observar, na FIGURA 18-A, que o aumento do volume de injeção causa um aumento na corrente de oxidação, até o volume de 2,5  $\mu$ L. Sendo injetados volumes maiores de solução, passa-se a observar um decréscimo nas intensidades de corrente. Na FIGURA 18-B observa-se também uma tendência geral de aumento das correntes de redução em função do aumento do volume de injeção. O comportamento esperado era justamente este aumento nas intensidades de acordo com o aumento do volume de injeção, uma vez que quanto maior é o volume, maior a quantidade de analitos sofrendo processos redox quando em contato com o eletrodo impresso gerando maiores intensidades de corrente.

Durante a realização dos experimentos observou-se que volumes superiores a 2,0  $\mu\text{L}$  não são adequados, pelo fato de a solução ser injetada nos fios têxteis que compõem o canal microfluídico. Para injeções com volumes a partir de 2,5  $\mu\text{L}$ , observa-se um vazamento de solução para as laterais do canal microfluídico, além de um aumento considerável do tempo de limpeza. Por esses motivos, o volume de injeção escolhido para as próximas análises foi de 2,0  $\mu\text{L}$ .

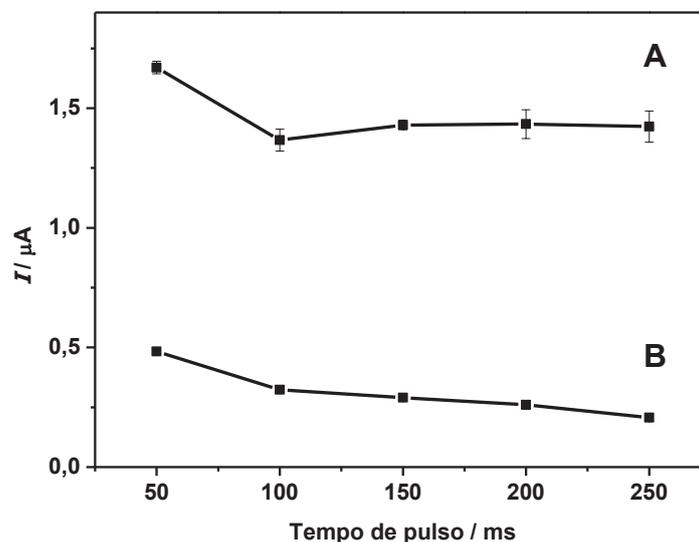
O volume de injeção foi um dos parâmetros relacionados ao  $\mu\text{TED}$  otimizados por Agustini e colaboradores [67] e os resultados deste trabalho corroboram com as observações feitas anteriormente. A faixa de volume avaliada foi exatamente a mesma avaliada no presente trabalho. Os autores verificaram um aumento linear de corrente ao se aumentar os volumes de 0,5 a 2,0  $\mu\text{L}$ , devido a uma menor dispersão da amostra quando maiores volumes são injetados próximo à região de detecção. Porém, para volumes maiores de 2,0  $\mu\text{L}$ , o aumento nas correntes foi menos pronunciado, demonstrando que o canal microfluídico é incapaz de suportar mais de 2,0  $\mu\text{L}$  de solução, sendo este o valor selecionado pelos autores.

#### 4.3.2 Tempo de pulso

Outro parâmetro experimental relacionado à técnica MPA foi avaliado: o tempo de pulso. Sabe-se que a amperometria de múltiplos pulsos permite a aplicação de mais de um potencial a uma mesma solução, em pulsos de potencial, cuja duração pode ser controlada. Por exemplo, se o tempo de pulso for definido como 100 ms, o equipamento irá aplicar, pelo tempo de 100 ms, um dos potenciais definidos e em seguida 100 ms do outro potencial definido, e assim sucessivamente. Neste caso, em um intervalo de 1 segundo, tem-se cada um dos dois potenciais definidos aplicados 5 vezes. Portanto, quanto menor o tempo de pulso definido, maior será a quantidade de dados coletados para a amperometria.

Soluções contendo DA e AA em concentração de 0,10 mmol  $\text{L}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20 mol  $\text{L}^{-1}$  foram analisadas várias vezes, sendo variado o tempo de pulso, de 50 a 250 ms. Os resultados obtidos para correntes de oxidação e redução são apresentados na FIGURA 19.

FIGURA 19 - AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE PULSO NAS INTENSIDADES DE CORRENTES DE OXIDAÇÃO (A) E REDUÇÃO (B). ELETRÓLITO:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ . POTENCIAIS APLICADOS NA MPA:  $0,65 \text{ E}$  E  $-0,1 \text{ V}$ .



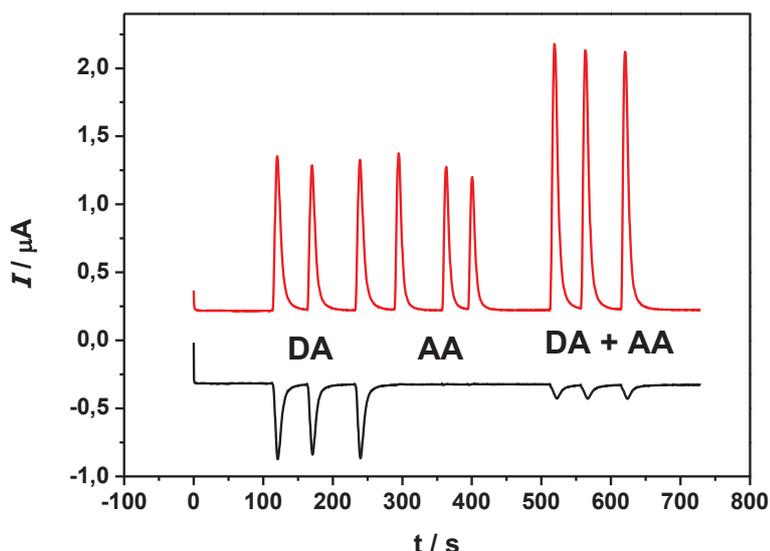
Observa-se, na FIGURA 19, que o comportamento esperado foi verificado: quanto menor o tempo de pulso dos potenciais, maior é a intensidade de corrente. Porém, o decréscimo nas correntes de oxidação e redução no intervalo de 100 a 250 ms não é expressivo. Portanto, o fator determinante para escolha do tempo de pulso para as análises posteriores foi a capacidade de coleta de dados do software utilizado. Conforme já comentado, quanto menor o tempo de pulso, maior a quantidade de dados a serem coletados por segundo de análise, e isso limita o tempo total da amperometria. Para ser possível realizar amperometrias durante até 3000 segundos, sem ter uma diminuição significativa nos sinais, optou-se por estabelecer 200 ms como tempo de pulso para as próximas análises.

#### 4.4 ESTUDOS PRELIMINARES COM O $\mu\text{TED}$

Foram realizadas medidas amperométricas preliminares empregando o  $\mu\text{TED}$  utilizando soluções de dopamina, ácido ascórbico, e mistura equimolar dos dois analitos, empregando os três eletrólitos: tampões fosfato pH 4,0 e 7,0, e  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ .

Os amperogramas obtidos para a análise de dopamina, ácido ascórbico e mistura em concentração  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato pH 4,0 são apresentados na FIGURA 20.

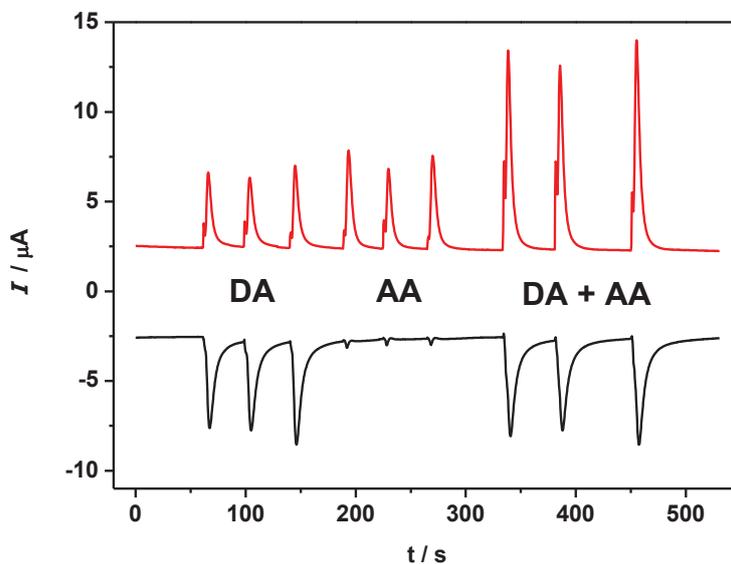
FIGURA 20 - AMPEROGRAMAS OBTIDOS PARA DETERMINAÇÃO MPA EM pH 4,0. SOLUÇÕES ANALISADAS EM TRIPLICATA: DA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (DA); AA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (AA) E MISTURA DE DA E AA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  (DA + AA) POTENCIAIS APLICADOS: 0,4 V (—) E -0,1 V (—)



Foi possível observar na FIGURA 20 que, para a determinação de dopamina, foram gerados sinais de corrente referentes à oxidação e redução do composto, devido ao processo reversível de oxidação-redução. Para o ácido ascórbico, observa-se apenas sinais de corrente anódica, o que era esperado uma vez que a oxidação do AA é irreversível. Conforme esperado, as correntes geradas pela aplicação do potencial de 0,4 V para a mistura de analitos foram maiores em relação às daquelas das soluções de cada um dos analitos separadamente, uma vez que referem-se à oxidação das duas espécies ao mesmo tempo, em concentração de  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  cada. Quanto às correntes geradas pela aplicação do potencial de -0,1 V, que promoveu a redução da dopamina o-quinona, esperava-se que os resultados fossem similares para as medidas na presença da solução de dopamina e da mistura. Porém, observou-se uma diminuição significativa nos valores de corrente para a mistura AA+DA.

Em seguida, foi realizada análise similar, porém empregando tampão fosfato pH 7,0. Os amperogramas obtidos são apresentados na FIGURA 21.

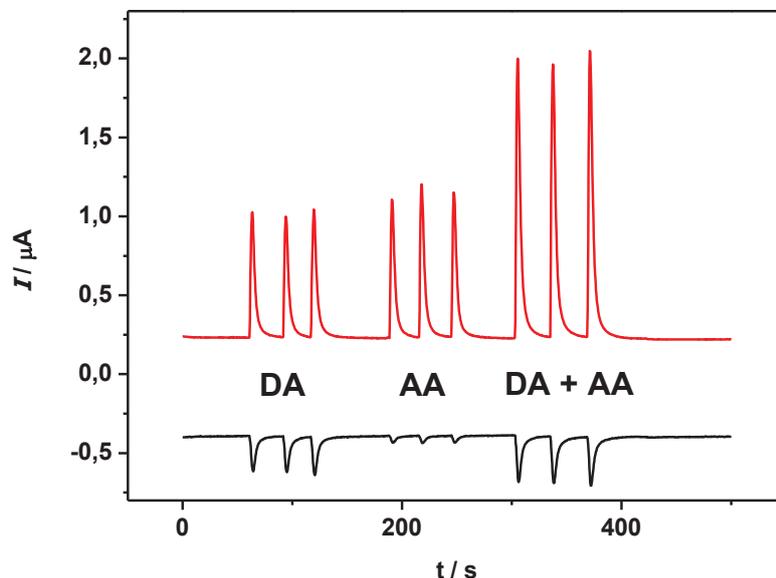
FIGURA 21 - AMPEROGRAMAS OBTIDOS PARA DETERMINAÇÃO MPA EM pH 7,0. SOLUÇÕES ANALISADAS EM TRIPLICATA: DA 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (DA); AA 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (AA) E MISTURA DE DA E AA 1,0 mmol L<sup>-1</sup> (DA + AA). POTENCIAIS APLICADOS: 0,4 V (—) E -0,1 V.



Chama atenção o fato de que em pH 7,0, os sinais de redução da dopamina para as duas condições (na presença e ausência de ácido ascórbico) apresentarem magnitude de sinal muito similar, diferentemente do perfil observado para a análise com tampão fosfato pH 4,0.

Por fim, foi realizada uma análise amperométrica de soluções de dopamina, ácido ascórbico em concentração de 0,10 mmol L<sup>-1</sup> e mistura dos dois analitos também em concentração de 0,10 mmol L<sup>-1</sup>. Os amperogramas obtidos são apresentados na FIGURA 22.

FIGURA 22 – ANÁLISE POR MPA EM SOLUÇÃO  $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  DE  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . SOLUÇÕES ANALISADAS EM TRIPLICATA: DA  $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$  (DA); AA  $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$  (AA) E MISTURA DE DA E AA  $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$  (DA + AA). POTENCIAIS APLICADOS:  $0,65 \text{ V}$  (—) E  $-0,1 \text{ V}$  (—)



Novamente, observa-se que, para a mistura, os sinais de oxidação (em vermelho) sofreram aumento em relação aos sinais dos analitos analisados separadamente, devido ao fato de serem gerados a partir da oxidação dos dois analitos simultaneamente. Quanto aos sinais de redução, não se observa diminuição na mistura em relação aos sinais obtidos na análise de dopamina separadamente.

Os sinais de redução de pequena intensidade observados para o ácido ascórbico podem ter ocorrido a uma contaminação do eletrodo, que permaneceu com traços de dopamina em sua superfície. Além disso, percebe-se que um leve aumento nos sinais de redução da dopamina em presença de ácido ascórbico (DA + AA) em relação aos sinais da dopamina na ausência de ácido ascórbico. Esse aumento pode ser devido a essa suposta contaminação.

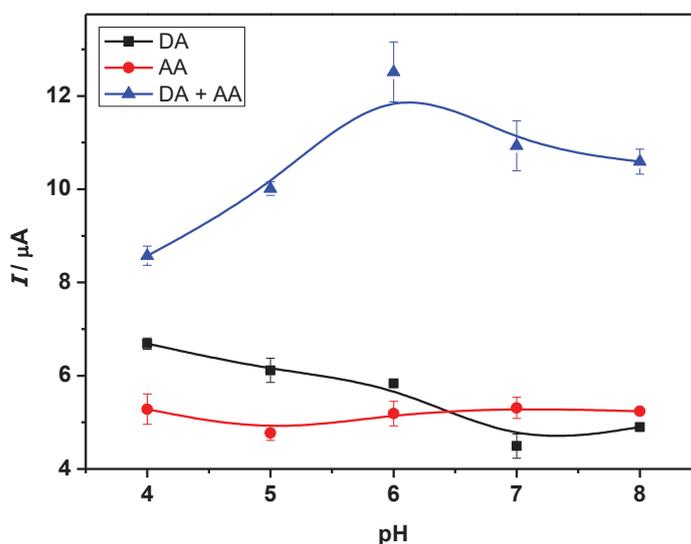
O próximo passo do trabalho consistiu em compreender o comportamento dos analitos quando misturados, e, em particular, entender o motivo pelo qual os sinais de redução da dopamina o-quinona sofreram diminuição quando em presença de ácido ascórbico em tampão fosfato pH 4,0.

#### 4.5 ESTUDO DE PH DO TAMPÃO FOSFATO

A diferença de comportamento da dopamina em presença de ácido ascórbico observada em tampão fosfato pH 4,0 e pH 7,0 motivou a realização de um estudo de pH deste eletrólito. Foi realizada uma avaliação da variação de intensidade dos sinais anódicos e catódicos em função do pH do eletrólito.

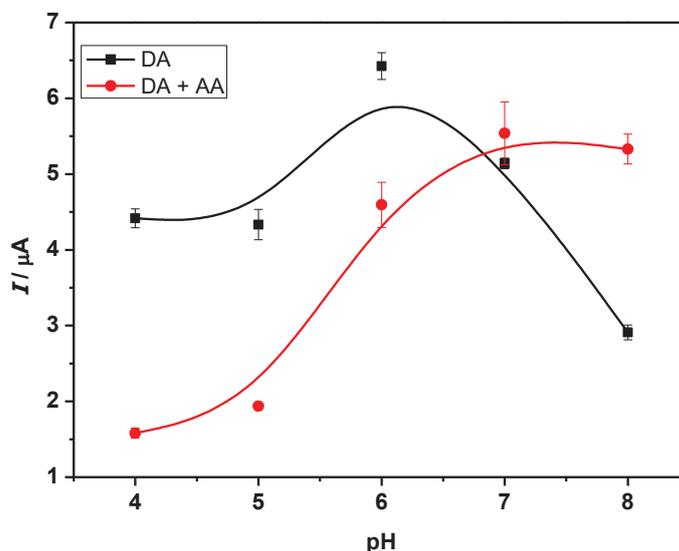
Os resultados obtidos para a oxidação de dopamina e ácido ascórbico e redução da dopamina são apresentados nas FIGURAS 23 E 24, respectivamente.

FIGURA 23 - VARIÇÃO DAS CORRENTES DE OXIDAÇÃO DE DA, AA E MISTURA EQUIMOLAR DOS DOIS ANALITOS, EM FUNÇÃO DA VARIÇÃO DO pH DO TAMPÃO FOSFATO 0,10 mol L<sup>-1</sup>. POTENCIAIS APLICADOS: 0,4 V E -0,1 V.



Observa-se que, considerando-se a mistura de analitos, a maior corrente foi gerada na análise utilizando o eletrólito em pH 6,0. Ao se analisar as tendências para os dois analitos separadamente, observa-se que a influência do pH na oxidação do ácido ascórbico não é significativa. No caso da oxidação da dopamina, em observa-se uma diminuição na corrente gerada à medida que o pH aumenta.

FIGURA 24 - VARIAÇÃO DAS CORRENTES DE REDUÇÃO DE DA, E MISTURA EQUIMOLAR DOS DOIS ANALITOS, EM FUNÇÃO DA VARIAÇÃO DO pH DO TAMPÃO FOSFATO 0,10 mol L<sup>-1</sup>. POTENCIAIS APLICADOS: 0,40 V E -0,10 V.



A variação das correntes geradas na redução da dopamina o-quinona em função do pH do eletrólito foi avaliada na ausência e presença de ácido ascórbico. Observa-se que, na ausência do ácido ascórbico, a redução da dopamina o-quinona gerou maior corrente quando utilizado eletrólito em pH 6,0. Em valores maiores de pH, a corrente diminui consideravelmente.

No caso da dopamina em presença de ácido ascórbico, observa-se que quanto mais alto o pH, maior é a corrente gerada na redução da dopamina o-quinona.

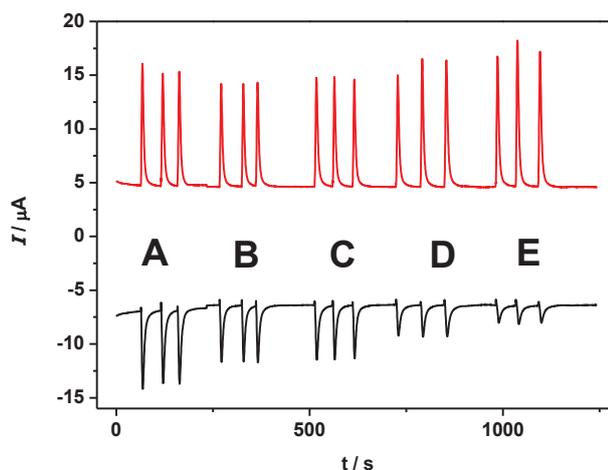
De fato, a mesma situação observada na FIGURA 24 é verificada neste estudo de pH: em pH 4,0 observa-se a maior diferença das correntes geradas para redução da dopamina o-quinona em ausência e presença de ácido ascórbico. Observa-se, ainda, que o pH em que essas duas correntes são mais próximas, é o pH 7,0.

A próxima etapa do trabalho consistiu em compreender o comportamento da dopamina em presença de ácido ascórbico.

#### 4.6 ESTUDOS COM MISTURAS DE DOPAMINA E ÁCIDO ASCÓRBICO

Com o intuito de entender o comportamento das espécies de interesse quando presentes simultaneamente em solução de tampão fosfato pH 4,0, soluções de dopamina de concentração  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  com concentrações crescentes de ácido ascórbico (0,0 (ausência) a  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) foram analisadas por MPA, visando verificar o comportamento das misturas de AA e DA. Os amperogramas obtidos estão representados na FIGURA 25.

FIGURA 25 - AMPEROGRAFAS REFERENTES À ANÁLISE DE SOLUÇÕES DE DA ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AA. (A: 0,0; B: 0,1; C: 0,4; D: 0,7; E:  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO FOSFATO pH 4,0. POTENCIAIS APLICADOS: 0,4 V (—) E -0,1 V (—).

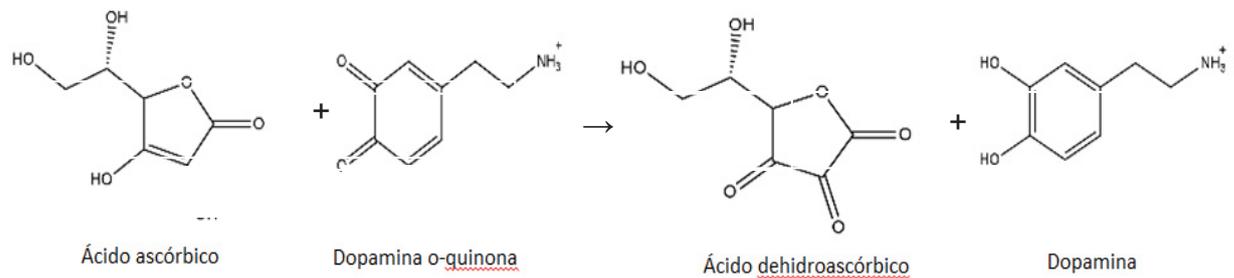


Os amperogramas obtidos permitiram visualizar o aumento das correntes geradas pela aplicação de potencial de 0,4 V, em função do aumento da concentração de ácido ascórbico em solução, e a diminuição da intensidade das correntes geradas pela aplicação de potencial de -0,1 V. Essa diminuição foi mais evidente para as maiores concentrações de ácido ascórbico avaliadas.

Esse comportamento pode ser explicado por uma reação que ocorre entre o produto de oxidação da dopamina, dopamina o-quinona (o-DQ), e o ácido ascórbico (AA). Conforme apresentado na reação da FIGURA 26, parte da o-DQ é consumida

promovendo a oxidação do ácido ascórbico a ácido dehidroascórbico (DHA). A porção de o-DQ que não foi consumida na reação do ácido ascórbico, é oxidada novamente a DA, o que gera um desvio negativo, conforme observado na diminuição dos sinais de redução da DA [51].

FIGURA 26 - REAÇÃO ENTRE ÁCIDO ASCÓRBICO E DOPAMINA O-QUINONA. (AA: ÁCIDO ASCÓRBICO; DA: DOPAMINA; O-DQ: DOPAMINA O-QUINONA; DHA: ÁCIDO DEHIDROASCÓRBICO.)



Fonte: Adaptado de Gimenes et.al. [51].

Como demonstrado anteriormente, entre os eletrólitos testados, o tampão fosfato pH 7,0 e o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20 mol  $\text{L}^{-1}$  não causaram desvio negativo no sinal de redução da dopamina quando na presença de ácido ascórbico. Assim, a etapa seguinte consistiu na realização de medidas amperométricas na presença de dopamina em concentração fixa e ácido ascórbico em concentrações crescentes, com o objetivo de determinar a razão máxima de concentração de ácido ascórbico e dopamina que não causaria diminuição do sinal de redução da dopamina, para esses dois eletrólitos. Os amperogramas obtidos são apresentados nas FIGURAS 27 e 28, para tampão fosfato pH 7,0 e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,20 mol  $\text{L}^{-1}$  respectivamente.

FIGURA 27 - AMPEROGRAMAS (N=3) OBTIDOS APÓS ADIÇÕES DE DA  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AA (A: 0,0; B: 0,25; C: 0,5; D: 0,75; E: 1,0; F: 1,25; G: 1,5; H: 1,75; I:  $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). ELETRÓLITO SUPORTE: TAMPÃO FOSFATO pH 7,0. POTENCIAIS APLICADOS: 0,4 V E -0,1 V.

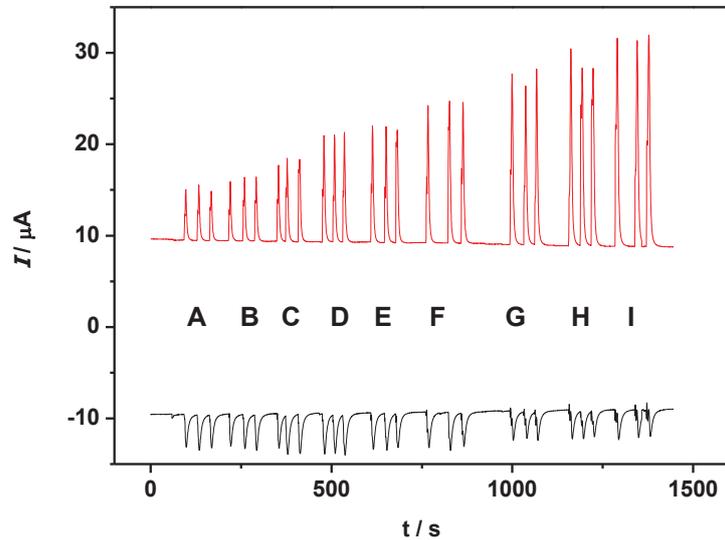
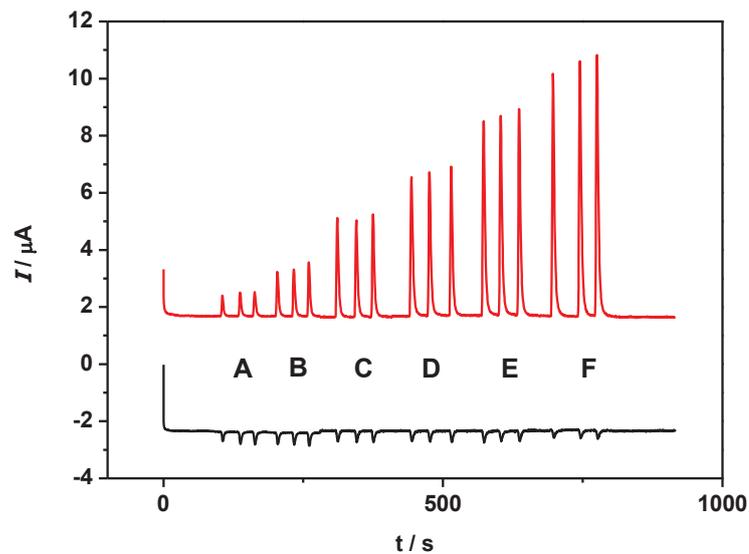


FIGURA 28 - AMPEROGRAMAS OBTIDOS (N=3) APÓS ADIÇÕES DE SOLUÇÕES DE DA ( $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ ) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE AA (A: 0,1; B: 0,2; C: 0,4; D: 0,6; E: 0,8; F:  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ). ELETRÓLITO SUPORTE:  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ . POTENCIAIS APLICADOS: 0,65 e -0,1 V.



Na FIGURA 27, foi observado que o sinal de redução da dopamina permaneceu constante até a adição de AA em concentração de  $1,25 \text{ mmol L}^{-1}$ .

Acima deste valor, notou-se a diminuição significativa dos sinais transientes, sendo que a concentração de ácido ascórbico encontrava-se acima de 1,5 vezes mais concentrada que a concentração de dopamina. Portanto, para as medidas simultâneas de AA e DA é possível utilizar tampão fosfato pH 7,0 como eletrólito suporte em concentrações equimolares de 1,0 mmol L<sup>-1</sup> de dopamina e ácido ascórbico.

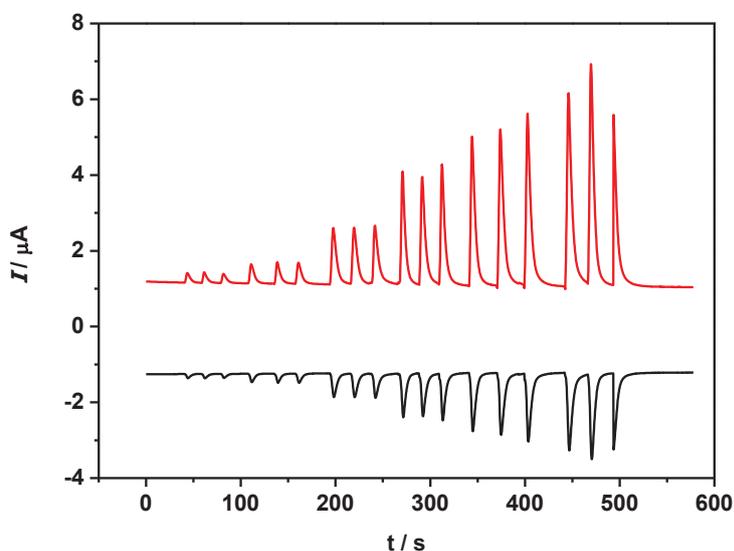
Já empregando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como eletrólito suporte, as medidas amperométricas apresentadas na FIGURA 28 permitem concluir que o sinal de redução da dopamina começa a sofrer leves alterações nas soluções em que o ácido ascórbico está presente em concentrações entre 8 e 10 vezes maiores em relação à concentração de dopamina (na FIGURA 28, sinais E e F, respectivamente).

Portanto, o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup> demonstrou melhor desempenho em relação ao tampão fosfato pH 7,0, e foi escolhido para ser empregado nos estudos seguintes.

#### 4.7 ESTUDOS DE QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DOS ANALITOS

Tendo em vista a quantificação simultânea dos analitos, foi estabelecida uma relação entre as correntes de oxidação e redução da dopamina. Para isso, soluções de dopamina (em ausência de ácido ascórbico) com concentrações crescentes (de 5 x 10<sup>-5</sup> a 9 x 10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>) foram analisadas em triplicata, com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup> como eletrólito suporte, e todos os parâmetros já otimizados foram aplicados. Os amperogramas obtidos para essa análise são apresentados na FIGURA 29 a seguir.

FIGURA 29 - AMPEROGRAMAS OBTIDOS (N=3) APÓS ADIÇÕES DE SOLUÇÕES DE DA (0,01 a 0,9 mmol L<sup>-1</sup>). ELETRÓLITO SUPORTE: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>. POTENCIAIS APLICADOS: 0,65 e -0,1 V.



Na FIGURA 29, observa-se que à medida que a concentração de dopamina aumenta, há um aumento nos sinais de corrente anódicos e catódicos. Para as 18 soluções analisadas, foram quantificados os sinais de corrente de redução e oxidação, e calculada a razão entre as duas correntes. Os resultados obtidos estão organizados na TABELA 5.

TABELA 5 – CÁLCULO DA RAZÃO ENTRE OS SINAIS CATÓDICO E ANÓDICO DA DOPAMINA.

Solução	Corrente de redução (μA)	Corrente de oxidação (μA)	Razão
Replicata 1 – Nível 1	0,11	0,29	0,38
Replicata 2 – Nível 1	0,13	0,28	0,46
Replicata 3 – Nível 1	0,11	0,27	0,41
Replicata 1 – Nível 2	0,23	0,53	0,43
Replicata 2 – Nível 2	0,24	0,58	0,41
Replicata 3 – Nível 2	0,25	0,59	0,42
Replicata 1 – Nível 3	0,66	1,50	0,44
Replicata 2 – Nível 3	0,61	1,50	0,41
Replicata 3 – Nível 3	0,65	1,53	0,42
Replicata 1 – Nível 4	1,17	2,97	0,39
Replicata 2 – Nível 4	1,13	2,86	0,40
Replicata 3 – Nível 4	1,25	3,16	0,40
Replicata 1 – Nível 5	1,52	3,97	0,38
Replicata 2 – Nível 5	1,66	4,16	0,40
Replicata 3 – Nível 5	1,76	4,51	0,39
Replicata 1 – Nível 6	2,06	5,21	0,40
Replicata 2 – Nível 6	1,97	5,06	0,39
Replicata 3 – Nível 6	2,06	5,82	0,35
<b>Média</b>	-	-	<b>0,40</b>
<b>Desvio padrão</b>	-	-	<b>0,02</b>

FONTE: O autor (2019)

. Foi calculada, ainda, a média de todas as razões, sendo obtido um valor de 0,40. Ou seja, em média, quando é efetuada uma divisão dos valores de corrente de redução pela corrente de oxidação, obtém-se um valor de 0,4, o que pode ser demonstrado na Equação (1)

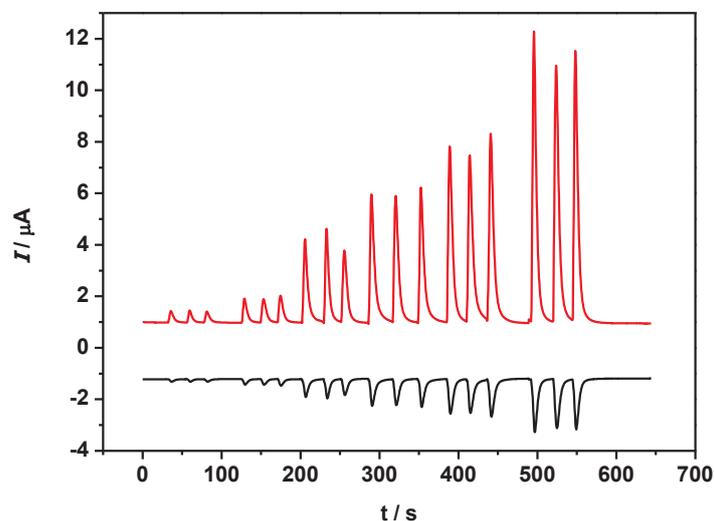
$$\frac{\textit{Corrente de redução}}{\textit{Corrente de oxidação}} = 0,4 \quad (1)$$

O desvio padrão obtido para esse conjunto de razões foi de 0,02. A razão foi calculada para concentrações diferentes de dopamina. A avaliação das razões obtidas não mostra uma relação evidente entre concentração de dopamina e a razão obtida.

Esta relação entre as correntes geradas na oxidação e na redução é interessante para determinações simultâneas de dopamina e ácido ascórbico, pois as correntes catódicas referem-se apenas à redução da dopamina o-quinona. A relação entre as correntes catódicas e anódicas pode definir qual a contribuição da dopamina no sinal de corrente anódica referente à mistura de dopamina e ácido ascórbico.

A fim de ser avaliada a eficiência do cálculo proposto, foi construída uma curva com soluções de concentrações crescentes de dopamina e ácido ascórbico (de  $5 \times 10^{-5}$  a  $9 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>). O amperograma obtido é apresentado na FIGURA 30.

FIGURA 30 - AMPEROGRAMAS OBTIDOS (N=3) APÓS ADIÇÕES DE SOLUÇÕES DE DA E AA (0,01 a 0,9 mmol L<sup>-1</sup>). ELETRÓLITO SUPORTE: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>. POTENCIAIS APLICADOS: 0,65 e -0,1 V.



Todos os sinais anódicos e catódicos gerados nessa análise foram quantificados. Em seguida, utilizando a equação (1), foi possível determinar a porção dos sinais anódicos da mistura que se refere à oxidação apenas da dopamina. Este cálculo foi realizado utilizando a equação (2):

$$\frac{\text{Corrente de redução (mistura)}}{0,4} = \text{Corrente de oxidação da dopamina} \quad (2)$$

Dessa maneira, foi possível determinar a porção da corrente de oxidação da mistura que se refere somente à oxidação da dopamina. Em seguida, utilizando a equação (3), a corrente de oxidação do ácido ascórbico foi calculada.

$$\begin{aligned} &\text{Corrente de oxidação (mistura)} - \text{Corrente de oxidação (dopamina)} = \\ &\text{Corrente de oxidação (ácido ascórbico)} \end{aligned} \quad (3)$$

A TABELA 6 a seguir mostra os valores obtidos ao serem realizados os cálculos descritos.

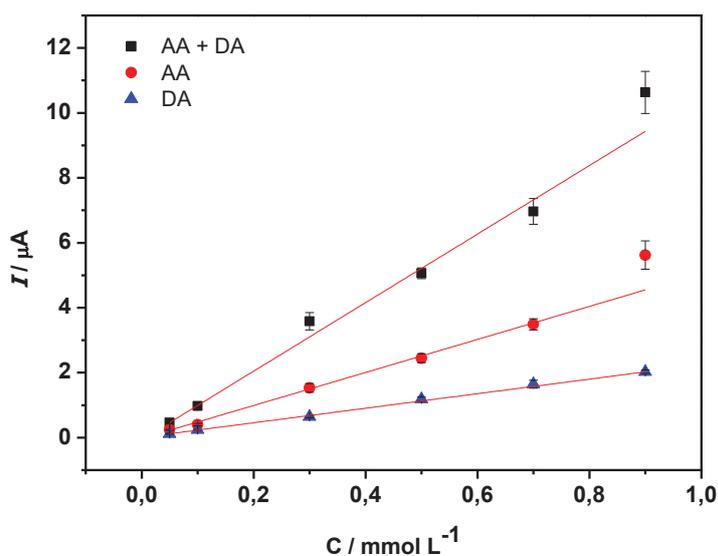
TABELA 6 – VALORES DE CORRENTE PARA DOPAMINA E ÁCIDO ASCÓRBICO.

Solução	Corrente de oxidação AA e DA ( $\mu\text{A}$ )	Corrente de redução DA ( $\mu\text{A}$ )	Corrente de oxidação DA ( $\mu\text{A}$ )	Corrente de oxidação AA ( $\mu\text{A}$ )
Replicata 1 – Nível 1	0,46	0,09	0,23	0,24
Replicata 2 – Nível 1	0,48	0,09	0,23	0,26
Replicata 3 – Nível 1	0,45	0,09	0,23	0,23
Replicata 1 – Nível 2	0,96	0,22	0,55	0,41
Replicata 2 – Nível 2	0,91	0,22	0,55	0,36
Replicata 3 – Nível 2	1,06	0,25	0,63	0,44
Replicata 1 – Nível 3	3,80	0,87	2,18	1,63
Replicata 2 – Nível 3	3,28	0,76	1,90	1,38
Replicata 3 – Nível 3	3,67	0,83	2,08	1,60
Replicata 1 – Nível 4	5,04	1,09	2,73	2,32
Replicata 2 – Nível 4	4,91	0,99	2,48	2,44
Replicata 3 – Nível 4	5,24	1,37	2,65	2,59
Replicata 1 – Nível 5	6,95	1,31	3,43	3,53
Replicata 2 – Nível 5	6,80	1,49	3,28	3,31
Replicata 3 – Nível 5	7,37	2,09	3,73	3,65
Replicata 1 – Nível 6	11,27	1,92	5,23	6,05
Replicata 2 – Nível 6	9,97	1,92	4,80	5,17
Replicata 3 – Nível 6	10,65	2,00	5,00	5,65

FONTE: O autor (2019).

Os valores da TABELA 6 foram utilizados para construir curvas analíticas para quantificação de dopamina e ácido ascórbico simultaneamente. As curvas construídas são apresentadas na FIGURA 31 a seguir.

FIGURA 31 – CURVAS ANALÍTICAS CONSTRUÍDAS PARA DA, AA E AA+DA.



Pode-se observar um aumento nos sinais de resposta que acompanham o aumento da concentração. A curva referente à dopamina leva em conta os sinais de redução da dopamina o-quinona, sendo, portanto, uma quantificação indireta.

A curva referente ao ácido ascórbico leva em conta as correntes de oxidação apenas dessa substância, após ter sido descontada a contribuição da oxidação da dopamina.

Na TABELA 7 a seguir são apresentados alguns parâmetros relacionados às curvas analíticas de dopamina e ácido ascórbico: sensibilidade,  $R^2$ , LOD e LOQ, calculados através das equações (4) e (5), respectivamente.

$$LOD = 3 \frac{SD}{b} \quad (4) \qquad LOQ = 10 \frac{SD}{b} \quad (5)$$

Nas equações, SD é o desvio padrão da prova em branco e b refere-se à sensibilidade (coeficiente angular da curva analítica).

TABELA 7 – FIGURAS DE MÉRITO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA ÁCIDO ASCÓRBICO E DOPAMINA

Parâmetro / Analito	Sensibilidade ( $\mu\text{A L mmol}^{-1}$ )	$R^2$	LOD ( $\text{mol L}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{mol L}^{-1}$ )
Dopamina	2240,2	0,99	$1,54 \times 10^{-6}$	$5,13 \times 10^{-6}$
Ácido ascórbico	5087,0	0,99	$2,60 \times 10^{-6}$	$8,65 \times 10^{-6}$

FONTE: O autor (2019).

Os valores de LOD e LOQ obtidos para o método proposto mostram que é possível realizar a quantificação de baixos teores de AA e DA, na ordem de  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Com o objetivo de avaliar se o cálculo proposto permite realmente quantificar ácido ascórbico e dopamina simultaneamente, foi construída uma curva analítica com soluções de ácido ascórbico na ausência de dopamina (FIGURA 32). Tal curva foi plotada juntamente com a curva para AA obtida por meio do cálculo proposto. Tal comparação é apresentada na FIGURA 33.

FIGURA 32 - AMPEROGRAMAS OBTIDOS (N=3) APÓS ADIÇÕES DE SOLUÇÕES DE AA (0,01 a 0,9 mmol L<sup>-1</sup>). ELETRÓLITO SUPORTE: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,20 mol L<sup>-1</sup>. POTENCIAIS APLICADOS: 0,65 e -0,1 V.

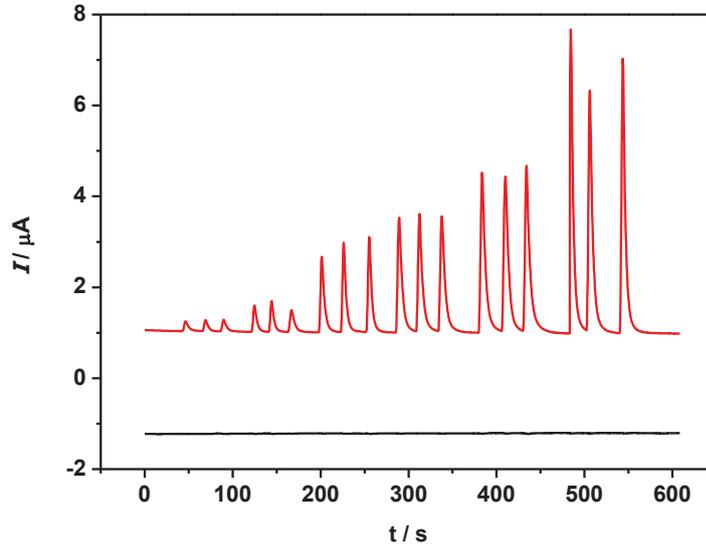
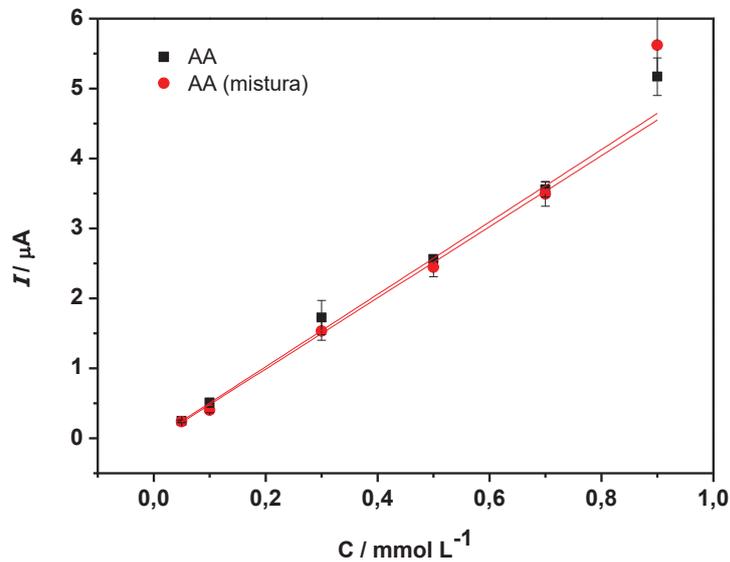


FIGURA 33 – COMPARAÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PARA O ÁCIDO ASCÓRBICO.



As sensibilidades das duas curvas são muito similares, de 5175,8  $\mu\text{A L mmol}^{-1}$  para a curva de ácido ascórbico (AA), e de 5087,0  $\mu\text{A L mmol}^{-1}$  para a curva obtida com os valores de corrente anódicas calculados a partir da relação estabelecida (AA (mistura)).

Essa semelhança marcante demonstra que a curva obtida por meio do cálculo proposto nesta metodologia tem a mesma semelhança de uma curva construída apenas para ácido ascórbico.

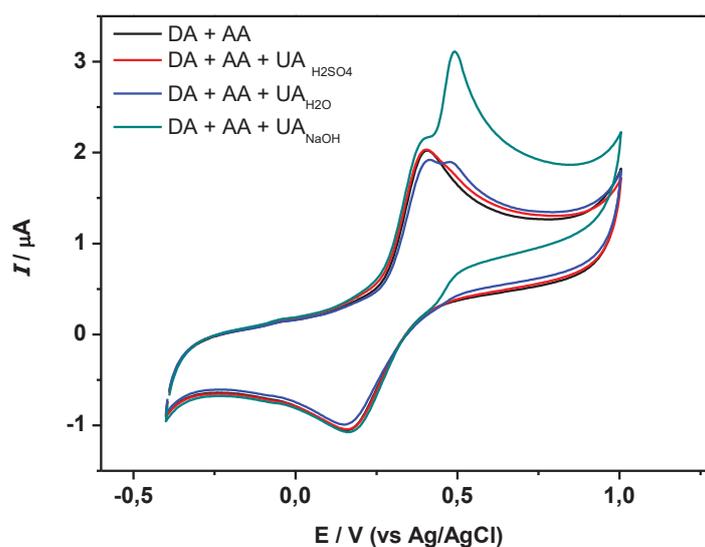
#### 4.8 ESTUDOS DE INTERFERENTES

Uma vez que um dos objetivos do presente trabalho é aplicar a metodologia proposta para determinação simultânea de dopamina e ácido ascórbico em amostras biológicas, é preciso avaliar a possível interferência de espécies concomitantes. Conforme já mostrado anteriormente, a maior dificuldade enfrentada no desenvolvimento de metodologias eletroanalíticas para quantificação simultânea desses dois analitos é a interferência do ácido úrico, que sofre oxidação em uma região de potencial próxima à da DA e AA.

O ácido úrico não se solubiliza bem em água ou em ácido sulfúrico, o eletrólito utilizado na metodologia proposta. Porém em meio alcalino, a solubilização do ácido úrico é completa.

Os voltamogramas obtidos na análise de misturas dos analitos com ácido úrico são apresentados na FIGURA 34 a seguir.

FIGURA 34 – VOLTAMOGRAMAS CÍCLICOS OBTIDOS PARA MISTURAS DE DOPAMINA, ÁCIDO ASCÓRBICO E ÁCIDO ÚRICO EM CONCENTRAÇÃO DE  $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$

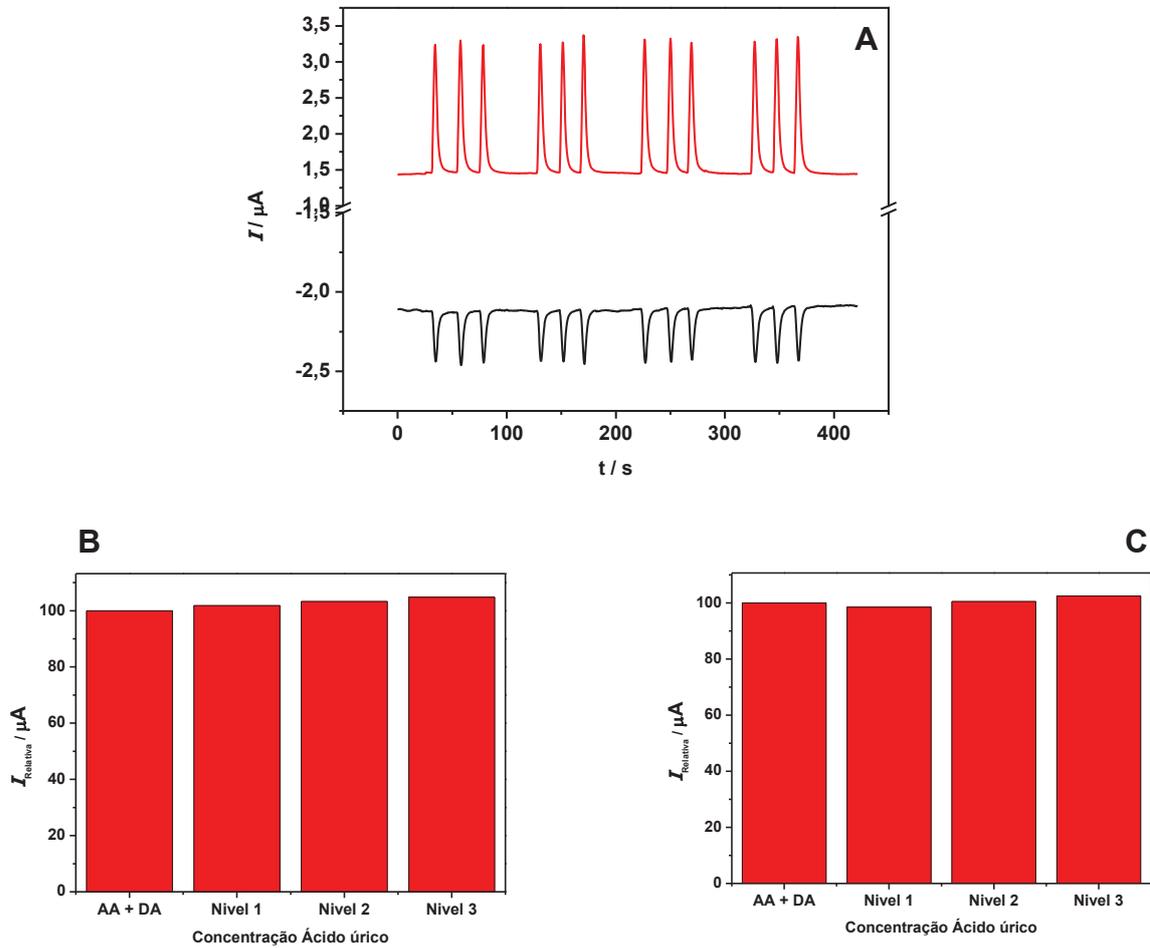


Pode-se observar que o único voltamograma que apresenta alguma interferência do ácido úrico é o da solução em que este foi solubilizado em solução de NaOH  $0,10 \text{ mol L}^{-1}$  antes de ser diluído em eletrólito. Neste voltamograma, percebe-se dois picos anódicos que quase se sobrepõem. Comparando-se com os voltamogramas das demais misturas, percebe-se que o segundo pico, com potencial de aproximadamente  $0,5 \text{ V}$  refere-se à oxidação do ácido úrico.

Sabendo-se que o comportamento voltamétrico do ácido úrico quando em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , eletrólito utilizado na metodologia, prosseguiu-se com o estudo de interferentes.

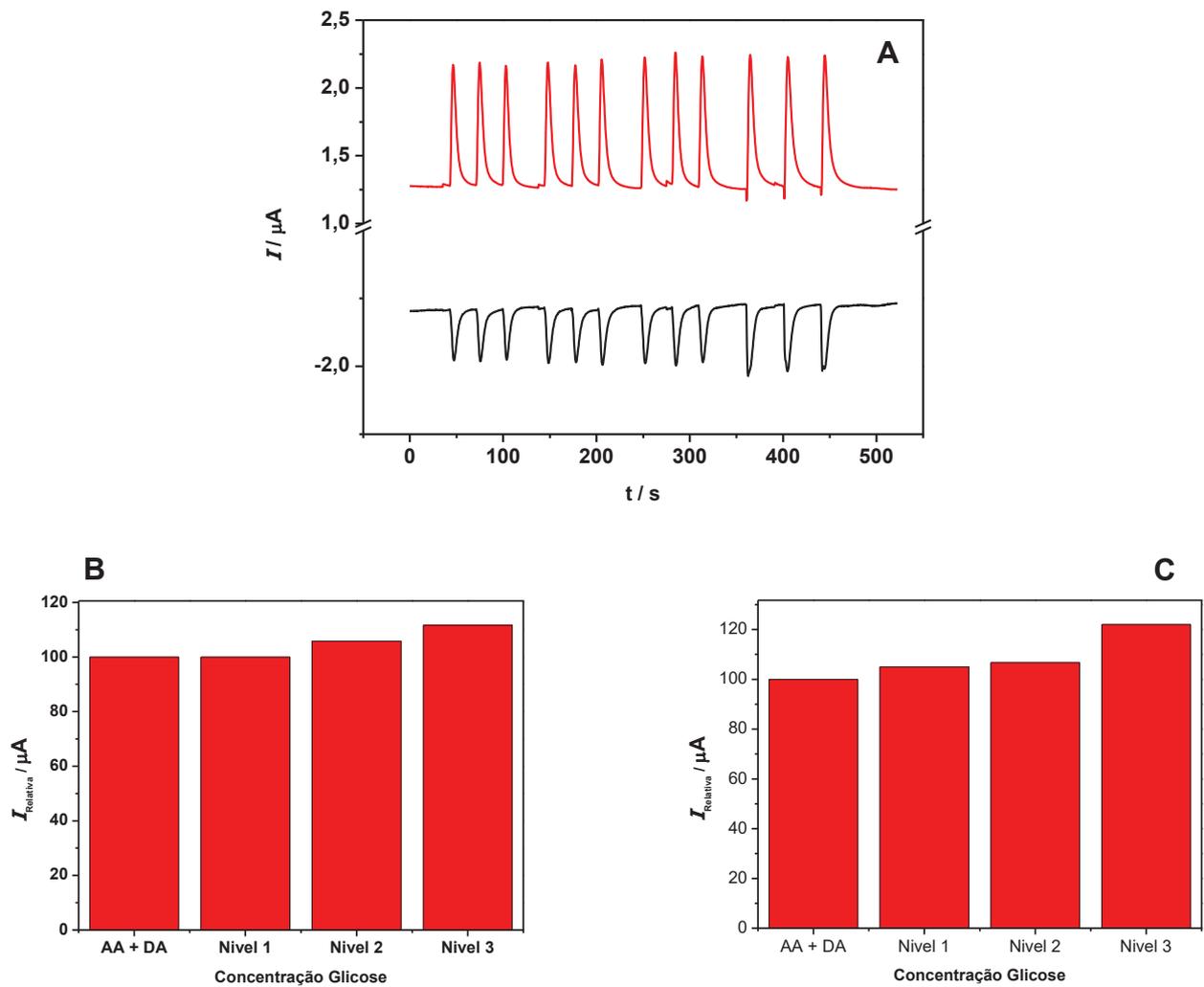
A seguir, nas FIGURAS 35, 36 e 37 são apresentados, respectivamente, os resultados obtidos para ácido úrico, glicose e cloreto de sódio. Em cada figura, têm-se os amperogramas obtido na análise das 4 soluções (controle, níveis 1, 2 e 3). Os sinais anódicos e catódicos foram quantificados e comparados, em dois gráficos de barras à solução controle, sem presença de interferente.

FIGURA 35 – AMPEROGRAMAS OBTIDOS NA ANÁLISE DA SOLUÇÃO CONTROLE, NÍVEIS 1, 2 E 3 DE ÁCIDO ÚRICO (A); CORRENTES RELATIVAS DE OXIDAÇÃO (B) E REDUÇÃO (C).



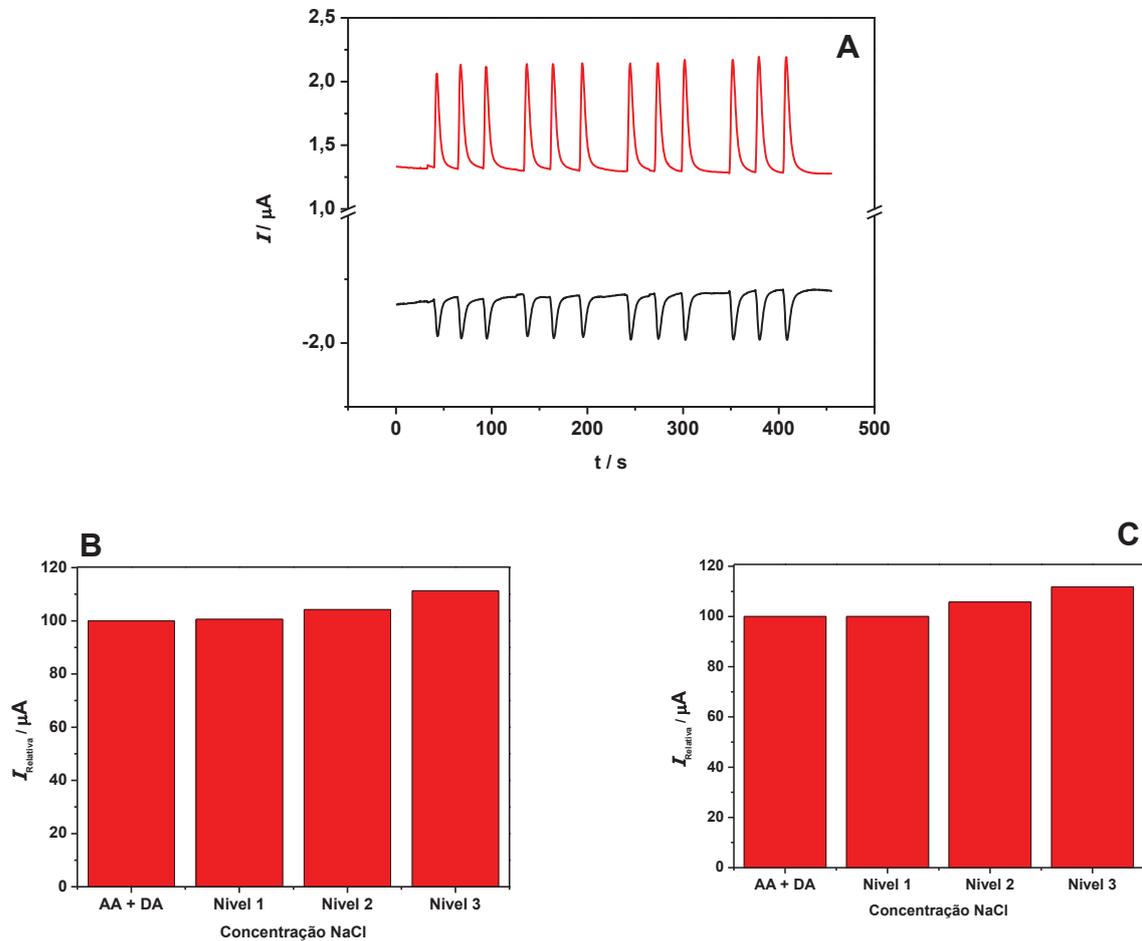
Em nenhum dos três níveis de concentração avaliados os sinais de redução ou oxidação referentes a ácido ascórbico e dopamina sofreram desvios positivos ou negativos. No caso dos sinais de oxidação, percebe-se um leve aumento à medida que aumenta a concentração do ácido úrico.

FIGURA 36 - AMPEROGRAMAS OBTIDOS NA ANÁLISE DA SOLUÇÃO CONTROLE, NÍVEIS 1, 2 E 3 DE GLICOSE (A); CORRENTES RELATIVAS DE OXIDAÇÃO (B) E REDUÇÃO (C).



Para a glicose, percebe-se que para o nível 3 (concentração de interferente 10 vezes mais alta que a concentração dos analitos) houve um aumento dos sinais de oxidação e redução, em torno de 11% e 20%, respectivamente.

FIGURA 37 - AMPEROGRAMAS OBTIDOS NA ANÁLISE DA SOLUÇÃO CONTROLE, NÍVEIS 1, 2 E 3 DE CLORETO DE SÓDIO (A); CORRENTES RELATIVAS DE OXIDAÇÃO (B) E REDUÇÃO (C).



A mesma tendência é observada para o cloreto de sódio, em que os sinais de oxidação e redução sofreram um aumento em torno de 11% quando este interferente estava presente na concentração do Nível 3.

#### 4.9 ESTUDOS COM AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO

Uma amostra de soro sanguíneo humano foi analisada através do método proposto. Uma curva analítica de dopamina e ácido ascórbico foi construída, utilizando as mesmas concentrações da etapa de estudos de quantificação simultânea dos analitos.

A amostra de soro sanguíneo foi diluída 2 vezes em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,20 \text{ mol L}^{-1}$  e analisada sem qualquer adição de analito. A diluição foi feita para diminuir a viscosidade da amostra

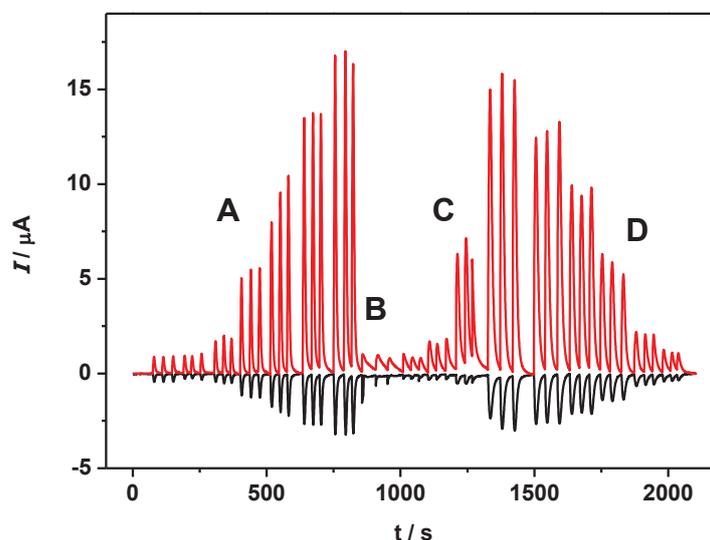
Posteriormente, foram realizadas adições de DA e AA na amostra em três níveis de concentração. As adições foram realizadas de maneira que após a diluição, fossem obtidas as concentrações de DA e AA relacionadas na TABELA 2.

A análise por MPA foi realizada empregando-se todos os parâmetros experimentais já definidos e otimizados. A sequência de injeções no  $\mu\text{TED}$  foi a seguinte:

- Pontos 1 a 6 (concentração de AA e DA crescente);
- Amostra sem adição; amostra com adição (níveis 1, 2 e 3);
- Pontos 6 a 1 (concentração de AA e DA decrescente).

A FIGURA 38 apresenta os amperogramas obtidos nesta análise.

FIGURA 38 – AMPEROGRAMA OBTIDO DA ANÁLISE POR MPA DE SEIS SOLUÇÕES DE DA+AA, EM ORDEM CRESCENTE DE CONCENTRAÇÃO (A), AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO SEM ADIÇÃO (B), AMOSTRA DE SORO SANGUÍNEO COM ADIÇÃO DE DA E AA EM TRÊS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO (C) E SOLUÇÕES DE DA+AA EM ORDEM DECRESCENTE DE CONCENTRAÇÃO (D)



O objetivo de se injetar os 6 pontos da curva em ordem crescente (antes da injeção da amostra) e em ordem decrescente (depois da injeção da amostra) foi demonstrar que o método não possui nenhum efeito de memória, e que após uma análise de amostras as intensidades de corrente para cada concentração não sofrem variações significativas. Essa comparação foi realizada separadamente para os sinais de oxidação (FIGURA 39) e redução (FIGURA 40).

FIGURA 39 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS NO SENTIDO CRESCENTE E DECRESCENTE DE CONCENTRAÇÃO (OXIDAÇÃO)

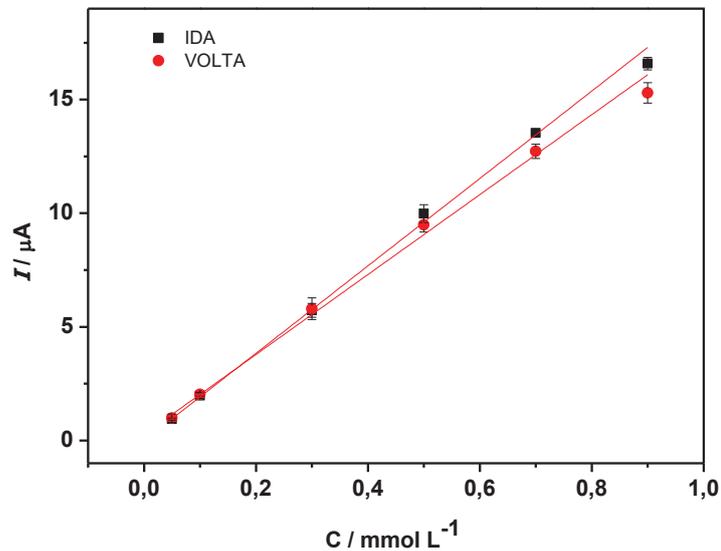
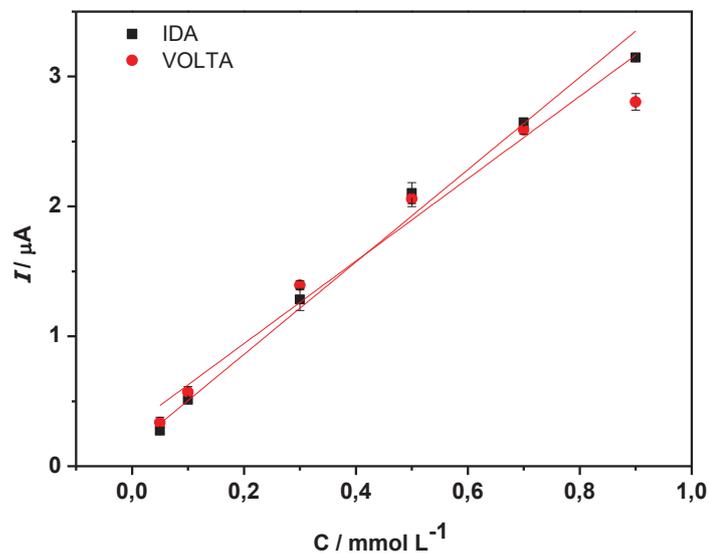


FIGURA 40 - COMPARAÇÃO DAS CURVAS NO SENTIDO CRESCENTE E DECRESCENTE DE CONCENTRAÇÃO (REDUÇÃO)



O fato de as sensibilidades serem próximas, ao se fazer a comparação das curvas de “ida” e “volta” da FIGURA 39 (oxidação) e FIGURA 40 (redução) indica que não há efeito de memória.

Os sinais transientes referente região B da FIGURA 38 sugerem a presença tanto de DA como de AA na amostra. Entretanto, analisando a região C da FIGURA 38, que trata das soluções de amostra enriquecidas com solução padrão dos

analitos, não se pode afirmar com absoluta certeza que os sinais gerados são referentes à oxidação/redução de DA e AA, uma vez que os índices de recuperação obtidos (da ordem de 60%) não podem ser considerados satisfatórios para esse nível de concentração [74].

Apesar da complexidade da matriz da amostra não permitir a quantificação dos analitos de forma satisfatória, pode-se dizer que o método proposto foi capaz de identificar a presença tanto de AA como de DA em soro sanguíneo na mesma ordem de concentração normalmente descrita para esse tipo de fluido [72, 73].

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi proposta uma metodologia para determinação eletroquímica simultânea de dopamina e ácido ascórbico em um sistema microfluídico, com a utilização de um eletrodo impresso. Como conclusões, pode-se destacar que:

Foi verificada a aplicabilidade do  $\mu$ TED ao método proposto. Foi realizada a otimização do volume de injeção, estudo que gerou conclusões similares às dos autores que criaram e otimizaram o dispositivo. Outros parâmetros, como o número de fios têxteis utilizados foram adotados segundo os resultados de tal otimização. O sistema de detecção se mostrou altamente reutilizável, tendo em vista que durante todo o período em que foram realizadas as análises, foi necessário realizar a troca dos fios de algodão e do eletrodo poucas vezes;

A técnica MPA com aplicação de dois pulsos de potencial sequencialmente se mostrou eficaz para promover a separação dos processos redox dos analitos, sendo gerados, simultaneamente, dois amperogramas: um referente à oxidação de DA e AA e outro referente à redução da o-DQ;

Procurou-se compreender a reação secundária que ocorre entre as espécies envolvidas nas reações de oxirredução que acontecem durante as análises, bem como a influência do pH do meio nos processos eletroquímicos envolvidos;

Foi possível, a partir dos sinais de corrente gerados na redução da dopamina o-quinona, calcular um fator de correção para os sinais de oxidação do ácido ascórbico, sendo possível quantificar os dois analitos simultaneamente.

A partir de uma única análise, gerar duas curvas analíticas para DA e AA, respectivamente, aplicando-se o fator de correção calculado. A partir das curvas, foram obtidos valores de LOD para DA e AA de  $1,79 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $8,31 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente. Os valores de LOQ para DA e AA foram  $8,31 \mu\text{mol L}^{-1}$  e  $27,7 \mu\text{mol L}^{-1}$ , respectivamente.

Foi realizado um estudo de interferentes, em que verificou-se que a presença de ácido úrico, glicose e cloreto de sódio não interferem significativamente nas correntes de oxidação e redução geradas na MPA.

Realizou-se uma análise de uma amostra de soro sanguíneo, em que a amostra sem adição de analitos gerou um sinal detectável para oxidação e redução. Para a amostra foi fortificada em três níveis de concentração, porém, não foram obtidos valores satisfatórios de recuperação, possivelmente devido a efeito de matriz.

A metodologia proposta se mostrou promissora para quantificação de dois importantes biomarcadores simultaneamente com a utilização de técnica eletroquímica sem a necessidade de etapa prévia de modificação de eletrodos, em um dispositivo microfluídico com possibilidade de portabilidade para aplicação futura em pontos de atendimento, por exemplo.

## REFERÊNCIAS

- [1] HU, J.; CUI, X.; GONG, Y.; XU, X.; GAO, B.; WEN, T.; LU, T. J.; XU, F. Portable microfluidic and smartphone-based devices for monitoring of cardiovascular diseases at the point of care. **Biotechnology Advances**, **34**, **3**, p.305-320, 2016.
- [2] SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. Biomarcadores em medicina. **Gazeta Médica da Bahia**, **78**, **1**, p.47-51, 2008.
- [3] BAHN, S.; SCHWARZ, E.; HARRIS, L. W.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; RAHMOUNE, H.; GUEST, P. C. Testes sanguíneos de biomarcadores para diagnóstico e tratamento de desordens mentais: foco em esquizofrenia. **Archives of Clinical Psychiatry** **40**, p.02-09, 2013.
- [4] JANKŮ, S.; KOMENDOVÁ, M.; URBAN, J. Development of an online solid-phase extraction with liquid chromatography method based on polymer monoliths for the determination of dopamine. **Journal of Separation Science**, **39**, **21**, p.4107-4115, 2016.
- [5] HASANZADEH, M.; SHADJOU, N.; DE LA GUARDIA, M. Current advancement in electrochemical analysis of neurotransmitters in biological fluids. **Trends in Analytical Chemistry**, **86**, p.107-121, 2017.
- [6] SI, B.; SONG, E. Recent Advances in the Detection of Neurotransmitters. **Chemosensors**, **6**, **1**, p.1, 2018.
- [7] NACCARATO, A.; GIONFRIDDO, E.; SINDONA, G.; TAGARELLI, A. Development of a simple and rapid solid phase microextraction-gas chromatography–triple quadrupole mass spectrometry method for the analysis of dopamine, serotonin and norepinephrine in human urine. **Analytica Chimica Acta**, **810**, p.17-24, 2014.
- [8] CHOI, S. Powering point-of-care diagnostic devices. **Biotechnology Advances**, **34**, **3**, p.321-330, 2016.
- [9] NUMAN, A.; SHAHID, M. M.; OMAR, F. S.; RAMESH, K.; RAMESH, S. Facile fabrication of cobalt oxide nanograin-decorated reduced graphene oxide composite as ultrasensitive platform for dopamine detection. **Sens. Actuator B-Chem.**, **238**, p.1043-1051, 2017.
- [10] SAJID, M.; NAZAL, M. K.; MANSHA, M.; ALSHARAA, A.; JILLANI, S. M. S.; BASHEER, C. Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: A review. **Trends in Analytical Chemistry**, **76**, p.15-29, 2016.
- [11] FERAPONTOVA, E. E. Electrochemical Analysis of Dopamine: Perspectives of Specific In Vivo Detection. **Electrochimica Acta**, **245**, p.664-671, 2017.

- [12] YANG, L.; LIU, D.; HUANG, J.; YOU, T. Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid at electrochemically reduced graphene oxide modified electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 193, p.166-172, 2014.
- [13] WANG, C.; DU, J.; WANG, H.; ZOU, C. E.; JIANG, F.; YANG, P.; DU, Y. A facile electrochemical sensor based on reduced graphene oxide and Au nanoplates modified glassy carbon electrode for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 204, p.302-309, 2014.
- [14] DU, J.; YUE, R.; REN, F.; YAO, Z.; JIANG, F.; YANG, P.; DU, Y. Novel graphene flowers modified carbon fibers for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Biosensors and Bioelectronics**, 53, p.220-224, 2014.
- [15] EMAMZADEH, F. N.; SURGUCHOV, A. Parkinson's Disease: Biomarkers, Treatment, and Risk Factors. **Front. Neurosci.**, 12, p.14, 2018.
- [16] BEITOLLAHI, H.; SAFAEI, M.; TAJIK, S. Different Electrochemical Sensors for Determination of Dopamine as Neurotransmitter in Mixed and Clinical Samples: A Review. **Anal. Bioanal. Chem. Res.**, 6, 1, p.81-96, 2019.
- [17] LIU, X.; ZHANG, W.; HUANG, L.; HU, N.; LIU, W.; LIU, Y.; LI, S.; YANG, C.; SUO, Y.; WANG, J. Fluorometric determination of dopamine by using molybdenum disulfide quantum dots. **Microchimica Acta**, 185, 4, p.234, 2018.
- [18] VUORENSOLA, K.; SIRÉN, H.; KARJALAINEN, U. Determination of dopamine and methoxycatecholamines in patient urine by liquid chromatography with electrochemical detection and by capillary electrophoresis coupled with spectrophotometry and mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, 788, 2, p.277-289, 2003.
- [19] ZHANG, L.; LI, X.; LIU, L.; LI, Y.; WANG, J. The Adequate Amount of Acid-Base Buffer for Electrochemical Investigation of Proton-Coupled Electron Transfer Reactions. **ChemistrySelect**, 3, 22, p.6267-6271, 2018.
- [20] RAHMAN, M. M.; LOPA, N. S.; JU, M. J.; LEE, J. J. Highly sensitive and simultaneous detection of dopamine and uric acid at graphene nanoplatelet-modified fluorine-doped tin oxide electrode in the presence of ascorbic acid. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 792, p.54-60, 2017.
- [21] OZCAN, A.; ILKBAS, S.; OZCAN, A. A. Development of a disposable and low-cost electrochemical sensor for dopamine detection based on poly(pyrrole-3-carboxylic acid)-modified electrochemically over-oxidized pencil graphite electrode. **Talanta**, 165, p.489-495, 2017.
- [22] SKROVANKOVA, S.; MLCEK, J.; SOCHOR, J.; BARON, M.; KYNICKY, J.; JURIKOVA, T. Determination of Ascorbic Acid by Electrochemical Techniques and other Methods. **International Journal of Electrochemical Science**, 10, p.2421-2431, 2015.

- [23] SPÍNOLA, V.; LLORENT-MARTÍNEZ, E. J.; CASTILHO, P. C. Determination of vitamin C in foods: Current state of method validation. **Journal of Chromatography A**, 1369, p.2-17, 2014.
- [24] LIU, R.; YANG, R.; QU, C. J.; MAO, H. C.; HU, Y.; LI, J. J.; QU, L. B. Synthesis of glycine-functionalized graphene quantum dots as highly sensitive and selective fluorescent sensor of ascorbic acid in human serum. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 241, p.644-651, 2017.
- [25] CHEN, Y.; ZHANG, T.; GAO, X.; PAN, W.; LI, N.; TANG, B. A highly selective and instantaneous upconversion fluorescent nanoprobe for ascorbic acid detection in biological samples. **Chin. Chem. Lett.**, 28, 10, p.1983-1986, 2017.
- [26] DUAN, R.; JIANG, J.; LIU, S.; YANG, J.; ZHU, J.; QIAO, M.; YAN, J.; HU, X. Spectrofluorometric determination of ascorbic acid using thiamine and potassium ferricyanide. **Instrumentation Science & Technology**, 45, 3, p.312-323, 2017.
- [27] CUI, W.; WANG, Y.; YANG, D.; DU, J. Fluorometric determination of ascorbic acid by exploiting its deactivating effect on the oxidase-mimetic properties of cobalt oxyhydroxide nanosheets. **Microchimica Acta**, 184, 12, p.4749-4755, 2017.
- [28] BIRGHILA, S.; POPESCU, V.; DOBRINAS, S.; MATEI, N. The spectrometric determination of the ascorbic acid from pharmaceutical products after stabilization in thiourea. **Rev. Chim.**, 54, 3, p.289-290, 2003.
- [29] CHEN, H.; LI, R.; LIN, L.; GUO, G.; LIN, J.-M. Determination of l-ascorbic acid in human serum by chemiluminescence based on hydrogen peroxide-sodium hydrogen carbonate-CdSe/CdS quantum dots system. **Talanta**, 81, 4, p.1688-1696, 2010.
- [30] WANG, J.; ZHOU, M.; DONG, R.; CONG, X.; ZHANG, R.; WANG, X. Simultaneous Determination of Peroxide Hydrogen and Ascorbic Acid by Capillary Electrophoresis with Platinum Nanoparticles Modified Micro-disk Electrode. **Electroanalysis**, 29, 11, p.2483-2490, 2017.
- [31] TURAK, F.; GÜZEL, R.; DINÇ, E. Simultaneous determination of ascorbic acid and caffeine in commercial soft drinks using reversed-phase ultraperformance liquid chromatography. **Journal of Food and Drug Analysis**, 25, 2, p.285-292, 2017.
- [32] SZULTKA, M.; BUSZEWSKA-FORAJTA, M.; KALISZAN, R.; BUSZEWSKI, B. Determination of ascorbic acid and its degradation products by high-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. **Electrophoresis**, 35, 4, p.585-592, 2014.
- [33] PISOSCHI, A. M.; POP, A.; SERBAN, A. I.; FAFANEATA, C. Electrochemical methods for ascorbic acid determination. **Electrochimica Acta**, 121, p.443-460, 2014.
- [34] ALONSO-LOMILLO, M. A.; DOMINGUEZ-RENEADO, O.; SALDANA-BOTIN, A.; ARCOS-MARTINEZ, M. J. Determination of ascorbic acid in serum samples by

screen-printed carbon electrodes modified with gold nanoparticles. **Talanta**, 174, p.733-737, 2017.

[35] ABELLAN-LLOBREGAT, A.; GONZALEZ-GAITAN, C.; VIDAL, L.; CANALS, A.; MORALLON, E. Portable electrochemical sensor based on 4-aminobenzoic acid-functionalized herringbone carbon nanotubes for the determination of ascorbic acid and uric acid in human fluids. **Biosens. Bioelectron.**, 109, p.123-131, 2018.

[36] GIMENES, D. T.; MARRA, M. C.; DE FREITAS, J. M.; ABARZA MUÑOZ, R. A.; RICHTER, E. M. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 212, p.411-418, 2015.

[37] HALDORAI, Y.; VILIAN, A. T. E.; RETHINASABAPATHY, M.; HUH, Y. S.; HAN, Y.-K. Electrochemical determination of dopamine using a glassy carbon electrode modified with TiN-reduced graphene oxide nanocomposite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 247, p.61-69, 2017.

[38] LI, J.; XIA, J.; ZHANG, F.; WANG, Z.; LIU, Q. A Novel Electrochemical Sensor Based on Copper-based Metal-Organic Framework for the Determination of Dopamine. **Journal of the Chinese Chemical Society**, 65, 6, p.743-749, 2018.

[39] SANTOS, W. T. P. D.; GIMENES, D. T.; RICHTER, E. M.; ANGNES, L. Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações. **Química Nova**, 34, p.1753-1761, 2011.

[40] FU, L.; WANG, A.; LAI, G.; SU, W.; MALHERBE, F.; YU, J.; LIN, C.-T.; YU, A. Defects regulating of graphene ink for electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Talanta**, 180, p.248-253, 2018.

[41] ZHU, S. L., HAIJUAN; NIU, WENXIN; XU, GUOBAO. Simultaneous electrochemical determination of uric acid, dopamine, and ascorbic acid at single-walled carbon nanohorn modified glassy carbon electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, 25, 4, p.940-943, 2009.

[42] SHENG, Z.-H.; ZHENG, X.-Q.; XU, J.-Y.; BAO, W.-J.; WANG, F.-B.; XIA, X.-H. Electrochemical sensor based on nitrogen doped graphene: Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Biosensors and Bioelectronics**, 34, 1, p.125-131, 2012.

[43] THIRUMALAI, D.; SUBRAMANI, D.; YOON, J.-H.; LEE, J.; PAIK, H.-J.; CHANG, S.-C. De-bundled single-walled carbon nanotubemodified sensors for simultaneous differential pulse voltammetric determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid. **New Journal of Chemistry**, 42, p.2432-2438, 2018.

[44] HE, W.; DING, Y.; JI, L.; ZHANG, X.; YANG, F. A high performance sensor based on bimetallic NiCu nanoparticles for the simultaneous determination of five species of biomolecules. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 241, p.949-956, 2017.

- [45] NAROU EI, F. H.; TAMMANDANI, H. K.; GHALANDARZEHI, Y.; SABBAGHI, N.; NOROOZIFAR, M. An Electrochemical Sensor based on conductive polymers/Graphite Paste Electrode for Simultaneous Determination of Dopamine, Uric acid and Tryptophan in Biological Samples. **International Journal of Electrochemical Science**, 12, p.7739-7753, 2017.
- [46] ZAIDI, S. A. Development of molecular imprinted polymers based strategies for the determination of Dopamine. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 265, p.488-497, 2018.
- [47] ZHANG, D.; LI, L.; MA, W.; CHEN, X.; ZHANG, Y. Electrodeposited reduced graphene oxide incorporating polymerization of l-lysine on electrode surface and its application in simultaneous electrochemical determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Materials Science and Engineering: C**, 70, p.241-249, 2017.
- [48] CHANG, Z.; ZHOU, Y. L.; HAO, L. J.; HAO, Y. Q.; ZHU, X.; XU, M. T. Simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid using beta-cyclodextrin/Au nanoparticles/graphene-modified electrodes. **Analytical Methods**, 9, 4, p.664-671, 2017.
- [49] GHANBARI, K.; BONYADI, S. An electrochemical sensor based on reduced graphene oxide decorated with polypyrrole nanofibers and zinc oxide-copper oxide p-n junction heterostructures for the simultaneous voltammetric determination of ascorbic acid, dopamine, paracetamol, and tryptophan. **New Journal of Chemistry**, 42, 11, p.8512-8523, 2018.
- [50] KACHOOSANGI, R. T.; COMPTON, R. G. A simple electroanalytical methodology for the simultaneous determination of dopamine, serotonin and ascorbic acid using an unmodified edge plane pyrolytic graphite electrode. **Anal. Bioanal. Chem.**, 387, 8, p.2793-2800, 2007.
- [51] GIMENES, D. T.; SANTOS, W. T. P.; TORMIN, T. F.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Flow-Injection Amperometric Method for Indirect Determination of Dopamine in the Presence of a Large Excess of Ascorbic Acid. **Electroanalysis**, 22, 1, p.74-78, 2010.
- [52] LIMA, A. B.; CHAVES, S. C.; SILVA, L. M. D.; PEREIRA, P. F.; RICHTER, E. M.; SANTOS, W. T. P. D. Determinação de nimesulida por análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos. **Química Nova**, 36, p.1296-1302, 2013.
- [53] BAVOL, D.; ECONOMOU, A.; ZIMA, J.; BAREK, J.; DEJMKOVA, H. Simultaneous determination of tert-butylhydroquinone, propyl gallate, and butylated hydroxyanisole by flow-injection analysis with multiple-pulse amperometric detection. **Talanta**, 178, p.231-236, 2018.
- [54] AGUSTINI, D.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Low cost microfluidic device based on cotton threads for electroanalytical application. **Lab on a Chip**, 16, p.345-352, 2016.

- [55] CHAVES, S. C.; AGUIAR, P. N. C.; TORRES, L. M. F. C.; GIL, E. S.; LUZ, R. C. S.; DAMOS, F. S.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M.; SANTOS, W. T. P. Simultaneous Determination of Caffeine, Ibuprofen, and Paracetamol by Flow-injection Analysis with Multiple-pulse Amperometric Detection on Boron-doped Diamond Electrode. **Electroanalysis**, 27, 12, p.2785-2791, 2015.
- [56] MIRANDA, C. E. S.; CARRILHO, E.; GERVASIO, A. P.; GINÉ, M. F. Sistemas interfaceados de análise por injeção em fluxo e eletroforese capilar (FIA - CE): desafios, aplicações e perspectivas. **Química Nova**, 25, p.412-419, 2002.
- [57] ALECRIM, M. F.; OLIVEIRA, F. M.; GUEDES, T. J.; NEVES, C. D. C.; MENDONÇA, V. A.; GIL, E. S.; VERLY, R. M.; DOS SANTOS, W. T. P. Electrochemical behavior of the cotinine at a boron-doped diamond electrode and its determination in saliva by multiple-pulse amperometry in an FIA system. **Electrochimica Acta**, 222, p.331-337, 2016.
- [58] STEFANO, J. S.; MONTES, R. H. O.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. Flow-injection analysis with multiple-pulse amperometry for simultaneous determination of paracetamol and naproxen using a homemade flow cell for screen-printed electrodes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 25, p.484-491, 2014.
- [59] PEREIRA, P. F.; DA SILVA, W. P.; MUÑOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. A simple and fast batch injection analysis method for simultaneous determination of phenazopyridine, sulfamethoxazole, and trimethoprim on boron-doped diamond electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 766, p.87-93, 2016.
- [60] RIBEIRO, G. A. C.; ROCHA, C. Q. R.; A., T. A.; SILVA, I. S. A fast, direct, and sensitive analysis method for catechin determination in green tea by batch injection analysis with multiple-pulse amperometry (BIA-MPA). **Analytical Methods**, 10, p.2034-2040, 2018.
- [61] KLOUDA, J.; BAVOL, D.; ECONOMOU, A.; ZIMA, J.; BAREK, J.; DEJMKOVA, H. Simultaneous Determination of Antioxidants by Flow-Injection Analysis With Multiple-Pulse Amperometric Detection. Proceedings of the 13th **International Students Conference Modern Analytical Chemistry**, ed. NESMERAK, K. Charles Univ, Fac Science: Prague 2, 2017.
- [62] DEROCO, P. B.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA-FILHO, R. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Selective and simultaneous determination of indigo carmine and allura red in candy samples at the nano-concentration range by flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Food Chemistry**, 247, p.66-72, 2018.
- [63] KALINKE, C.; WOSGRAU, V.; OLIVEIRA, P. R.; OLIVEIRA, G. A.; MARTINS, G.; MANGRICH, A. S.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO, L. H. Green method for glucose determination using microfluidic device with a non-enzymatic sensor based on nickel ions supported at activated biochar. **Talanta**, 200, p.518–525, 2019.
- [64] OCHIAI, L. M.; AGUSTINI, D.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; BANKS, C. E.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H.; BERGAMINI, M. F. Electroanalytical thread-device for

estriol determination using screen-printed carbon electrodes modified with carbon nanotubes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 241, p.978-984, 2017.

[65] NAYAK, S.; BLUMENFELD, N. R.; LAKSANASOPIN, T.; SIA, S. K. Point-of-Care Diagnostics: Recent Developments in a Connected Age. **Anal. Chem.**, 89, 1, p.102-123, 2017.

[66] YANG, Y. Y.; NOVIANA, E.; NGUYEN, M. P.; GEISS, B. J.; DANDY, D. S.; HENRY, C. S. Paper-Based Microfluidic Devices: Emerging Themes and Applications. **Anal. Chem.**, 89, 1, p.71-91, 2017.

[67] AGUSTINI, D.; BERGAMINI, M. F.; MARCOLINO-JUNIOR, L. H. Characterization and optimization of low cost microfluidic thread based electroanalytical device for micro flow injection analysis. **Analytica Chimica Acta**, 951, p.108-115, 2017.

[68] NYHOLM, L. Electrochemical techniques for lab-on-a-chip applications. **The Analyst**, 130, p.599-605, 2005.

[69] OLIVEIRA, M. C.; WATANABE, E. Y.; AGUSTINI, D.; BANKS, C. E.; MARCOLINO, L. H.; BERGAMINI, M. F. Nonenzymatic sensor for determination of glucose in blood plasma based on nickel oxyhydroxide in a microfluidic system of cotton thread. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 840, p.153-159, 2019.

[70] CARNEIRO, E. A.; AGUSTINI, D.; FIGUEIREDO, L. C. S.; BANKS, C. E.; MARCOLINO, L. H.; BERGAMINI, M. F. 3D-printed Microfluidic Device Based on Cotton Threads for Amperometric Estimation of Antioxidants in Wine Samples. **Electroanalysis**, 30, 1, p.101-108, 2018.

[71] KARLOS, T. C. W.; CHAO-MIN, C.; EMANUEL, C.; PEREIRA, J. D. Recent advances in low-cost microfluidic platforms for diagnostic applications. **Electrophoresis**, 35, 16, p.2309-2324, 2014.

[72] LENG, Y.; XIE, K.; YE, L.; LI, G.; LU, Z.; HE, J. Gold-nanoparticle-based colorimetric array for detection of dopamine in urine and serum. **Talanta**, 139, p.89-95, 2015.

[73] MARTINELLO, F.; SILVA, E. L. D. Interferência do ácido ascórbico nas determinações de parâmetros bioquímicos séricos: estudos in vivo e in vitro. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 39, p.323-334, 2003.

[74] HORWITZ, W.; KAMPS, L. R.; BOYER, K. W. Quality assurance in the analysis of foods and trace constituents. **J Assoc Off Anal Chem**, 63, 6, p.1344-1354, 1980.