



UFAL

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA TECNOLÓGICA E INDUSTRIAL**



IQB

ELVIS MAX XAVIER DE LIMA

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA USANDO DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO
ANALÍTICO BASEADO EM PAPEL (μ PAD)**

Maceió - AL

2019



UFAL

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA TECNOLÓGICA E INDUSTRIAL**



IQB

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A
DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA USANDO DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO
ANALÍTICO BASEADO EM PAPEL (μ PAD).**

ELVIS MAX XAVIER DE LIMA

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para a obtenção do Título de Graduado em bacharel em Química Tecnológica e Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Diógenes Meneses dos Santos.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Fabiane Caxico de Abreu Galdino.

Maceió- AL

2019



ATA DE APRESENTAÇÃO E DEFESA DE TCC - IQB

1. Data da apresentação do TCC:	19 de Fevereiro de 2019		
2. Aluno / matrícula:	Elvis Jox Xavier de Lima / 14112886		
3. Orientador(es) / Unidade Acadêmica:	Diógenes Meneses dos Santos (orientador) coorientadora: Fabiane Caires de Abreu Galvão		
4. Banca Examinadora (nome / Unidade Acadêmica):			
<u>Diógenes Meneses dos Santos</u>	(Presidente)	Nota:	<u>9,5</u>
<u>André Luis Fernandes</u>	(1º avaliador)	Nota:	<u>9,5</u>
<u>Oranella Gomes da Silva</u>	(2º avaliador)	Nota:	<u>9,5</u>
<u>Fabiane Caires de Abreu Galvão</u>	(3º avaliador)	Nota:	<u>9,5</u>
5. Título do Trabalho:	Determinação de metaadalogia analítica para a determinação de dopamina usando dispositivo microfluídico analítico baseado em papel CYPAD		
6. Local:			
7. Apresentação: Horário início:	<u>10:00</u>	Horário final:	<u>10:22'</u>
Arguição: Horário início:	<u>10:22'</u>	Horário final:	<u>11:45'</u>
8. Nota final:	<u>9,5 (nove inteiros e cinco décimos)</u>		
9. Justificativa da nota. Em caso de APROVAÇÃO COM RESTRIÇÕES, indicar as principais alterações que devem ser efetuadas no trabalho para que o mesmo venha a ser aprovado.			

Em sessão pública, após exposição do seu trabalho de TCC por cerca de 22 minutos, o candidato foi arguido oralmente pelos membros da banca por 83 minutos, tendo como resultado:

APROVADO

() **APROVADO COM RESTRIÇÕES** – mediante modificações no trabalho que foram sugeridas pela banca como condicional para aprovação.

() **NÃO APROVADO.**



Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
Instituto de Química e Biotecnologia (IQB)

Av. Lourival de Melo Mota, s/n, Campus A.C. Simões,
Maceió-AL, 57072-970, Brasil.

www.iqb.ufal.br // Tel: (82) 3214-1384/1189



Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pelo candidato:

Maceió, 19 de Fevereiro de 2019

Presidente: Digene Regina dos Santos
1º Avaliador: André Luis Fernandes
2º Avaliador: Emmanuelle Gomes da Silva
3º Avaliador: Fabiane Cavaco de Alencar Calhaz
Candidato: Elton José Xavier de Lima

Dedico este trabalho, aos meus pais por sempre apoiarem minhas escolhas e me ensinarem que estudar é o melhor caminho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por me conceder a graça de chegar até aqui.

Aos meus amados pais Neide Xavier e Ernande Bonifácio que são meu exemplo de vida, amor, dedicação e honestidade a qual sempre me incentivaram.

À minha família que sempre me incentivou, com destaque a meus avós Benedita e João, pelo carinho. Minha querida tia Salete Xavier, um exemplo de mulher. Aos meus primos-irmãos que sempre estiveram comigo Alessane Xavier, Hugo Joaquim e Aléssio Xavier (em quem sempre me inspirei).

Ao meu orientador Diógenes Meneses pelo incentivo durante este trabalho, paciência, ensinamentos e compreensão. Sua empolgação ao falar de pesquisa é um incentivo.

À professora Fabiane Caxico pelas oportunidades proporcionadas, sempre agindo como uma mãe cuidando dos seus alunos e zelando pelo sucesso deles.

A minha grande companheira para todos os momentos, Raiane Araúna por toda paciência (quer dizer ... as vezes nem tanto) e incentivo onde muitas vezes viu em mim capacidade que eu nem imaginava ter.

Aos meus amigos de graduação Nicholas (na verdade vem bem antes da graduação, quem eu considero um irmão), Ivis e Victor Fireman que sempre estiveram comigo para enfrentar adversidades encontradas na universidade. E aquelas aulas de estatística, Ivis?

Aos meus amigos-irmãos que por muitas vezes me auxiliaram em minhas principais rotas de escape nos momentos mais estressantes. Marcela Silva (sempre me socorre quando preciso conversar), Fernando Jumper, Artur Amasai, Everaldo Junior, Kristian K1, Kristhoffee K2, Allan Safadão e Palmeira.

Aos integrantes da família LEMAN, João, Renata, Marília Niedja e todos os outros não citados. A qual destaca-se a equipe L, que tem como principal característica a hipocrisia, porém sempre estiveram dispostos a ajudar, apoiar e incentivar e cada vez mais ajudar uns aos outros a se tornarem doutores se si mesmos, porque uma coisa não anula a outra. Somos melhores juntos, em especial a Leyllanne, Sara, Angladis, Emanuella, João Victor, Guimarães, Samaysa, Alysson.

Ao técnico Aldy por sempre estar disposto a ajudar.

Aos irmãos Elric por mostrar o quanto somos capazes quando lutamos por nossos objetivos e que a vida é feita de sacrifícios (Don't forget 3 oct 11).

A Kal-El pelo exemplo de senso de justiça e por mostrar o quanto é importante proteger quem está ao seu redor.

RESUMO

A dopamina é um neurotransmissor que é usado como indicador de doenças como Parkinson e esquizofrenia, sua determinação e quantificação se faz necessário para realização um diagnóstico precoce e seus métodos convencionais de determinação, como exemplo HPLC acoplado a espectroscopia de Uv-visível, são análises de alto custo. O presente trabalho descreve o desenvolvimento de um método colorimétrico de determinação de dopamina por meio de um microdispositivo analítico a base de papel (μ PADs) visando o barateamento da análise. O método é baseado em uma reação de oxirredução onde a dopamina, em uma estequiometria de um pra um, reduz o Fe^{3+} (amarelo) a Fe^{2+} e que por sua vez complexa com fenantrolina formando um complexo alaranjado que apresenta sinal na região do espectro visível por volta de 510 nm. Os dispositivos foram fabricados pela impressão em cera e as mudanças na intensidade da cor foram registradas usando um telefone celular com uma lente macro acoplada. Esse método permitiu um LD = 0,49 μM e um LQ = 1,6 μM com R = 0,89837 . Um estudo espectroscópico de Uv-Visível também permitiu calcular um LD = 1,30 μM e LQ = 4,32 μM com R = 0,9913 para DA.

Palavras-chave: Colorimetria; μ PAD; dopamina; complexação.

ABSTRACT

Dopamine is a neurotransmitter which is used as an indicator of diseases such as Parkinson's disease and schizophrenia, being its determination and quantification necessary to carry out early diagnosis. Common methods for dopamine determination, as an example HPLC coupled to Uv-visible spectroscopy, are analyzes of high cost. The present work describes the development of a colorimetric method for the determination of dopamine by means of an analytical microdevice based on paper (μ PADs) aiming a low-cost analysis. The method is based on a 1:1 mole ratio oxidation reaction where dopamine reduces Fe^{3+} (which shows a yellow color) to Fe^{2+} , which is capable of complex with phenanthroline yielding an orange complex that shows a signal in the visible spectrum by around 510 nm. The μ PAD devices were manufactured by wax printing and changes in color intensity were recorded using a cell phone with a macro-coupled lens. This method allowed a LD = 0.49 μM and an LQ = 1.6 μM with R = 0.89837. A Uv-Visible spectroscopic study also allowed to calculate a LD = 1.30 μM and LQ = 4.32 μM with R = 0.9913 for DA.

Keywords: Colorimetry; μ PAD; dopamine; complexation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Microprocessador utilizados em nova geração de computadores.....	15
Figura 2 – Ilustração do primeiro microssistema para cromatografia em fase gasosa fabricado em substrato de silício, com diâmetro de 5 cm, na Universidade de Stanford, no fim da década de 70.	15
Figura 3 – Gráfico do número de publicações de artigos relacionados a microdispositivos de 2014 a fevereiro de 2019.	16
Figura 4 – Gráfico de n° de patentes publicadas por ano em todo o mundo segundo a plataforma LENS.	17
Figura 5 – Esquema de μ TAS.	17
Figura 6 – a) Reactionware confeccionado em impressora 3D. b) Esquema feito em CAD do dispositivo (fluidic reactionware).	19
Figura 7 – Dissipadores de calor para sistemas microfluídicos.	19
Figura 8 – Esquema de μ PAD confeccionado a base de parafina em papel de filtro para quantificação de níquel e cobre.	21
Figura 9 – Dispositivo analítico microfluídico baseado em papel (μ PADs) proposto por Ilacas.	21
Figura 10 – Estrutura química da dopamina.....	22
Figura 11 – Um esquema simples (não desenhado à escala) das principais vias dopaminérgicas no cérebro, juntamente com os seus núcleos de origem.	23
Figura 12 – μ PAD projetado por Liu e seus colaboradores para detecção de dopamina.	24
Figura 13 – (a) Carimbo usado na confecção dos μ Pads de teste. (b) μ Pad de parafina utilizado nos testes.	27
Figura 14 – Folha contendo μ Pad de cera.	28
Figura 15 – μ Pads para a análise de dopamina.	28
Figura 16 – Foto tirada (a) antes e (b) depois da secagem.	29
Figura 17 – Tela de edição do Photoshop CC e sua ferramenta de histograma.	30
Figura 18 – Esquemas de reação de dopamina com Fe^{3+} e Fenantrolina e Fe^{2+}	32

Figura 19 – Imagem da solução com o complexo final. a) em tampão fosfato pH = 7,00. b) em tampão acetato pH = 4,68.	33
Figura 21 – μ Pads de parafina. (1) DA/ Fe^{3+} , (2) DA/Fenantrolina, (3) Tampão acetato, (4) DA, (5) Fe^{3+} , (6) Fenantrolina, (7) Fe^{3+} /Fenantrolina e (8) Complexo final (Fe^{2+} /Fenantrolina).	33
Figura 22 – μ Pads para a determinação de dopamina (amostra III, antes e após a secagem).	34
Figura 22 – Curvas analíticas. a) para as imagens depois da secagem da amostra b) para as imagens antes da secagem da amostra.	38
Figura 23 – Espectros das soluções dos reagentes envolvidos na reação.	39
Figura 24 – Espectro da solução de Fe^{3+} /Fenantrolina e do complexo final formado (Fenantrolina- Fe^{2+})	40
Figura 25 – Espectros das diferentes concentrações do complexo Fenantrolina- Fe^{2+}	41
Figura 26 – Soluções com diferentes concentrações de DA.	41
Figura 27 – Espectros do complexo fenantrolina Fe^{2+}	42
Figura 28 – Curva analítica do estudo de DA no espectrofotômetro de Uv-Visível.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Soluções de dopamina.	27
Tabela 2 – Valores da média aritmética da intensidade de pixel obtidos do μ Pads de cera antes e após a secagem da amostra.	36
Tabela 3 – Valores da média aritmética da intensidade de pixel obtidos do μ Pads de cera....	37
Tabela 4 – Comparação do método abordado nesse trabalho com outros métodos já consolidados.	44

LISTAS DE SIGLAS E ABREVIACÕES

μPADs - Dispositivos analíticos à base de papel (do inglês microfluidic paper-based analytical devices)

μTAS - Microssistemas de análises totais (do inglês micro-total analysis systems)

DA – Dopamina.

LD – Limite de detecção.

LQ – Limite de quantificação.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 MICRODISPOSITIVOS	14
2.2 MICROFLUÍDICA	18
2.3 MICRODISPOSITIVOS ANALÍTICOS A BASE DE PAPEL (μ PADS)	20
2.4 DOPAMINA	22
3 OBJETIVOS	25
3.1 GERAL	25
3.2 ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES	26
4.2 CONFECÇÃO DE μ PAD DE PARAFINA PARA TESTES INICIAIS	27
4.3 PREPARO DOS μ PADS PARA ANÁLISE DE DOPAMINA	27
4.4 MEDIÇÕES COLORIMÉTRICAS	29
4.5 ESPECTROS DE ABSORÇÃO MOLECULAR	30
4.5.1 ESTUDO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE DOPAMINA	30
4.6 LIMITE DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO	30
4.6.1 PARA AS ANÁLISES ESPECTROFOTÔMETRO DE UV-VISÍVEL	30
4.6.2 PARA OS μ PAD DE CERA.	31

<u>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES</u>	<u>32</u>
4.1 μPADS DE PARAFINA PARA TESTES INICIAIS.	33
4.2 μPADS DE CERA PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA	34
4.3 ESPECTROS NO UV-VISÍVEL	38
4.4 COMPARAÇÃO DE COM OUTRAS METODOLOGIAS DE DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA.	43
<u>CONCLUSÃO</u>	<u>45</u>
<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>46</u>
<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>47</u>

1 INTRODUÇÃO

Dopamina é um neurotransmissor muito importante que desempenha funções no sistema nervoso central de mamíferos e modula vários aspectos dos processos fisiológicos. Um nível anormal de dopamina está associado a distúrbios neurológicos, como a esquizofrenia, o Parkinson e as doenças de Huntington. Portanto, é altamente desejável desenvolver métodos de detecção eficazes. Muitos métodos têm sido usados para detectar DA no corpo humano, como a uso de sensores eletroquímicos, cromatografia líquida de alta eficiência e a eletroforese capilar (LIN et al., 2018). Os microdispositivos têm tido grande destaque em várias áreas da ciência devido a sua versatilidade. Os dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (μ PADs) atraem grande interesse e atenção por oferecerem eficiência, simplicidade, baixo custo, portabilidade, possibilitam análise *in situ* e o uso de baixo consumo de amostras e reagentes (LIU et al., 2019).

Justificativa do trabalho

Tendo em vista a importância do monitoramento da dopamina uma vez que ela serve de marcador para várias doenças é imprescindível o desenvolvimento de metodologias para sua determinação aliando rapidez, baixo custo e que possa ser feita em lugares remotos. Uma alternativa ao uso dos métodos convencionais é o uso de dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (μ PADs) junto a técnicas colorimétricas para a determinação de dopamina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Microdispositivos

A humanidade já não mais caminha em direção ao desenvolvimento, ela corre, e cada vez mais rápido progride na obtenção de novas tecnologias. Exemplo a ser ressaltado é a miniaturização de dispositivos eletrônicos. Desde o final da década de 70 e o “boom” do silício sendo utilizado na usinagem de microdispositivos mecânicos, o surgimento de novas pesquisas em áreas afins, vem se consolidando cada vez mais (NAM-TRUNG NGUYEN et al., 2018)

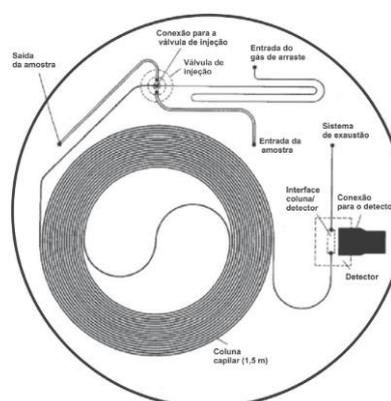
Figura 1 – Microprocessador utilizados em nova geração de computadores.



Fonte: Intel, 2018.

O primeiro dispositivo analítico miniaturizado foi um sistema de cromatografia em fase gasosa, apresentado na década de 70, com capacidade para realização de separações rápidas (Figura 2). Nos anos seguintes o desenvolvimento de micro-bombas, micro válvulas e sensores eletroquímicos proporcionaram a ampliação do uso desse tipo de microdispositivo (KARLOS et al., 2007).

Figura 2 – Ilustração do primeiro microssistema para cromatografia em fase gasosa fabricado em substrato de silício, com diâmetro de 5 cm, na Universidade de Stanford, no fim da década de 70.

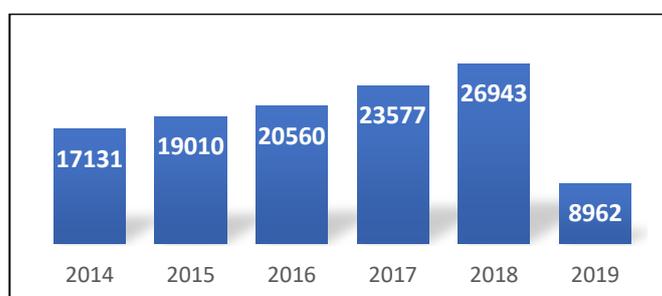


Fonte: Karlos et al., 2007.

Dentre uma gama de áreas onde a miniaturização foi empregada ao decorrer dos anos, as análises laboratoriais têm tido grande destaque (KARLOS et al., 2007). Diversos trabalhos presentes na literatura evidenciam a importância dos microdispositivos, os quais

possuem aplicações em diversos campos científicos, se observa um crescente número de publicações de artigos acadêmicos relacionados a microdispositivos, segundo a ferramenta de pesquisa *Science Direct*. A figura 3 mostra esse número de publicações entre os anos de 2014-2019:

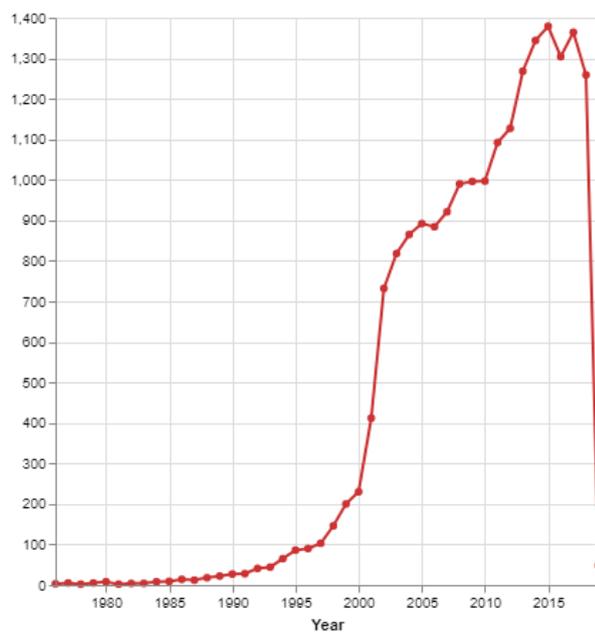
Figura 3 – Gráfico do número de publicações de artigos relacionados a microdispositivos de 2014 a fevereiro de 2019.



Fonte: Autor, 2019.

Os microdispositivos se destacam também devido a seu potencial inovador e tecnológico, o que pode ser verificado através do aumento de publicações de patentes nos últimos anos em todo o mundo, como demonstra pesquisa segundo a plataforma LENS (Figura 4).

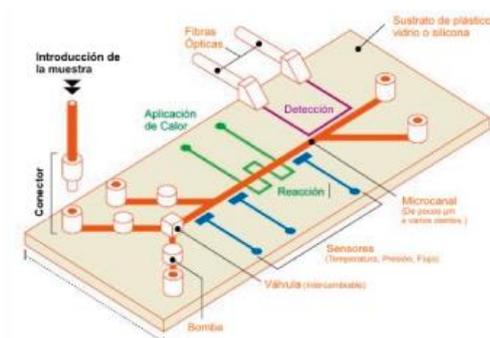
Figura 4 – Gráfico de n° de patentes publicadas por ano em todo o mundo segundo a plataforma LENS.



Fonte: Lens, 2019.

Junto a essa leva de microdispositivos Manz e colaboradores propuseram o conceito de microsistemas para análises totais, ou simplesmente μ TAS. E com isso foi possível integrar várias etapas analíticas como: pré-tratamento da amostra, reações químicas, separação analítica e detecção em um único dispositivo (KARLOS et al., 2007).

Figura 5 – Esquema de μ TAS.



Fonte: Shimadzu, 2018.

Atualmente a miniaturização vem inovando como mostra Trotta, e seus colaboradores, em seu trabalho sobre uma plataforma de micro fabricação para a produção de dispositivos microfluídicos poliméricos em escala de massa, baseada na integração de tecnologias de microinjeção e laser de femtossegundo (fs-laser) (TROTТА et al., 2019)..

Dentre as vantagens de sistemas miniaturizados destaca-se o foco em aumentar a funcionalidade dos dispositivos, diminuir o custo da fabricação, diminuir a geração de resíduos e cada vez mais tornar as análises portáteis para serem utilizadas no *point-of-care* (POC). Esses tipos de dispositivos visam encontrar formas de fazer com que as análises possam ser feitas em locais remotos, sem a necessidade de armazenamento da amostra, de maneira rápida e dando a possibilidade de execução sem se fazer necessário mão-de-obra especializada (OLIVEIRA, 2017).

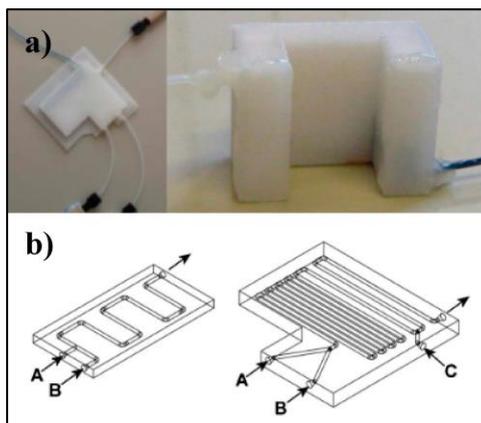
A introdução da miniaturização atrelada ao desenvolvimento fez surgir tecnologias e estudos que visassem várias áreas, dentre elas, uma que vem se consolidando é a própria microfluídica.

2.2 Microfluídica

Podendo ser definida como a ciência e tecnologia de sistemas que manipulam e estudam pequenas quantidades de fluídos (WEIBEL et al., 2006), a microfluídica vai além do que seu próprio nome sugere. Outra definição diz que ela é a ciência e engenharia de sistemas nos quais o comportamento dos fluidos difere da teoria convencional de escoamento de fluidos principalmente devido ao reduzido comprimento de escala do sistema (NAM-TRUNG et al., 2018).

Um exemplo de utilização microfluídica pode ser vista no trabalho de Kitson e seus colaboradores que fazem o uso de técnicas de *desing* e impressão 3D para fabricar vários dispositivos *fluidic reactionware* (aparato de reação) miniaturizados para sínteses químicas em apenas algumas horas, usando materiais baratos assim produzindo reatores confiáveis e robustos (PHILIP J. KITSON et al., 2012). A Figura 6 mostra o dispositivo desenvolvido por Kitson e seus colaboradores:

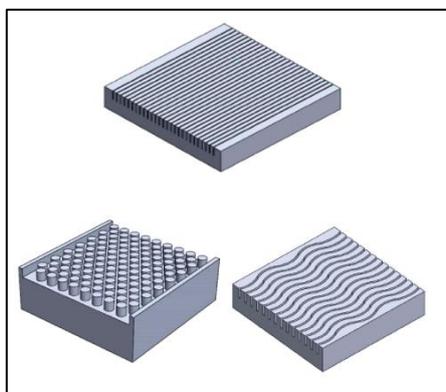
Figura 6 – a) Reactionware confeccionado em impressora 3D. b) Esquema feito em CAD do dispositivo (fluidic reactionware).



Fonte: Adaptado de Kitson et al, 2012.

Não só tem surgido estudos que tem como principal foco a microfluídica como há também o desenvolvimento de novas tecnologias para melhorar a performance desses dispositivos microfluídicos como mostra Naquiuddin, e seus colaboradores, em seu trabalho onde desenvolveu diferentes desenhos geométricos de dissipadores de calor em microcanal para promover uma melhor transferência de calor entre as paredes do micro canal e o fluido de resfriamento (NAQUIUDDIN et al., 2018).

Figura 7 – Dissipadores de calor para sistemas microfluídicos.



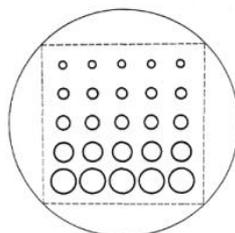
Fonte: NAQUIUDDIN, et al., 2018.

2.3 *Microdispositivos analíticos a base de papel (μ PADs)*

Dispositivos microfluídicos à base de papel (microfluidic paper-based devices, μ PAD) são hoje uma opção promissora levando em consideração a capacidades de dispositivos microfluídicos convencionais com a simplicidade de indicadores químicos e biológicos que usam tiras de papel poroso impregnadas com reagentes específicos. Com a utilização de μ PAD, é possível realizar análises rápidas e de baixo custo tirando proveito de apenas um suporte externo simples e pequenos volumes de amostras e reagentes (DAIKUZONO, 2017).

Um dos primeiros a utilizar papel na confecção de dispositivos microfluídicos foi Yagoda, e em um de seus trabalhos ele confeccionou zonas reacionais circulares de aproximadamente 12,5 mm de diâmetro à base de parafina em papel de filtro seguido de aquecimento para quantificar níquel e cobre. A adição de reagentes era feita com uma micropipeta previamente calibrada, posicionada perpendicularmente aos dispositivos, a uma distância de 3 mm. Nesse estudo, os μ PAD (Figura 8) eram impregnados com soluções alcólicas a 1 % de dimetilglioxima e alfa-22benzoinoxima para a quantificação de níquel e cobre, respectivamente pela formação de dimetilglioximato de níquel, que é percebido visualmente por uma tonalidade vermelha e o complexo $\text{Cu}(\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N})$, que tem tonalidade amarelo esverdeada. A quantificação baseava-se na comparação da cor das manchas resultantes nas zonas reacionais dos μ PAD com escala de cor de padrões, após secagem (YAGODA, 1937).

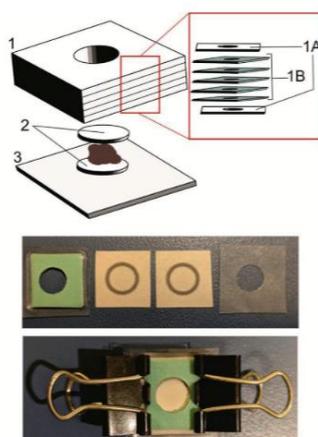
Figura 8 – Esquema de μ PAD confeccionado a base de parafina em papel de filtro para quantificação de níquel e cobre.



Fonte: Yagoda, 1937.

Recentemente outros trabalhos presentes na literatura evidenciam avanços dentro desta área, tendo como exemplo o trabalho de Ilacas e seus colaboradores que desenvolveram dois dispositivos analíticos microfluídicos baseados em papel (μ PADs), um baseado em poços e outro baseado em uma configuração de análise de fluxo lateral (LFA), para detectar glicose através de um ensaio colorimétrico usando a estrutura sólida de metal orgânico (MOF) Zr-PCN-222 (Fe), para encapsular a glucose oxidase (GOx) (Figura 9) (ILACAS et al., 2019).

Figura 9 – Dispositivo analítico microfluídico baseado em papel (μ PADs) proposto por Ilacas.

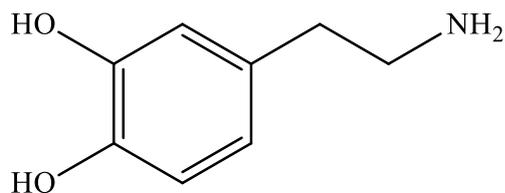


Fonte: Ilaca et al., 2019.

2.4 Dopamina

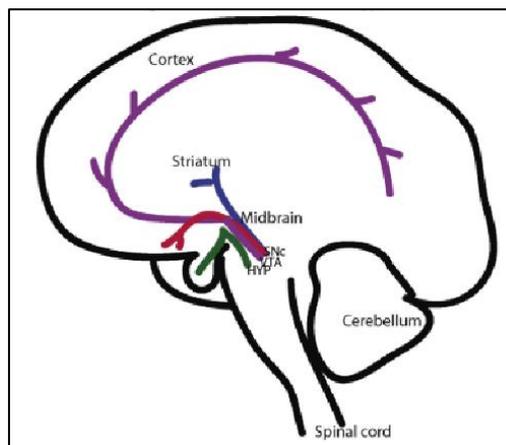
A dopamina (DA) é um neurotransmissor catecolamínico, responsável por ajustar processos biológicos do sistema nervoso central, dentre alguns deles estão: percepção, emoção e afeto, bem como secreção neuroendócrina(WEI; ZHANG; WANG, 2019). Muitas vezes na literatura neurocientífica, a dopamina é frequentemente considerada responsável pela química do prazer, pois está fortemente associada aos sistemas de recompensa do cérebro, mediando respostas cerebrais a opioides, recompensas em dinheiro, alimentos ou até imagens agradáveis (CHAKRAVARTHY et al., 2018). Por ser um indicador de várias doenças como Parkinson e esquizofrenia, tem sido alvo de bastante pesquisa, tornando conveniente o desenvolvimento de métodos simples e eficientes de monitoramento(WEI; ZHANG; WANG, 2019). A estrutura química da dopamina pode ser vista na Figura 10 e as principais vias dopaminérgicas na Figura 11.

Figura 10 – Estrutura química da dopamina.



Fonte: Autor 2019.

Figura 11 – Um esquema simples (não desenhado à escala) das principais vias dopaminérgicas no cérebro, juntamente com os seus núcleos de origem.

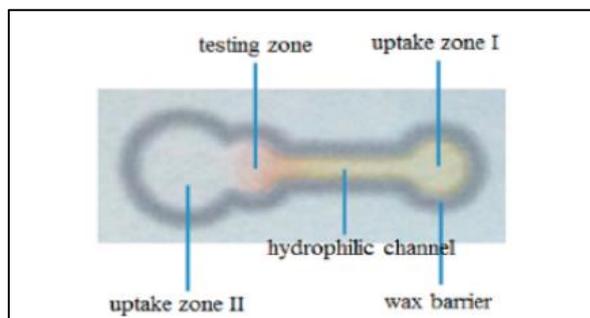


Fonte: WANG et al., 2019.

Existem muitos métodos de detecção de DA, incluindo análises eletroquímicas, cromatografia acoplada a espectroscopia. Porém, vem surgindo propostas alternativas para detecção dessa molécula como Liu e seus colaboradores descrevem em seu trabalho sobre a detecção colorimétrica de dopamina (DA) em dispositivos analíticos baseados em papel microfluídico (μ PADs) usando um método de oxidação-redução. Onde a DA reduz ferro³⁺ a ferro²⁺ e em seguida um complexo de cor vermelha alaranjada é formada com ferro²⁺ e fenantrolina.(LIU et al., 2019)

Liu e seus colaboradores mostram o canal hidrofílico, zonas de captação e zonas de teste cercadas pela barreira de cera hidrofóbica. A cor da zona de captação I é amarelo e corresponde ao cloreto de ferro (III), a zona de captação II contém dopamina e fenantrolina e a zona de teste onde forma o produto da reação (cloreto férrico com dopamina) e fenantrolina, respectivamente, de acordo com a Figura 12.

Figura 12 – μ PAD projetado por Liu e seus colaboradores para detecção de dopamina.



Fonte: Liu et al., 2019.

Seguindo essa linha de pensamento de Liu visando uma alternativa para fazer a determinação de dopamina de maneira barata o presente trabalho foi desenvolvido.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolvimento de um método colorimétrico para determinação de dopamina utilizando μ Pads.

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito da obtenção das imagens antes e depois da secagem da amostra;
- Avaliar o efeito da concentração de dopamina;
- Realizar o estudo espectroscópico de Uv-visível para melhor entender a reação no microdispositivo;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e soluções

Os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico. As soluções foram preparadas com água ultrapura (condutividade elétrica $< 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$) e resistividade específica de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ obtida a partir do purificador Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, USA). Diluições subsequentes das soluções foram efetuadas quando necessárias. As massas foram pesadas em uma balança semi-analítica da marca Shimadzu.

Inicialmente, todas as soluções tampão foram preparadas a concentração de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Para o sistema tampão acetato, a solução foi preparada dissolvendo-se $6,804 \text{ g}$ de acetato de sódio trihidratado (Exôdo Científica), com ajuste de pH sendo efetuado com solução de HCl ou NaOH em água deionizada. O pH foi aferido em um pHmetro modelo Quimis Q400A.

As soluções estoque de DA ($189,64 \text{ g mol}^{-1}$), ferro ($270,3 \text{ g mol}^{-1}$) e fenantrolina ($198,23 \text{ g mol}^{-1}$) foram preparadas como a dissolução de $11,38$, $168,18$ e $23,79 \text{ mg}$, respectivamente, em tampão acetato ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 4,6$). Essas soluções estoque foram diluídas com tampão acetato para o preparo das demais soluções.

Foram preparadas nove soluções com volume de 10 mL . Foram fixadas as concentrações de ferro ($1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e fenantrolina ($2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), Diluições foram realizadas a partir da solução estoque de dopamina de maneira que cada solução apresenta-se as concentrações de DA conforme a Tabela 1.

Tabela 1 – Soluções com diferentes concentrações de dopamina.

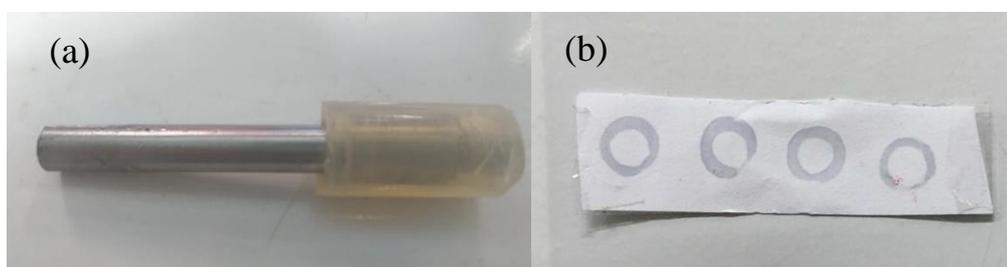
CONCENTRAÇÃO DE DOPAMINA (mol L ⁻¹)	
1	4,00 x 10 ⁻⁴
2	3,50 x 10 ⁻⁴
3	2,00 x 10 ⁻⁴
4	1,75 x 10 ⁻⁴
5	1,50 x 10 ⁻⁴
6	1,00 x 10 ⁻⁴
7	8,00 x 10 ⁻⁵
8	5,00 x 10 ⁻⁵

Fonte: Autor, 2019.

4.2 Confeção de μ Pad de parafina para testes iniciais

Foi desenvolvido um μ Pad para testes iniciais, se utilizou como base papel ofício A4 e como barreira hidrofóbica parafina. Se utilizou um carimbo com *layout* específico para o teste em formato circular Figura 13 – a), o mesmo foi colocado sobre a parafina derretida e em seguida foi colocado sobre o papel, onde se manteve pressionado até a secagem da parafina. Por fim, se adicionou uma fita adesiva na superfície inferior do papel para evitar possíveis vazamentos Figura 13 – b).

Figura 13 – (a) Carimbo usado na confecção dos μ Pads de teste. (b) μ Pad de parafina utilizado nos testes.



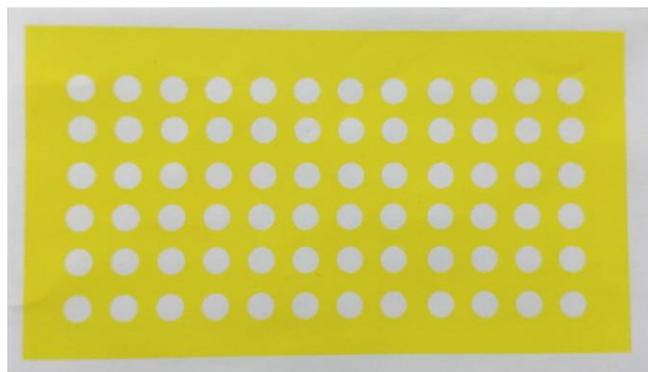
Fonte: Autor, 2019.

4.3 Preparo dos μ Pads para análise de dopamina

Com o *layout* desenhado no CorelDraw X7 os microdispositivos em papel foram impressos utilizando impressora ColorQube 8870 da marca Xerox em sua maior

resolução (2400 FinePoint™). As folhas utilizadas foram sulfite A4 da marca Report. A tinta em cera utilizada foi da marca Xerox. A Figura 14 mostra o microdispositivo.

Figura 14 – Folha contendo μ Pad de cera.



Fonte: Autor, 2019.

Os dispositivos foram cortados em 3 fitas de maneira a se obter um total de 12 reservatórios em cada fita. Em seguida essas fitas foram levadas ao aquecimento (40°C) onde permaneceram até o derretimento da cera, logo após, o material foi resfriado a temperatura ambiente e se adicionou uma fita adesiva na superfície inferior, por fim foram inseridas hastes de madeira fixadas com o auxílio de fita dupla-face para facilitar o manuseio (Figura 15).

Figura 15 – μ Pads para a análise de dopamina.



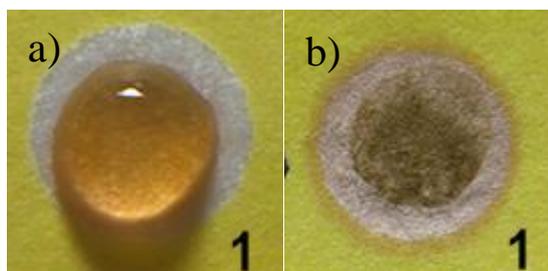
Fonte: Autor, 2019.

Em cada reservatório foram adicionadas diferentes soluções totalizando volumes de 4 μ L. Inicialmente para avaliação do branco analítico se adicionou em diferentes reservatórios soluções de DA, Fenantrolina, Fe³⁺ e fenantrolina+Fe³⁺, respectivamente. Para os reservatórios restantes fixou-se a concentração de Fe³⁺ e Fenantrolina em cada um desses reservatórios, depois foram adicionadas diferentes concentrações de DA, obtendo-se reservatórios com diferentes concentrações de DA conforme Tabela 1.

4.4 Medições colorimétricas

As imagens dos dispositivos foram obtidas a partir da câmera, de um celular Iphone 5SE (distância focal de 4mm) com resolução de 3024x4032 pixels, acoplado a uma lente macro chinesa. As fotografias foram obtidas 1 min após a adição de DA e também depois da secagem da amostra, como mostra a Figura 16.

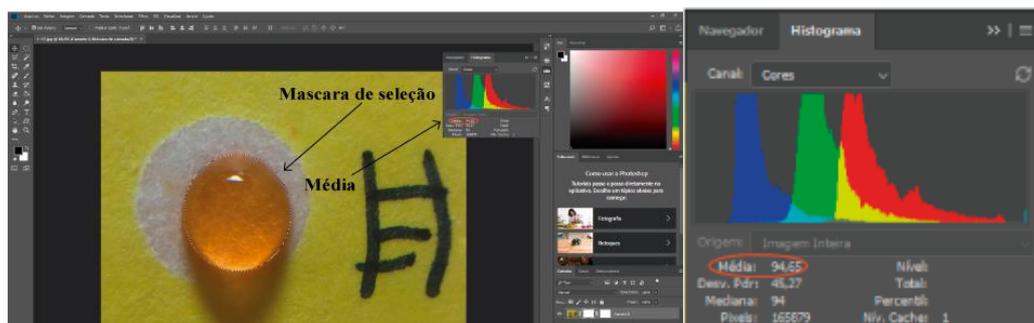
Figura 16 – Foto tirada (a) antes e (b) depois da secagem.



Fonte: Autor, 2019.

A conversão das imagens para RGB 24-bit foi realizada e a intensidade de cor foi medida no histograma. A média aritmética da intensidade dos pixels da região onde desejava-se efetuar o teste colorimétrico foi registrada, com o auxílio de uma máscara de corte. Esses procedimentos foram realizados no software Adobe Photoshop CC versão 19.1.2.

Figura 17 – Tela de edição do Photoshop CC e sua ferramenta de histograma.



Fonte: Autor, 2019.

4.5 Espectros de absorção molecular

Os estudos espectroscópicos foram realizados no UV-visível HP 8453 (G1103A) da Agilent® no modo de varredura com comprimento de onda de 190 a 900 nm. Foi utilizada uma cubeta de quartzo com capacidade para 3 mL. Realizou-se a análise das soluções de DA, fenantrolina e cloreto férrico (III). Também foram efetuadas medições para as soluções: DA + ferro, DA + fenantrolina, fenantrolina + ferro e complexo formado.

4.5.1 Estudo da variação da concentração de dopamina

Foram preparadas 8 soluções onde se mantiveram fixas as concentrações de Fe^{3+} ($2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) e fenantrolina ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) variando apenas a concentração de dopamina, de acordo com a Tabela 1. As soluções foram levadas avaliadas via espectrofotometria na região do uv-visível.

4.6 Limite de detecção e quantificação

4.6.1 Para as análises espectrofotômetro de UV-visível

Para a determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) foram utilizadas as Equações 1 e 2a seguir:

$$LD = \frac{3xS_b}{b}$$

Equação 1

$$LQ = \frac{10xS_b}{b}$$

Equação 2

Onde: S_b é o desvio padrão da média aritmética das correntes obtidas por 10 espectros do branco na mesma faixa de varredura e b é o coeficiente angular da curva analítica (SKOOG, WEST, HOLLER, 2014).

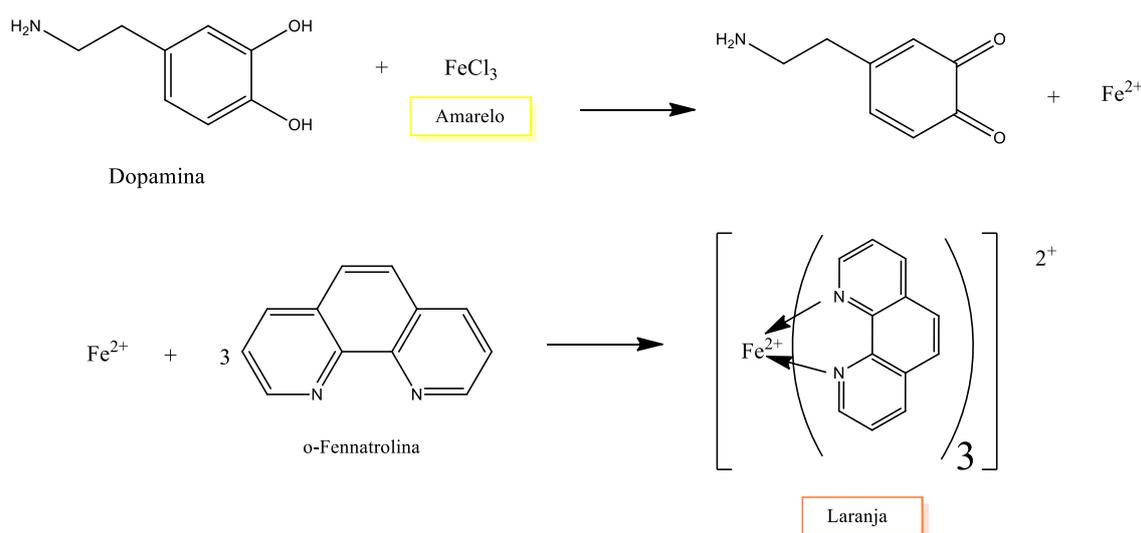
4.6.2 Para os μ Pad de cera.

Para a determinação do limite de detecção (LD) e do limite de quantificação (LQ) foram utilizadas as Equações 1 e 2, como anteriormente. Porém o S_b foi obtido da média aritmética dos valores de intensidade de cor de 10 brancos nas mesmas condições e b é o coeficiente angular da curva analítica (SKOOG, WEST, HOLLER, 2014).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A DA possui a capacidade de reduzir o Fe^{3+} a Fe^{2+} . Isso pode ser observado em trabalhos como o de Gonza (GONZA et al., 2010). Sabe-se que a solução de Fe^{3+} possui coloração amarelada, uma vez que o Fe^{2+} forma um complexo colorido alaranjado com a o-Fenantrolina, a DA pode ser determinada de forma indireta. Portanto a DA reduz o Fe^{3+} a Fe^{2+} e o Fe^{2+} complexa com a o-Fenantrolina como demonstra a Figura 18.

Figura 18 – Esquemas de reação de dopamina com Fe^{3+} e Fenantrolina e Fe^{2+} .



Fonte: Adaptado de Liu, 2019.

Inicialmente as soluções foram preparadas em tampão fosfato $\text{pH} = 7,00$ conforme metodologia utilizada por Liu, 2019(LIU et al., 2019). Porém, se observou turbidez na solução de Fe^{3+} (Figura 19 – a) o que poderia prejudicar a obtenção do produto final da reação, além de inviabilizar as análises espectroscópicas. Uma hipótese para a turbidez da solução se dá através da hidrólise do Fe^{3+} , possibilitando sua precipitação em forma de hidróxido de ferro (III) por conta do meio. Como alternativa, o meio foi alterado para tampão acetato $\text{pH} = 4,68$ uma vez que nessa condição o ferro provavelmente não precipitaria via formação de hidróxido de ferro (III), este resultado pode ser observado na Figura 19 – b).

Figura 19 – Imagem da solução com o complexo final. a) em tampão fosfato pH = 7,00. b) em tampão acetato pH = 4,68.

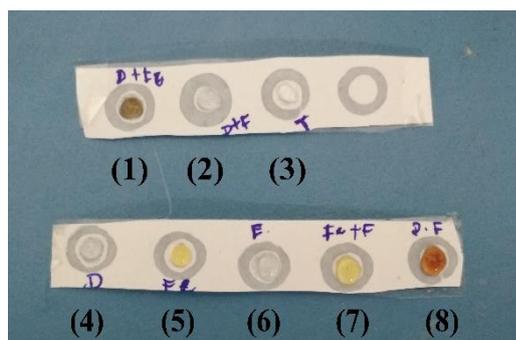


Fonte: Autor, 2018.

4.1 μ Pads de parafina para testes iniciais.

Os testes da reação foram realizados nos μ Pads de parafina e o resultado se mostrou promissor como pode ser observado na Figura 20. Nota-se uma diferença na coloração nas regiões onde continha dopamina, fenantrolina e Fe^{3+} , fenantrolina e Fe^{3+} em comparação a região que continha os três reagentes juntos, isso pode ser atribuído a formação do complexo de Fe^{2+} -fenantrolina.

Figura 20 – μ Pads de parafina. (1) DA/ Fe^{3+} , (2) DA/Fenantrolina, (3) Tampão acetato, (4) DA, (5) Fe^{3+} , (6) Fenantrolina, (7) Fe^{3+} /Fenantrolina e (8) Complexo final (Fe^{2+} /Fenantrolina).

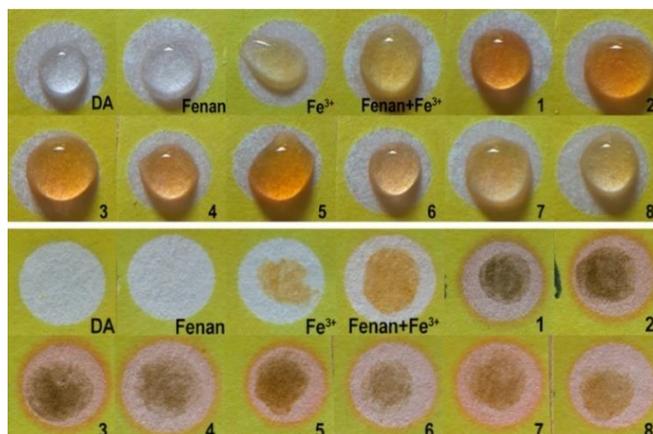


Fonte: Autor, 2019.

4.2 μ Pads de cera para a determinação de dopamina

Para os microdispositivos com a região hidrofóbica a base de cera, foi realizado teste em triplicata quanto a variação de cor relacionada a concentração de DA, observou-se mudança na intensidade da cor com a redução da concentração de dopamina obtendo-se a Figura 21, onde as concentrações de Fe^{3+} e fenantrolina foram fixadas em $0,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente, quanto a DA foram avaliadas concentrações de $1,25 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ conforme a Tabela 2 (concentrações corrigidas), obtendo-se imagens antes e depois da secagem da amostra (Figura 21).

Figura 21 – μ Pads para a determinação de dopamina (amostra III, antes e após a secagem).



Fonte: Autor, 2019.

Tabela 2 – Concentrações corrigidas de dopamina.

CONCENTRAÇÃO DE DOPAMINA (mol L^{-1})	
1	$1,00 \times 10^{-4}$
2	$8,75 \times 10^{-5}$
3	$5,00 \times 10^{-5}$
4	$4,38 \times 10^{-5}$
5	$3,75 \times 10^{-5}$
6	$2,50 \times 10^{-5}$
7	$2,00 \times 10^{-5}$
8	$1,25 \times 10^{-5}$

Fonte: Autor, 2019.

Para cada reservatório foi calculada a média aritmética a partir da intensidade de pixel da região onde aconteceu a reação e esses valores podem ser observados nas Tabelas 3 e 4. Se calculou também a média desses valores entre as triplicatas e assim uma curva analítica foi construída onde o eixo y refere-se a esses valores de média e o eixo x corresponde as suas respectivas concentrações de DA. Esse procedimento foi realizado tanto para as imagens obtidas antes da secagem da amostra quanto para as imagens obtidas depois da secagem. Conforme a metodologia utilizada por Garcia para a determinação de Fe^{2+} (GARCIA et al., 2017).

Tabela 3 – Valores da média aritmética da intensidade de pixel obtidos do μ Pads de cera antes e após a secagem da amostra.**AMOSTRA ANTES DA SECAGEM**

I	II		III		Média da triplicata	
AMOSTRA	Média	Amostra	Média	Amostra		Média
DA	153,41	DA	154,98	DA	158,99	154,20
FENAN	139,29	Fenan	122,88	Fenan	159,80	140,66
FE	127,19	Fe	130,01	Fe	131,83	128,60
FE(III)+FENAN	122,65	Fe(III)+Fenan	122,67	Fe(III)+Fenan	123,03	122,66
1	97,41	1	95,09	1	96,59	96,36
2	100,11	2	107,06	2	101,72	102,96
3	94,3	3	110,88	3	113,97	106,38
4	112,42	4	114,98	4	121,02	116,14
5	115,27	5	113,64	5	101,77	110,23
6	117,71	6	118,08	6	131,55	122,45
7	124,17	7	126,9	7	127,38	126,15
8	128,48	8	128,32	8	128,51	128,44

Fonte: Autor, 2019.

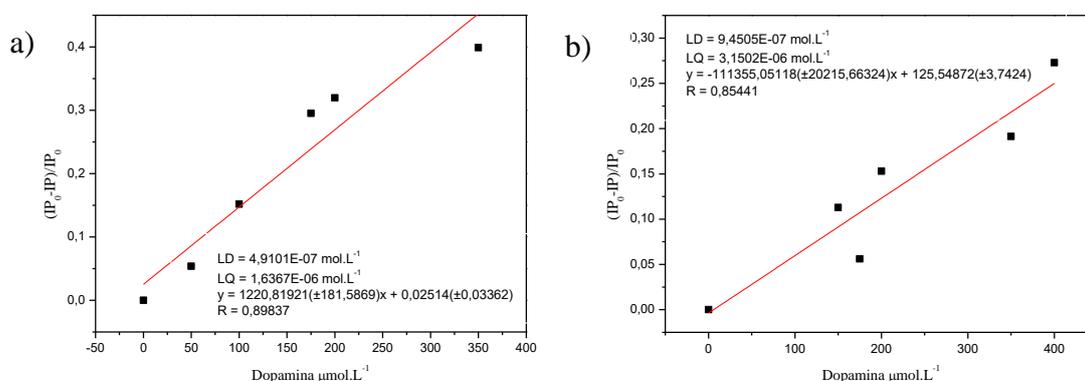
Tabela 4 – Valores da média aritmética da intensidade de pixel obtidos do μ Pads de cera.**AMOSTRA DEPOIS DA SECAGEM**

I	II		III		Média da triplicata	
AMOSTRA	Média	Amostra	Média	Amostra		Média
DA	171,50	DA	167,67	DA	166,84	168,67
FENAN	171,54	Fenan	174,55	Fenan	171,42	172,50
FE	142,56	Fe	147,95	Fe	133,15	141,22
FE(III)+FENAN	133,77	Fe(III)+Fenan	129,79	Fe(III)+Fenan	125,13	129,56
1	88,84	1	90,09	1	91,62	90,18
2	99,77	2	91,16	2	86,94	92,62
3	94,49	3	105,98	3	94,04	98,17
4	97,27	4	89,3	4	113,58	100,05
5	96,79	5	103,95	5	90,4	97,05
6	113,42	6	104,97	6	119,07	112,49
7	100,05	7	108,85	7	110,55	106,48
8	127,82	8	121,92	8	119,15	122,96

Fonte: Autor, 2019.

Com os valores foi possível confeccionar curvas analíticas e calcular seus respectivos LDs e LQs que podem ser encontrados na Figura 22.

Figura 22 – Curvas analíticas. a) para as imagens depois da secagem da amostra b) para as imagens antes da secagem da amostra.

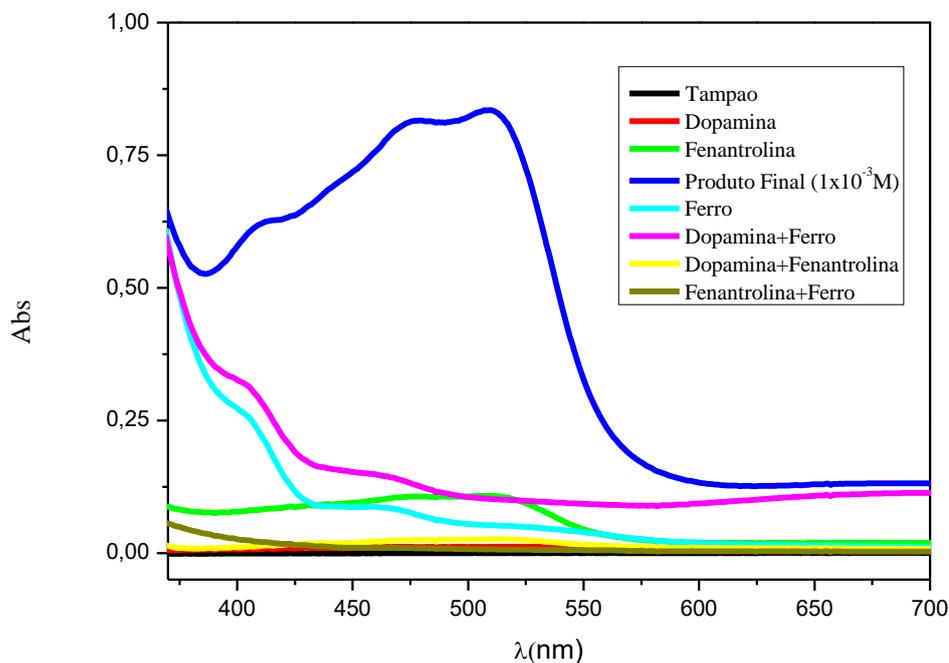


Fonte: Autor, 2019.

Para as imagens obtidas após a secagem da amostra o LD e LQ calculados foram 0,49 μM e 1,6 μM , respectivamente, e $R = 0,89837$. Já para imagens obtidas antes da secagem da amostra os valores de LD e LQ foram 0,95 μM e 3,2 μM e $R = 0,85441$.

4.3 Espectros no Uv-visível

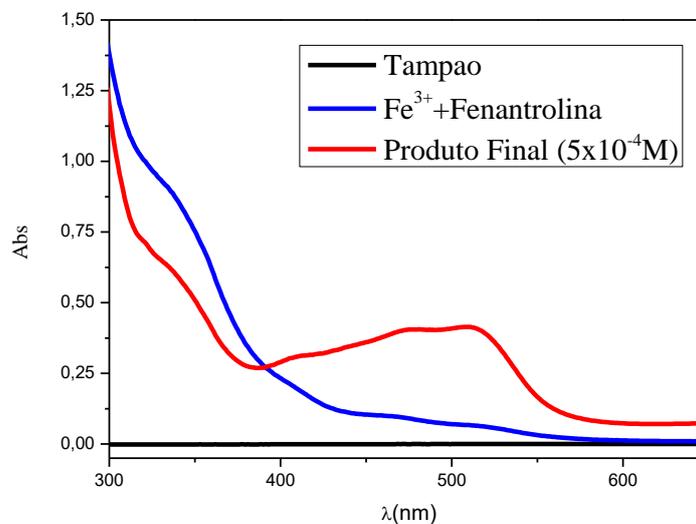
A técnica espectroscópica de Uv-visível foi utilizada para avaliar o comportamento das reações da dopamina com o Fe^{3+} e subsequente do Fe^{2+} com fenantrolina observadas nos microdispositivos em papel. Na Figura 23 é possível observar que todas as soluções, exceto o produto final (complexo de fenantrolina com Fe^{2+}) apresentam características similares na região do visível (em torno de 400 a 700 nm), não apresentando banda característica. Porém, no espectro correspondente ao complexo final formado é observado o surgimento de uma banda característica, nessa mesma região, que pode ser atribuída a ao complexo de Fe^{2+} com fenantrolina como já evidenciado por Bariya (2015) em outro trabalho (BARIYA; SINGH; CHAUDHARI, 2014).

Figura 23 – Espectros das soluções dos reagentes envolvidos na reação.

Fonte: Autor, 2019.

Visto que para o funcionamento do dispositivo, as concentrações de Fe^{3+} e fenantrolina devem ser mantidas fixas e a variação no sinal/cor estar relacionada apenas com a concentração de dopamina, foram realizadas varreduras. Foi realizado um corte de 300 a 700 nm para melhor avaliação uma vez que a região mais interessante para esse trabalho é a do visível. Observou-se novamente o surgimento da banda característica ao complexo final. Destacando então que não há sinal característico no branco da amostra (Fe^{3+} /fenantrolina) como pode ser visto na Figura 24.

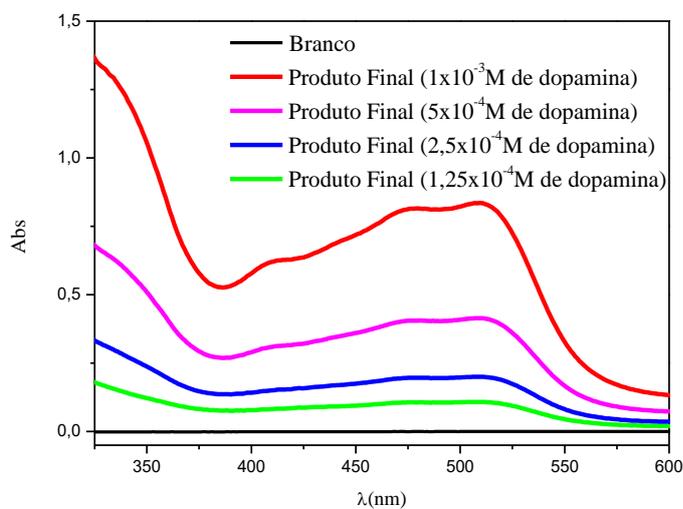
Figura 24 – Espectro da solução de Fe^{3+} /Fenantrolina e do complexo final formado (Fenantrolina- Fe^{2+})



Fonte: Autor, 2019.

Avaliou-se então o comportamento do sinal dessa banda com diferentes concentrações dos reagentes, manteve-se a proporção entre eles de 1 DA para 2 Fenantrolina e 10 Fe^{3+} e foi notado que a intensidade do sinal cresceu junto ou aumento da concentração dos reagentes como mostra a Figura 25. Esse estudo ajudou a elucidar em que faixa de concentração seria adequado trabalhar nos estudos espectroscópicos, uma vez se usa-se concentrações em torno de $1 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ para os reagentes não seria possível enxergar resultado com essa técnica.

Figura 25 – Espectros das diferentes concentrações do complexo Fenantrolina- Fe^{2+} .



Fonte: Autor, 2019.

A fim de avaliar a influência da DA na intensidade do sinal foi fixado a concentração de Fe^{3+} ($1 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$) e Fenantrolina ($3 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$) e variou-se a concentração de DA. Ao preparar as soluções já foi possível notar a diferença da intensidade de cor isso pode ser visto na Figura 26.

Figura 26 – Soluções com diferentes concentrações de DA.

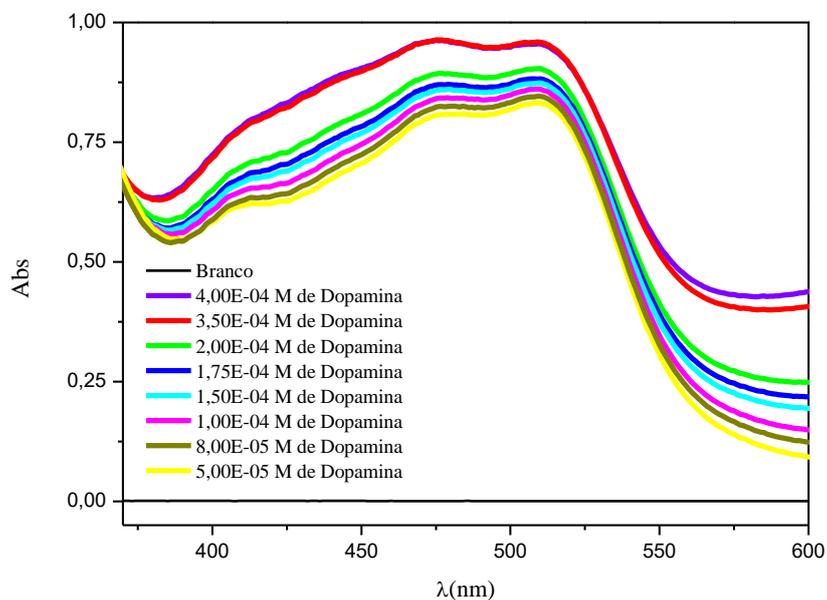


Fonte: Autor, 2019.

Notou-se um aumento na intensidade do sinal a medida que a concentração de DA aumentava até a sua saturação nos dois últimos pontos uma vez que a fenantrolina se

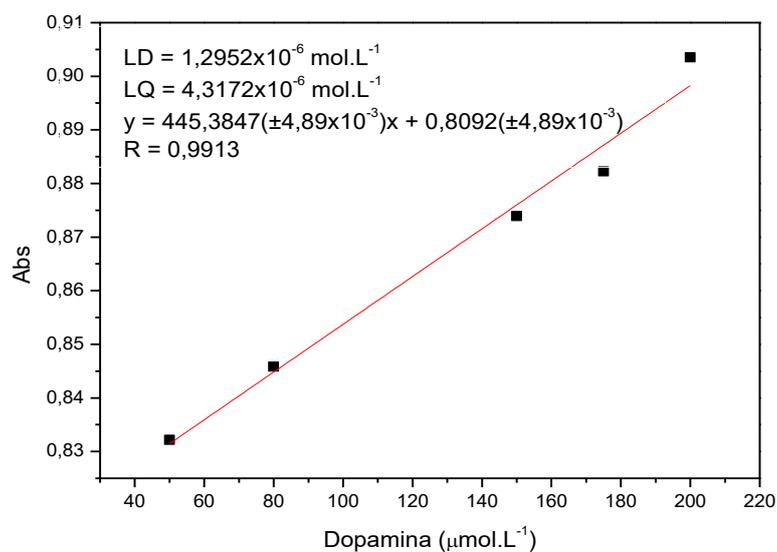
tornará o reagente limitante pois há excesso de dopamina em relação a fenantrolina, como pode ser visto na Figura 27.

Figura 27 – Espectros do complexo fenantrolina Fe^{2+} .



Fonte: Autor, 2019

Com a realização do estudo acima foi possível calcular o LD e LQ de acordo como descrito no item 4.6.1. Os valores de LD ($1,2952 \mu\text{molL}^{-1}$), LQ ($4,3172 \mu\text{molL}^{-1}$) e R (0,9913) podem ser conferidos na Figura 28.

Figura 28 – Curva analítica do estudo de DA no espectrofotômetro de Uv-Visível

Fonte: Autor, 2019.

4.4 Comparação com outras metodologias de determinação de dopamina.

Para microdispositivo em papel desenvolvido nesse trabalho a melhor resposta foi obtida nas fotografias tiradas após a secagem da amostra. Ao comparar com a metodologia com utilização da técnica espectroscópica essa por sinal se saiu melhor. Como pode ser visto na Tabela 5.

Tabela 5 – Comparação do método abordado nesse trabalho com outros métodos já consolidados.

Detecção	LD	LQ	Faixa Linear	R	Referência	Ano
<i>μPad úmido</i>	0,95 μM	3,2 μM	150-400μM	0,8544	Autor	2019
<i>μPad Seco</i>	0,49 μM	1,6 μM	50-350μM	0,8984	Autor	2019
<i>Espectroscopia UV-visível</i>	1,30μM	4,32μM	50-200μM	0,9913	Autor	2019
<i>Espectroscopia UV-visível</i>	0.2μM	-	0.2-30μM	-	(RAJ et al., 2016)	2016
<i>Fluorescência</i>	0.022Mm	-	4-40 μM	0,986	Sylwia (2017)	2017
<i>Colorimétrica</i>	0.37 μM	-	0.53–4.75μM	-	(LIU et al., 2019)	2019

Fonte: Autor, 2019.

Comparado a outros métodos de determinação como a espectroscopia de Uv-visível e de fluorescência se mostrou bem satisfatório. E pelo seu baixo custo de análise e facilidade de execução sem torna uma alternativa extremamente viável. Porém há necessidade de execução de estudos pra avaliar repetibilidade do método e influência de possíveis interferentes ao utilizar amostras reais como soro e urina.

CONCLUSÃO

Foi possível a confecção de um microdispositivo analítico a base de papel para determinação indireta de dopamina. O sistema apresenta funcionamento baseado na capacidade da DA de reduzir Fe^{3+} (cor amarela) a Fe^{2+} , este último complexo com fenantrolina gerando produto de coloração laranja. Foi avaliada a média de intensidade de cor do complexo obtido em função de adições de diferentes concentrações de DA, observou-se que ao comparar a obtenção do registro de imagem antes e após a secagem da amostra, depois da secagem da amostra o método apresenta mais sensibilidade. Permitindo a obtenção de LD = 0,49 μM e um LQ = 1,6 μM com R = 0,89837 em função de diferentes concentrações de dopamina. O microdispositivo apresentou-se satisfatório, devido a sua praticidade, rapidez e baixo custo, com potencial para portabilidade visando a realização de análise *in situ*, em relação a outras técnicas mais complexas e outros trabalhos nessa linha de pesquisa. São necessários mais estudos para otimizar, avaliar a repetibilidade do sistema e verificação de possíveis interferentes que podem estar presentes em amostras reais.

PERSPECTIVAS

Avaliação do microssistema desenvolvido a partir de papel com obtenção de imagens após a secagem da amostra quanto a repetibilidade e reprodutibilidade.

Otimização do sistema e redução de LD e LQ, agregando mais sensibilidade ao método e permitindo sua correlação com métodos já apresentados na literatura.

Realizar estudo elaborado de prováveis interferentes comumente presentes em amostras reais utilizando o sistema de melhor resultado deste trabalho.

Desenvolver estudos de quantificação de dopamina em amostras reais utilizando o método proposto, permitindo comparação com os resultados já existentes na literatura.

Promover a validação do método proposto através do uso de técnicas clássicas empregadas para a determinação deste analito.

REFERÊNCIAS

BARIYA, H.; SINGH, A. L.; CHAUDHARI, V. Communications in Soil Science and Plant Analysis Measurement of Fe (II) and Fe (III) in Groundnut by In-column and Post- column Reactions in Ion Chromatography. n. November 2015, 2014.

CHAKRAVARTHY, S. et al. Physiology & Behavior The many facets of dopamine : Toward an integrative theory of the role of dopamine in managing the body ' s energy resources. Physiology & Behavior, v. 195, n. May, p. 128–141, 2018.

DAIKUZONO, C. M. Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para análise de sistemas líquidos complexos. 2017.

GARCIA, P. D. E. T. et al. PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA Desenvolvimento de sensores colorimétricos e eletroquímicos para aplicações clínicas e forenses. 2017.

GONZA, A. G. et al. Fe(III) Reduction in the Presence of Catechol in Seawater ´. p. 467–482, 2010.

ILACAS, G. C. et al. Analytica Chimica Acta Paper-based micro fl uidic devices for glucose assays employing a metal-organic framework (MOF). Analytica Chimica Acta, n. xxxx, p. 1–7, 2019.

KARLOS, W. et al. Revisão. v. 30, n. 8, p. 1986–2000, 2007.

LIN, J. et al. Materials Science & Engineering C Chiral ZnO nanoparticles for detection of dopamine. Materials Science & Engineering C, v. 93, n. August, p. 739–745, 2018.

LIU, C. et al. A colorimetric assay system for dopamine using microfluidic paper-based analytical devices. Talanta, v. 194, n. October 2018, p. 171–176, 2019.

NAM-TRUNG NGUYEN; STEVEN T. WERELEY. Fundamentals and Applications of Microfluidics Second Edition. [s.l: s.n.].

NAQUIDDIN, N. H. et al. Overview of micro-channel design for high heat flux application. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 82, n. September 2017, p. 901–914, 2018.

OLIVEIRA, K. A. Desenvolvimento de sensores colorimétricos em materiais poliméricos para detecção de biomarcadores para diagnósticos clínicos. 2017.

PHILIP J. KITSON, MALI H. ROSNES, VICTOR SANS, V. D. AND L. C. Configurable 3D-Printed millifluidic and microfluidic ‘lab on a chip’ reactionware devices. v. 12, n. 18, 2012.

RAJ, D. R. et al. Sensors and Actuators B : Chemical Surface plasmon resonance based fiber optic dopamine sensor using green synthesized silver nanoparticles. v. 224, p. 600–606, 2016.

SKOOG, WEST, HOLLER, C. Fundamentos de química analítica. 9^a edição ed. [s.l.] Cengage Learning, 2014.

SYLWIA BALUTA^{1*}, JOANNA CABAJ¹, K. M. Neurotransmitters detection using a fluorescence-based sensor with graphene quantum dots. v. XLVII, n. 2, 2017.

TROTTA, G. et al. Flexible micro manufacturing platform for the fabrication of PMMA micro fluidic devices. *Journal of Manufacturing Processes*, v. 35, n. September 2017, p. 107–117, 2018.

WEI, X.; ZHANG, Z.; WANG, Z. A simple dopamine detection method based on fluorescence analysis and dopamine polymerization. *Microchemical Journal*, v. 145, n. October 2018, p. 55–58, 2019.

WEIBEL, D. B.; WHITESIDES, G. M. Applications of microfluidics in chemical biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 10, n. 6, p. 584–591, 2006.

YAGODA, H. Applications of Confined Spot Tests in Analytical Chemistry. p. 79–82, 1937.