

Bruno Filipe dos Santos Mamede

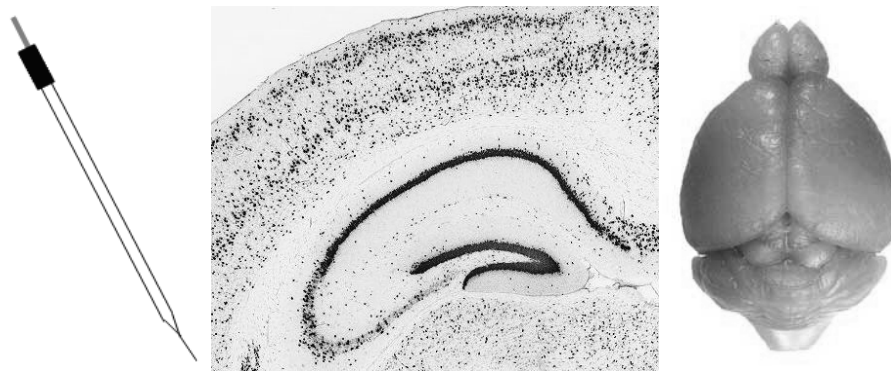
# Desenvolvimento de Microelétrodos de Fibra de Carbono para a Medição de Dopamina no Cérebro

Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Farmacêutica, orientada pelo Professor Doutor Rui M. Barbosa  
e apresentada na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Bruno Filipe dos Santos Mamede

# Desenvolvimento de Microelétrodos de Fibra de Carbono para a Medição de Dopamina no Cérebro

Tese de mestrado na área científica da Biotecnologia, no ramo da Biotecnologia Farmacêutica, sob orientação do Prof. Doutor Rui M. Barbosa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro de 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**O presente trabalho foi desenvolvido na Faculdade de Farmácia e no Centro de Neurociências e Biologia Celular da Universidade de Coimbra sob orientação do Professor Doutor Rui M. Barbosa.**



Na reta final de mais um ciclo na minha vida académica onde concentrei grande parte do meu tempo e energia, não poderia de modo algum deixar passar a oportunidade de agradecer a algumas pessoas que, através das mais diversas formas, tornaram possível e/ou me ajudaram à conclusão desta jornada. A eles dirijo os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Professor Doutor Rui M. Barbosa, em primeiro lugar por me ter possibilitado a elaboração do meu trabalho sob a sua orientação. Também pela excelente orientação e apoio que me proporcionou, supervisionando o meu trabalho com regularidade, fornecendo ideias e antecipando possíveis problemas.

Ao Professor Doutor Luís Almeida, que me proporcionou uma enorme ajuda na busca pelo local ideal para que eu pudesse desenvolver a minha tese.

Ao meu colega e amigo Nuno Ricardo Esteves Ferreira, que desde cedo me ajudou no laboratório, no contacto com novos materiais e equipamentos. Mesmo envolto nos seus diversos tipos de trabalho foi alguém que nunca se importou de parar alguns minutos para me explicar ou me ajudar com algo, permitindo que seguisse também o seu trabalho de perto. Teve um papel muito importante na minha adaptação ao laboratório.

À doutora Ana Ledo, que me introduziu e me permitiu acompanhar e participar nas suas experiências *in vivo* e ainda colaborou neste trabalho de forma ativa.

A todos os meus colegas e funcionários quer do Laboratório de Métodos Instrumentais de Análise da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra quer do Centro de Neurociências e Biologia Celular pela forma acolhedora com que me receberam, e pela disponibilidade que sempre me demonstraram.

À minha família e namorada, em especial aos meus pais, que me proporcionaram esta oportunidade e que sempre me ensinaram a “voar mais alto”.

# ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
I INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Comunicação química no cérebro.....	1
1.1.1 Neurotransmissores e neuromoduladores.....	1
1.1.1.1 Propriedades eletroquímicas.....	2
1.1.1.2 Detecção eletroquímica no espaço extracelular.....	5
1.1.1.3 Microelétrodos de fibra de carbono.....	6
1.1.2 Dopamina.....	9
1.1.2.1 Biossíntese, recetores e transportadores.....	10
1.1.2.2 Clearance e metabolismo.....	12
1.1.2.3 Os gânglios da base e via nigrostriatal.....	13
1.2 Métodos Eletroquímicos.....	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
2.1 Reagentes e Soluções.....	16
2.1.1 Reagentes.....	16
2.1.2 Soluções.....	16
2.2 Microelétrodos de fibra de carbono.....	18
2.2.1 Fabricação.....	18
2.2.2 Modificação da superfície dos microelétrodos.....	21
2.2.2.1 Nafion®.....	21
2.2.2.2 Filme compósito de nanotubos de carbono em Nafion®.....	21
2.3 Métodos eletroquímicos.....	22
2.3.1 Voltametria cíclica.....	23
2.3.2 Voltametria de onda quadrada.....	24
2.3.3 Amperometria.....	25
2.4 Microscopia eletrónica de varrimento.....	25

2.5	Célula eletroquímica.....	27
2.6	Sistema de análise por injeção em fluxo .....	27
2.7	Parâmetros Analíticos.....	30
2.8	Medição da libertação de dopamina endógena no estriado de um roedor anestesiado .....	31
2.9	Tratamento de dados.....	32
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
3.1	Estudo eletroquímico da dopamina .....	33
3.1.1	Potenciais de Oxidação-Redução .....	34
3.1.2	Efeito da velocidade de varrimento.....	36
3.1.3	Efeito do pH.....	40
3.1.4	Mecanismo da reação .....	43
3.2	Avaliação analítica dos microelétrodos de fibra de carbono revestidos com Nafion® .....	44
3.2.1	Calibração por voltametria de onda quadrada .....	44
3.2.2	Calibração por amperometria .....	48
3.2.3	Sistema de análise por injeção em fluxo.....	49
3.2.3.1	Fiagramas .....	49
3.2.3.2	Sensibilidade e limite de deteção .....	49
3.2.3.3	Seletividade .....	55
3.2.3.4	Tempo de resposta .....	58
3.3	Avaliação analítica dos microelétrodos de fibra de carbono revestidos com o filme compósito de nanotubos de carbono em Nafion® .....	59
3.3.1	Fiagramas .....	59
3.3.2	Sensibilidade e limite de deteção .....	62
3.3.3	Seletividade.....	64
3.3.4	Tempo de resposta .....	66
3.4	Medição da libertação de dopamina endógena no estriado em ratos anestesiados.....	67
4	CONCLUSÕES.....	69
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	71

---

## **Abreviaturas**

---



---

<b>3-MT</b>	3-metoxitriptamina
<b>5-HIAA</b>	ácido 5-hidroxiindolacético
<b>AA</b>	ácido ascórbico
<b>AC</b>	adenilciclase
<b>AP</b>	anterior-posterior
<b>ATP</b>	adenosina trifosfato
<b>CFM7</b>	microelétrodos de fibra de carbono de 7 $\mu$ m de diâmetro
<b>CFM30</b>	microelétrodos de fibra de carbono de 30 $\mu$ m de diâmetro
<b>CNT</b>	nanotubos de carbono
<b>CV</b>	voltametria cíclica
<b>DA</b>	dopamina
<b>DAT</b>	transportadores de dopamina
<b>DOPAC</b>	3,4-dihidroxifenilacético
<b>DV</b>	dorsal-ventral
<b>EA</b>	elétrodo auxiliar
<b>EC</b>	eletroquímico-químico
<b>E<sub>i</sub></b>	potencial inicial
<b>E<sub>f</sub></b>	potencial final
<b>E<sub>pa</sub></b>	potencial de pico anódico
<b>E<sub>pc</sub></b>	potencial de pico catódico
<b>ER</b>	elétrodo de referência

---

---

<b>ET</b>	elétrodo de trabalho
<b>FIA</b>	análise por injeção em fluxo
<b>FSCV</b>	voltametria cíclica de varrimento rápido
<b>GABA</b>	ácido $\gamma$ -aminobutírico
<b>I<sub>pa</sub></b>	intensidade de pico anódico
<b>I<sub>pc</sub></b>	intensidade de pico catódico
<b>L-DOPA</b>	L-3,4-dihidroxifenilalanina
<b>LOD</b>	limite de detecção
<b>MAO</b>	monoamina oxidase
<b>ML</b>	médio-lateral
<b>o-PD</b>	orto-fenilenodiamina
<b>PBS</b>	tampão fosfato salino
<b>SEM</b>	erro padrão da média
<b>SVMT</b>	proteínas transportadoras de monoaminas vesiculares sinápticas
<b>SWCNT</b>	nanotubos de carbono de parede simples
<b>SWV</b>	voltametria de onda quadrada
<b>UA</b>	ácido úrico

---

**Resumo**

---

---

A dopamina é um dos neurotransmissores do grupo das catecolaminas mais estudados pelo facto de estar envolvida em vários processos neuronais fisiológicos tais como o desenvolvimento motor, o controlo dos movimentos, a recompensa, a memória, e a percepção. Adicionalmente, desempenha um papel relevante em certas patologias, como nas doenças de Parkinson e Huntington, na esquizofrenia e na adicção. Como tal, a medição da dopamina *in vivo* ou *ex vivo* no cérebro é bastante importante para a compreensão do funcionamento dos circuitos dopaminérgicos.

A microdiálise e as técnicas eletroquímicas têm sido bastante utilizadas para medir a dopamina no cérebro. O recurso a técnicas eletroquímicas rápidas é particularmente atrativo porque confere uma elevada resolução temporal e espacial, e ainda uma elevada sensibilidade e seletividade. Baseiam-se na utilização de microelétrodos de que são exemplo os microelétrodos de fibra de carbono, beneficiando das suas dimensões micrométricas, das excelentes propriedades eletroquímicas e da sua biocompatibilidade.

No presente trabalho fabricaram-se microelétrodos de fibra de carbono de 7 e de 30 $\mu$ m de diâmetro (CFM7 e CFM30, respetivamente). A superfície eletroquimicamente ativa dos microelétrodos foi revestida com duas e quatro camadas de Nafion<sup>®</sup> (5%) ou com um filme compósito de nanotubos de carbono de parede simples suspensos em Nafion<sup>®</sup> (5%). Foi feita uma avaliação das propriedades analíticas dos microelétrodos através da utilização de técnicas eletroquímicas (e.g. voltametria cíclica, voltametria de onda quadrada e amperometria), nomeadamente da sensibilidade, seletividade, limite de deteção (LOD) e tempo de resposta. Adicionalmente, foi efetuado o estudo eletroquímico da dopamina, designadamente dos potenciais de oxidação e redução e a avaliação dos efeitos do pH e da velocidade de varrimento sobre os mesmos, tendo como objetivo compreender o mecanismo da reação redox. Por voltametria cíclica comprovou-se que a dopamina tem um comportamento eletroquímico quasi-reversível, em que a reação de oxidação é controlada por adsorção e difusão a baixas (<50mV/s) e elevadas (>100mV/s) velocidades de varrimento, respetivamente. O potencial de oxidação diminuiu com o pH -56mV/pH e -69mV/pH para os CFM30 e os CFM7, respetivamente. Estes resultados indicam que o mecanismo de reação envolve uma reação eletroquímica da dopamina seguida por uma reação química do seu produto de oxidação (mecanismo EC). Pela utilização da voltametria de onda quadrada verificou-se um potencial de pico de oxidação de +0,2V vs. Ag/AgCl. Adicionalmente, foi observado que a relação entre a corrente de pico e a concentração de

---

dopamina se afasta da linearidade para concentrações  $\geq 2\mu\text{M}$ , o que pode estar relacionado com a adsorção dos produtos de oxidação à superfície dos microelétrodos.

Os dois tipos de microelétrodos CFM30 e CFM7 foram avaliados por amperometria e num sistema de análise por injeção de fluxo (FIA) ao nível da sensibilidade, limite de deteção, seletividade e tempo de resposta. Quando comparados com os microelétrodos em *bare*, o revestimento com duas e quatro camadas de Nafion<sup>®</sup> (5%) diminuiu ligeiramente a sensibilidade e aumentou o LOD ( $p>0,05$ ). Como era esperado, o Nafion<sup>®</sup> aumentou significativamente a seletividade dos microelétrodos e o tempo de resposta, o que está de acordo com publicações anteriores. Ademais, a sensibilidade e o LOD não foram melhorados com o revestimento dos dois tipos de microelétrodos com o filme compósito de nanotubos de carbono de parede simples em Nafion<sup>®</sup> (5%). No entanto, a seletividade aumentou significativamente ( $p<0,05$ ) ainda que em menor escala quando comparada com os CFMs revestidos com quatro camadas de Nafion<sup>®</sup> (5%).

Por último, fez-se a aplicação de um CFM30 numa experiência *in vivo* para medir a libertação de dopamina endógena no estriado de rato.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que os dois tipos de microelétrodos revestidos com quatro camadas de Nafion<sup>®</sup> exibiram propriedades analíticas adequadas no que diz respeito à sensibilidade, LOD, seletividade e tempo de resposta, para medir a dopamina em tempo real em ambientes químicos complexos como é o caso do espaço extracelular do cérebro.

**Palavras-Chave:** Dopamina; Técnicas eletroquímicas; Microelétrodos de fibra de carbono; Nafion<sup>®</sup>; Nanotubos de carbono.

---

**Abstract**

---

---

Dopamine is a well-studied neurotransmitter belonging to the catecholamine group that is involved in several physiological neuronal processes such as motor development, movement control, reward, memory and perception. This neurotransmitter plays a critical role on some pathologies, namely Parkinson's and Huntington's diseases, schizophrenia and addiction. Therefore, *in vivo* and *ex vivo* dopamine measurements are very important to understand the dopaminergic circuitry.

Microdialysis and electrochemical techniques have been used extensively to measure dopamine in the brain. The use of electrochemical techniques is particularly attractive because of its high temporal and spatial resolutions, high sensibility and selectivity. These techniques are based on the use of microelectrodes such as carbon fibre microelectrodes, taking advantage of their micrometre dimension, excellent electrochemical properties and biocompatibility.

In the present work, carbon fibre microelectrodes (CFMs) were hand-made fabricated with fibres of 7 and 30 $\mu\text{m}$  diameter (CFM7 and CFM30, respectively). The electrochemical active surface of the microelectrodes was coated with two and four layers of Nafion<sup>®</sup> (5%) or with a composite film of single-walled carbon nanotubes suspended in Nafion<sup>®</sup> (5%). An evaluation of the analytical properties sensitivity, selectivity, detection limit (LOD) and response time of the microelectrodes was performed using electrochemical techniques (e.g. cyclic voltammetry, square-wave voltammetry and amperometry). Additionally, electrochemical behaviour of dopamine was studied, namely its oxidation and reduction potentials, effect of pH and scan rate, aiming at understanding the redox reaction mechanism. By using cyclic voltammetry, it was observed that dopamine behaves like an almost-reversible electrochemical system, in which oxidation reactions were controlled by adsorption and by diffusion at low (<50mV/s) and high scan rates (>100mV/s), respectively. The oxidation potential decreased with pH -56mV/pH and -69mV/pH for the CFM30 and CFM7, respectively. These results indicate that the reaction mechanism involves an electrochemical reaction of dopamine followed by a chemical reaction of its oxidation product (*EC* mechanism). By using square wave voltammetry the oxidation peak potential was determined to be +0,2V vs. Ag/AgCl. Furthermore, the relationship between the current peak and dopamine concentration departs from linearity for concentrations  $\geq 2\mu\text{M}$ , which can be related with the adsorption of oxidation products onto the microelectrode surface.

Both CFM30 and CFM7 microelectrodes were assessed in terms of sensitivity, limit of detection (LOD), selectivity and response time by amperometry in a flow injection analysis system (FIA). When compared with bare microelectrodes, coating with two or four layers of Nafion<sup>®</sup> (5%) slightly decreased the sensitivity and increased LOD ( $p > 0.05$ ). As expected, Nafion<sup>®</sup> significantly increased the microelectrode selectivity and delayed the response time in agreement with previous reports. Furthermore, the sensitivity and LOD were not improved by coating either type of microelectrodes with a composite film of single wall carbon nanotubes in Nafion<sup>®</sup> (5%). However, the selectivity increased significantly ( $p < 0.05$ ), even though it remained lower than CFMs coated with four layers of Nafion<sup>®</sup>.

At last, a CFM30 was applied on a *in vivo* experiment to measure the release of endogenous dopamine in a rat striatum.

Overall, the results obtained in this work indicate that both types of microelectrodes coated with four layers of Nafion<sup>®</sup> displayed suitable analytical properties in terms of sensitivity, LOD, selectivity and response time for measuring in real-time dopamine in complex chemical environments such as brain extracellular space.

**Key-Words:** Dopamine; Electrochemical techniques; Carbon fibre microelectrodes; Nafion<sup>®</sup>; Carbon nanotubes.



---

## I Introdução

---

## 1.1 Comunicação química no cérebro

A transmissão de sinais químicos está dependente da libertação de substâncias químicas ou neurotransmissores nos terminais pré-sinápticos, onde estão presentes vesículas sinápticas, cada uma contendo várias moléculas de um neurotransmissor específico. As zonas da membrana especializadas na libertação de neurotransmissores são designadas por zonas ativas. A despolarização provocada pelo potencial de ação no terminal pré-sináptico, leva à entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  através de canais sensíveis à voltagem, o que faz aumentar a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular provocando a fusão das vesículas com a membrana pré-sináptica e a consequente libertação do neurotransmissor. Os neurotransmissores ligam-se posteriormente a recetores localizados na membrana do terminal pós-sináptico, o que os ativa levando geralmente à abertura ou ao encerramento de canais iónicos na membrana. A comunicação química tem um importante papel na amplificação dos sinais: um pequeno terminal pré-sináptico pode libertar uma quantidade enorme de neurotransmissores que podem despolarizar uma célula pós-sináptica, permitindo a continuidade da passagem de informação (Koester, J. and Siegelbaum, S., 2000, Lodish, H. [et al.], 2000, Siegelbaum, S. and Kandel, E., 2000).

### 1.1.1 Neurotransmissores e neuromoduladores

Os neurotransmissores e neuromoduladores têm uma ação temporária em escalas de tempo que variam de milissegundos a minutos. A neurotransmissão e neuromodulação utilizam dois tipos de neurotransmissores: moléculas de pequenas dimensões e peptídeos neuro-ativos – ambos contidos nas vesículas sinápticas. Os peptídeos neuro-ativos derivam de proteínas que são formadas no corpo celular, são primeiramente processadas no retículo endoplasmático, seguem para o complexo de Golgi onde são novamente processadas, e saem como grânulos para os terminais pré-sinápticos (devido ao transporte axonal) para se tornarem em vesículas. O estudo deste tipo de neurotransmissores é importante pelo papel que alguns deles desempenham em certas emoções ou na perceção sensorial, como as respostas a *stress* ou a perceção de dor. A ocitocina e a angiotensina são exemplos deste tipo de transmissores (Schwartz, J. and Javitch, J., 2000).

Em relação às moléculas de menores dimensões, são geralmente reconhecidos nove neurotransmissores – aminas e ATP (e seus metabolitos). As primeiras são sintetizadas de precursores derivados de substratos de hidratos de carbono através de cadeias biossintéticas relativamente curtas e são todas carregadas eletricamente enquanto que o

ATP é produzido na mitocôndria e está presente de forma abundante em toda a célula. A biossíntese das aminas é regulada por uma reação enzimática onde a enzima reguladora é, por norma, característica de um tipo de neurónios e está geralmente ausente noutros. Deste grupo de aminas constam a acetilcolina, adrenalina e noradrenalina, serotonina, histamina, glicina, glutamato, ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) e a dopamina (Robinson, D.L. [et al.], 2008, Schwartz, J. and Javitch, J., 2000).

Apesar da variedade de neurotransmissores, a sua ação nas células pós-sinápticas não depende das suas propriedades químicas e sim das propriedades dos recetores que os reconhecem e aos quais se ligam. Com base nesta afirmação, o mesmo neurotransmissor pode excitar ou inibir as células pós-sinápticas, sendo possível ter os dois efeitos na mesma célula (Calabresi, P. [et al.], 2014, Siegelbaum, S. and Kandel, E., 2000).

#### **1.1.1.1 Propriedades eletroquímicas**

Em função da sua deteção eletroquímica, os neurotransmissores e neuromoduladores podem ser divididos em três grupos: os ativos eletroquimicamente, os que não são eletroquimicamente ativos mas que através de uma reação enzimática podem ser quantificados e os que não são eletroquimicamente ativos e não podem ser quantificados pelas técnicas eletroquímicas (Robinson, D.L. [et al.], 2008, Turner, A.P., 2013).

Do primeiro grupo fazem parte substâncias como a adrenalina, noradrenalina, a dopamina e alguns dos seus metabolitos como o L-Dopa ou o DOPAC (Kundys, M. [et al.], 2014, Wightman, R.M., 2015).

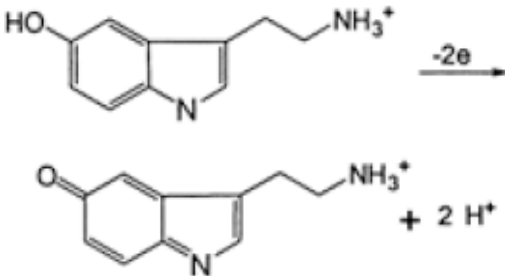
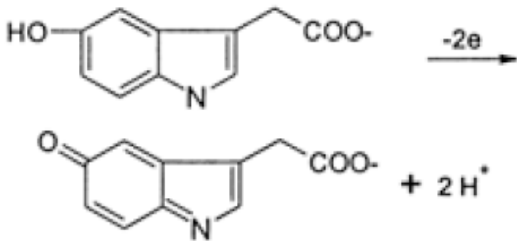
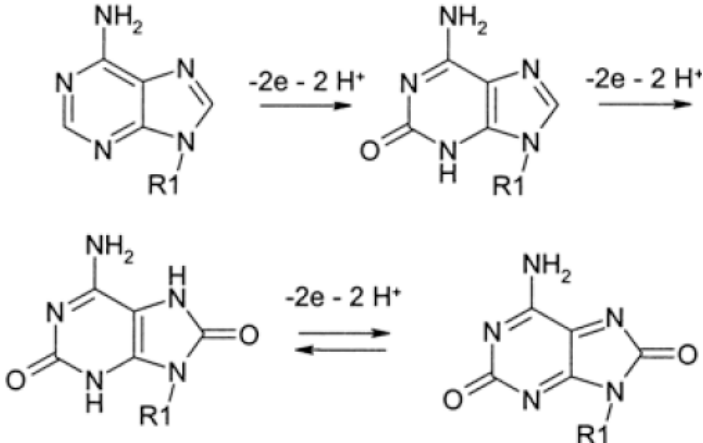
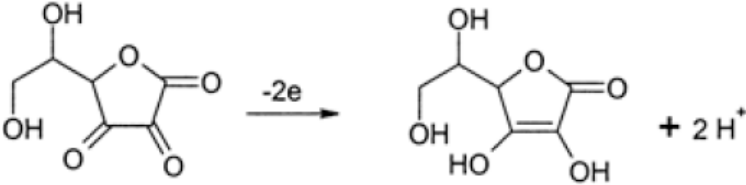
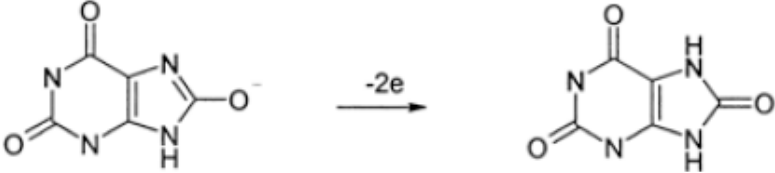
Na Tabela 1 estão representados alguns derivados da tirosina, as respetivas reações redox e o seu potencial de oxidação aproximado vs. Ag/AgCl. Nesta tabela verifica-se que todos os compostos apresentam reações de oxidação semelhantes envolvendo dois eletrões e perda dos seus grupos hidroxilo, cujo potencial é relativamente baixo.

Na Tabela 2 estão representados outros compostos que estão presentes no cérebro e que são eletroquimicamente ativos tais como derivados do triptofano, ou os ácidos ascórbico (AA) e úrico (UA), que estão presentes em elevadas concentrações no espaço extracelular (AA 0,1-0,6mM, UA 0,15-0,45mM) (Adams, R.N., 1990, Kundys, M. [et al.], 2014).

**Tabela I** - Reações redox e potenciais de oxidação (Epa) de derivados da tirosina presentes no cérebro a pH fisiológico (adaptado de (Robinson, D.L. [et al.], 2008)).

COMPOSTO (Epa vs. Ag/AgCl)	REAÇÃO REDOX
Dopamina (+0,2V)	$\text{Dopamine} \xrightarrow{-2e} \text{Dopamine}^{\text{ox}} + 2\text{H}^+$
L-Dopa (+0,4V)	$\text{L-Dopa} \xrightarrow{-2e} \text{L-Dopa}^{\text{ox}} + 2\text{H}^+$
DOPAC (+0,2V)	$\text{DOPAC} \xrightarrow{-2e} \text{DOPAC}^{\text{ox}} + 2\text{H}^+$
3-Metoxitiramina (+0,5V)	$\text{3-Metoxitiramina} \xrightarrow{-2e} \text{3-Metoxitiramina}^{\text{ox}} + \text{H}^+ + \text{H}_3\text{C-OH}$
Ácido Homovanílico (+0,5V)	$\text{Ácido Homovanílico} \xrightarrow{-2e} \text{Ácido Homovanílico}^{\text{ox}} + \text{H}^+ + \text{H}_3\text{C-OH}$
Noradrenalina (+0,2V)	$\text{Noradrenalina} \xrightarrow{-2e} \text{Noradrenalina}^{\text{ox}} + 2\text{H}^+$
Adrenalina (+0,2V)	$\text{Adrenalina} \xrightarrow{-2e} \text{Adrenalina}^{\text{ox}} + 2\text{H}^+$

**Tabela 2** - Reações redox e potenciais de oxidação (Epa) dos derivados do triptofano, serotonina e ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA), e de outras moléculas eletroativas presentes no cérebro a pH fisiológico (adaptado (Robinson, D.L. [et al.], 2008).

COMPOSTO (Epa vs. Ag/AgCl)	REAÇÃO REDOX
Serotonina (+0,35V)	 $\text{Serotonin} \xrightarrow{-2e} \text{5-Hydroxytryptophan} + 2\text{H}^+$
5-HIAA (+0,35V)	 $\text{5-HIAA} \xrightarrow{-2e} \text{5-Hydroxytryptophan} + 2\text{H}^+$
Adenosina (+1,2V)	 $\text{Adenosine} \xrightarrow{-2e - 2\text{H}^+} \text{6-Aminocaproamide} \xrightarrow{-2e - 2\text{H}^+} \text{6-Aminocaproamide} + 2\text{H}^+$
Ácido Ascórbico (+0,2V)	 $\text{Ácido Ascórbico} \xrightarrow{-2e} \text{Dehidroascórbico} + 2\text{H}^+$
Ácido Úrico (+0,3V)	 $\text{Ácido Úrico} \xrightarrow{-2e} \text{Úrico} + 2\text{H}^+$

Ao segundo grupo pertencem compostos que, não sendo eletroquimicamente ativos, podem no entanto ser quantificados através do consumo ou da produção de um composto envolvido numa reação enzimática. Por exemplo, por ação da enzima glutamato oxidase, o glutamato (que não é eletroativo) é convertido em  $\alpha$ -cetoglutarato e peróxido de hidrogénio que pode ser quantificado por técnicas eletroquímicas. Outros exemplos que podem ser monitorizados desta forma são o ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), a colina e a acetilcolina (Huffman, M.L. and Venton, B.J., 2009, Kiyatkin, E.A. [et al.], 2013, Perry, M. [et al.], 2009).

Por último, existem ainda moléculas que não são eletroquimicamente ativos e que não se enquadram no segundo grupo e como tal não podem ser quantificadas por técnicas eletroquímicas, como por exemplo a glicina e alguns peptídeos neuroativos (Perry, M. [et al.], 2009, Wightman, R.M., 2006).

### 1.1.1.2 Detecção eletroquímica no espaço extracelular

Atualmente as técnicas que são utilizadas na deteção neuroquímica quer *in vitro*, através de cultura de células, *ex vivo* como fatias de cérebro e *in vivo* em animais anestesiados e acordados, podem ser subdivididas em duas classes: técnicas não invasivas e técnicas invasivas. No grupo de técnicas não invasivas incluem-se por exemplo a ressonância magnética funcional (fMRI) e a tomografia de emissão de positrões (PET), e nas invasivas destacam-se a microdiálise e técnicas eletroquímicas baseadas em microelétrodos (Chefer, V.I. [et al.], 2009, Kennedy, R.T., 2013, Schultz, K.N. and Kennedy, R.T., 2008, Watson, C.J. [et al.], 2006).

Contudo, a medição e monitorização dos neurotransmissores no tecido neuronal em tempo real requer métodos sensíveis, de baixo limite de deteção e ainda uma elevada seletividade tendo em conta que o espaço extracelular é um meio quimicamente muito complexo onde podem coexistir cerca de 200 compostos distintos. Por outro lado, o sistema de transdução de sinal deve possuir um tempo de resposta rápido na ordem de milissegundos a segundos que permita acompanhar as variações de concentração em tempo real (Robinson, D.L. [et al.], 2008).

A microdiálise é um método que se caracteriza pela utilização de uma sonda fabricada com uma membrana de diálise numa das suas extremidades, no interior da qual flui uma solução de perfusão. As moléculas mais pequenas (<20000Da) atravessam a membrana semi-permeável devido ao gradiente de concentração e são depois analisadas por métodos de separação convencionais (e.g. HPLC, eletroforese capilar, entre outros). A microdiálise tem

como principais desvantagens o facto de a membrana ter rácios de perfusão baixos, e também o dano significativo que causa nos tecidos devido à dimensão da sonda que tem um diâmetro  $>200\mu\text{m}$ . Uma alternativa na monitorização dos neurotransmissores envolve a utilização de métodos como a ressonância magnética funcional (fMRI) ou a tomografia de emissão de positrões (PET) cuja principal vantagem deriva de serem abordagens não invasivas e que podem ser utilizadas em humanos. No entanto, apresentam uma baixa resolução temporal e espacial e implicam a utilização de agentes farmacológicos (Jacobs, C.B. [et al.], 2009, Robinson, D.L. [et al.], 2008, Schultz, K.N. and Kennedy, R.T., 2008).

### 1.1.1.3 Microelétrodos de fibra de carbono

Em 1978, Gonon e colaboradores (Gonon, F. [et al.], 1978) utilizaram pela primeira vez microelétrodos de fibra de carbono para medições *in vivo* de catecolaminas, beneficiando da reduzida dimensão da fibra com  $8\mu\text{m}$  de diâmetro, elevada condutividade e compatibilidade biológica. Um marco importante foi a introdução por Gerhardt e colaboradores (Gerhardt, G.A. [et al.], 1984) do revestimento da superfície ativa dos microelétrodos com Nafion<sup>®</sup>, um filtro aniónico derivado do Teflon utilizado principalmente para aumentar a seletividade dos elétrodos (Huffman, M.L. and Venton, B.J., 2009, Michael, A. and Borland, L., 2007, Ponchon, J.L. [et al.], 1979, Wightman, R.M., 2015).

A fibra de carbono, é um derivado do carbono desenvolvido no final dos anos cinquenta com o patrocínio da força aérea norte americana e mais tarde com o seu programa espacial para a construção de vaivéns. A fibra pode ser sintetizada a partir de vários materiais poliméricos sendo que o poliácrlonitrilo (PAN) é geralmente o precursor mais utilizado (Morgan, P., 2005, Santos, R.M. [et al.], 2008).

A utilização dos microelétrodos de fibra de carbono associada às diferentes técnicas eletroquímicas confere diversas vantagens face a outras técnicas, como por exemplo a elevada resolução espacial. A diminuição do tamanho dos elétrodos, por exemplo em relação às sondas de microdiálise em cerca de 20x, tem várias implicações nas medições. Em primeiro lugar, o dano que provocam quando são colocados *in vivo* é reduzido significativamente. Segundo, possibilita a colocação dos elétrodos suficientemente perto das células de interesse de forma a assegurar a oxidação completa das moléculas que são libertadas no processo de neurotransmissão (Borland, L.M. and Michael, A.C., 2007, Kita, J.M. and Wightman, R.M., 2008, Peters, J.L. [et al.], 2004, Venton, B.J. [et al.], 2003).

Outro fator que torna a utilização de microelétrodos de fibra de carbono vantajosa é a resolução temporal que oferecem. Num sistema biológico podem ocorrer alterações em diferentes escalas temporais que vão desde milissegundos a minutos, o que impossibilita a medição dessas mesmas alterações através da microdiálise. A neurotransmissão química é um dos exemplos que ocorre em intervalos de tempo bastante reduzidos, no entanto a utilização de microelétrodos possibilita o acompanhamento em tempo real das alterações químicas no meio, possibilitando o estudo de vários mecanismos biológicos importantes como a excitação, a funcionalidade dos receptores neuronais e alterações químicas que possam ocorrer em diferentes estados patológicos (Ledo, A. [et al.], 2002, Robinson, D.L. and Wightman, R.M., 2007, Santos, R.M. [et al.], 2013).

Às vantagens acima enunciadas associa-se uma elevada estabilidade no meio biológico onde são inseridos, com baixos índices de *bio-fouling*. Em conjugação com várias técnicas eletroquímicas rápidas, a utilização de microelétrodos de fibra de carbono possibilita estudar uma vasta gama de neurotransmissores dos quais se destacam as catecolaminas (e.g. dopamina, noradrenalina, adrenalina) e os seus metabolitos (e.g. DOPAC, L-DOPA, 3-metoxitiramina), e as indolaminas (e.g. a serotonina) e os seus precursores e metabolitos (e.g. histamina e a adenosina). Outras substâncias presentes no cérebro podem também ser objeto de análise com os microelétrodos de fibra de carbono, como o ácido ascórbico, o ácido úrico e ainda óxido nítrico, oxigénio e peróxido de hidrogénio. Contudo, como foi previamente referido, existe uma vasta gama de neurotransmissores e neuromoduladores que não são eletroativos e consequentemente não podem ser analisados através de métodos eletroanalíticos (Borland, L.M. and Michael, A.C., 2007, Budai, D. [et al.], 2010, Ferreira, N. [et al.], 2005, Robinson, D.L. [et al.], 2008).

Outra desvantagem associada à utilização dos microelétrodos de fibra de carbono diz respeito à sua seletividade. Numa experiência no grupo de Ralph Adams (Kissinger, P.T. [et al.], 1973) realizada no início da década de 70, os investigadores obtiveram uma intensidade de corrente que associaram à oxidação da dopamina, no entanto, cedo se percebeu que o sinal não derivava da dopamina mas da oxidação de todas as espécies eletroativas que se encontravam no meio (como o ascorbato ou o DOPAC) onde o eletrodo foi colocado e cujo potencial de oxidação era igual ou inferior ao potencial de oxidação que foi aplicado no eletrodo de trabalho. Desde então que a seletividade tem sido um tema central nas medições eletroquímicas e diferentes abordagens têm sido aplicadas como por exemplo a utilização de pré-tratamentos físicos e químicos aos microelétrodos (Borland, L.M. and Michael, A.C., 2007, Bucher, E.S. and Wightman, R.M., 2015).



No trabalho de Gerhardt e colaboradores (Gerhardt, G.A. [et al.], 1984) cuja importância já foi discutida neste trabalho, os investigadores utilizaram o Nafion<sup>®</sup> para revestir a superfície ativa dos elétrodos de fibra de carbono, um polímero perfluorosulfonado derivado do Teflon que devido aos seus grupos sulfonados carregados negativamente forma um filtro aniónico. A aplicação deste polímero na superfície ativa do eletrodo exclui por exemplo o ascorbato e o DOPAC, os dois grandes interferentes na medição de dopamina (Heien, M.L. [et al.], 2003, Peairs, M.J. [et al.], 2011).

Outros polímeros foram utilizados como o polipirrol, um polímero que quando oxidado funciona como filtro aniónico baseado na elevada densidade dos eletrões presentes nos seus grupos carbonilo, ou a orto-fenilenodiamina (o-PD), que forma uma camada bastante compacta e fortemente aderente à superfície do eletrodo com o objetivo de excluir moléculas como por exemplo a dopamina (Ciszewski, A. and Milczarek, G., 2001, Ferreira, N. [et al.], 2005, Friedemann, M.N. [et al.], 1996, Hsueh, C.B.-T., A., 1994, Pihel, K. [et al.], 1996, Sasso, L. [et al.], 2013).

Mais recentemente têm vindo a ser utilizadas suspensões de nanotubos de carbono em Nafion<sup>®</sup> ou em polipirrol. Estes nanomateriais são estruturas de 2 a 20nm que têm excelentes propriedades, nomeadamente elétricas, químicas e mecânicas, conforme se comprovou em 1996 relativamente à reversibilidade do comportamento eletroquímico da dopamina estudada por voltametria cíclica (Britto, P. [et al.], 1996). A utilização dos nanotubos pode conferir seletividade através da diminuição do potencial de oxidação do ascorbato por exemplo, contudo, a sua utilização visa geralmente o aumento da sensibilidade e do limite de deteção dos elétrodos (Ferreira, N. [et al.], 2013, Jacobs, C.B. [et al.], 2010, Swamy, B.E. and Venton, B.J., 2007).

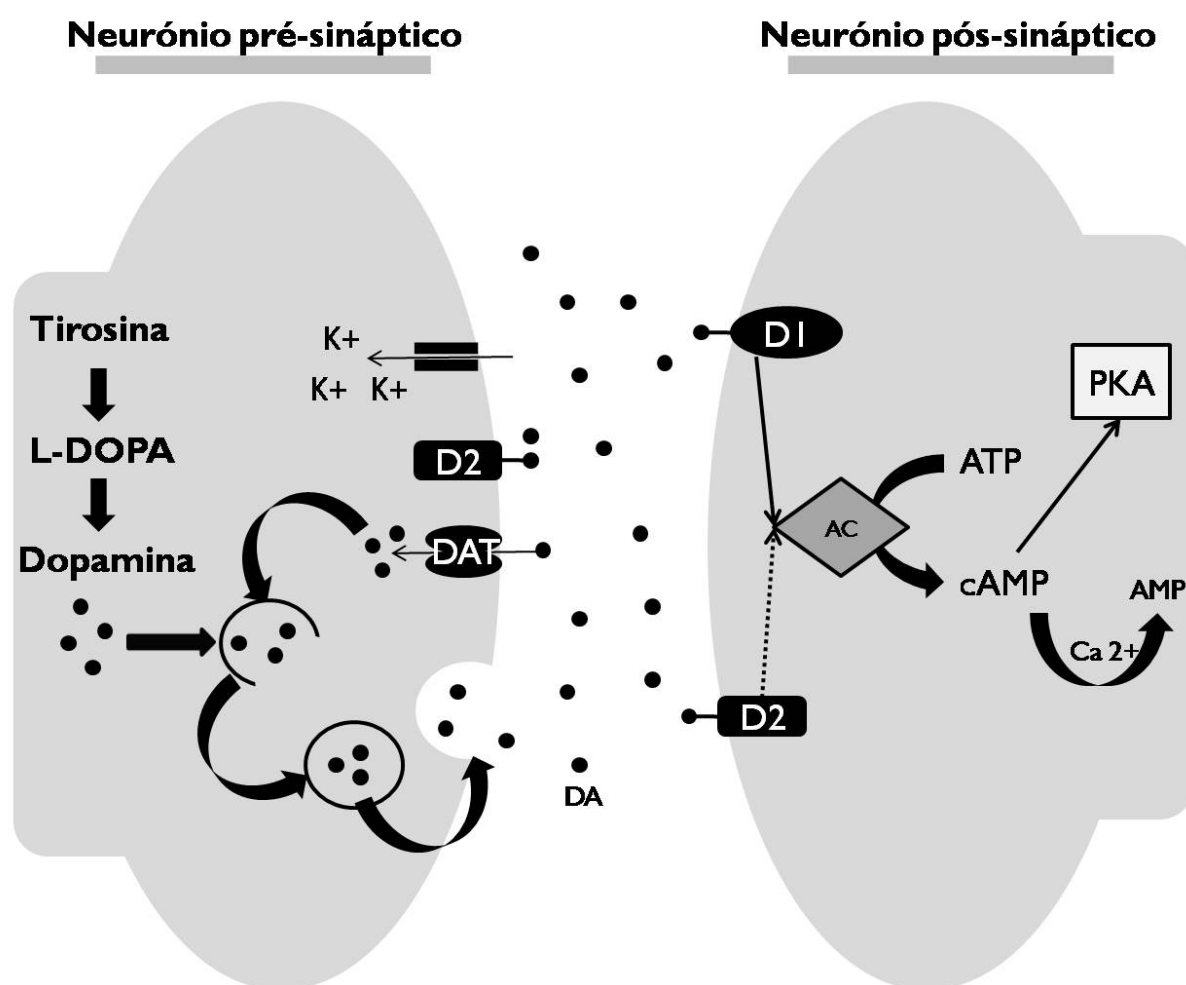
O uso de filmes poliméricos acarreta geralmente alguns problemas nomeadamente o aumento do tempo de resposta ao analito, a possibilidade do filme fissurar, descamar, ou ainda de ser degradado quimicamente (Robinson, D.L. [et al.], 2008, Santos, R.M. [et al.], 2008).

Adicionalmente, a utilização dos revestimentos permite tornar moléculas não eletroativas em moléculas detetáveis eletroquimicamente através de biossensores. Estes biossensores consistem em microelétrodos de fibra de carbono modificados com enzimas imobilizadas numa matriz polimérica. O seu princípio de funcionamento baseia-se na medição de uma espécie eletroativa formada (e.g. o peróxido de hidrogénio) através da oxidação do analito pela enzima imobilizada (Huffman, M.L. and Venton, B.J., 2009, Llaudet, E.

[et al.], 2003, Mitala, J.J. and Michael, A.C., 2006, Turner, A.P., 2013, Wilson, G.S. and Johnson, M.A., 2008).

### 1.1.2 Dopamina

A dopamina tem sido objeto de intensos estudos principalmente a partir da década de 1950 quando foram identificadas as suas ações biológicas. É constituída por um grupo catecol e por um grupo amina, produzida a partir do aminoácido tirosina, e é precursora de outras catecolaminas nomeadamente da noradrenalina e da adrenalina (Beaulieu, J.M. and Gainetdinov, R.R., 2011, Hervé, D. and Girault, J., 2005, Schwartz, J. and Javitch, J., 2000).



**Figura 1.1.** Representação de uma sinapse dopaminérgica. Assim que o potencial de ação chega ao terminal pré-sináptico os canais de cálcio são ativados gerando um fluxo do ião para o interior da célula. Este fluxo promove a fusão das vesículas sinápticas com a membrana celular que resulta na libertação da dopamina (DA) na fenda sináptica onde se pode ligar aos recetores do tipo D1 ou D2 do neurónio pós sináptico, ou aos recetores do tipo D2 do neurónio pré-sináptico (auto-recetores). A ligação da dopamina aos recetores

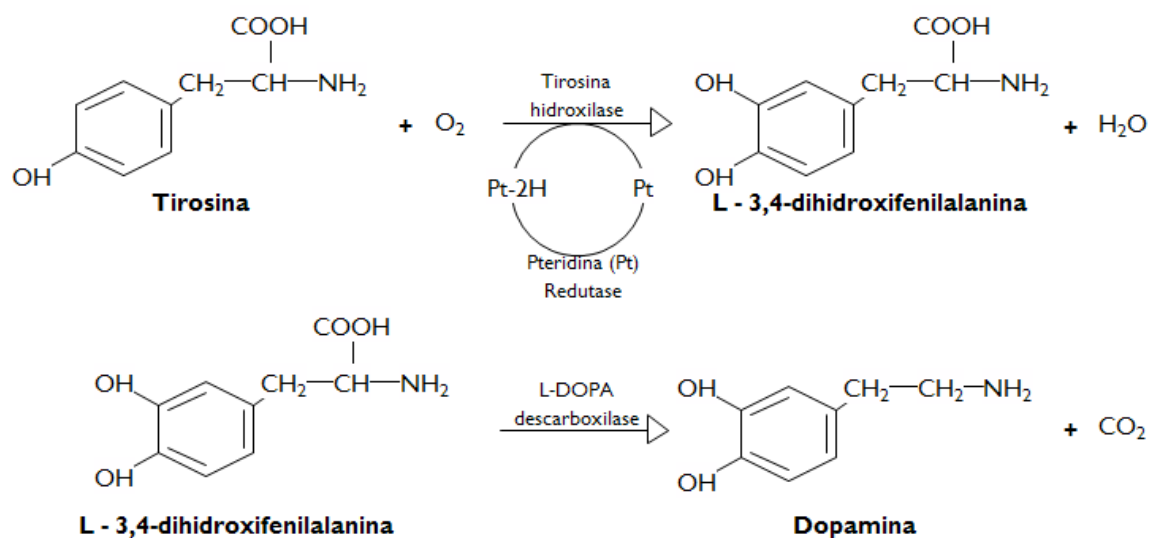
D1 e D2 do terminal pós-sináptico promove e inibe, respetivamente, a atividade de enzima adenilciclase. No neurónio pré-sináptico os auto-recetores têm a função de controlar a libertação de mais dopamina na fenda sináptica e a atividade dos transportadores da dopamina (DAT). Os transportadores de dopamina são em grande parte responsáveis pelo *clearance* da dopamina do espaço extracelular através da sua captação para o interior do neurónio onde pode ser novamente incorporada em vesículas sinápticas ou degradada. A dopamina que não é captada pelos transportadores de dopamina é degradada por enzimas existentes no espaço extracelular.

Apesar dos neurónios dopaminérgicos representarem apenas 0,001% de todos os neurónios, eles regulam uma grande variedade de processos como o desenvolvimento motor, o controlo dos movimentos, a recompensa, a memória, a perceção. Além disto, devido à importância e ao elevado número de funções em que os neurónios dopaminérgicos estão envolvidos, a sua disfunção está associada a diversas patologias das quais se destacam a doença de Parkinson, doença de Huntington, a esquizofrenia, a síndrome de Tourette, a hiperprolactinemia e a adição. O interesse no estudo da dopamina deve-se não só às funções que desempenha no SNC mas maioritariamente à investigação do seu papel nas referidas patologias (Beckstead, M.J. [et al.], 2004, Missale, C. [et al.], 1998, Nikolaus, S. [et al.], 2007, Rice, M.E. and Patel, J.C., 2015).

### **1.1.2.1 Biossíntese, recetores e transportadores**

Como foi referido no ponto anterior, a dopamina é originada a partir da tirosina, aminoácido que é sintetizado a partir da fenilalanina proveniente da dieta (Figura 1.2.). Após a síntese no fígado pela enzima fenilalanina hidroxilase, a tirosina é transportada ao longo da corrente sanguínea para os neurónios dopaminérgicos através de sistemas de transporte de aminoácidos de alta e de baixa afinidade. Nos neurónios é convertida em L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) através da enzima tirosina hidroxilase que constitui o passo limitante da biossíntese da dopamina. Por último, dá-se a descarboxilação da L-DOPA através da enzima L-DOPA descarboxilase formando a dopamina que é posteriormente armazenada em vesículas sinápticas por proteínas transportadoras de monoaminas vesiculares sinápticas (SVMT ou VMAT) em concentrações de aproximadamente 0,1M por vesícula. De seguida dá-se o processo de ancoragem onde ocorre a ligação da membrana das vesículas com um recetor específico na membrana plasmática nos terminais pré-sinápticos, um processo que se julga ser mediado por uma família de proteínas designada por SNAREs

(do inglês *soluble NSF attachment protein receptors*), onde se posicionam para serem libertadas (Bajjalieh, S.M., 1999, Chen, N. and Reith, M.E., 2000, Kelly, R.B., 1993, Sudhof, T.C. and Rizo, J., 2011, Weimer, R.M. and Richmond, J.E., 2005).



**Figura 1.2.** Representação das reações de biossíntese da dopamina a partir do seu precursor, a tirosina, que é convertida em L-3,4-dihidroxifenilalanina por ação da enzima tirosina hidroxilase, e posteriormente descarboxilada pela L-DOPA descarboxilase, sintetizando a dopamina.

Após a libertação na fenda sináptica, a dopamina liga-se aos seus recetores quer no neurónio pós-sináptico quer no neurónio pré-sináptico. Todos os recetores da dopamina pertencem à família dos recetores ligados às proteínas G que no geral são formadas por três subunidades proteicas,  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ . A classificação das proteínas G é baseada na natureza da subunidade  $\alpha$  e nas características que essa unidade lhe confere (Hervé, D. and Girault, J., 2005, Missale, C. [et al.], 1998, Nikolaus, S. [et al.], 2007). Os recetores da dopamina dividem-se em dois grandes grupos: recetores do tipo D1 e D5 que regulam positivamente a atividade da enzima adenilciclase (AC) e que se encontram expressos nos neurónios pós-sinápticos, e os recetores D2, D3 e D4 que estão expressos em ambos os terminais e que têm várias funções como a inibição da AC ou o bloqueamento dos canais de cálcio (Beaulieu, J.M. and Gainetdinov, R.R., 2011, Beaulieu, J.M. [et al.], 2007, Neve, K.A. [et al.], 2004). Por último, a dopamina é removida da fenda sináptica através de um transportador (DAT), uma proteína de 619 aminoácidos que se localiza na membrana plasmática e que transporta a dopamina da fenda sináptica para o interior do neurónio pré-sináptico, regulando desta

---

forma a amplitude e a duração no sinal químico (Bannon, M.J., 2005, Ciliax, B.J. [et al.], 1995, Huotari, M. [et al.], 2002, Sossi, V. [et al.], 2007, Vaughan, R.A. and Foster, J.D., 2013).

### 1.1.2.2 Clearance e metabolismo

A remoção dos neurotransmissores da fenda sináptica constitui uma etapa de extrema importância no sistema nervoso central. Como foi referido no ponto anterior, o DAT exerce uma função chave na captação e consequente reciclagem da dopamina libertada, processo que representa geralmente 80% do *clearance* da fenda sináptica (Halbach, O. and Dermietzel, R., 2002, Vaughan, R.A. and Foster, J.D., 2013, Zahniser, N.R. [et al.], 1999).

No interior da célula, a dopamina pode ser degradada pela enzima monoamina oxidase A (MAO<sub>A</sub>) presente na membrana da mitocôndria formando um aldeído instável. De seguida, pela ação da enzima aldeído desidrogenase, esse aldeído é convertido em DOPAC (3,4 - dihidroxifenilacético) que é o principal produto do metabolismo da dopamina nos roedores. Nos primatas, o processo continua no espaço extracelular, onde se encontra presente a enzima catecol o-metil transferase que metila o DOPAC em ácido homovalínico (Elsworth, J.D. and Roth, R.H., 1997, Harsing Jr, L., 2008, Nestler, E. [et al.], 2009).

Além do mecanismo acima descrito a dopamina pode ser metabolizada por um segundo mecanismo que envolve a sua metilação pela enzima catecol o-metil transferase. Após a conversão da dopamina em 3-metoxitriptamina (3-MT), este último é desaminado pela MAO<sub>B</sub> (isoforma B da enzima monoamina oxidase, que tem um grande grau de semelhança com a MAO<sub>A</sub>, apesar de terem origens em genes distintos e diferentes propriedades bioquímicas como a especificidade, localização celular ou a sua regulação por compostos farmacológicos) formando um aldeído que por sua vez é convertido em ácido homovalínico pela aldeído desidrogenase. Esta via metabólica tem geralmente um papel secundário no *clearance* e no metabolismo da dopamina (que como já foi referido, é maioritariamente feito pelos DAT e consequente degradação pela MAO<sub>A</sub>), porém, tem grande importância no cortex pré-frontal onde há uma expressão reduzida de DAT por parte dos neurónios e que leva a uma diminuição da captação de dopamina da fenda sináptica (Halbach, O. and Dermietzel, R., 2002, Huotari, M. [et al.], 2002, Matsumoto, M. [et al.], 2003, Sesack, S.R. [et al.], 1998, Wayment, H.K. [et al.], 2001).

### 1.1.2.3 Os gânglios da base e via nigrostriatal

Os gânglios da base são um grupo de núcleos presentes no telencéfalo e no mesencéfalo de mamíferos, aves e répteis e que constituem filogeneticamente uma das partes mais antigas do encéfalo, indicando que estes núcleos têm uma função importante no SNC das espécies destas classes (Dudman, J. and Gerfen, C., 2015, Lanciego, J.L. [et al.], 2012, Wilson, C., 2004). Anatomicamente são constituídos pelo núcleo caudado, putâmen, globo pálido, núcleo *accumbens* e ainda pela substância *nigra* e núcleo subtalâmico. O núcleo caudado e o putâmen têm uma constituição semelhante, maioritariamente de neurónios pequenos, e estão funcionalmente relacionados sendo integrantes do estriado (ou neostriado) (Brodal, P., 2010, Gerfen, C. and Bolam, J., 2010).

O estriado é responsável pela receção de informação nos gânglios de base, como por exemplo a informação proveniente do cortex, mas também recebe informações provenientes doutros gânglios da base, por exemplo da *substância nigra pars compacta* (SNc) (Brodal, P., 2010, Wilson, C., 2004). Esta via que projeta informação da substância nigra pars compacta para o estriado é designada por via nigrostriatal e é constituída por neurónios dopaminérgicos. Nas sinapses, a dopamina libertada vai atuar nos neurónios espinhais médios (do inglês *medium spiny neurons*, ou MSNs) inibitórios do estriado de acordo com o tipo de recetores que possuem. Estes últimos estão envolvidos em duas vias de efeitos opostos que atuam sobre o tálamo, as vias direta e indireta, e cuja finalidade é a regulação do movimento (Calabresi, P. [et al.], 2014, Chakravarthy, V.S. [et al.], 2010, Gardoni, F. and Bellone, C., 2015, Matsuda, W. [et al.], 2009).

Como foi previamente referido, um dos motivos pelo qual a dopamina é objeto de intenso estudo deve-se à sua envolvimento em determinadas patologias, como é o caso da doença de Parkinson na qual há a degradação dos neurónios da via nigrostriatal que utilizam precisamente este neurotransmissor (Olanow, C. [et al.], 2011, Perl, D., 2011, Purves, D. [et al.], 2001).

## 1.2 Métodos Eletroquímicos

Para detetar e quantificar neurotransmissores ou outras moléculas eletroativas de interesse, os investigadores têm utilizado diversas técnicas eletroquímicas como a amperometria, a voltametria cíclica e algumas técnicas de impulso. Durante uma medição eletroquímica, a corrente medida deriva da oxidação e da redução dos compostos na superfície ativa do eléctrodo de trabalho. Na oxidação de uma molécula, os eletrões passam

da molécula para o eléctrodo e daí para um amperímetro, que mede a intensidade da corrente enquanto na redução o processo é invertido. Algumas das técnicas apresentadas nesta secção estão também descritas na secção de materiais e métodos (Borland, L.M. and Michael, A.C., 2007, Bucher, E.S. and Wightman, R.M., 2015).

### ***Amperometria***

A amperometria baseia-se na aplicação de um potencial constante ao eléctrodo de trabalho que tem de ser suficientemente elevado para oxidar ou reduzir a substância de interesse, que induz a transferência de electrões gerando assim uma corrente eléctrica. A corrente eléctrica gerada, ou corrente faradaica, é directamente proporcional à concentração das espécies eletroativas oxidadas ou reduzidas em solução. Tem como vantagens ser uma técnica sensível e permitir a rápida aquisição de informação, no entanto, qualquer molécula em solução que oxide no potencial aplicado pode ser detetada pelo que esta técnica só deve ser aplicada em amostras cujo conteúdo é conhecido qualitativamente. A amperometria é bastante utilizada para medir variações de concentrações de substâncias como por exemplo a libertação de neurotransmissores numa determinada região do cérebro, no entanto, não permite o cálculo de concentrações basais das mesmas (Bucher, E.S. and Wightman, R.M., 2015, Felix, F.S. and Angnes, L., 2010, Robinson, D.L. [et al.], 2008).

### ***Cronoamperometria***

Na cronoamperometria o potencial aplicado varia de forma de onda quadrada desde um potencial inicial, onde não se dá qualquer reacção eletroquímica, a um potencial com capacidade suficiente para promover a oxidação ou redução do composto de interesse. Com o aumento da corrente os compostos são oxidados e posteriormente reduzidos quando o potencial volta ao valor inicial. A corrente observada é então proporcional ao potencial aplicado e decai com o inverso da raiz quadrada do tempo. Normalmente a corrente medida é amostrada após o impulso de potencial, medições que são depois usadas no cálculo da concentração do analito. Do rácio das correntes medidas nos dois potenciais obtêm-se informações sobre a identidade das espécies químicas. A vantagem de utilização desta técnica diz respeito ao aumento do rácio entre o sinal e o ruído que é conseguido através da elevada frequência dos registos (Borland, L.M. and Michael, A.C., 2007, Daws, L.C. and Toney, G.M., 2007, Perez, X.A. and Andrews, A.M., 2005).

### ***Voltametria cíclica de varrimento rápido***

A voltametria cíclica de varrimento rápido (FSCV) é uma técnica eletroquímica que pode ser utilizada para acompanhar as dinâmicas de libertação de vários neurotransmissores (John, C.E. and Jones, S.R., 2007).

Nesta técnica é aplicado no eléctrodo de trabalho um potencial em forma de onda triangular a uma velocidade de varrimento superior a 100V/s. Uma das vantagens é o facto de fornecer uma resolução temporal bastante boa. Os limites dos potenciais aplicados são escolhidos para que os potenciais de redução e de oxidação do analito de interesse estejam contidos no seu intervalo. Assim, quando o potencial aplicado atinge o potencial de oxidação do analito ocorre a sua oxidação que gera uma corrente que é proporcional à sua concentração. Inversamente, quando o potencial toma valores inferiores ao do potencial de redução da substância em questão dá-se a sua redução. Uma das vantagens desta técnica é que os voltamogramas de cada substância são geralmente únicos, o que permite uma identificação qualitativa das substâncias analisadas. Porém, gera uma elevada corrente de base e não permite a deteção de concentrações basais. Conjuntamente com a amperometria, a voltametria cíclica de varrimento rápido é uma das técnicas eletroquímicas mais utilizadas cuja principal finalidade é a medição de alterações da concentração de neurotransmissores (Borland, L.M. and Michael, A.C., 2007, Bucher, E.S. and Wightman, R.M., 2015, Ferreira, N., 2006, John, C.E. and Jones, S.R., 2007, Nguyen, M.D. and Venton, B.J., 2015).



---

## 2 Materiais e Métodos

---

## 2.1 Reagentes e Soluções

### 2.1.1 Reagentes

Neste trabalho foram utilizados os seguintes reagentes:

- Cloreto de sódio (NaCl) (Panreac);
- Cloreto de potássio (KCl) (Panreac);
- Cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) (Panreac);
- Dihidrogenofosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) (Sigma);
- Hidrogenofosfato de sódio dibásico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Fluka);
- Ácido sulfúrico >95% (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Fischer Chemical);
- Acetato de sódio trihidratado (CH<sub>3</sub>COONa.3H<sub>2</sub>O) (Chem-Lab);
- Ácido acético glacial 99,7% (CH<sub>3</sub>COOH) (Panreac);
- Carbonato de sódio anídrico (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (Fluka);
- Hidrogenocarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (Fluka);
- Ácido perclórico 70% (HClO<sub>4</sub>) (Merck);
- Dopamina (C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>2</sub>) (Fluka);
- DOPAC (C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub>) (Aldrich);
- Ácido Ascórbico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>) (Fluka);
- Nafion<sup>®</sup> 5% numa mistura de álcoois alifáticos e água (Aldrich).

### 2.1.2 Soluções

As soluções foram preparadas com água ultra pura, obtida através do sistema Milli-Q (Millipore, EUA), com uma resistividade  $\geq 18,0\text{M}\Omega\text{cm}$ .

#### **Eletrólito de suporte**

O eletrólito de suporte utilizado em grande parte dos ensaios descritos neste trabalho foi o tampão fosfato salino (PBS) de pH 7,4. A composição utilizada foi:

- a) 100mM de cloreto de sódio;
- b) 10mM de dihidrogenofosfato de sódio monobásico e;

c) 40mM de hidrogenofosfato de sódio dibásico.

O tampão foi armazenado num frasco âmbar à temperatura de 4°C sendo posteriormente utilizado à temperatura ambiente (22°C).

#### **Soluções tampão para o estudo do efeito do pH**

Para verificar o efeito do pH no potencial de pico da dopamina foram utilizadas 4 soluções: ácido sulfúrico, tampão acetato, PBS e tampão carbonato.

a) A solução de ácido sulfúrico foi preparada através da diluição em água Milli-Q de uma solução comercial de ácido sulfúrico >95% de forma a atingir uma concentração final de 0,1M;

b) A solução de tampão acetato foi obtida através da dissolução de acetato de sódio trihidratado em água Milli-Q para uma concentração final de 50mM à qual se seguiu a diluição de uma solução de ácido acético glacial 99,7% para uma concentração final de 50mM;

c) O tampão fosfato salino utilizado foi preparado tal como se encontra descrito para o eletrólito de suporte;

d) O tampão carbonato foi obtido através da dissolução de carbonato de sódio anídrico e de hidrogenocarbonato de sódio para as concentrações finais de 19,5 e 25mM, respetivamente.

O pH das diferentes soluções foi medido com um medidor de pH da Metrohm (Suíça) e devidamente registado.

#### **Soluções utilizadas nas calibrações**

Na realização das calibrações dos microelétrodos foram utilizadas três soluções padrão: de dopamina, DOPAC (ácido 3,4-di-hidroxifenilacético) e ascorbato. Na preparação das duas primeiras, foi utilizado ácido perclórico 0,1M preparado a partir da diluição de uma solução comercial de ácido perclórico 70%.

a) Na preparação da solução *stock* de dopamina, o reagente foi dissolvido na solução de ácido perclórico supra referida de forma a obter uma concentração final de 20mM. A solução resultante foi dividida em alíquotas que foram armazenadas a -21°C até à sua utilização à temperatura ambiente;

b) A solução *stock* de DOPAC 20mM foi preparada através da sua dissolução em ácido perclórico 0,1M, que foi também dividida em alíquotas, armazenadas a -21°C e utilizadas à temperatura ambiente;

c) Por último, a solução de ascorbato foi obtida através da dissolução de ácido ascórbico em água Milli-Q para uma concentração final de 20mM. Devido à sua instabilidade, a solução foi preparada no dia da sua utilização.

Com base nestas três soluções, foram preparadas soluções de dopamina 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 e 100µM, soluções de DOPAC 100µM e de ascorbato 250µM, através da diluição das respetivas soluções *stock* em tampão fosfato salino.

### ***Soluções para modificação da superfície dos eléctrodos***

Para a modificação da superfície ativa dos eléctrodos foram utilizadas duas soluções:

- Nafion<sup>®</sup> 5% numa mistura de álcoois alifáticos e água;
- Filme compósito de nanotubos de carbono de parede simples produzido através da suspensão de nanotubos de carbono de parede simples (SWCNTs) (NanoLab, E.U.A.) na solução de Nafion<sup>®</sup> comercial para uma concentração final de 10mg/mL de SWCNTs. A suspensão propriamente dita foi conseguida através da aplicação de ultra-sons durante 30 minutos.

### ***Soluções para estímulo da libertação endógena de dopamina in vivo no estriado de ratos anestesiados***

Para promover a libertação de dopamina endógena no SNC de roedores anestesiados, foi utilizada uma solução despolarizante com a seguinte composição:

- a) 120mM cloreto de potássio;
- b) 29mM de cloreto de sódio e;
- c) 2,5mM de cloreto de cálcio.

Esta solução foi filtrada utilizando um filtro de seringa com membrana de acetato de celulose de porosidade 0,2µm (VWR, E.U.A.).

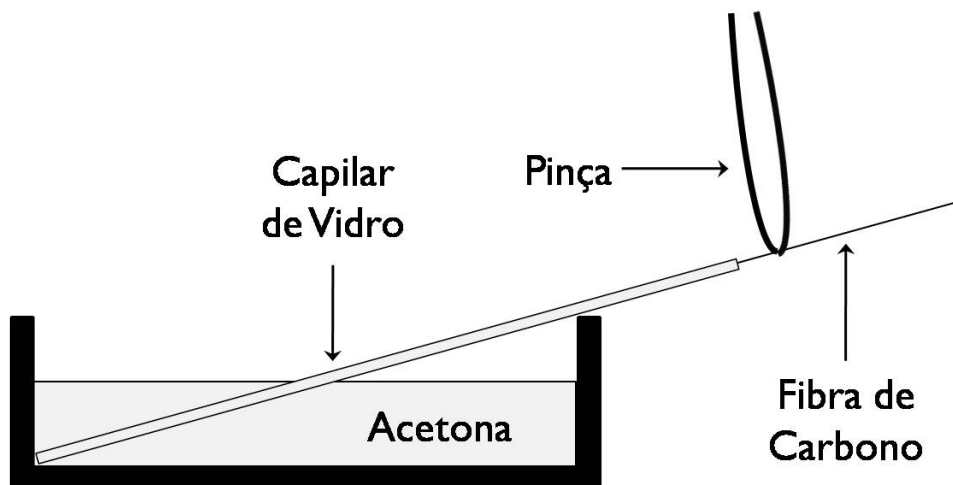
## **2.2 Microeléctrodos de fibra de carbono**

### **2.2.1 Fabricação**

Dada a sua utilidade, baixo custo e facilidade de produção, a construção destes microeléctrodos tem vindo a ser abordada por uma grande diversidade de autores estando já

devidamente descrita na literatura (Ferreira, N., 2006, Ledo, A. [et al.], 2005, Ledo, A. [et al.], 2004).

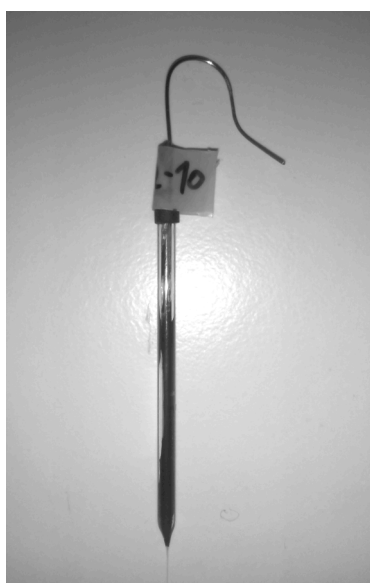
O processo de fabricação dos elétrodos inicia-se com a inserção de uma fibra de carbono num capilar de vidro de borossilicato (1,6mm i.d. x 2mm o.d.) (Harvard Apparatus, R.U.) após a qual se corta o excesso de fibra resultante. As fibras de carbono utilizadas no trabalho foram a *Good Fellow fibre* (GoodFellow, R.U.) e a *Specialty fibre* (Specialty Materials, E.U.A.) de diâmetros 7 $\mu$ m e 30 $\mu$ m, respetivamente. Para os elétrodos de fibra de carbono de 7 $\mu$ m (CFM7), antes da inserção da fibra, os capilares de vidro foram postos num recipiente contendo acetona, na qual uma das pontas fica imersa e a outra emersa com vista à entrada do solvente através de fenómenos de capilaridade. A acetona tem como principal função a minimização da atração eletrostática entre os capilares e a fibra, o que possibilita a inserção da mesma, no entanto serve também para a limpar a fibra de algumas resinas que eventualmente possa conter. Para os microelétrodos de fibra de carbono de 30 $\mu$ m de diâmetro (CFM30) a inserção da fibra de carbono é feita com os capilares vazios.



**Figura 2.1.** Representação esquemática da inserção da fibra de carbono de 7 $\mu$ m de diâmetro no capilar de vidro cheio de acetona.

Após a inserção das fibras nos diversos capilares realizou-se o estiramento num *puller* vertical (Harvard Apparatus, R.U.). Os parâmetros a utilizar variam de acordo com vários fatores e após cada estiramento a temperatura e a força de *pulling* aplicada para separar os capilares foram ajustadas de forma a obter microelétrodos de fibra de carbono com as melhores características possíveis, nomeadamente a selagem obtida e a distância que compreende a superfície ativa do elétrodo e o *chunk*. De cada capilar resultaram duas partes, uma que continha a fibra e outra que foi descartada.

Após o estiramento é necessário proceder ao corte da fibra para obter uma superfície ativa adequada à sua aplicação. Com recurso a um microscópio ótico (Olympus, E.U.A.) e a uma pinça de pontas finas cortou-se a fibra de carbono com o comprimento pretendido. No caso dos CFM30 o comprimento da ponta (parte da fibra de carbono que não está coberta com o vidro) deve situar-se entre os 150 e os 250 $\mu\text{m}$  e para os CFM7 deve ser igual ou inferior a 100 $\mu\text{m}$ . Seguidamente, colocou-se no interior do capilar cola de grafite (TAAB Instruments, R.U.) e um fio de cobre previamente cortado e raspado nas pontas de forma a fazer o contacto elétrico entre a fibra de carbono e o fio de cobre. Para isolar o que está dentro do capilar e aumentar a resistência do microelétrodo, o fio de cobre foi fixado à extremidade correspondente do capilar com cola de cianoacrilato.



**Figura 2.2.** Fotografia de um microelétrodo de fibra de carbono de 7 $\mu\text{m}$  de diâmetro fabricado no âmbito deste trabalho.

Para verificar a qualidade dos microelétrodos de fibra de carbono recorreu-se a um potencióstato (Esman Instrumentation, E.U.A.) e à técnica de *Fast-Scan Cyclic Voltammetry* (FSCV). A variação de potencial utilizada foi de -0,4 a 1,6V correspondente a uma baixa anodização. A análise foi feita de elétrodo em elétrodo, para tal conectou-se o microelétrodo a analisar a um potencióstato e inseriu-se a ponta do elétrodo de fibra de carbono em PBS 0,05M (assim como o elétrodo de referência). De acordo com os perfis gerados num osciloscópio (Tektronix, E.U.A.) procedeu-se à seleção dos elétrodos que responderam favoravelmente ou não ao estímulo gerado pelo potencióstato. Durante a FSCV, os elétrodos que responderam favoravelmente permaneceram em análise durante aproximadamente 20 segundos para melhorar as características da superfície ativa dos mesmos (pré-tratamento) (Santos, R.M. [et al.], 2008). Além da avaliação qualitativa, através

da análise dos perfis gerados é possível saber quais os elétrodos com uma resposta melhor ao estímulo do potenciostato e conseqüentemente prever o comportamento destes aquando da sua utilização. Posteriormente, na junção do fio de cobre com o capilar de vidro foi colocada manga retrátil com o objetivo de conferir uma maior resistência ao conjunto. Por último, identificaram-se os elétrodos de acordo com o lote e o número de série e registou-se o tamanho das pontas das suas superfícies ativas.

### **2.2.2 Modificação da superfície dos microelétrodos**

Como já foi referido, existe uma grande variedade de substâncias eletroativas no espaço extracelular pelo que a aplicação de uma determinada diferença de potencial no eletrodo de trabalho não garante *per se* que a medição lida corresponda na íntegra ao composto de interesse. Assim, para garantir que o sinal que se obtém é proveniente apenas da corrente de oxidação/redução da substância de interesse, torna-se quase que indispensável a aplicação de polímeros e/ou nanomateriais na superfície ativa do eletrodo que confirmem seletividade para uma variedade de substâncias, quer pela impermeabilidade a substâncias indesejadas quer pela modificação dos potenciais de oxidação/redução onde só a substância pretendida se oxide/reduza.

#### **2.2.2.1 Nafion®**

Para revestir a superfície ativa dos elétrodos de fibra de carbono com o polímero Nafion®, estes foram primeiramente secados na estufa a 170°C durante 4 minutos. Após esse período imergiu-se a superfície ativa dos elétrodos na solução comercial de Nafion® 5% durante 5 segundos seguida de uma nova secagem em estufa a 170°C durante 4 minutos, obtendo-se desta forma a primeira camada de Nafion®. O número de camadas pode ser aumentado consoante o número de ciclos de imersão/secagem realizados. Neste trabalho foram utilizados elétrodos de fibra de carbono de 7 e de 30µm de diâmetro com 2 e 4 camadas de Nafion®.

#### **2.2.2.2 Filme compósito de nanotubos de carbono em Nafion®**

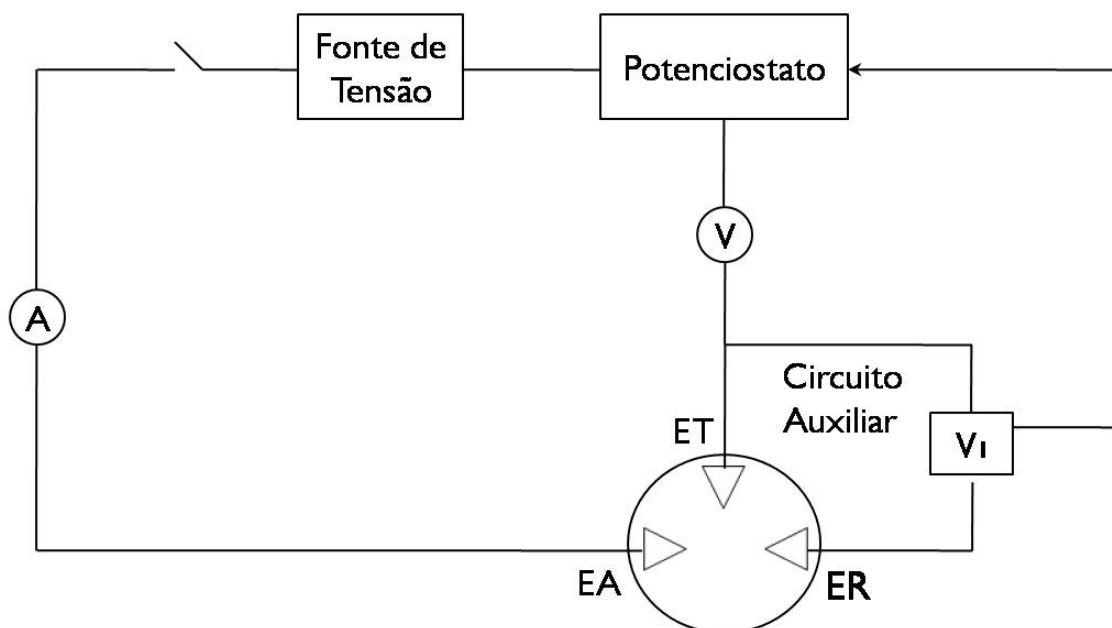
O revestimento com SWCNTs foi feito através da imersão das superfícies ativas dos elétrodos em gotas do filme compósito. Com o auxílio de um micromanipulador (Stoelting, E.U.A.) e uma lupa (Meiji Techno, Japão) foi-se imergindo de forma rápida e sucessiva a

ponta do microelétrodo na gota da suspensão até que esta evaporasse. Os elétrodos foram posteriormente incubados a 170°C durante 4 minutos.

### 2.3 Métodos eletroquímicos

Como base deste trabalho, foram utilizadas algumas técnicas amperométricas e voltamétricas já descritas na literatura. Estas são baseadas na quantificação da relação proveniente dos fenômenos químicos de transferência de elétrons e das propriedades elétricas que daí advêm.

Nas técnicas voltamétricas a intensidade da corrente produzida pela oxidação ou pela redução de substâncias eletroativas é medida em função da diferença de potencial aplicada no elétrodo de trabalho. Tal como noutras técnicas, a reação redox ocorre na superfície ativa do elétrodo, onde se dá a transferência de elétrons entre a substância e o próprio elétrodo. A transferência de elétrons gera um aumento da intensidade da corrente que pode ser então medida. A forma de aplicação do potencial no elétrodo de trabalho é o principal fator de distinção entre as diferentes técnicas voltamétricas assim como a amostragem da corrente (Brett, C. and Brett, A., 1993).

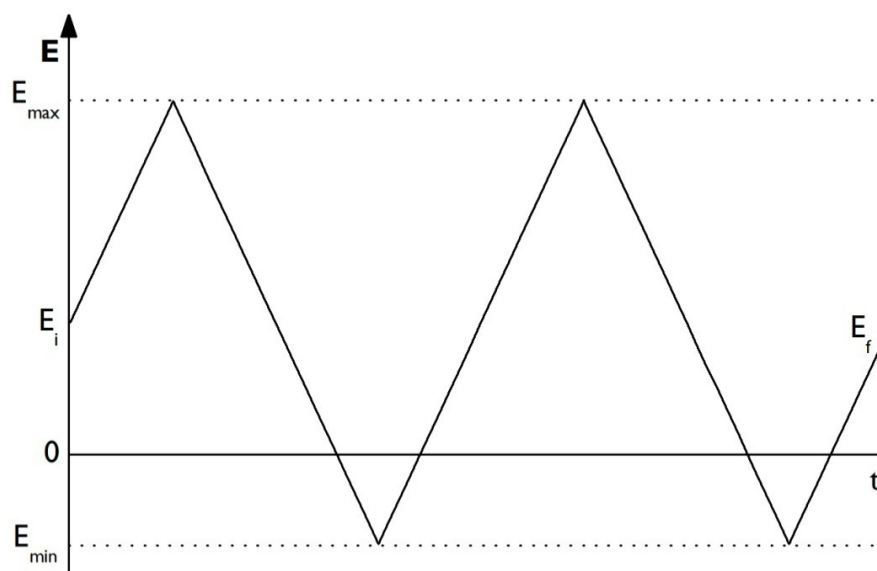


**Figura 2.3.** Circuito utilizado em voltametria composto por 3 elétrodos - o de trabalho (ET), de referência (ER) e o auxiliar (EA) - por um amperímetro (A), um voltímetro (V), um voltímetro de alta impedância de entrada (VI), um potenciostato e uma fonte de tensão.



### 2.3.1 Voltametria cíclica

A técnica de voltametria cíclica (CV) é caracterizada pela variação do potencial que é aplicado no eletrodo de trabalho ao longo do tempo sendo que o varrimento é feito de forma cíclica ou triangular nos dois sentidos, de oxidação e de redução. Nesta técnica dá-se a oxidação e/ou redução de diferentes espécies eletroativas em solução o que permite o estudo comportamental dos pares redox. Assim, pares redox reversíveis apresentam 2 picos no seu voltamograma enquanto que sistemas redox irreversíveis apresentam apenas 1. O processo de carga do eletrodo que ocorre durante o varrimento contribui para o aumento da corrente capacitiva e é diretamente proporcional à velocidade de varrimento utilizada. Trata-se de uma técnica pouco sensível e como tal não é geralmente utilizada em termos quantitativos, no entanto permite fazer estudos qualitativos de um sistema eletroquímico relativamente às substâncias eletroativas presentes (Brett, C. and Brett, A., 1993).



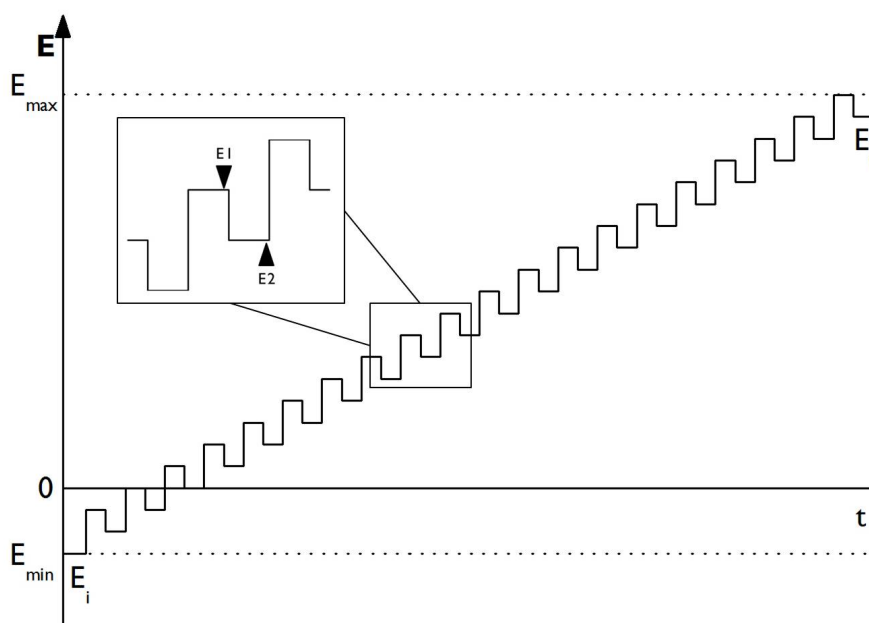
**Figura 2.4.** Forma de aplicação do potencial em voltametria cíclica. A voltametria inicia-se com um potencial ( $E_i$ ) que vai variando ao longo do tempo ( $t$ ) entre um potencial máximo ( $E_{max}$ ) e um mínimo ( $E_{min}$ ) até um potencial final ( $E_f$ ).

No presente trabalho a voltametria cíclica foi utilizada nos sentidos anódico e catódico com diferentes velocidades de varrimento (entre 5 e 1000mV/s) e intervalos de potencial (compreendidos entre -0,6 a +1V). Para realizar as medições foi utilizado um potencióstato/galvanóstato CompactStat.e (Ivium Technologies, EUA) e respetivo software de leitura.

### 2.3.2 Voltametria de onda quadrada

Pertencente ao grupo das técnicas de voltametria de impulso, a voltametria de onda quadrada tem como tal a vantagem de minimizar a corrente capacitiva sendo mais sensível às correntes faradaicas provenientes das reações redox que ocorrem.

A forma como o potencial é aplicado nesta técnica está ilustrada na Figura 2.5.. Trata-se de uma sobreposição de ondas quadradas, em forma de escada e onde a direção do impulso é a mesma que a direção do varrimento. A corrente é medida duas vezes em cada onda quadrada e o sinal resultante provém da diferença da intensidade da corrente medida no final do impulso positivo e do impulso negativo. Como as correntes são medidas no final dos impulsos ( $E_1$  e  $E_2$  da Figura 2.5.) e as variações do potencial destes são constantes ao longo do tempo, as curvas geradas nesta técnica apresentam um perfil bem definido e são geralmente simétricas. Enquanto a voltametria cíclica gera curvas de forma sigmóide, a voltametria de onda quadrada forma picos (Brett, C. and Brett, A., 1993).



**Figura 2.5.** Forma de aplicação do potencial em voltametria de onda quadrada. A voltametria inicia-se a um potencial mínimo ( $E_i$  e  $E_m$ ) que através da sobreposição de ondas quadradas atinge apenas por uma vez um potencial máximo ( $E_{max}$ ). A corrente é medida em cada impulso através da diferença da intensidade no potencial de impulso direto ( $E_1$ ) e no potencial reverso ( $E_2$ ).

As principais vantagens desta técnica são:

- a minimização da corrente capacitiva, como já havia sido referido;
- a possibilidade de se fazer varrimentos rápidos de potencial;
- possibilidade de obtenção de informação semelhante à obtida por voltametria cíclica mas com maior sensibilidade.

O instrumento utilizado para realizar os voltamogramas de onda quadrada foi o potencióstato/galvanóstato CompactStat.e (Ivium Technologies, E.U.A.). Os registos foram obtidos entre um potencial de -0,2 e +0,6V, a uma amplitude de impulso de 25mV, 10 Hz de frequência e com um aumento de 2mV a cada ciclo no potencial de escada.

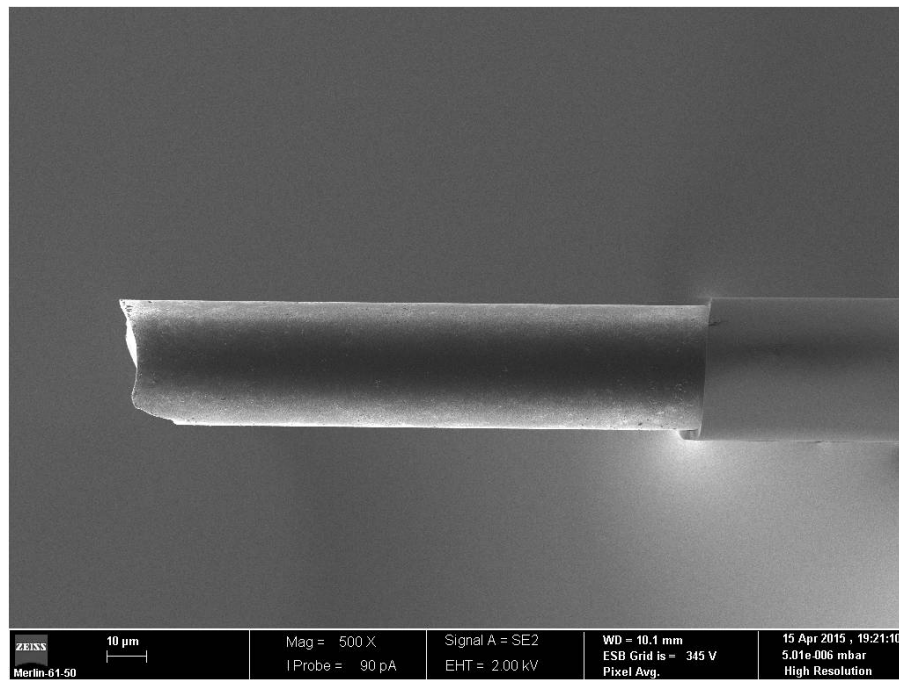
### **2.3.3 Amperometria**

A técnica de amperometria baseia-se na aplicação de um potencial constante no eléctrodo de trabalho ao longo do tempo com o objetivo de oxidar ou reduzir as substâncias eletroativas de interesse. O potencial aplicado no eléctrodo varia com o analito que se pretende medir e é geralmente 100 a 200mV superior ao potencial redox deste. Tem como principais vantagens ser uma técnica sensível e de alta resolução temporal. Em contrapartida, é pouco seletiva uma vez que são oxidadas todas as espécies que tenham um potencial de oxidação igual ou inferior ao potencial aplicado. Nos ensaios realizados com esta técnica foi aplicado ao eléctrodo de trabalho um potencial de +0,55V vs. Ag/AgCl.

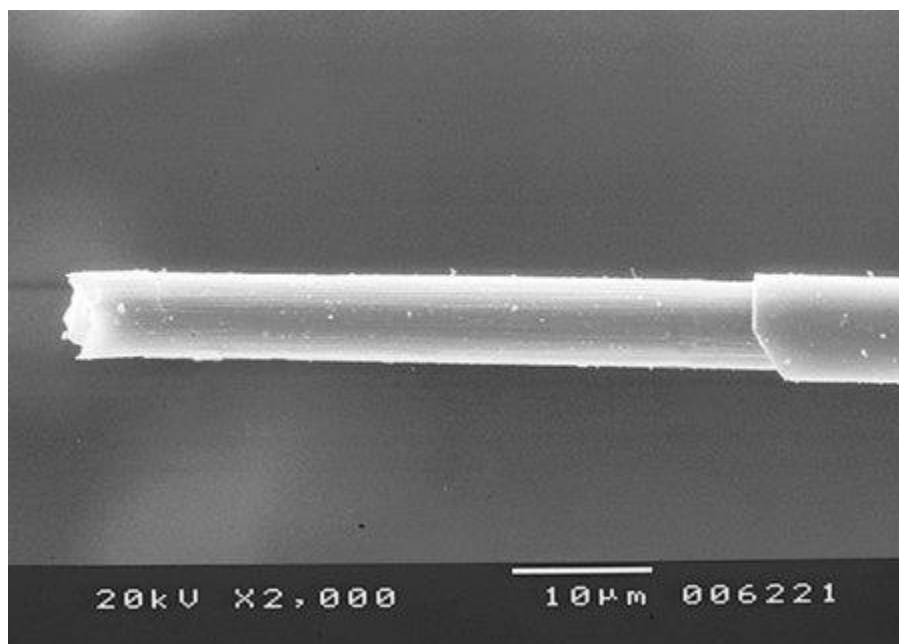
## **2.4 Microscopia eletrónica de varrimento**

Neste trabalho a microscopia eletrónica de varrimento foi realizada utilizando um feixe de eletrões gerado através de um cátodo de tungsténio incandescente.

Nas microfotografias (Figuras 2.6. e 2.7.) pode observar-se em pormenor a superfície rugosa da fibra de carbono e a zona de selagem que se consegue no *pulling*. Na fotografia de maior ampliação (Figura 2.7.) relativa aos CFM7 pode visualizar-se a presença de estrias ao longo da fibra.



**Figura 2.6.** Microfotografia da superfície ativa de um microeletrodo de fibra de carbono de 30µm de diâmetro obtido por microscopia de varrimento eletrônico.

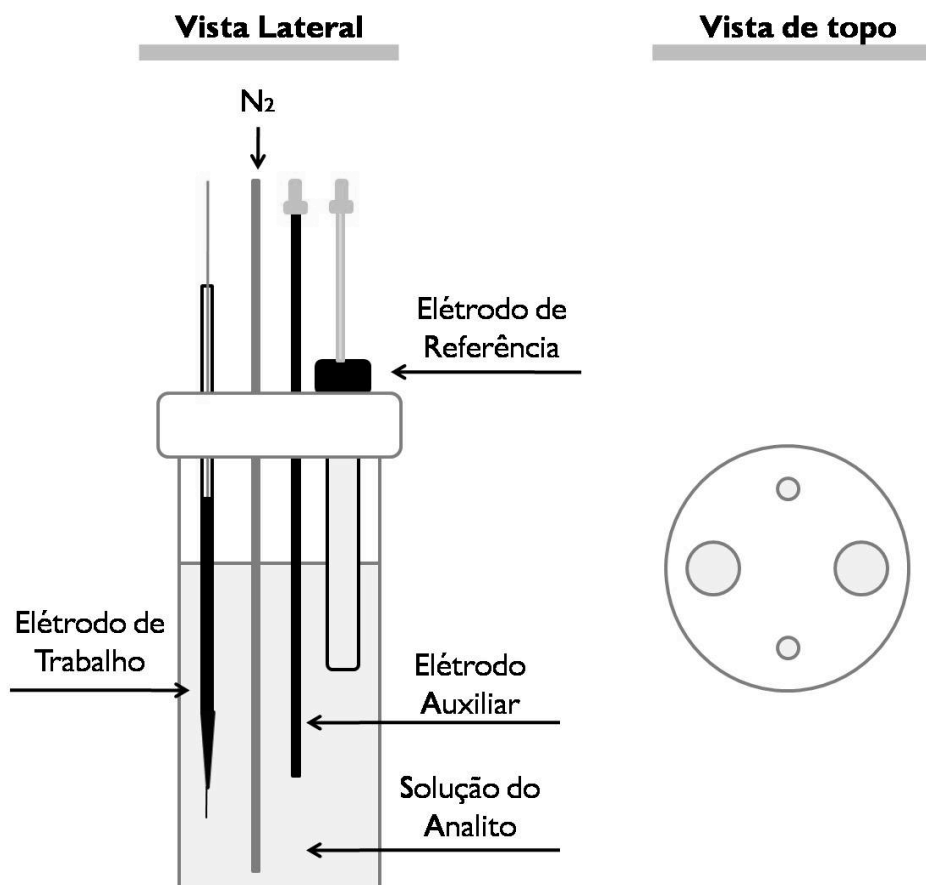


**Figura 2.7.** Microfotografia da superfície ativa de um microeletrodo de fibra de carbono de 7µm de diâmetro obtido por microscopia de varrimento eletrônico.

## 2.5 Célula eletroquímica

Na avaliação do comportamento eletroquímico e das propriedades analíticas dos microelétrodos foram utilizados um vaso e uma célula de fluxo.

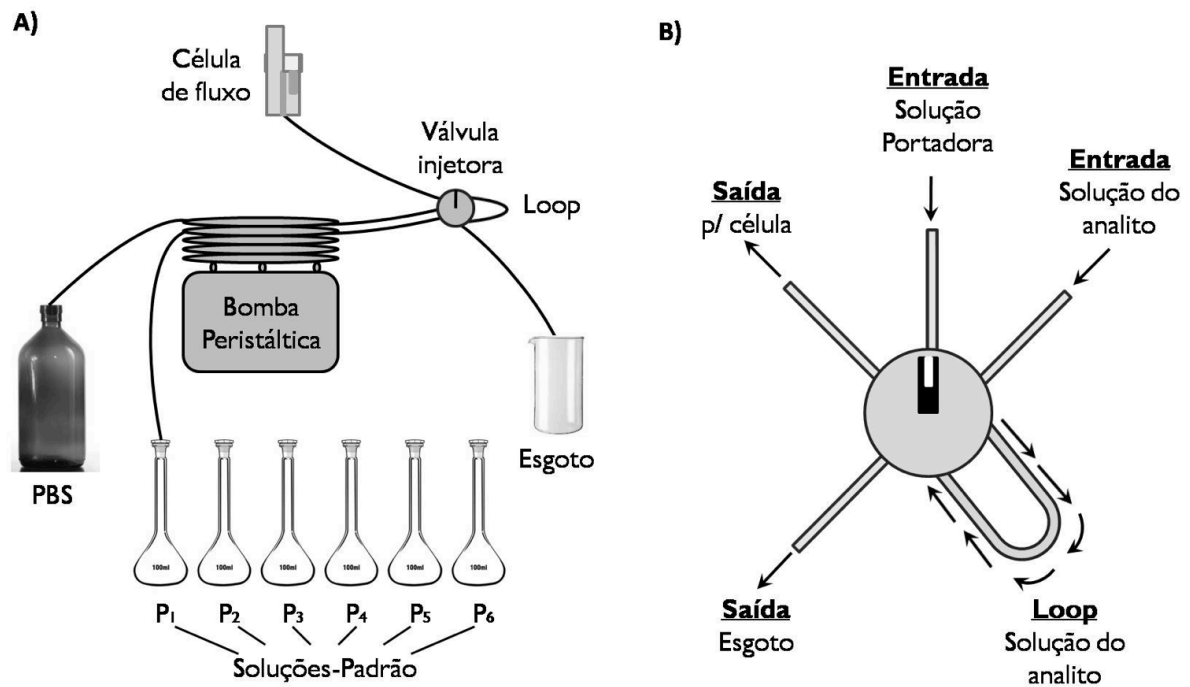
Neste trabalho a célula eletroquímica em vaso (Figura 2.8.) foi utilizada nas três técnicas de análise: voltametria cíclica; voltametria de onda quadrada; e amperometria.



**Figura 2.8.** Representação da célula eletroquímica em vaso vista de lado e de topo. Consiste apenas num recipiente do vidro e numa tampa de teflon através da qual são inseridos os eletrodos e o tubo de gás inerte (azoto).

## 2.6 Sistema de análise por injeção em fluxo

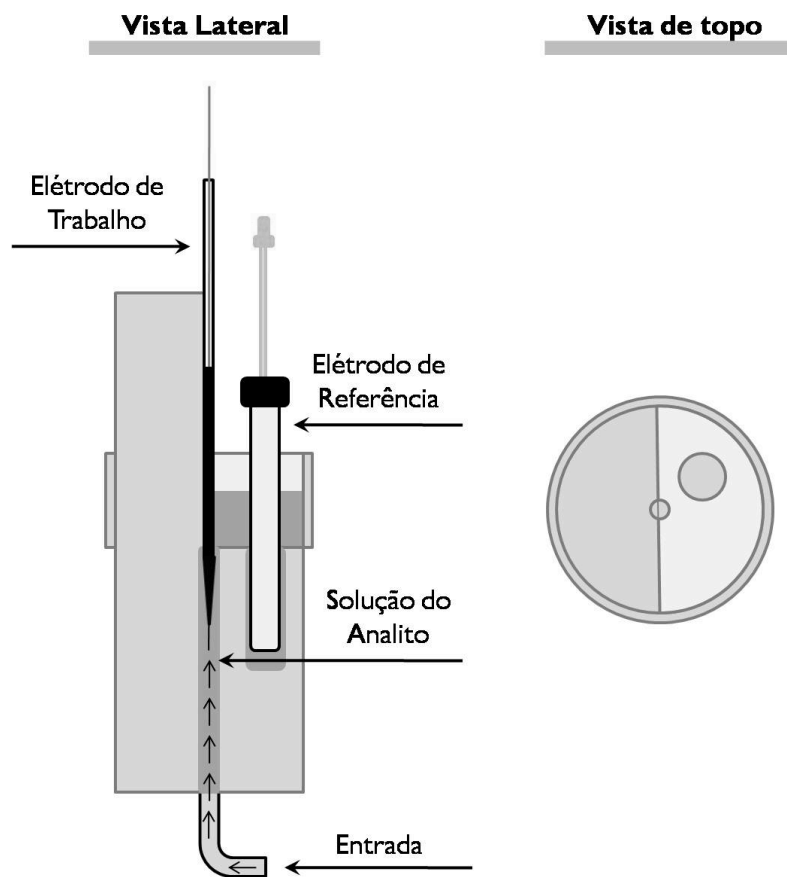
Este tipo de sistema de injeção (Figura 2.9. A)) baseia-se na utilização de uma célula de fluxo de acrílico (Figura 2.10.), uma bomba peristáltica que bombeia a solução portadora à velocidade de fluxo desejada, e por uma válvula injetora, que possibilita a regulação manual das soluções que entram na célula assim como a sua quantidade (através do volume do "loop" (Figura 2.9. B)).



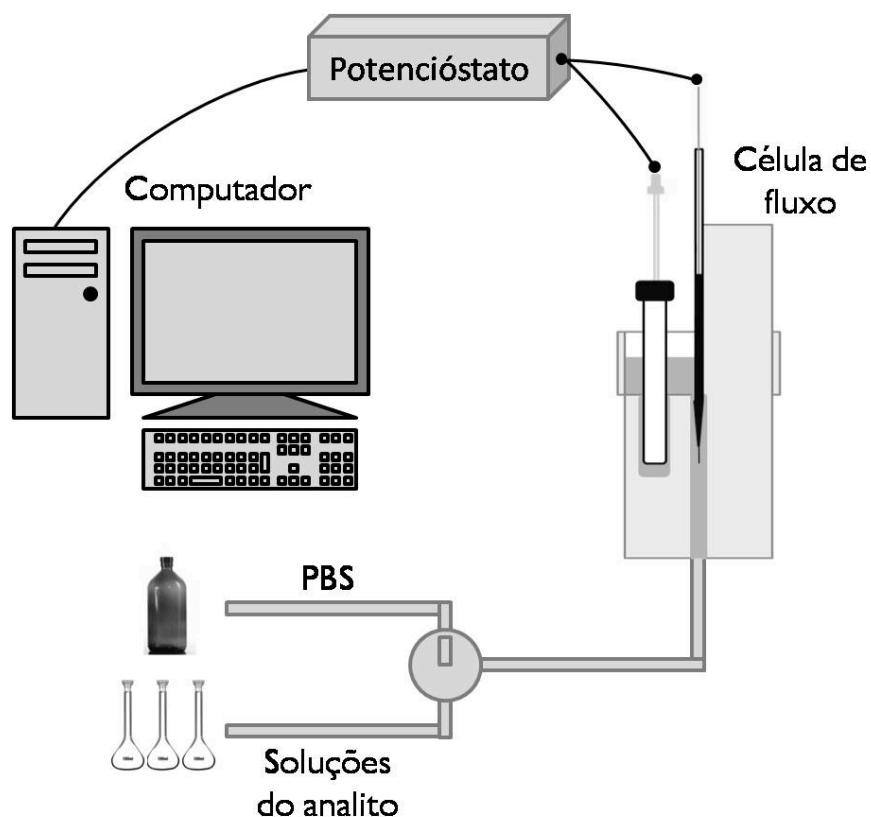
**Figura 2.9. A)** Representação de um sistema de análise por injeção de fluxo (FIA) onde há a injeção de soluções (PBS e de soluções-padrão (soluções P)) na célula de análise através de uma bomba peristáltica. **B)** Representação de uma válvula de injeção através de qual se determina a solução a injetar na célula de análise.

Tem como principal vantagens a reprodutibilidade dos ensaios e a possibilidade de utilização de várias soluções de análise (Soluções P).

Neste trabalho, o sistema de injeção por fluxo foi utilizado para realizar estudos com a técnica de amperometria, na qual foi utilizado um potencióstato/galvanóstato CompactStat.e (Ivium Technologies, E.U.A.), e a uma velocidade de fluxo 2mL/min. O eletrodo de trabalho foi inserido no poço central da célula de fluxo e o eletrodo de referência no poço adjacente tal como ilustra a Figura 2.10.. Na Figura 2.11. está representado o sistema de análise por injeção de fluxo completo (FIA).



**Figura 2.10.** Representação de uma célula eletroquímica no sistema de análise por injeção de fluxo vista de lado e de topo. É uma célula de acrílico cilíndrica com dois orifícios, um central e outro lateral onde se inserem os eletrodos de trabalho e de referência, respectivamente. A solução portadora entra pela base da célula de fluxo e sai pela parte de cima.



**Figura 2.11.** Representação do sistema de análise por injeção de fluxo completo onde as soluções do analito são injetadas na célula de fluxo por ação de uma bomba peristáltica e de uma válvula de injeção. Mediante as propriedades das soluções e o potencial aplicado no eletrodo de trabalho gera-se ou não um fluxo de elétrons que produz uma corrente que é medida por um potenciômetro. O sinal elétrico é convertido num sinal digital que é visualizado num computador com *software* adequado.

## 2.7 Parâmetros Analíticos

### **Sensibilidade**

Após estabilização da corrente de base seguiu-se a adição ou injeção das soluções a analisar, em primeiro de uma solução de ascorbato (AA) 250  $\mu\text{M}$ , depois de uma solução de DOPAC 100  $\mu\text{M}$ , e de quatro soluções de dopamina 1, 2, 5 e 10  $\mu\text{M}$ . No sistema FIA cada solução foi injetada em triplicado tomando o valor médio da intensidade da corrente dos três picos obtidos.



### **Limite de detecção**

O limite de detecção de cada microelétrodo foi calculado a partir das calibrações em modo amperométrico e num sistema de injeção de fluxo (tal como o anterior) para valores de concentração de dopamina entre 1 e 10  $\mu\text{M}$  através da fórmula:

$$\text{LOD} = 3 \frac{S_{y/x}}{m}, \text{ em que:}$$

$S_{y/x}$  é o desvio padrão da linha de base;

$m$  é o declive.

### **Seletividade**

A seletividade dos microelétrodos foi determinada através da intensidade de corrente gerada pelas adições de dopamina e dos seus interferentes. Com base na medição da corrente produzida em amperometria foi calculada a sensibilidade dos elétrodos para os três compostos em análise. A seletividade é expressa em forma de razão molar (DA:interferente) e é dada pela razão da sensibilidade dos elétrodos para a dopamina pela sensibilidade dos mesmos para cada interferente.

### **Tempo de resposta**

O tempo de resposta ( $t_{50\%}$ ) é definido como o tempo decorrido para a obtenção de 50% do sinal produzido após a injeção do analito. Desta forma, para cada injeção de dopamina foi calculada uma curva de forma sigmóide em que o tempo de resposta era dado pelo momento em que a 2ª derivada da curva era igual a zero.

## **2.8 Medição da libertação de dopamina endógena no estriado de um roedor anestesiado**

No sentido de se demonstrar a aplicabilidade dos CFM30 revestidos com 4 camadas de Nafion<sup>®</sup> na monitorização de dopamina no SNC, foi realizado um ensaio *in vivo* num rato *wistar* (macho, 8 semanas de idade) anestesiado. Este ensaio foi realizado medindo a corrente amperométrica ao potencial de +0,55V vs. Ag/AgCl, utilizando o sistema eletroquímico FAST16mkII (Quanteon, USA).

O rato foi anestesiado com uretano (1,25mg/kg, i.p.) e colocado numa câmara estereotáxica (Stoelting, E.U.A.). Após exposição do crânio foram feitas duas aberturas no osso (craniotomia): a primeira sobre a zona de interesse (estriado, coordenadas AP: +0,1mm, ML: -2,0mm, de acordo com o mapa de coordenadas estereotáxicas de Paxinos e Watson (Paxinos, G. and Watson, C., 2007)) para inserção do CFM30 e a segunda

contralateral num posicionamento caudal, para colocação de uma pseudo-referência (Ag/AgCl) respetivamente.

O CFM30 acoplado num arranjo a uma pipeta cheia de solução de despolarização (distância de 200 $\mu$ m entre eles) foi introduzido no estriado, numa coordenada DV de -3,0 a -5,0mm. Após obtenção de uma corrente de base estável, a libertação de dopamina endógena foi evocada por ejeção de um volume controlado (25-50nL) de solução de despolarização da pipeta.

## **2.9 Tratamento de dados**

Os resultados são apresentados como valores médios  $\pm$  SEM. A significância estatística foi avaliada por recurso ao teste de t de Student ou ANOVA seguida de pós-teste de Bonferroni, para um grau de confiança de 95% ( $p < 0,05$ ). O tratamento de dados e os gráficos das figuras foram feitos com as aplicações Graphpad Prism 6 (GraphPad Software, E.U.A.) e Origin 8 (OriginLab Corporation, E.U.A.).

---

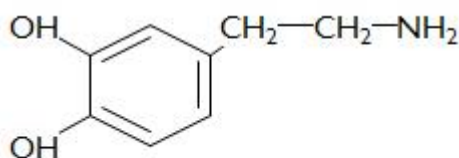
### **3 Resultados e Discussão**

---

### 3.1 Estudo eletroquímico da dopamina

A medição eletroquímica da dopamina *in vivo* no cérebro com microelétrodos de fibra de carbono é uma metodologia de eleição nos casos em que se pretendem obter medidas com elevada resolução temporal e espacial (Perry, M. [et al.], 2009, Venton, B.J. [et al.], 2003).

Como foi previamente referido, a dopamina apresenta na sua estrutura química (Figura 3.1.) um grupo catecol que pode ser oxidado em vários materiais do eletrodo, designadamente em carbono, a potenciais relativamente baixos (+0,2V vs. Ag/AgCl).



**Dopamina**

**Figura 3.1.** Estrutura química da dopamina.

A voltametria cíclica é frequentemente utilizada no estudo de reações eletroquímicas porque fornece uma informação crucial sobre os mecanismos e cinética das reações de transferência de eletrões, de processos de adsorção à superfície do eletrodo de trabalho e sobre reações químicas acopladas. Permite de forma rápida conhecer os potenciais redox de espécies químicas eletroativas, e a avaliação dos materiais do eletrodo e eletrolíticos de suporte (e.g. pH) sobre o processo redox (Brett, C. and Brett, A., 1993).

Os critérios de avaliação da reversibilidade eletroquímica de um par redox por voltametria cíclica são as seguintes:

- i)  $I_p \sim \nu^{1/2}$ ;
- ii)  $E_p$  independente de  $\nu$ ;
- iii)  $\Delta E_p = (E_{pa} - E_{pc}) = 57/n$  (mV);

iv)  $I_{pa}/I_{pc} = 1$ , em que  $I_{pa}$  e  $I_{pc}$  correspondem às correntes de pico anódico e catódico, respetivamente,  $E_{pa}$  e  $E_{pc}$  aos potenciais de pico anódico e catódico e  $\nu$  a velocidade de varrimento.

Não se verificando estes critérios, a reação redox pode ser considerada quasi-reversível ou irreversível.

Os eventuais processos de adsorção das espécies oxidada e reduzida à superfície do eletrodo distorcem os voltamogramas porque o processo de difusão é fortemente afetado.

Uma espécie química eletroativa pode apresentar vários picos de oxidação redução em função do mecanismo da reação eletroquímica. Por exemplo a ocorrência de uma reação química homogênea acoplada a seguir a uma reação eletroquímica heterogênea de acordo com um mecanismo *Electrochemical-Chemical (EC)*.

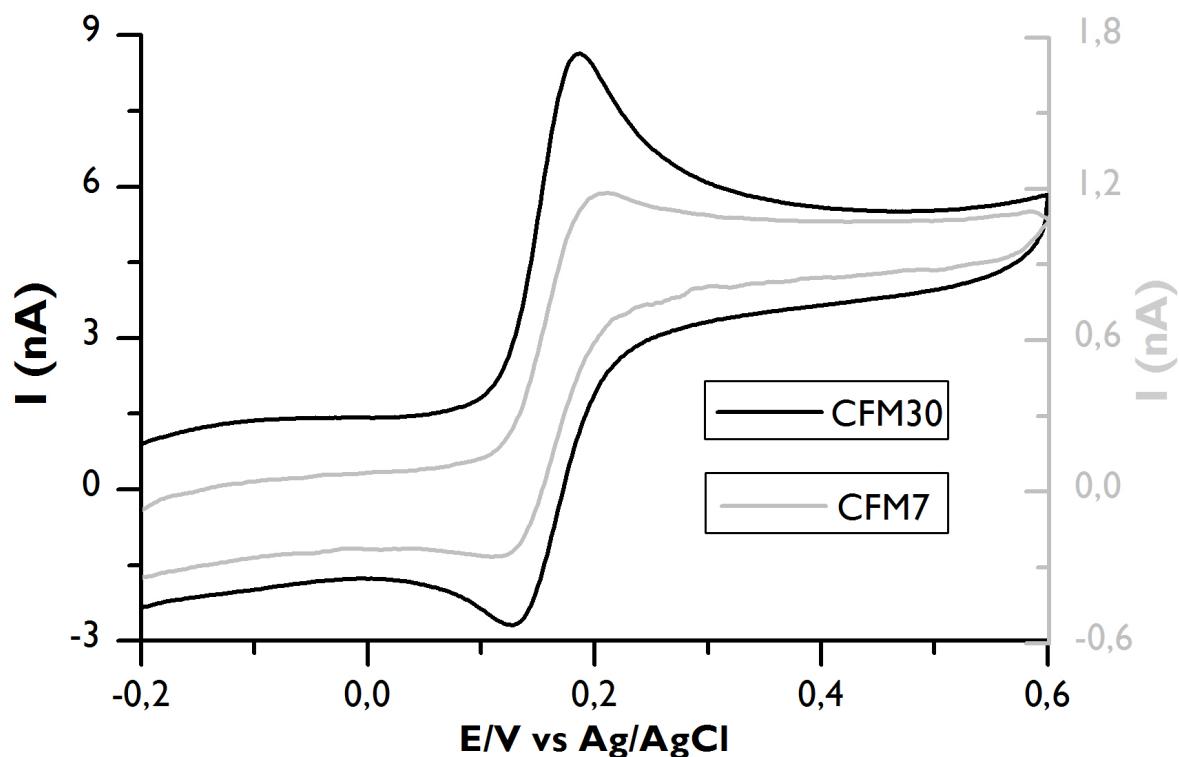
Nesta secção é apresentado o estudo eletroquímico da dopamina realizado por voltametria cíclica (CV) e voltametria de onda quadrada (SWV) em microeletrodos fabricados com fibras de carbono de 7 $\mu$ m (CFM7) e 30 $\mu$ m (CFM30) de diâmetro, cuja descrição foi feita anteriormente na secção 2.2 do capítulo dos Materiais e Métodos.

### **3.1.1 Potenciais de Oxidação-Redução**

Os ensaios de voltametria cíclica foram registados a partir de soluções de dopamina 50 $\mu$ M e 100 $\mu$ M em tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4, e noutros eletrólitos de suporte como o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 1,6), tampão acetato (pH 4,7) e carbonato (pH 10,0). Nos varrimentos de potencial na zona catódica o oxigénio foi removido borbulhando azoto durante 10 min.

Na Figura 3.2. apresentam-se os voltamogramas cíclicos de uma solução de dopamina 50 $\mu$ M em PBS obtidos com microeletrodos de fibra de carbono com fibras de 30 e 7 $\mu$ m de diâmetro e a uma velocidade de 50mV/s.

Os valores de potencial e corrente de pico apresentados na Tabela 3 indicam que o sistema eletroquímico se afasta dos valores teóricos definidos nos critérios de reversibilidade, e se aproximam de um sistema com comportamento quasi-reversível.



**Figura 3.2.** Voltamogramas cíclicos de uma solução de  $50\mu\text{M}$  de dopamina a uma velocidade de varrimento de  $50\text{mV/s}$  com um CFM30 (voltamograma a negro) e um CFM7 (voltamograma a cinzento).

**Tabela 3** - Valores dos potenciais de oxidação ( $E_{pa}$ ) e de redução ( $E_{pc}$ ) da dopamina e respectivas correntes de pico.

	$E_{pa}$ (V)	$E_{pc}$ (V)	$E_{pa}-E_{pc}$ (V)	$I_{pa}$ (nA)	$I_{pc}$ (nA)	$I_{pa}/I_{pc}$ (nA)
<b>CFM30</b>	0,186	0,12	0,066	6,14	-4,02	1,54
<b>CFM7</b>	0,198	0,11	0,088	0,83	-0,67	1,23

É sabido que os potenciais de oxidação-redução e a intensidade da corrente de pico da dopamina dependem dos pré-tratamentos eletroquímicos aplicados aos microelétrodos de fibra de carbono (Santos, R.M. [et al.], 2008, Takmakov, P. [et al.], 2010). Por esta razão, o protocolo de anodização que foi utilizado (secção 2.2 dos Materiais e Métodos) não foi além de  $+1,6\text{V}$ , o que pode ser considerado fraco ou pouco drástico. De qualquer modo, este procedimento provoca uma ativação da superfície da fibra de carbono nomeadamente de determinados grupos funcionais (e.g. carboxilo, hidroxilo, epóxido) que facilitam o processo de transferência de eletrões, que leva a um abaixamento do potencial de oxidação por efeito eletrocatalítico. Por outro lado, e dado que criam uma densidade de carga

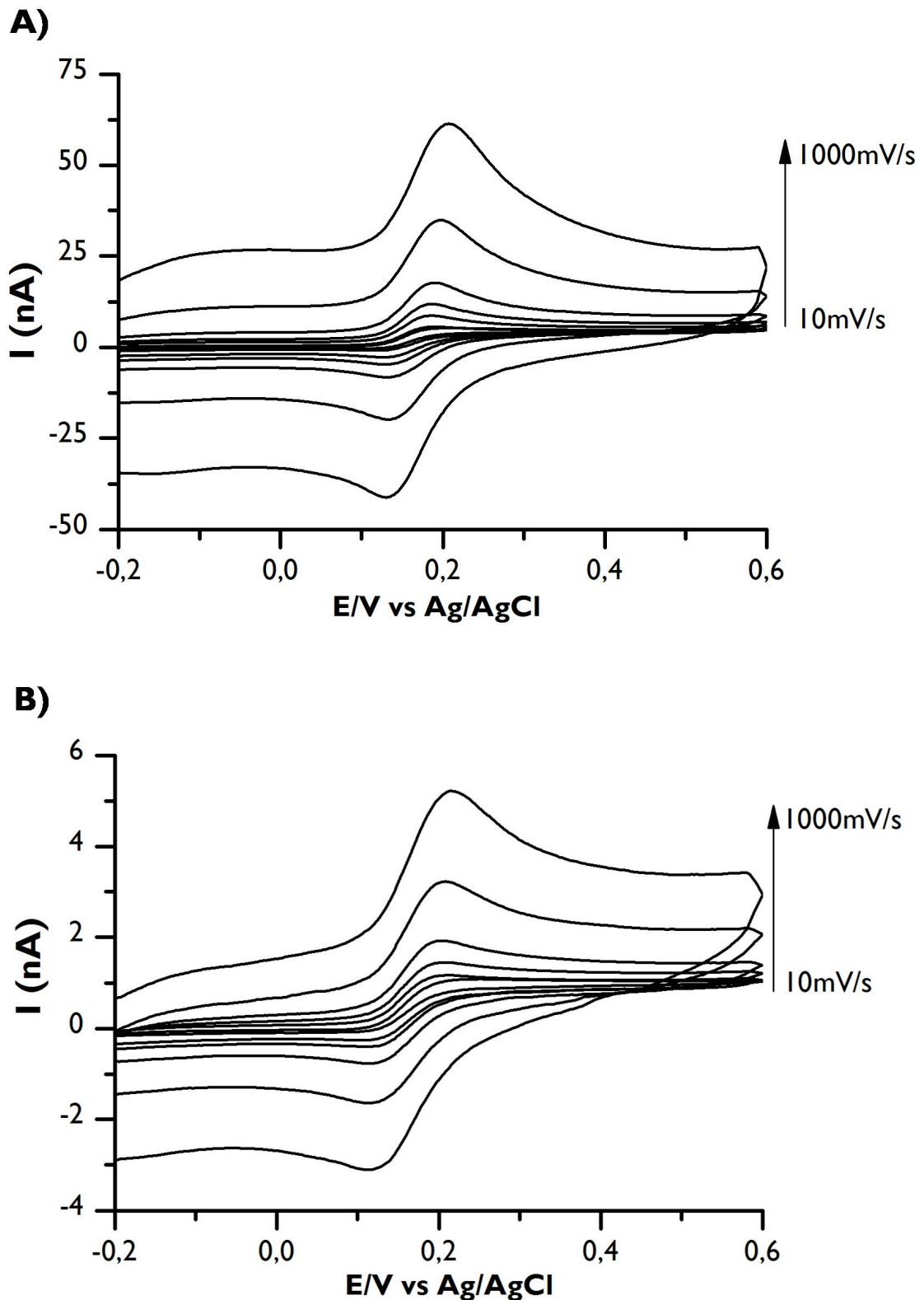
negativa à superfície do microelétrodo, promovem a adsorção de moléculas carregadas positivamente a pH 7.4, como é o caso da dopamina que tem um pKa de 10.63 (Hawley, M.D. [et al.], 1967) .

Foi demonstrado por FCV com CFMs que a adsorção da dopamina aumenta se o limite de potencial for de +1,4V quando comparado com 1,0V (Heien, M.L. [et al.], 2003). Num trabalho mais recente, foi demonstrado a partir de técnicas de análise de superfície (XPS, AFM) que quando se atingem potenciais de +1,4V vs. Ag/AgCl ocorre uma alteração da rugosidade da superfície (*etching*) do microelétrodo (Takmakov, P. [et al.], 2010). O mecanismo proposto por estes autores para este processo oxidativo envolve o desenvolvimento de CO<sub>2</sub> com esfoliação de óxido de grafite e/ou partículas de carbono. A possibilidade de renovação da superfície dos CFMs por FCV repetitivo atingindo potenciais de oxidação desta ordem de grandeza tem sido explorado frequentemente para aumentar a sensibilidade e evitar o envenenamento da superfície ativa (Takmakov, P. [et al.], 2010).

### **3.1.2 Efeito da velocidade de varrimento**

A cinética da reação no eletrodo foi avaliada através da análise do efeito da velocidade de varrimento nos picos de corrente de oxidação e redução da dopamina. Adicionalmente, foi avaliado em que medida a difusão determina processo de transporte de massa.

Como se pode observar na Figura 3.3. foram registados os voltamogramas cíclicos de uma solução 50µM de dopamina em PBS a velocidades de varrimento entre 10 e 1000mV/s, iniciando-se no sentido anódico entre -0,2V e +0,6V vs. Ag/AgCl para os CFM30 (painel A) e para os CFM7 (painel B).



**Figura 3.3. A)** Voltamogramas de uma solução de  $50\mu\text{M}$  de dopamina realizadas com diferentes velocidades de varrimento, 5, 10, 20, 40, 50, 80, 100, 160, 200, 320, 500, 640 e 1000  $\text{mV/s}$ , com um CFM30 **B)** Voltamogramas de uma solução de dopamina  $50\mu\text{M}$  a diferentes velocidades de varrimento, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 e  $1000\text{mV/s}$  com um CFM7.

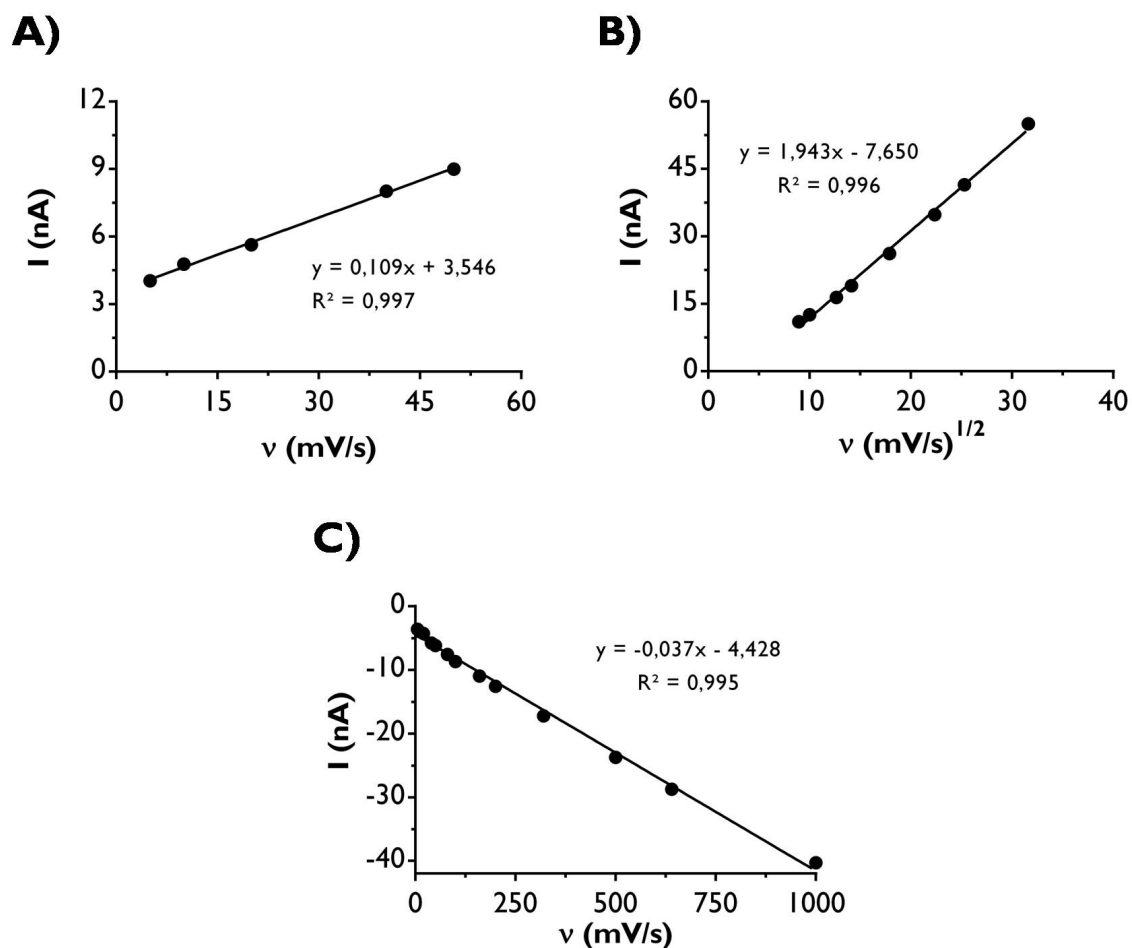


À medida que se aumentaram as velocidades de varrimento, os voltamogramas transitaram de uma forma de curva sigmóide típica registadas a velocidades de varrimento inferiores a 20mV/s, para voltamogramas com o pico bem definido que são típicos de um macroelétrodo (Stulík, K. [et al.], 2000, Sujaritvanichpong, S. [et al.], 1986).

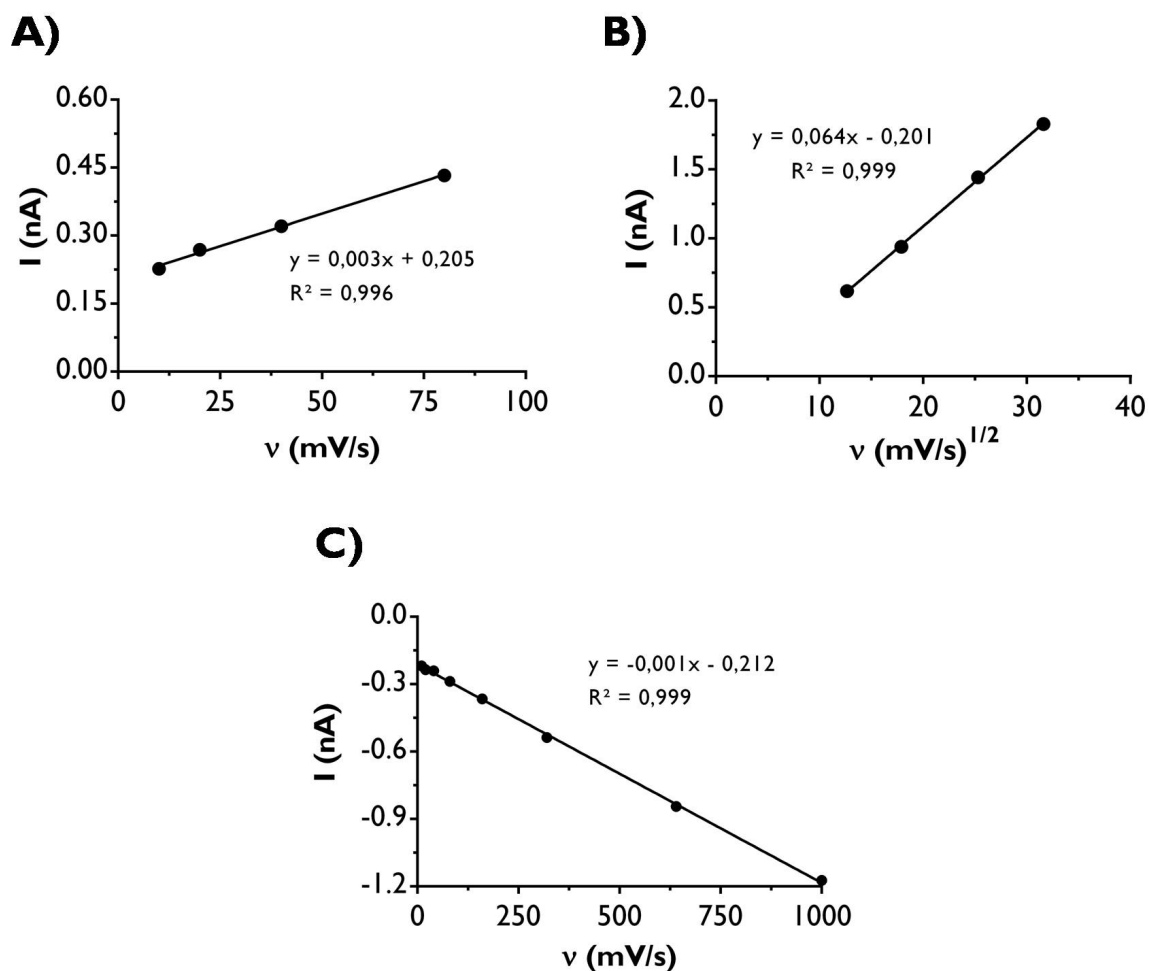
Nas Figuras 3.4. e 3.5. mostram-se os gráficos da corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ ) em função da velocidade de varrimento ( $v$ ) para um microelétrodo CFM30 e um CFM7, respetivamente, na presença de 50 $\mu$ M dopamina em PBS. A velocidades de varrimento entre 10 e 80 mV/s observou-se uma relação linear entre  $I_{pa}$  vs.  $v$  (painel A), o que indica tratar-se de um processo controlado por adsorção. A valores mais elevados verificou-se uma boa linearidade entre  $I_{pa}$  vs.  $v^{1/2}$  (painel B), o que indica tratar-se de um processo controlado por difusão. Estes resultados estão de acordo com os publicados por outros autores em elétrodos do tipo *screen printed* modificados com grafeno (Ping, J. [et al.], 2012) e para elétrodos de carbono vítreo modificados com um compósito de quitosano e grafeno entre 10-150mV/s (Han, D. [et al.], 2010).

Por outro lado, foi reportado um comportamento controlado exclusivamente por adsorção na gama de 0,01-1V/s para elétrodos de grafite pirolítica (Kachosangi, R.T. and Compton, R.G., 2007).

No caso de  $I_{pc}$  vs.  $v$  (painel C) obteve-se uma excelente linearidade em toda a gama de velocidade de varrimento, indicando tratar-se de um processo controlado exclusivamente por adsorção. Adicionalmente, os picos de potencial de oxidação, ao contrário dos picos de redução, deslocaram-se positivamente com o aumento da velocidade de varrimento sugerindo que não se trata de um processo totalmente reversível.



**Figura 3.4.** **A)** Reto de calibração da intensidade de corrente dos picos anódicos dos voltamogramas de uma solução de dopamina 50 $\mu$ M para as velocidades de varrimento de 5, 10, 20, 40, 50 mV/s obtidos com um CFM30. **B)** Reto de calibração da intensidade de corrente dos picos anódicos dos voltamogramas de uma solução de dopamina 50 $\mu$ M em função da raiz quadrada das velocidades de varrimento 80, 100, 160, 200, 320, 500, 640 e 1000 mV/s obtidos com um CFM30. **C)** Reto de calibração da intensidade de corrente dos picos catódicos dos voltamogramas de uma solução de dopamina 50 $\mu$ M em função das velocidades de varrimento 5, 10, 20, 40, 50, 80, 100, 160, 200, 320, 500, 640 e 1000 mV/s obtidos com um CFM30.

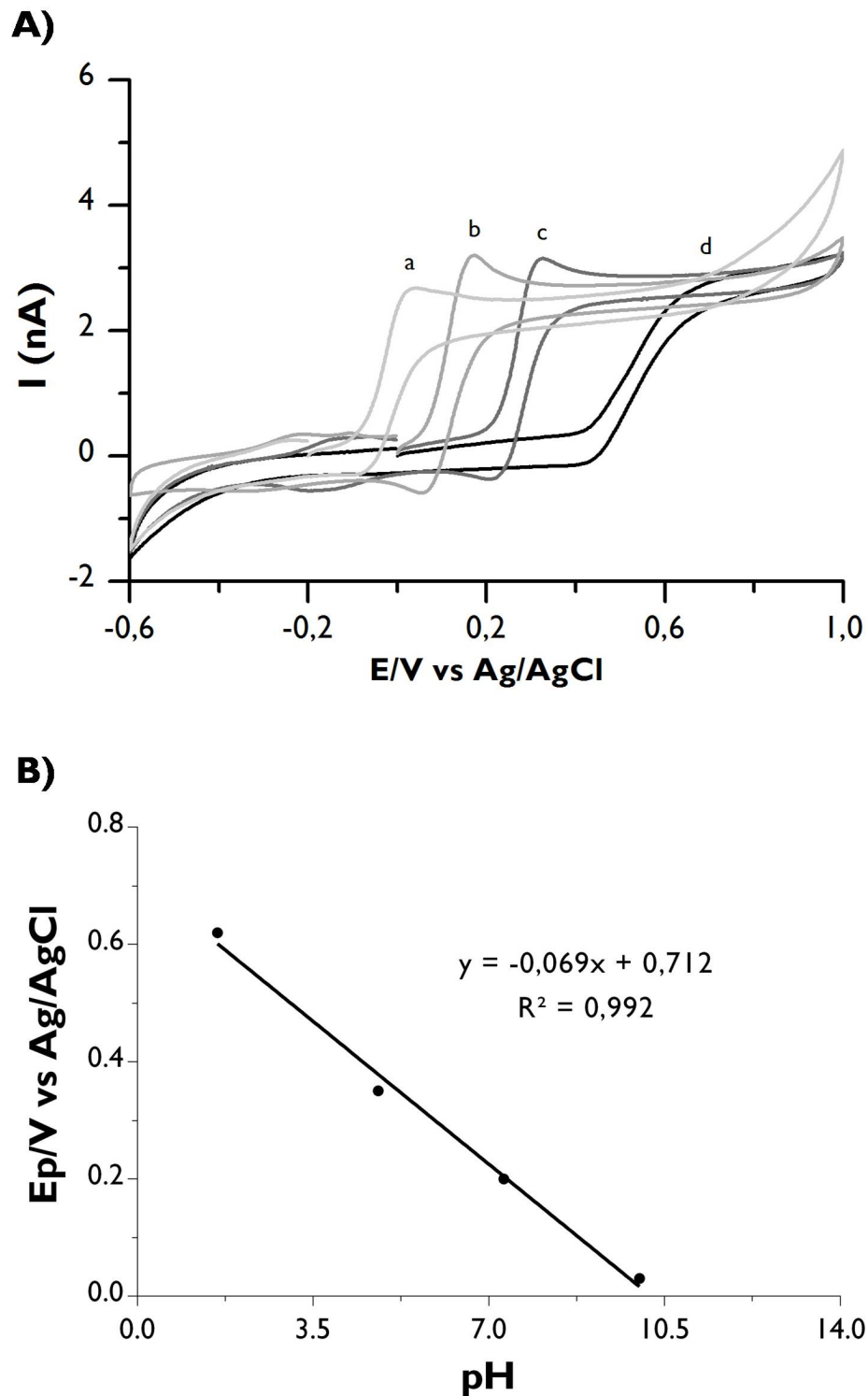


**Figura 3.5.** **A)** Retra de calibração da intensidade de corrente dos picos anódicos dos voltamogramas de uma solução de dopamina 50 $\mu$ M para as velocidades de varrimento de 10, 20, 40, 80mV/s obtidos com um CFM7. **B)** Retra de calibração da intensidade de corrente dos picos anódicos dos voltamogramas de uma solução de dopamina 50 $\mu$ M em função da raiz quadrada das velocidades de varrimento 160, 320, 640 e 1000mV/s obtidos com um CFM7. **C)** Retra de calibração da intensidade de corrente dos picos catódicos dos voltamogramas de uma solução de dopamina 50 $\mu$ M em função das velocidades de varrimento 10, 20, 40, 80, 100, 160, 320, 640 e 1000 mV/s obtidos com um CFM7.

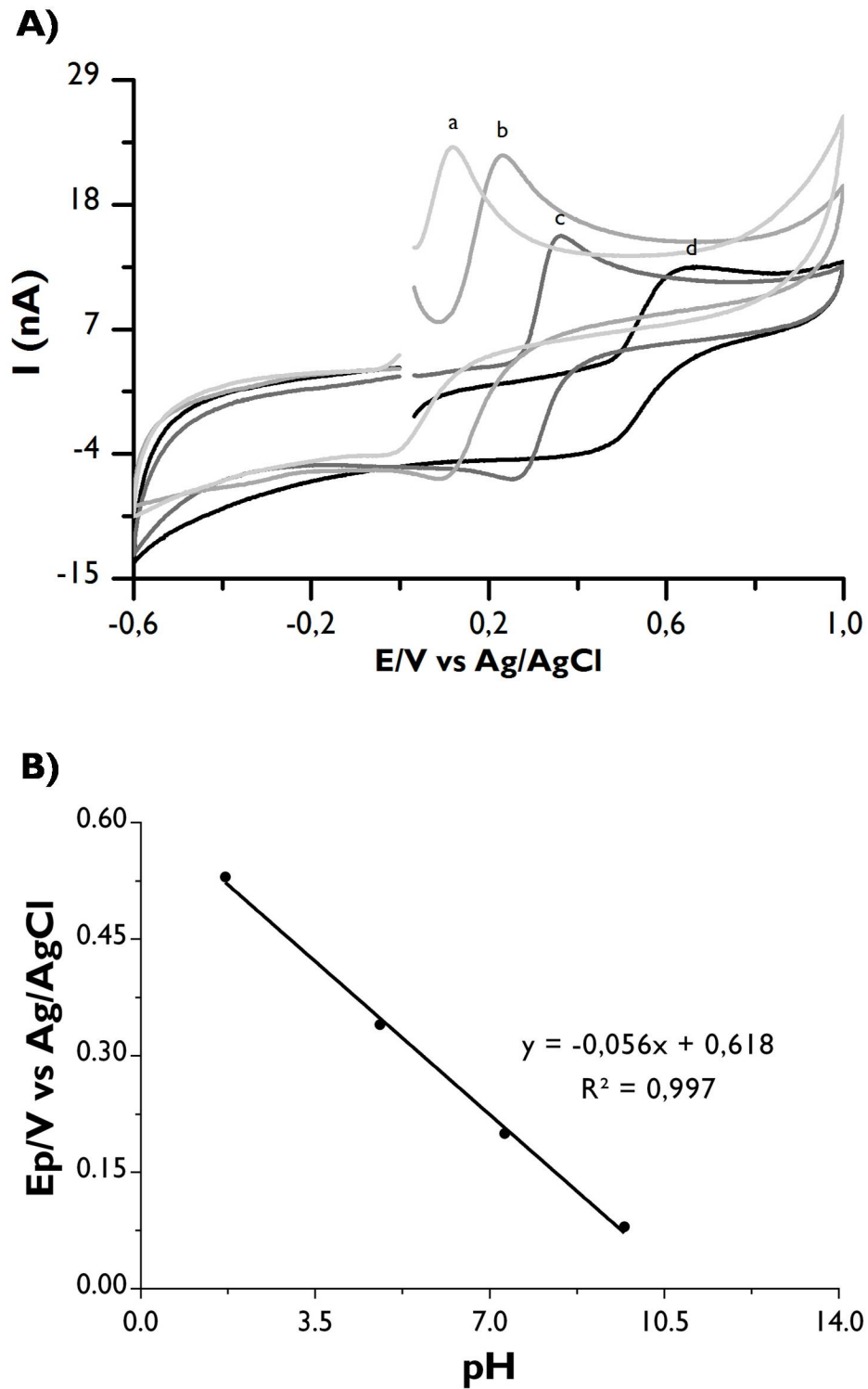
### 3.1.3 Efeito do pH

O efeito do pH na reação redox da dopamina nos microelétrodos foi estudado na gama de valores entre 1,6 e 9,8 por forma estimar o número de prótons envolvidos na reação. A Figura 3.6. A) ilustra o efeito do pH no potencial de pico de oxidação da dopamina obtido com microelétrodos CFM7. Como se pode observar no painel Figura 3.6 B), o  $E_{pa}$  varia linearmente em função do pH ( $E_{pa} = -0,069 \text{ pH} + 0,712$ ), e desloca-se para valores menos positivos com um declive de -69mV por unidade de pH, o que está próximo do valor

teórico de  $-0,059\text{V}/\text{pH}$  indicando o envolvimento de um número idêntico de prótons e elétrons i.e. dois elétrons e dois prótons (Brett, C. and Brett, A., 1993).



**Figura 3.6. A)** Voltamogramas de uma solução de dopamina  $100\mu\text{M}$  registados com um CFM7 em tampão carbonato (a), PBS (b), tampão acetato (c) e ácido sulfúrico (d) de pH, 9,8, 7,4, 4,8, e 1,6, respetivamente. **B)** Reta de calibração do potencial de pico anódico em função do pH das soluções.



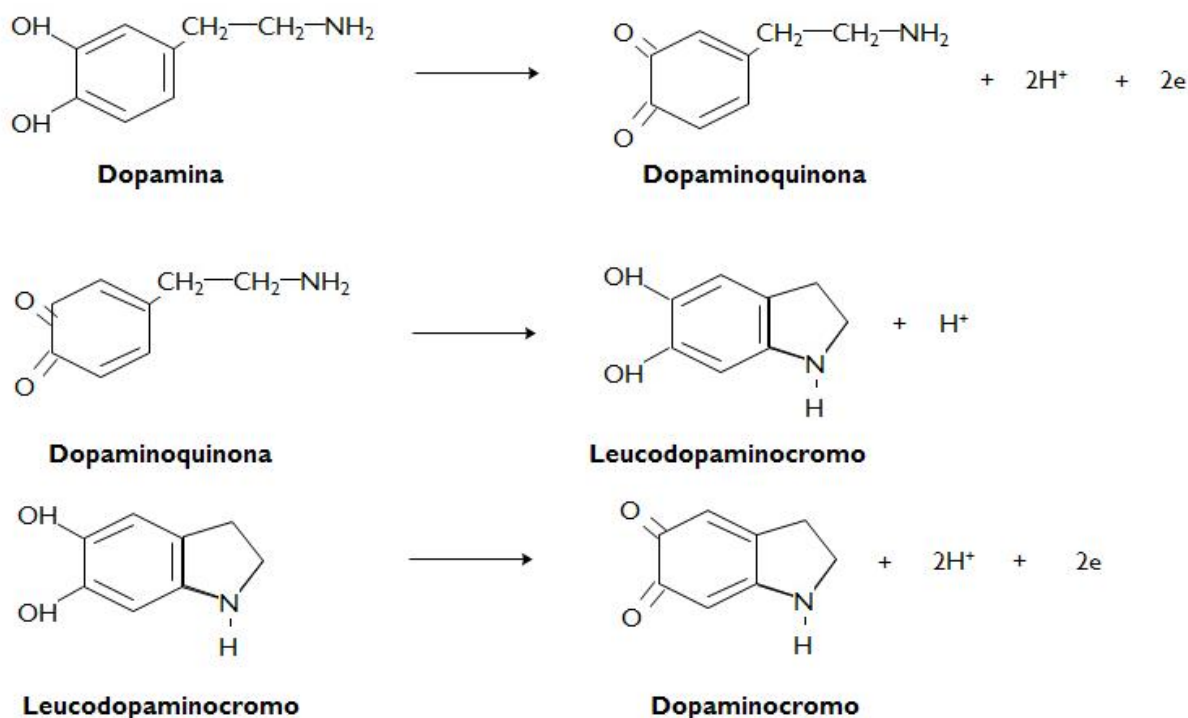
**Figura 3.7. A)** Voltamogramas de uma solução de dopamina  $100\mu\text{M}$  registados com um CFM30 em tampão carbonato (a), PBS (b), tampão acetato (c) e ácido sulfúrico (d) de pH, 9,8, 7,4, 4,8 e 1,6, respetivamente **B)** Reta de calibração do potencial de pico anódico em função do pH das soluções.

Os resultados obtidos com microelétrodos CFM30 nas mesmas condições experimentais mostram-se na Figura 3.7.. O declive da reta obtido foi de  $-0,056\text{V/pH}$  o que corrobora os resultados anteriores obtidos com os CFM7.

Ocorre uma resposta ótima com a menor separação entre picos (Epa-Epc) a pH 7,4 correspondente ao pH fisiológico o que corrobora resultados reportados por outros autores (Xu, Z. [et al.], 2004, Zhang, Y. [et al.], 2007).

### 3.1.4 Mecanismo da reação

É bem conhecido que o grupo catecol das catecolaminas é oxidado por via eletroquímica com formação da correspondente quinona (dopaminoquinona) com o envolvimento de dois prótons e dois elétrons tal como ilustrado na Figura 3.8. para a dopamina (reação I). Após a oxidação inicial e dependendo do pH, pode ocorrer uma reação química na qual se forma um produto designado por leucocromo de acordo com um mecanismo EC (Harreither, W. [et al.], 2013, Hawley, M.D. [et al.], 1967, Zhao, Y. [et al.], 2005).



**Figura 3.8.** Reações de oxidação da dopamina e subseqüentes etapas para a formação do dopaminocromo.

No entanto, a valores de pH baixos a quinona está significativamente protonada o que impede a reação de ciclização. A valores de pH elevados a quinona não protonada origina o

leucocromo que pode sofrer uma reação eletroquímica subsequente originando um par redox cujos picos de potencial podem ser observados, ainda que com amplitude diminuta, a -0,35V e a -0,22V (Harreither, W. [et al.], 2013).

O produto da reação dopaminocromo pode polimerizar formando melanina por uma reação que envolve radicais livres e deste modo bloquear a superfície ativa da fibra de carbono e impedir a reação redox da dopamina. Os resultados obtidos estão de acordo com o que está descrito para o mecanismo redox da dopamina, principalmente com macroelétrodos de carbono (Corona-Avedaño, S. [et al.], 2007, Hawley, M.D. [et al.], 1967, Patel, A.N. [et al.], 2013, Zhao, Y. [et al.], 2005) e também em microelétrodos (Harreither, W. [et al.], 2013).

### **3.2 Avaliação analítica dos microelétrodos de fibra de carbono revestidos com Nafion®**

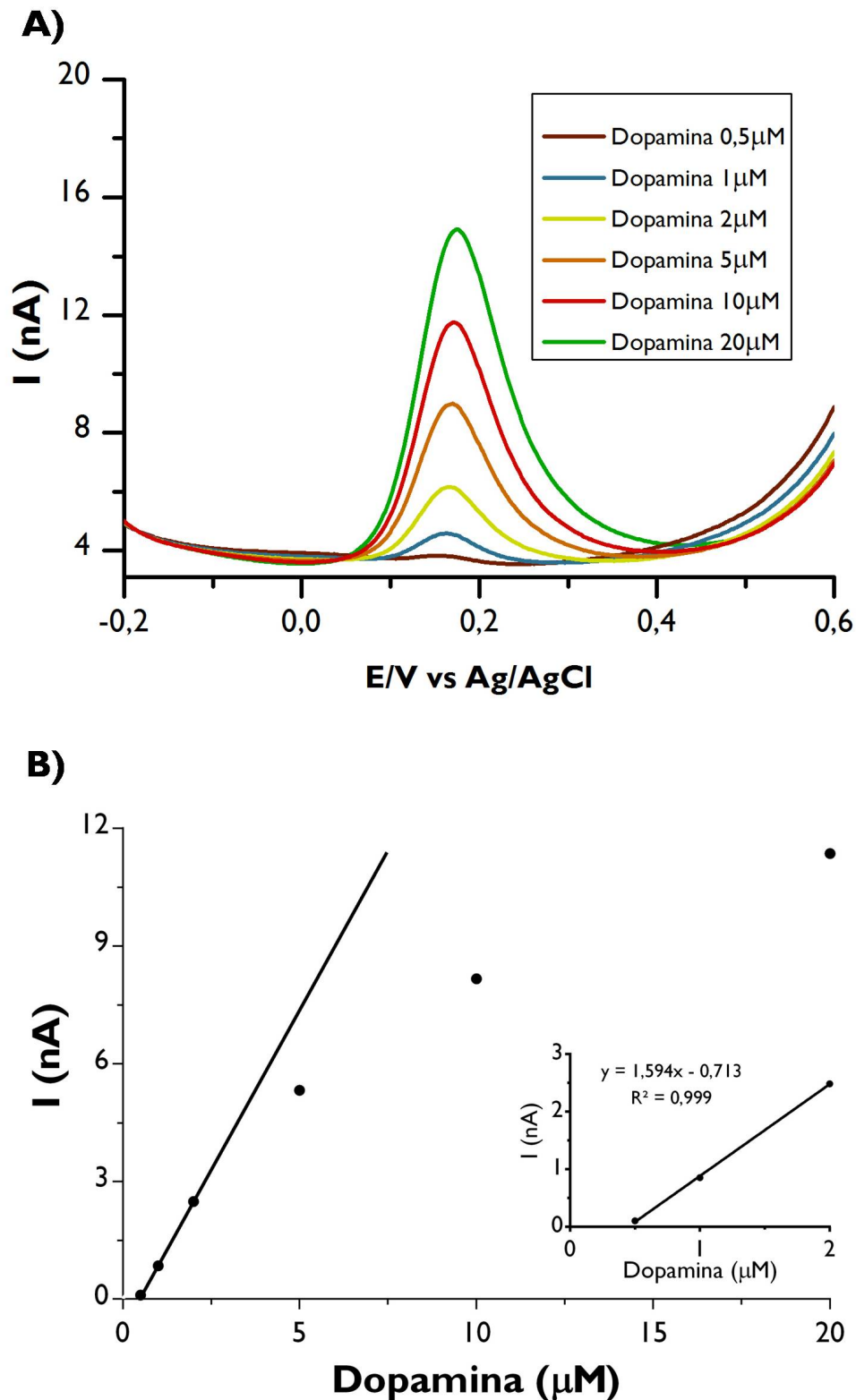
#### **3.2.1 Calibração por voltametria de onda quadrada**

Os voltamogramas de onda quadrada (SWV) foram registados em soluções de dopamina no intervalo de concentrações 0,5-20 $\mu$ M em PBS com CFM30 (Figura 3.9.) e CFM7 (Figura 3.10.).

Nos CFM30 (Figura 3.9.), o potencial de pico obtido foi de +180mV vs. Ag/AgCl tendo-se verificado uma boa linearidade no intervalo de concentrações entre 0,5 e 2 $\mu$ M de dopamina, uma sensibilidade de 1,594 nA/ $\mu$ M e um LOD de 0,968  $\mu$ M.

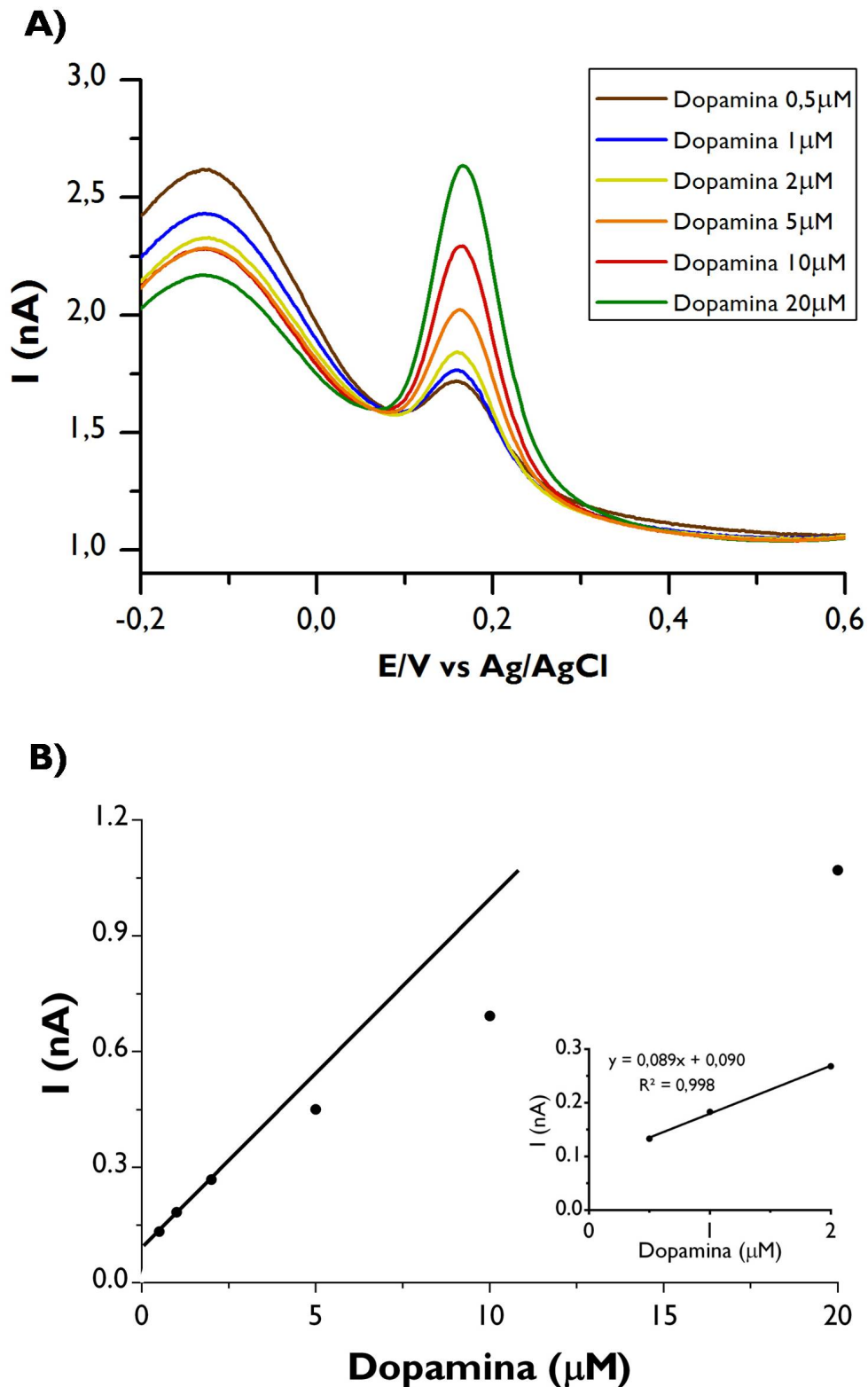
Na Figura 3.10. mostram-se os voltamogramas por obtidos por SWV de soluções de dopamina no mesmo intervalo de concentrações com os CFM7. Tal como esperado os valores de corrente foram de uma ordem de grandeza mais baixos, e o valor do potencial de pico de oxidação foi de +160 mV vs. Ag/AgCl, ou seja, 20mV mais baixo que o valor obtido com os CMF30 sugerindo que a fibra de carbono de 7 $\mu$ m diâmetro apresenta um efeito catalítico mais acentuado sobre a oxidação da dopamina.

A presença de um pico a -150mV pode resultar da presença de grupos quinona que vão diminuindo à medida que os produtos de oxidação da dopamina vão bloqueando por adsorção a superfície da fibra de carbono. Esta característica é muito menos pronunciada nas fibras de 30 $\mu$ m.



**Figura 3.9. A)** Voltamogramas de onda quadrada obtidos com um CFM30 em soluções de dopamina 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 $\mu\text{M}$ . **B)** Intensidade da corrente no potencial de pico em função da concentração de dopamina. No gráfico interior mostra-se a curva de calibração no intervalo de concentrações de dopamina entre 0,5e 2 $\mu\text{M}$ .





**Figura 3.10. A)** Voltamogramas de onda quadrada obtidos com um CFM7 em soluções de dopamina 0,5, 1, 2, 5, 10 e 20 $\mu\text{M}$ . **B)** Intensidade da corrente no potencial de pico em função da concentração de dopamina. No gráfico interior mostra-se a curva de calibração no intervalo de concentrações de dopamina entre 0,5 e 2 $\mu\text{M}$ .

Geralmente, os estudos publicados na literatura utilizam a voltametria de impulso diferencial com macroelétrodos com e sem revestimento por nanomateriais para determinar a concentração de dopamina na presença de interferentes como o ascorbato, ácido úrico, ou a serotonina (Tabela 4). Por isto, os resultados obtidos para os parâmetros analíticos em estudo são em geral difíceis de comparar com os publicados na literatura.

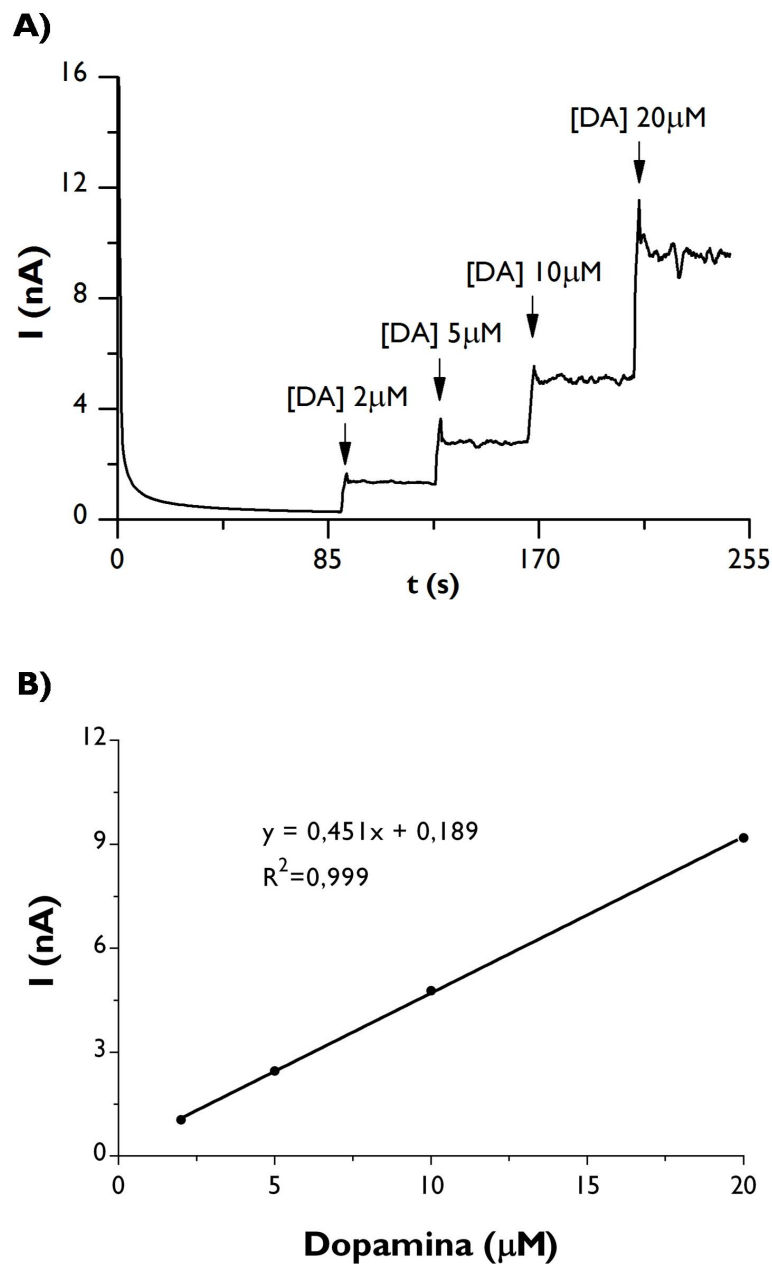
**Tabela 4** - Valores de sensibilidade, LOD e intervalos de linearidade da dopamina em função das referências bibliográficas.

Elétrodo	Sensibilidade ( $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ )	LOD (nM)	Linearidade ( $\mu\text{M}$ )	Referência
Grafite pirolítica	0,11	90	0,2 - 25,0	(Kachosangi, R.T. and Compton, R.G., 2007)
Pasta de carbono c/ nanofibras de carbono	-	40	0,04 - 5,60	(Liu, Y. [et al.], 2008)
Carbono Vítreo c/ CNTs	0,073	0,6	4 - 120	(Zhang, Y. [et al.], 2007)
Grafite Pirolítica c/ CNTs	2,1	100	0,5 - 10,0	(Wang, Z. [et al.], 2002)
Carbono Vítreo c/ gel iónico e CNTs	0,24	100	0,2 - 100	(Zhao, Y. [et al.], 2005)
Screen-printed com grafeno	0,087	-	0,5 - 2000	(Ping, J. [et al.], 2012)

A diminuição de corrente e conseqüente perda de linearidade verificada neste trabalho com a técnica de voltametria de onda quadrada pode estar relacionada com a adsorção dos produtos de oxidação da dopamina, que levam ao bloqueamento da superfície ativa do microelétrodo e impedem a difusão da dopamina da solução para a superfície deste (Brett, C. and Brett, A., 2003).

### 3.2.2 Calibração por amperometria

As calibrações por amperometria foram efetuadas a um potencial de +0,55V vs. Ag/AgCl em PBS (pH 7,4) sob agitação suave da solução. Após estabilização da corrente de fundo adicionaram-se volumes crescentes de uma solução stock de dopamina (20mM) de modo a obterem-se as concentrações finais de 2, 5, 10, 20 $\mu$ M tal como ilustra a Figura 3.11.. A partir da curva de calibração (Figura 3.11. B)) e por regressão linear foi calculada uma sensibilidade de 0,451nA/ $\mu$ M, um LOD de 0,431 $\mu$ M e linearidade ( $R^2=0,999$ ).



**Figura 3.11. A)** Calibração por amperometria a um potencial constante de +0,55V vs. Ag/AgCl com umCFM30 em vaso. As setas indicam o momento de adição da solução de

dopamina 20mM perfazendo as concentrações indicadas. **B)** Reta de calibração da intensidade de corrente gerada em função da concentração de dopamina adicionada.

### 3.2.3 Sistema de análise por injeção em fluxo

O sistema por injeção em fluxo (FIA) utilizado na calibração dos microelétrodos CFM30 e CFM7 foi descrito anteriormente no capítulo Materiais e Métodos. A principal característica deste sistema é a elevada reprodutibilidade do processo analítico, simplicidade na automatização e porque mimetiza o processo de monitorização *in vivo* de sinais analíticos transientes.

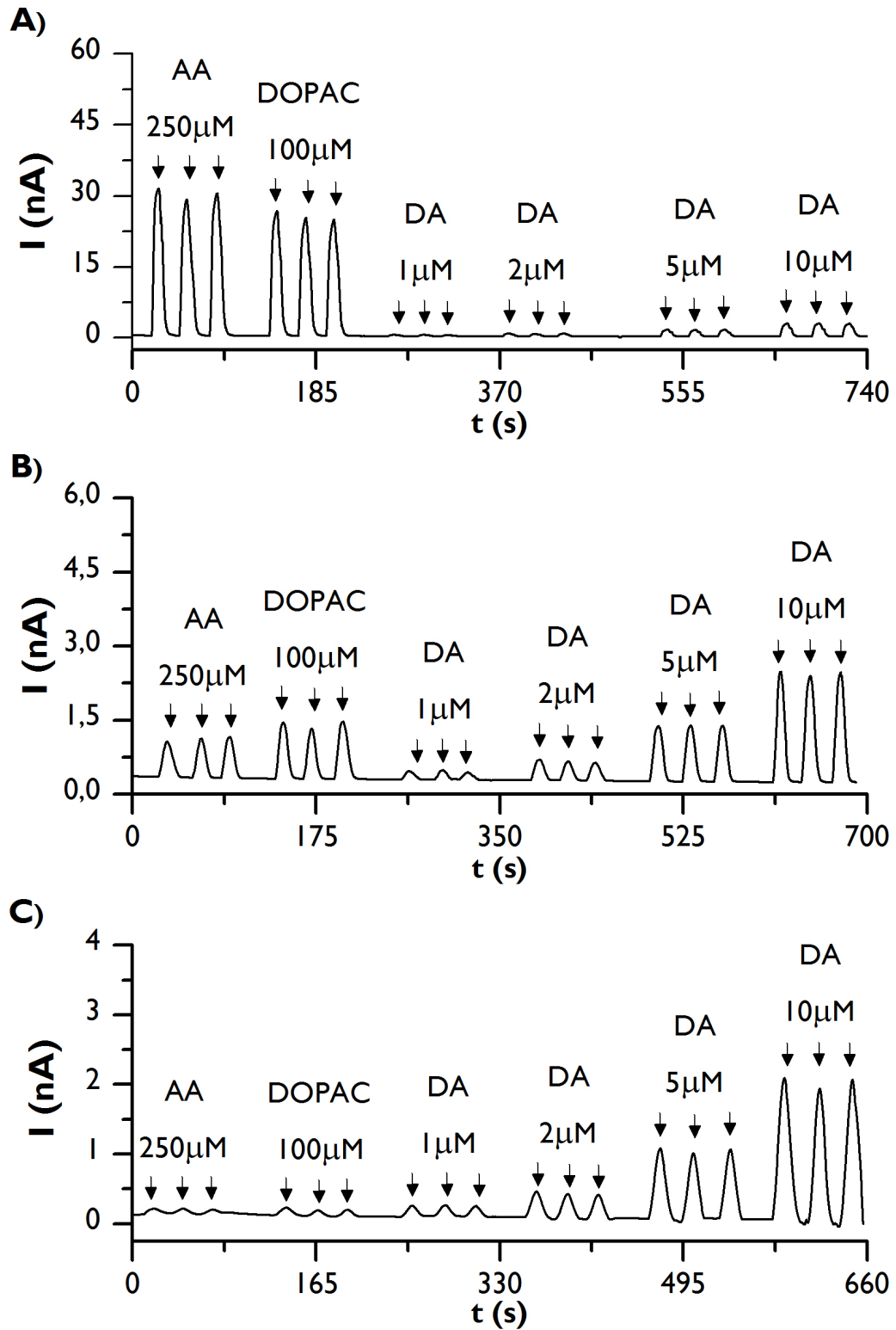
#### 3.2.3.1 Fiagramas

Na Figura 3.12. apresentam-se os registos amperométricos que podemos designar por fiagramas obtidos com um microeléctrodo CFM30 não revestido (*bare*) polarizado a +0,55V vs. Ag/AgCl (painel A), e ainda fiagramas obtidos com CFM30 revestido com duas camadas (Painel B) e quatro camadas de Nafion® (painel C). Experiências similares foram realizadas com CFM7 (Figura 3.13.). Todas as soluções foram injetadas em triplicado em *loop* de 100µL, tendo-se iniciado o registo com as soluções dos interferentes (250µM de ascorbato e 100µM de DOPAC), a que se seguiram as soluções de calibração de dopamina 1, 2, 5 e 10µM. Para cada uma das soluções calculou-se o valor médio da altura de pico, a partir da qual se avaliou a sensibilidade e o LOD dos microelétrodos para a dopamina, bem como a seletividade contra os principais interferentes e o tempo de resposta ( $t_{50\%}$ ).

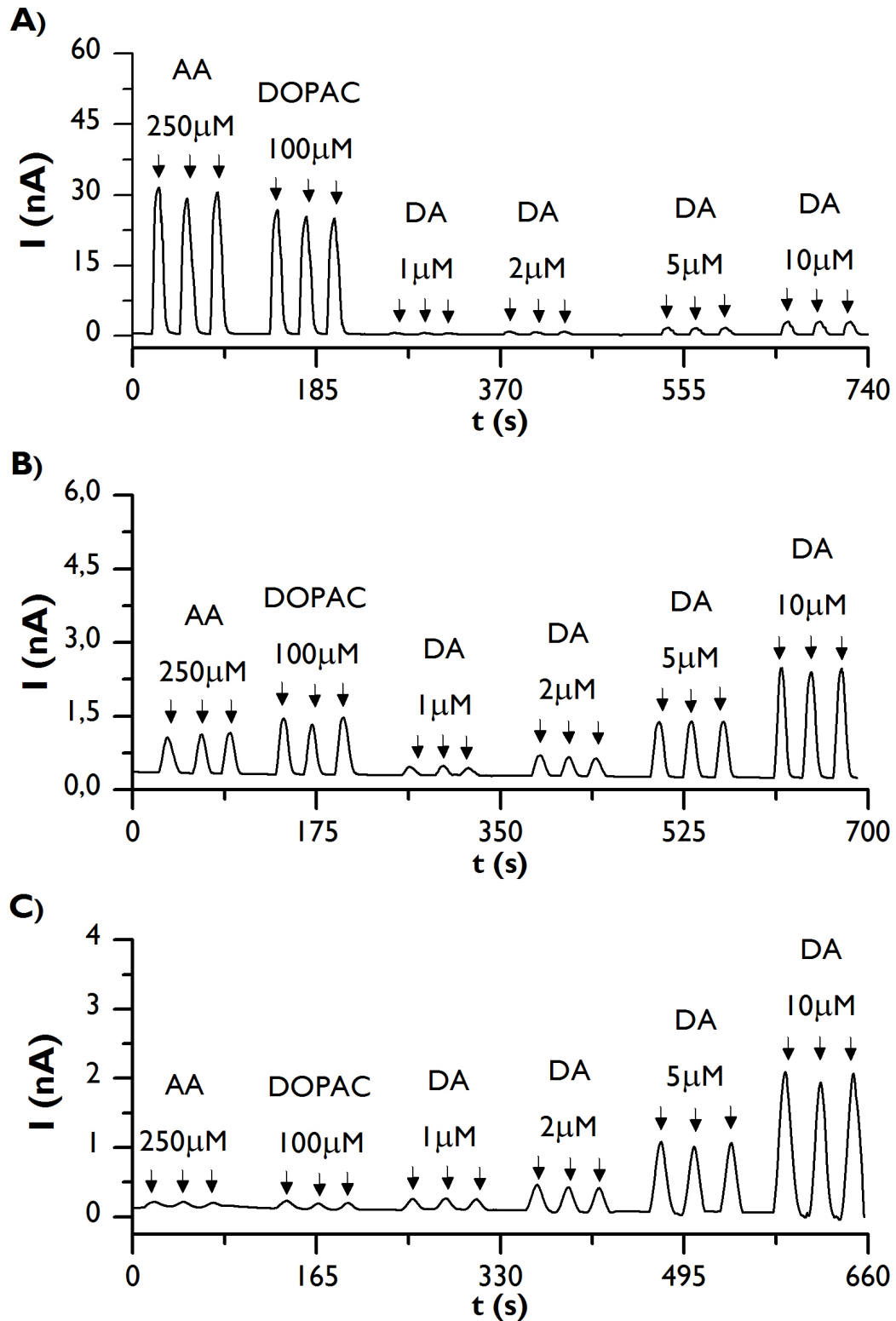
É notório nos fiagramas ilustrados nas Figuras 3.12. A) e 3.13. A) que os microelétrodos não revestidos (*bare*) têm uma resposta muito significativa aos interferentes como era expectável dado que são compostos facilmente oxidáveis ao valor do potencial de +0,55V vs. Ag/AgCl (Robinson, D.L. [et al.], 2008).

#### 3.2.3.2 Sensibilidade e limite de deteção

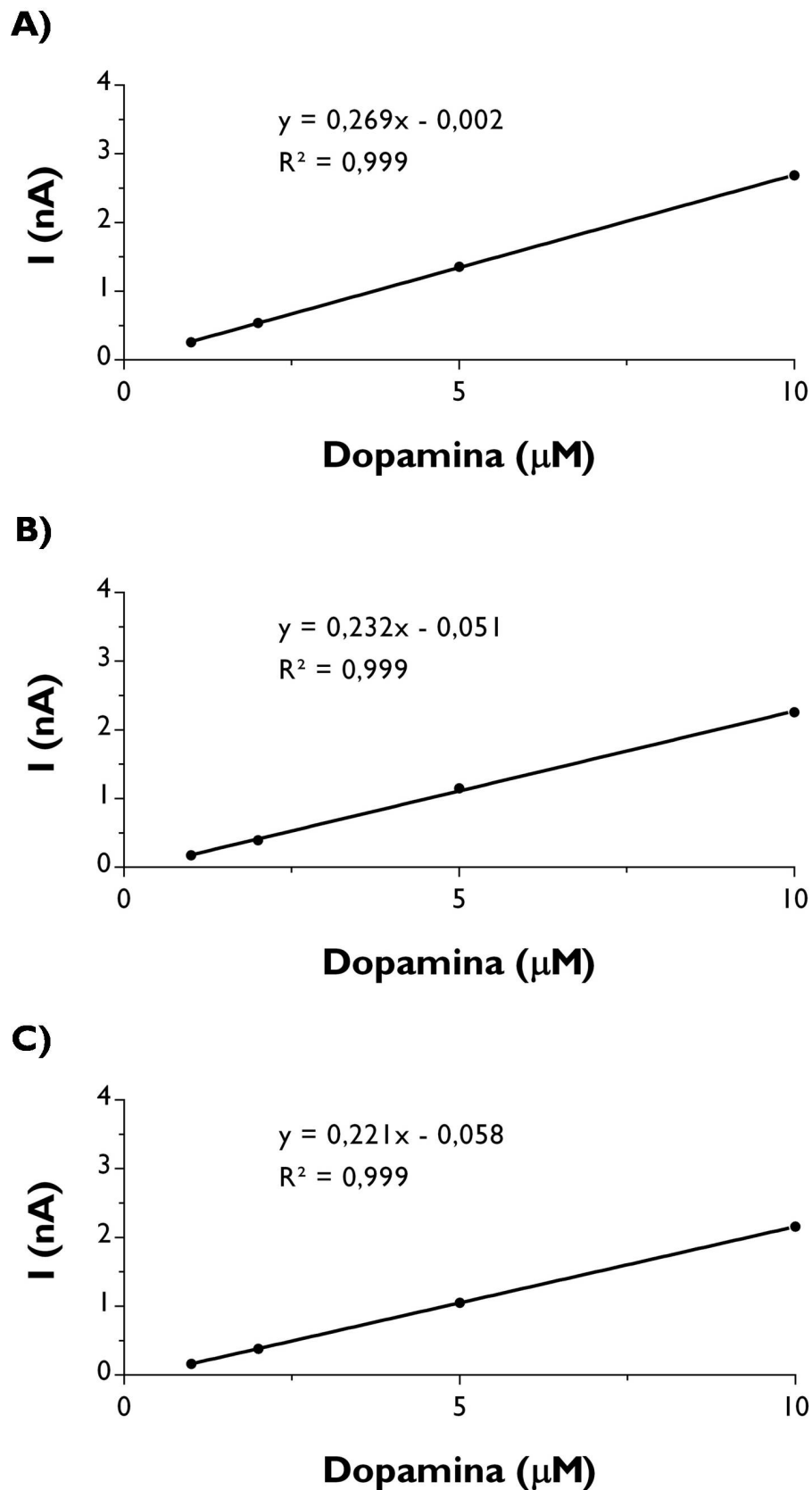
Nas Figuras 3.14. e 3.15. encontram-se as retas de calibração de um CFM30 e de um CFM7, respetivamente, em *bare* (painel A)) e revestidos com 2 (painel B)) e 4 camadas (painel C)) de Nafion®. Nestas figuras é visível a diminuição da sensibilidade (declive das retas de calibração) para a dopamina com a aplicação das camadas de Nafion® e ainda que as sensibilidades registadas para os CFM30 são de uma ordem de grandeza superior face à dos CFM7.



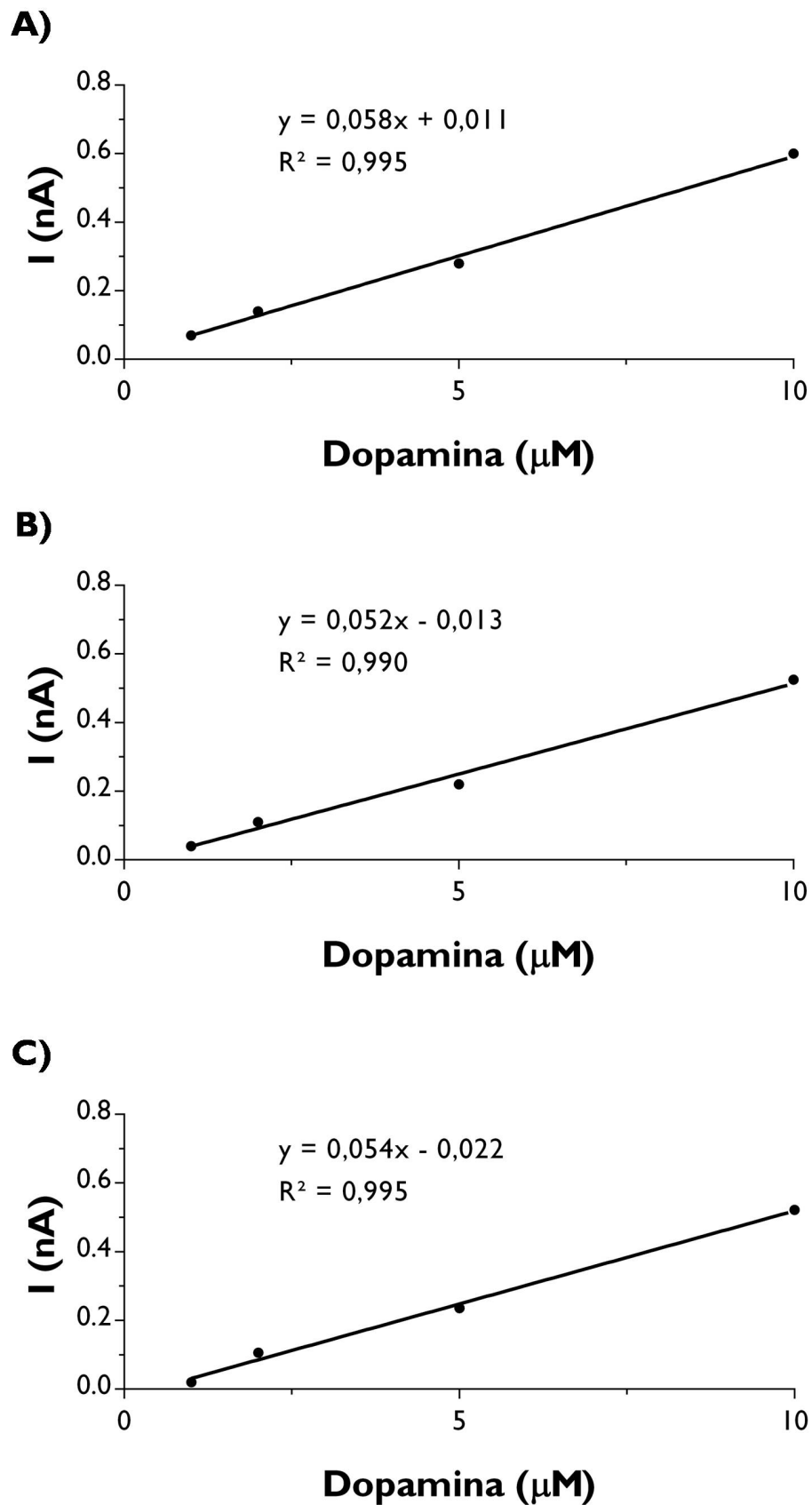
**Figura 3.12.** Registos amperométricos a um potencial constante de +0,55V vs. Ag/AgCl de um CFM30 **A)** em *bare*, **B)** revestido com 2 camadas de Nafion<sup>®</sup> e **C)** revestido com 4 camadas de Nafion<sup>®</sup>. As setas indicam as injeções de ascorbato (AA), DOPAC e dopamina (DA) e as respetivas concentrações.



**Figura 3.13.** Registos amperométricos a um potencial constante de +0,55V vs. Ag/AgCl de um CFM7 **A)** em *bare*, **B)** revestido com 2 camadas de Nafion<sup>®</sup> e **C)** revestido com 4 camadas de Nafion<sup>®</sup>. As setas indicam as injeções de ascorbato (AA), DOPAC e dopamina (DA) e as respetivas concentrações.



**Figura 3.14.** Retas de calibração da intensidade da corrente dos registros da Figura 3.12. em função da concentração de dopamina **A)** em *bare*, **B)** com 2 camadas e **C)** com quatro camadas de Nafion®.

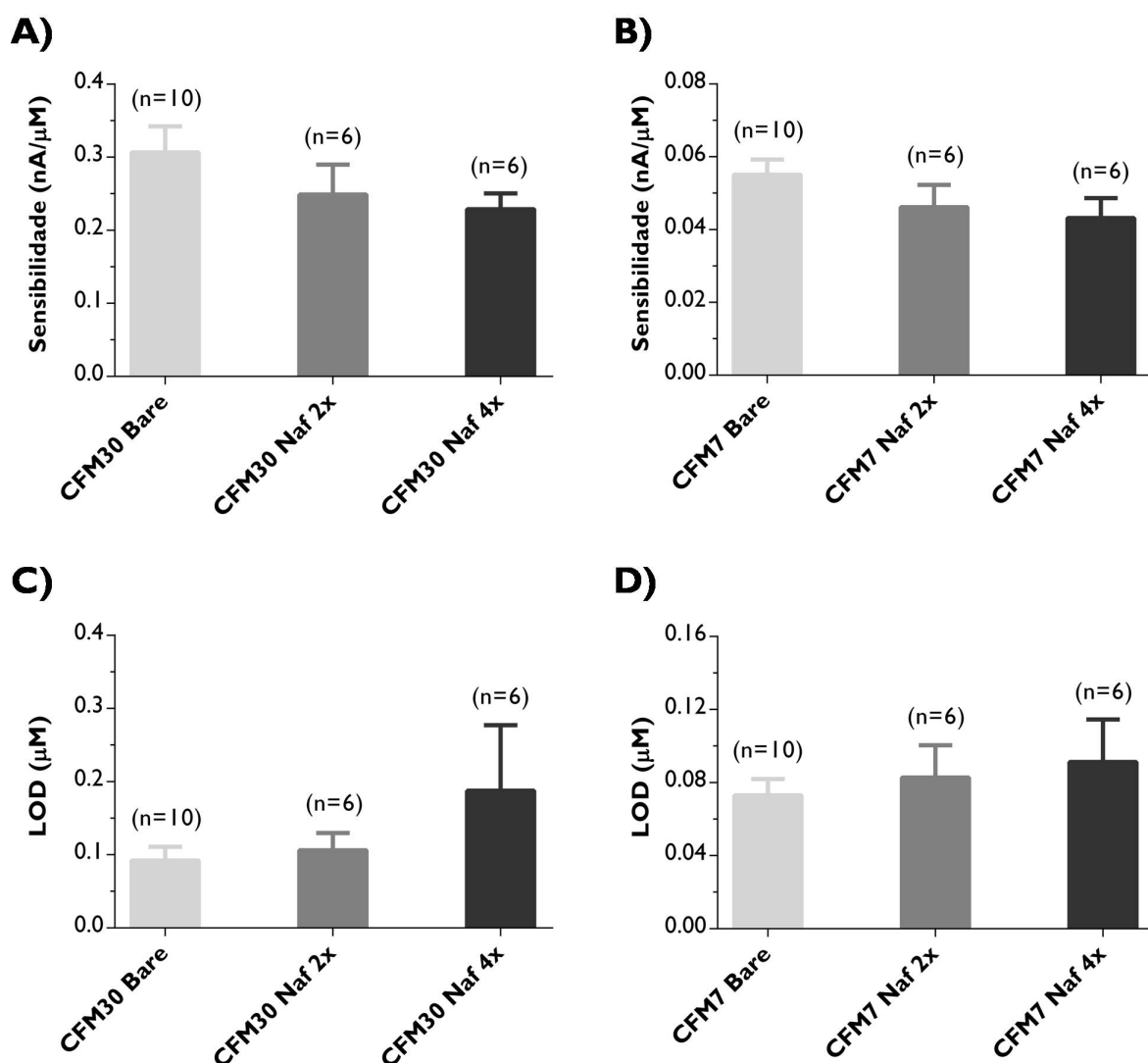


**Figura 3.15.** Retas de calibração da intensidade da corrente dos registos da Figura 3.13. em função da concentração de dopamina **A)** em *bare*, **B)** com 2 camadas e **C)** com quatro camadas de Nafion®.



A análise dos resultados de todas as experiências realizadas com CFM30 e CFM7 (n=10) com e sem revestimento por Nafion® (2x e 4x) quanto à sensibilidade e LOD está ilustrada graficamente na Figura 3.16..

Como se pode observar nos painéis A) e B) da Figura 3.16., a sensibilidade média diminuiu com o revestimento de Nafion® e com o aumento do número de camadas nos dois grupos de microelétrodos testados.



**Figura 3.16.** Gráficos de sensibilidade e LOD dos CFM30 (A) e C), respectivamente) e dos CFM7 (B) e D), respectivamente) obtidos com os diferentes números de camadas de Nafion® expressos em barras através de média  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ).

A sensibilidade média dos CFM30 diminuiu de 307pA/μM em *bare* para 249pA/μM com duas camadas de Nafion® e 229pA/μM com quatro camadas de Nafion®. Contudo, a diminuição da sensibilidade dos microelétrodos provocada pelos revestimentos não é estaticamente significativa (ANOVA, Pós-Teste de Bonferroni;  $p > 0,05$ ).

Na Figura 3.16. B) representam-se os valores de sensibilidade dos CFM7 à dopamina. O valor médio da sensibilidade para microelétrodos em *bare* foi de 55pA/μM, decrescendo para 46 e para 43pA/μM nos microelétrodos revestidos com duas e quatro camadas de Nafion<sup>®</sup>, respetivamente. A sensibilidade foi inferior à obtida para os CFM30 devido às dimensões mais reduzidas da superfície ativa dos microelétrodos (<700μm<sup>2</sup> nos CFM7 e de 4500 a 7500μm<sup>2</sup> para os CFM30) com a consequente diminuição da corrente medida e de um possível efeito relacionado com o tipo de fibras utilizado (Ferreira, N., 2006, Santos, R.M. [et al.], 2008). A diminuição da sensibilidade com o número de camadas de Nafion<sup>®</sup> aplicadas poderá estar associada ao aumento da espessura do filme que apesar de ser permeável à dopamina, não deixa de constituir uma barreira física limitando o acesso do analito à superfície do eletrodo. Embora tenha ocorrido um decréscimo da sensibilidade média dos CFM7 à dopamina, os resultados experimentais não são estatisticamente significativos (ANOVA, Pós-Teste de Bonferroni; p>0,05).

Estes resultados estão em consonância com o descrito por Gerhardt, G.A. and Hoffman, A.F. (2001) e Brazell, M.P. [et al.] (1987) e indicam que a utilização de Nafion<sup>®</sup> não diminui a sensibilidade dos microelétrodos de forma estatisticamente significativa (p>0.05).

Na Figura 3.16. C) estão representados os valores de LOD em função do número de camadas de Nafion<sup>®</sup> aplicadas aos CFM30. Nos microelétrodos em *bare* o valor médio de LOD foi <100nM, e aumentou para 200nM com 4 camadas de Nafion<sup>®</sup>, o que é superior ao valor reportado por Gerhardt, G.A. and Hoffman, A.F. (2001) (≤25nM). Estes dados apontam para a existência de uma relação entre o aumento do LOD e o número de camadas de Nafion<sup>®</sup> no microeletrodo.

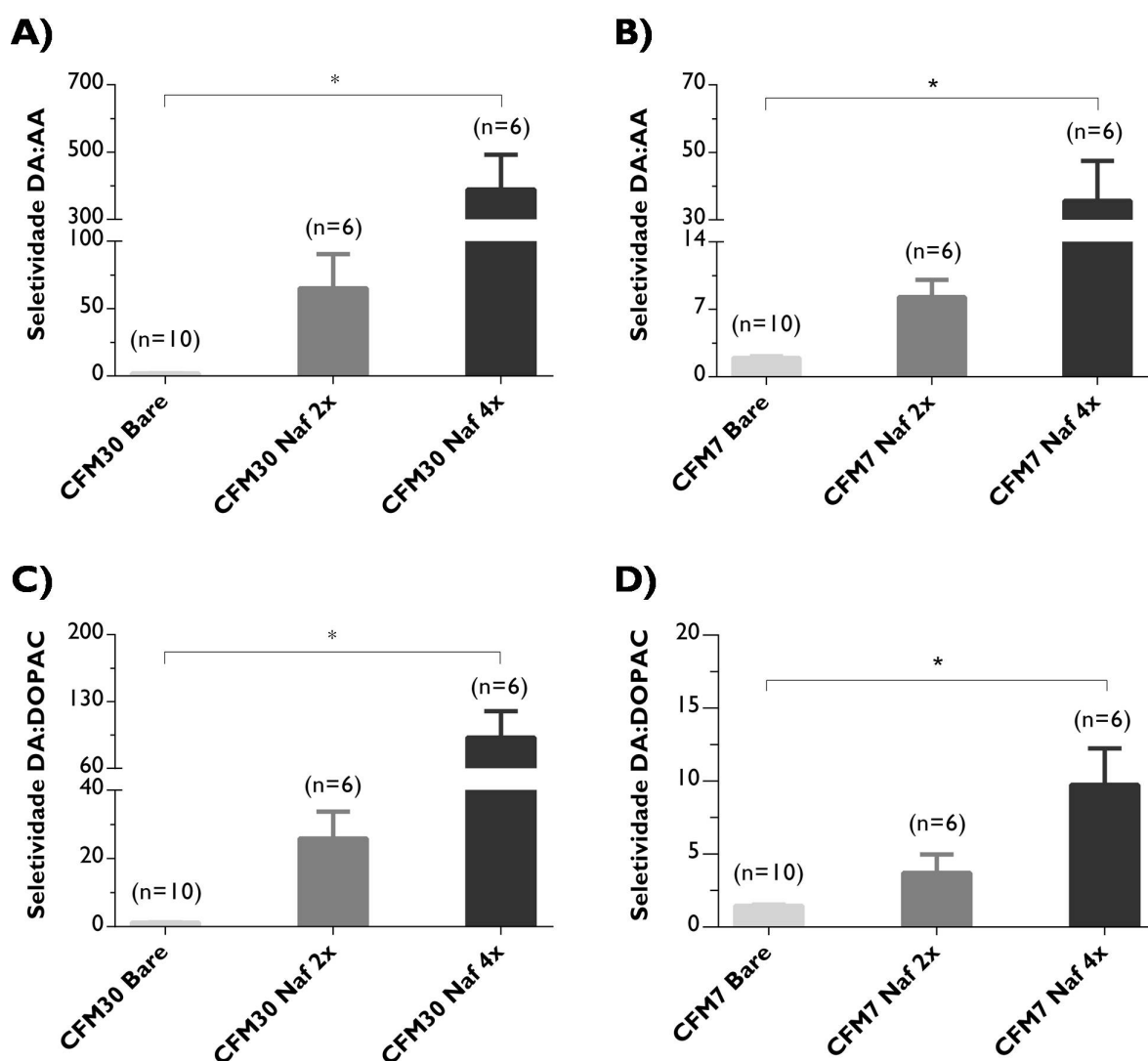
Embora com grandes variações, também o LOD registado para os CFM7 (Figura 3.16. D)) aumentou com o número de camadas de Nafion<sup>®</sup> aplicadas, de 73nM para 83 e 91nM, embora este aumento também não seja estatisticamente significativo (ANOVA, Pós-Teste de Bonferroni; p>0,05). No entanto, os valores de LOD inferiores a 100μM registados para os CFM7 contrastam com os obtidos para os CFM30 (>100 μM).

### 3.2.3.3 Seletividade

Um dos maiores problemas relacionados com a medição de moléculas eletroativas *in vivo* no cérebro utilizando métodos voltamétricos ou amperométricos está relacionado com a seletividade dos microelétrodos. Como já foi referido no capítulo da introdução, a principal razão advém do fato de existirem no espaço extracelular alguns compostos

eletroativos, cujos potenciais de oxidação são iguais ou inferiores ao da dopamina, cuja concentração no espaço extracelular é bastante inferior (na ordem dos nanomolar) à dos seus interferentes como é o caso do ascorbato e do DOPAC. Por exemplo, a concentração extracelular de dopamina no estriado de rato é de cerca de 20-30nM, bastante inferior a 20 $\mu$ M de DOPAC e 200 $\mu$ M de ascorbato na mesma região (Church, W. [et al.], 1987, Gonon, F.G. [et al.], 1984, Wiedemann, D.J. [et al.], 1990).

Um dos progressos mais marcantes nesta matéria foi a utilização de Nafion<sup>®</sup> por Gerhardt, G.A. [et al.] (1984) cuja importância já foi abordada neste trabalho (Gerhardt, G.A. and Hoffman, A.F., 2001, Wiedemann, D.J. [et al.], 1990).



**Figura 3.17.** Gráficos de seletividade ao ascorbato e ao DOPAC para os CFM30 (A) e C), respetivamente) e para os CFM7 (B) e D), respetivamente) obtidos com os diferentes números de camadas de Nafion<sup>®</sup> expressos em barras através de média  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ).

Em ambos os microelétrodos CFM30 e CFM7 o revestimento com Nafion<sup>®</sup> resultou num aumento estatisticamente significativo da seletividade (ANOVA, Pós-Teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ ). A seletividade dos CFM30 revestidos com quatro camadas de Nafion<sup>®</sup> aumentou de 2:1 nos elétrodos em *bare* para 65:1 e 389:1 nos elétrodos revestidos. No caso do CFM7, este aumento foi de 2:1 em *bare* para 8:1 e 36:1 nos elétrodos revestidos com 2 e 4 camada de Nafion<sup>®</sup>.

Estes resultados corroboram dados que foram descritos anteriormente sobre o efeito do revestimento com Nafion<sup>®</sup> (Gerhardt, G.A. and Hoffman, A.F., 2001, Gerhardt, G.A. [et al.], 1984, Santos, R.M. [et al.], 2008). Na Tabela 5 comparam-se os valores de seletividade ao ascorbato e DOPAC obtidos neste trabalho com os valores reportados na literatura.

**Tabela 5** - Comparação dos valores de seletividade obtidos com outros presentes na literatura.

	CFM30	Brazell et al, 1987	Weidmann et al, 1990	Gerhardt et Hoffman, 2001
<b>DA:DOPAC</b>	92	>100	480	2882
<b>DA:AA</b>	389	>1000	1300	4071

Em todos os trabalhos indicados foram utilizados microelétrodos de fibra de carbono e o Nafion<sup>®</sup> como revestimento. No entanto, nos diversos trabalhos foram utilizados diferentes tipos e diâmetros de fibras de carbono, exceção feita no trabalho de Gerhardt, G.A. and Hoffman, A.F. (2001) no qual os autores utilizaram microelétrodos de fibra de carbono de 30 $\mu$ m de diâmetro da Textron Systems Divisions, E.U.A., aparentemente similar à fibra de carbono utilizada neste trabalho da marca Specialty Materials Inc, E.U.A.. Contudo, os autores utilizaram 5 camadas do revestimento com secagem a 200°C após cada revestimento.

As diferenças nos procedimentos utilizados nos trabalhos indicados na Tabela 5 dificultam a comparação dos resultados. No trabalho de Brazell, M.P. [et al.] (1987) os elétrodos foram sujeitos a pré-tratamentos por anodização a potenciais de +3,0V vs. Ag/AgCl para eletrodepositar o Nafion<sup>®</sup> na superfície ativa do elétrodo o que alterou significativamente as propriedades físico-químicas da fibra de carbono sendo a fibra usada de 30-40 $\mu$ m de diâmetro (AVCO, E.U.A.). No trabalho de Wiedemann, D.J. [et al.] (1990) foi

utilizada a fibra *Thornell P-55* de 5 $\mu$ m (Amoco Corporation, EUA) que foi revestida com 5 camadas de Nafion<sup>®</sup> 10% (ao invés de 5%) seguida de secagem por ar aquecido.

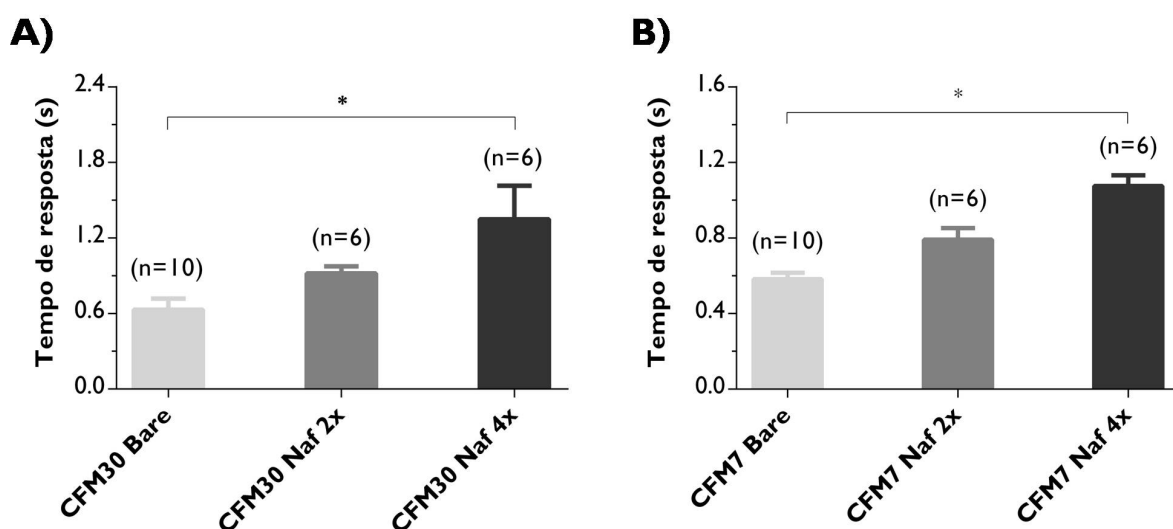
O tipo de fibra de carbono tem influência na sensibilidade, LOD e na seletividade a vários interferentes conforme foi demonstrado para CFMs desenvolvidos para medição de óxido nítrico no cérebro (Santos, R.M. [et al.], 2008), o que explica em parte a variação dos valores de seletividade apresentados na Tabela 5. Os resultados deste trabalho sugerem que a adesão mecânica dos filmes de Nafion<sup>®</sup> é mais eficiente na fibra de carbono Textron (30 $\mu$ m) do que na Cortaulds (7 $\mu$ m).

Quando se comparam os resultados da seletividade para o DOPAC e para o ascorbato, em todos os casos descritos assim como neste trabalho, verifica-se que o Nafion<sup>®</sup> tem um maior poder de exclusão sobre o ascorbato do que sobre o DOPAC.

#### **3.2.3.4 Tempo de resposta**

Os tempos de resposta ( $t_{50\%}$ ) à dopamina foram calculados tal como descrito na secção 2.7 e estão representados na Figura 3.18. Os valores registados foram de 0,65, 0,90 e de 1,35s para os CFM30 em *bare*, revestidos com 2 e 4 camadas de Nafion<sup>®</sup>, respetivamente. No caso dos CFM7 os valores obtidos foram de 0,58, 0,79 e de 1,08s. Para ambos os casos as diferenças registadas constituem diferenças estatisticamente significativas para o grau de confiança analisado pelo que se pode referir que a utilização de Nafion<sup>®</sup> faz aumentar o tempo de resposta dos microelétrodos (ANOVA, Pós-Teste de Bonferroni;  $p < 0,05$ ).

Ao contrário dos outros três parâmetros analíticos referidos anteriormente, a comparação dos tempos de resposta deverá ser feita com prudência dado que depende do sistema experimental utilizado, como por exemplo da velocidade do fluxo, do diâmetro da tubagem, dispersão do sistema e ainda das concentrações de dopamina (Ferreira, N., 2006, Kristensen, E.W. [et al.], 1987). Apesar disto, o aumento do tempo de resposta dos elétrodos está marcadamente associado à utilização de revestimentos da superfície ativa do microelétrodo, nomeadamente com Nafion<sup>®</sup>. Quanto maior for a espessura do filme, maior será o tempo de resposta, tal como acontece nos resultados aqui apresentados o que está de acordo com os resultados reportados (Brazell, M.P. [et al.], 1987, Gerhardt, G.A. and Hoffman, A.F., 2001, Kawagoe, K.T. [et al.], 1993).



**Figura 3.18.** Gráficos do tempo de resposta para a dopamina **A)** nos CFM30 e **B)** nos CFM7, obtidos com os diferentes números de camadas de Nafion<sup>®</sup> expressos em barras através de média  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ).

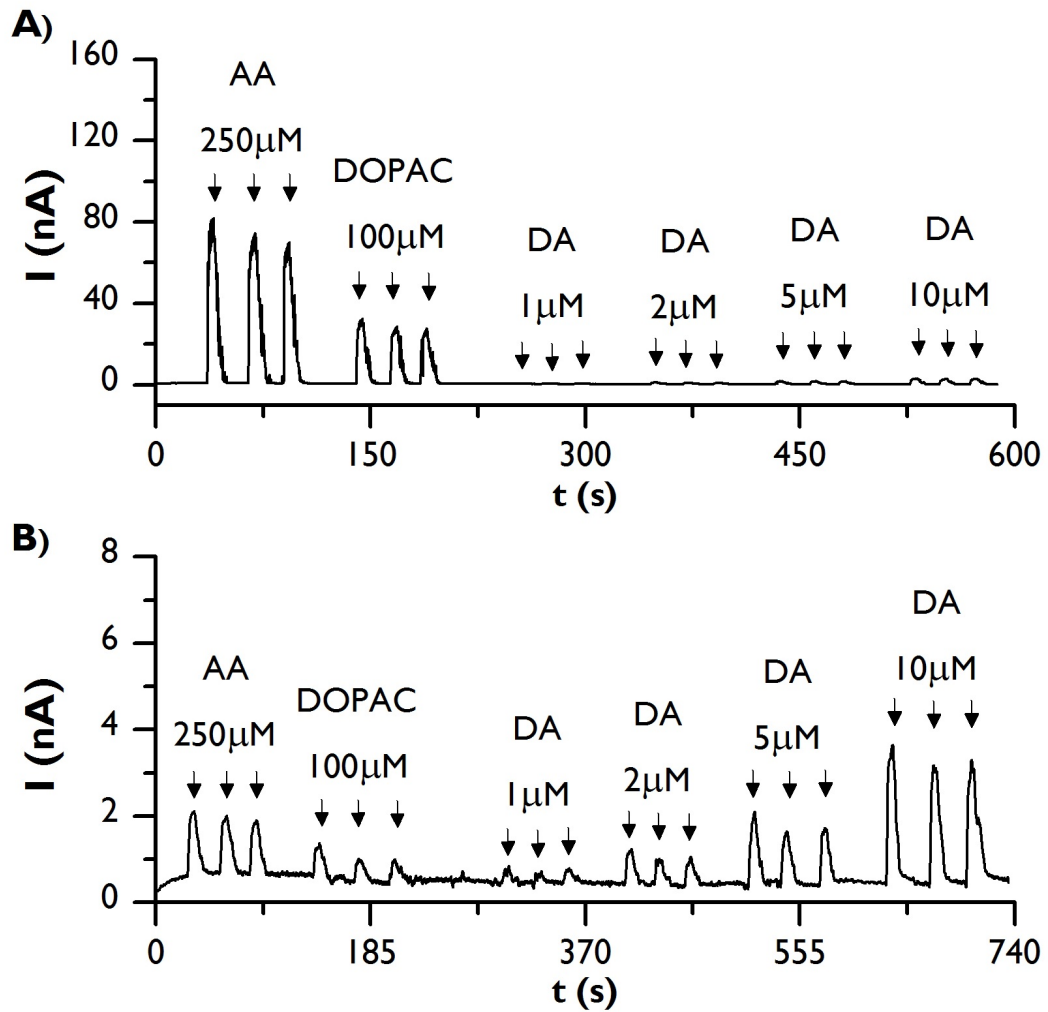
### 3.3 Avaliação analítica dos microelétrodos de fibra de carbono revestidos com o filme compósito de nanotubos de carbono em Nafion<sup>®</sup>

#### 3.3.1 Diagramas

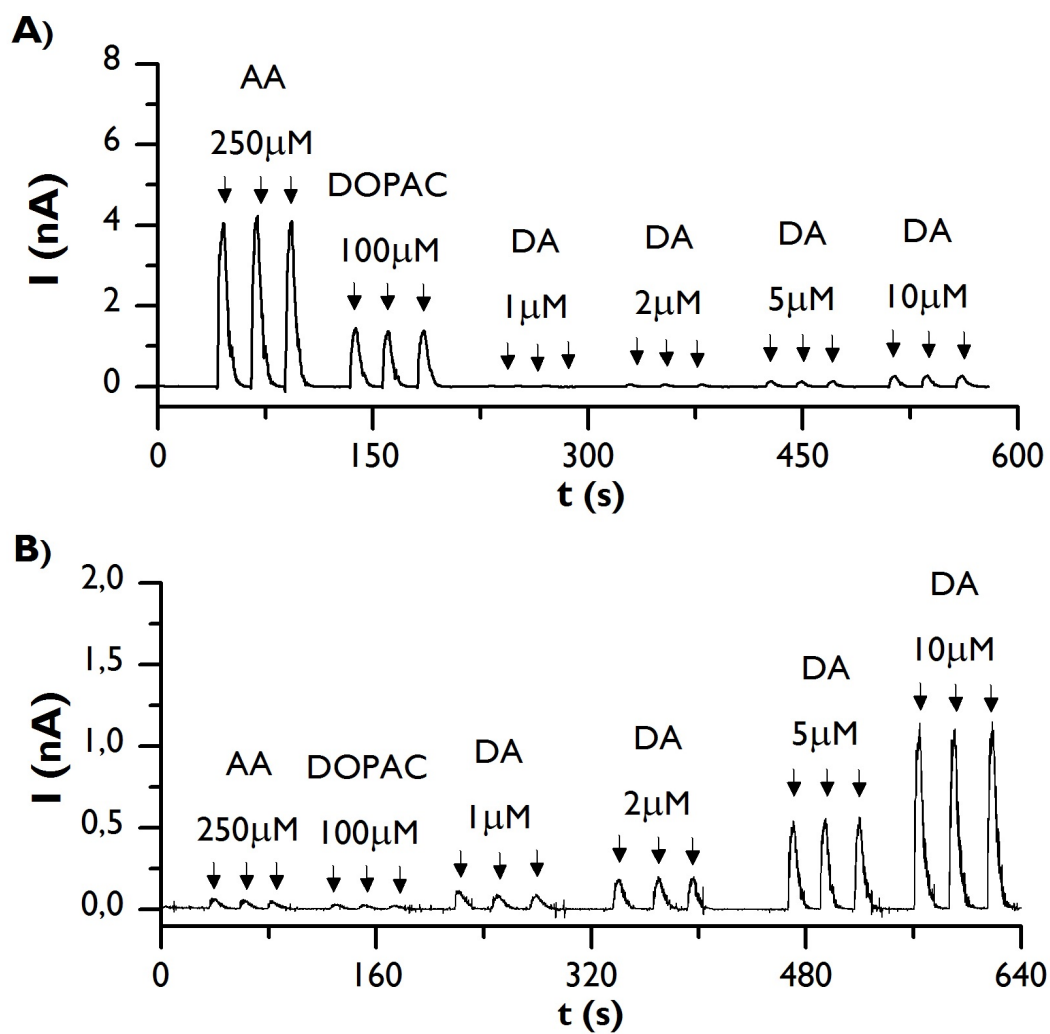
Os nanotubos de carbono são estruturas com dimensões compreendidas entre 2 e 20nm, com excelentes propriedades elétricas, mecânicas e eletroquímicas que se manifestam por exemplo no comportamento reversível da dopamina estudado por voltametria cíclica (Britto, P. [et al.], 1996, Jacobs, C.B. [et al.], 2010, Swamy, B.E. and Venton, B.J., 2007).

Um dos objetivos do presente trabalho visava a avaliação analítica dos CFM30 e CFM7 revestidos com um filme compósito de nanotubos de carbono de parede simples (*single-walled carbon nanotubes*) (SWCNTs) em Nafion<sup>®</sup> 5%.

Os diagramas correspondentes aos registos amperométricos obtidos com CFM30 e CFM7 a +0,55V vs. Ag/AgCl em *bare* (painel A) e revestidos com a suspensão de 10mg/mL de SWCNTs em Nafion<sup>®</sup> 5% (painel B) ilustram-se nas Figuras 3.19. e 3.20., respetivamente.



**Figura 3.19.** Registos amperométricos a um potencial constante de +0,55V vs. Ag/AgCl de um CFM30 **A)** em *bare*, **B)** revestido com o filme compósito de SWCNTs em Nafion® 5%. As setas indicam as injeções de ascorbato (AA), DOPAC e dopamina (DA) e respetivas concentrações.



**Figura 3.20.** Registos amperométricos a um potencial constante de +0,55V vs. Ag/AgCl de um CFM7 **A)** em *bare*, **B)** revestido com o filme composto de SWCNTs em Nafion®5%. As setas indicam as injeções de ascorbato (AA), DOPAC e dopamina (DA) e respetivas concentrações.

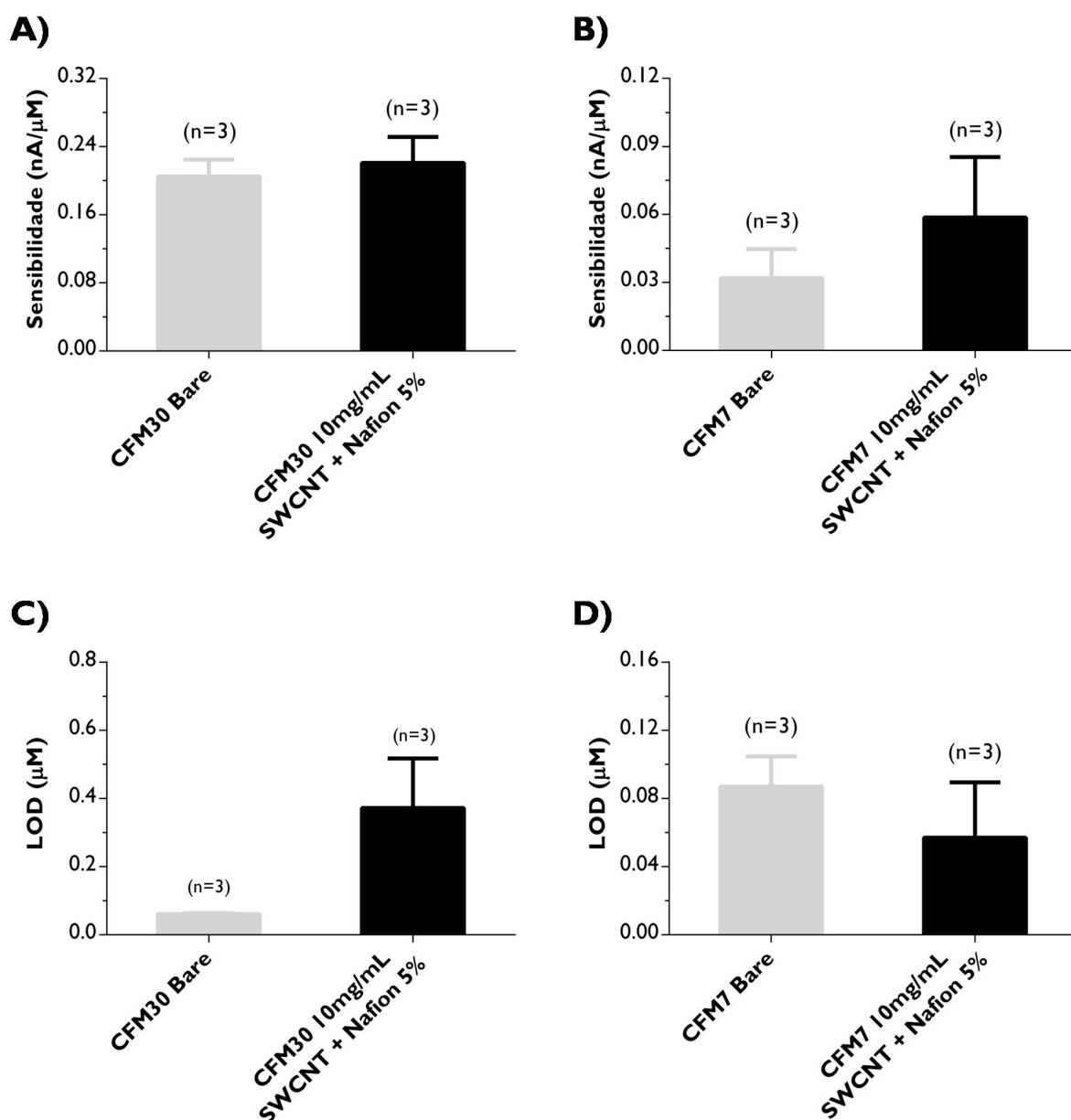


### 3.3.2 Sensibilidade e limite de detecção

Ao contrário dos CFM30 revestidos apenas com Nafion<sup>®</sup>, os microelétrodos revestidos com o filme compósito de nanotubos de carbono em Nafion<sup>®</sup> 5% demonstraram um aumento da sensibilidade em relação aos seus homólogos em *bare*, apesar deste aumento não ser estatisticamente significativo (*t* de student;  $p > 0,05$ ). Observando a Figura 3.21. A), constata-se que a sensibilidade para a dopamina deste tipo de microelétrodos aumentou muito ligeiramente de  $0,205 \text{ nA}/\mu\text{M}$  em *bare* para  $0,221 \text{ nA}/\mu\text{M}$  nos CFM30 revestidos. Este aumento era expectável dado que os nanotubos de carbono aumentam a superfície ativa do microelétrodo, o que está de acordo com o descrito na literatura (Jacobs, C.B. [et al.], 2010, Santos, R.M. [et al.], 2008, Swamy, B.E. and Venton, B.J., 2007). No entanto, o valor registado ficou abaixo do aumento de 3 vezes conseguido por Peairs, M.J. [et al.] (2011), e de 36 vezes conseguidas por Xiao, N. and Venton, B.J. (2012). Esta discrepância pode estar relacionada com os pré-tratamentos aplicados aos nanotubos e à ativação de alguns grupos presentes na sua superfície (Jacobs, C.B. [et al.], 2010, Peairs, M.J. [et al.], 2011, Xiao, N. and Venton, B.J., 2012).

À semelhança destes últimos, a sensibilidade dos CFM7 revestidos com nanotubos de carbono aumentou em relação aos mesmos elétrodos em *bare* (Figura 3.21. B). A sensibilidade para a dopamina aumentou de 32 para  $59 \text{ pA}/\mu\text{M}$  o que constitui um aumento de quase 100%. Tal como nos CFM30, este aumento pode ser explicado pelo aumento da área de superfície ativa dos elétrodos provocado pela deposição dos nanotubos de carbono (Santos, R.M. [et al.] (2008). A sensibilidade foi cerca de 60% superior à obtida por Peairs, M.J. [et al.] (2011) para nanotubos de carbono não funcionalizados, todavia inferiores aos aumentos conseguidos em trabalhos que envolveram a funcionalização dos nanotubos de carbono (Xiao, N. and Venton, B.J., 2012).

De referir que o aumento de sensibilidade registado indica apenas que o filme compósito de nanotubos pode favorecer os elétrodos em termos de sensibilidade, já que estes resultados não são estatisticamente significativos (*t* de student;  $p > 0,05$ ). Neste caso, a falta de robustez estatística poderá estar relacionada com o baixo número de microelétrodos testados ( $n=3$ ).



**Figura 3.21.** Gráficos de sensibilidade e LOD dos CFM30 (**A**) e **C**), respetivamente) e dos CFM7 (**B**) e **D**), respetivamente) obtidos em *bare* e com o revestimento de nanotubos de carbono expressos em barras através de média  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ).

Os valores de LOD obtidos com CFM30 aumentaram de  $61\mu\text{M}$  em *bare* para  $372\mu\text{M}$  com o revestimento do filme compósito em análise. Apesar do ligeiro aumento na sensibilidade, o enorme aumento do ruído na corrente de *background* foi determinante no aumento do LOD.

Experimentalmente, os resultados obtidos com estes elétrodos não corroboram o descrito por Jacobs, C.B. [et al.] (2010) onde os autores associam a utilização de nanotubos com a diminuição do LOD. Este facto pode estar associado à utilização de uma elevada concentração de nanotubos neste trabalho o que provoca uma consequente deposição

excessiva na superfície dos elétrodos analisados o que leva a uma elevada corrente de *background*.

Já nos CFM7 o LOD melhorou, passando de 87nM para 57nM o que se pode dever ao grande aumento da sensibilidade dos microelétrodos. Este caso difere dos CFM30 revestidos com SWCNT e Nafion<sup>®</sup> 5% porque o aumento da sensibilidade verificada nestes últimos é bastante inferior ao registado para os CFM7, e ainda porque o desvio padrão da linha de base no caso dos CFM7 é menor. Esta diminuição, embora não sendo estatisticamente significativa, indica que a utilização dos nanotubos pode melhorar o LOD, tal como foi descrito anteriormente (Ferreira, N. [et al.], 2013, Jacobs, C.B. [et al.], 2010).

### **3.3.3 Seletividade**

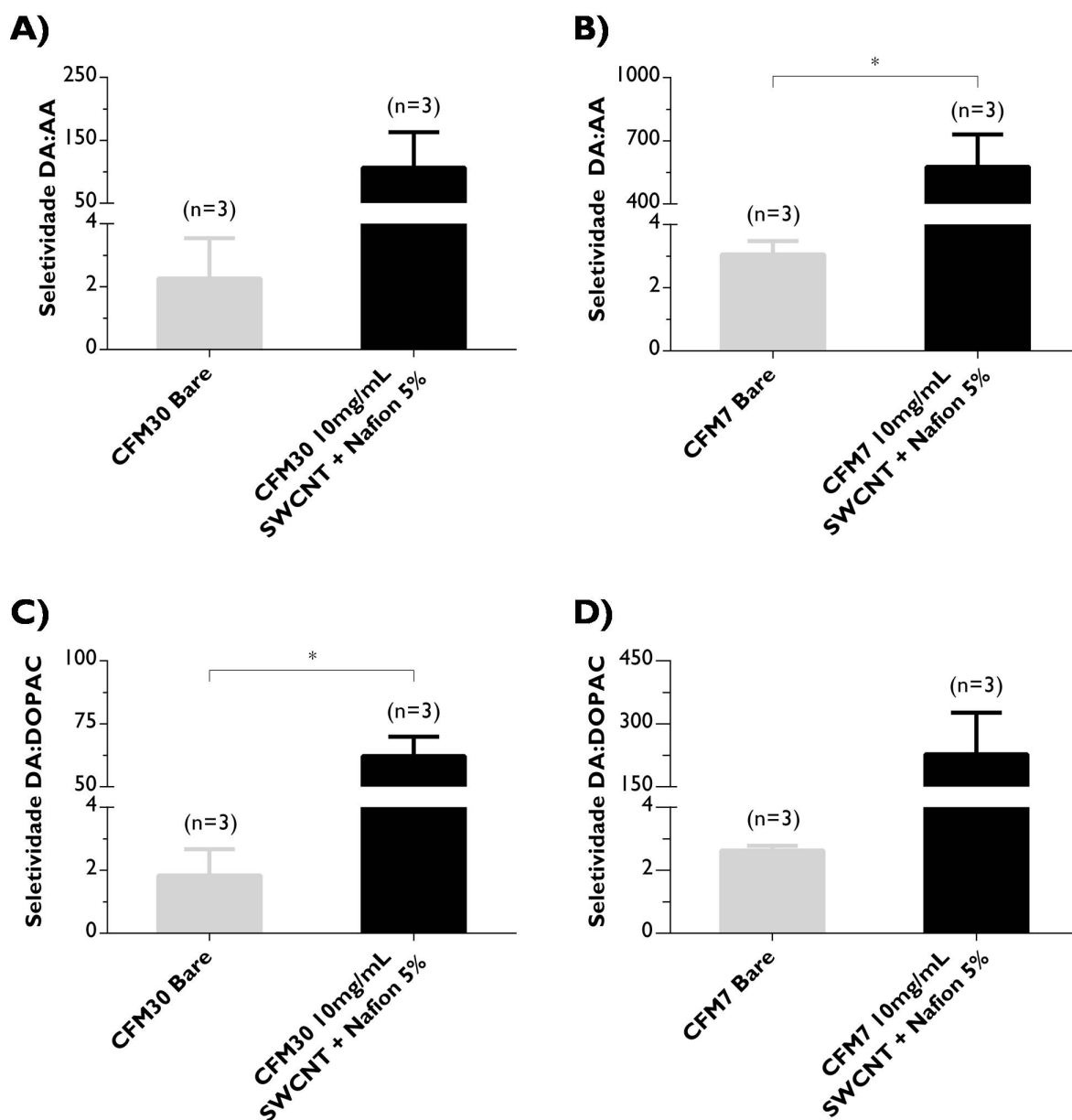
Como já foi referido neste trabalho, a seletividade é um parâmetro de extrema importância na deteção neuroquímica, o que justifica a avaliação deste parâmetro neste trabalho apesar de na maioria dos trabalhos publicados envolvendo nanotubos de carbono os autores deem preferência à avaliação da sensibilidade e do LOD.

Os resultados de seletividade para o ascorbato e para DOPAC estão representados na Figura 3.22.. No caso dos CFM30, houve um aumento da seletividade para o ascorbato (Figura 3.22. A)) com a utilização do filme compósito de 2,3:1 para 108:1 estatisticamente não significativo, no entanto, o aumento da seletividade para o DOPAC (Figura 3.22. C)) de 1,8:1 para 62:1 já o foi (t de student;  $p < 0,05$ ). Inversamente, nos CFM7 a seletividade para o ascorbato (Figura 3.22. B)) aumentou de 3:1 para 577:1 (t de student;  $p > 0,05$ ) e para o DOPAC aumentou de 2,6:1 para 228:1 (t de student;  $p < 0,05$ ) (Figura 3.22. D)).

Estes aumentos na seletividade dos CFM30 e CFM7 revestidos com 10mg/mL de SWCNTs em Nafion<sup>®</sup> 5% estão de acordo com as experiências nas secções anteriores relativamente ao efeito exercido pelo Nafion<sup>®</sup>, contudo, os resultados foram conseguidos com um único revestimento superando os valores de seletividade dos microelétrodos CFM30 revestidos com 2 camadas de Nafion<sup>®</sup>. Tais resultados introduzem a possibilidade de que o protocolo utilizado pode melhorar de algum modo a deposição de Nafion<sup>®</sup> na fibra de carbono.

De notar a discrepância existente entre as seletividades para o ascorbato e para o DOPAC que neste último caso diminuiu em relação ao apresentado para os CFM30 revestidos com 2 e 4 camadas de Nafion<sup>®</sup>. Esta diminuição pode estar relacionada com o

aumento da sensibilidade causada pelos nanotubos de carbono nas medições quer de dopamina quer de ascorbato (Ferreira, N. [et al.], 2013, Jacobs, C.B. [et al.], 2010).



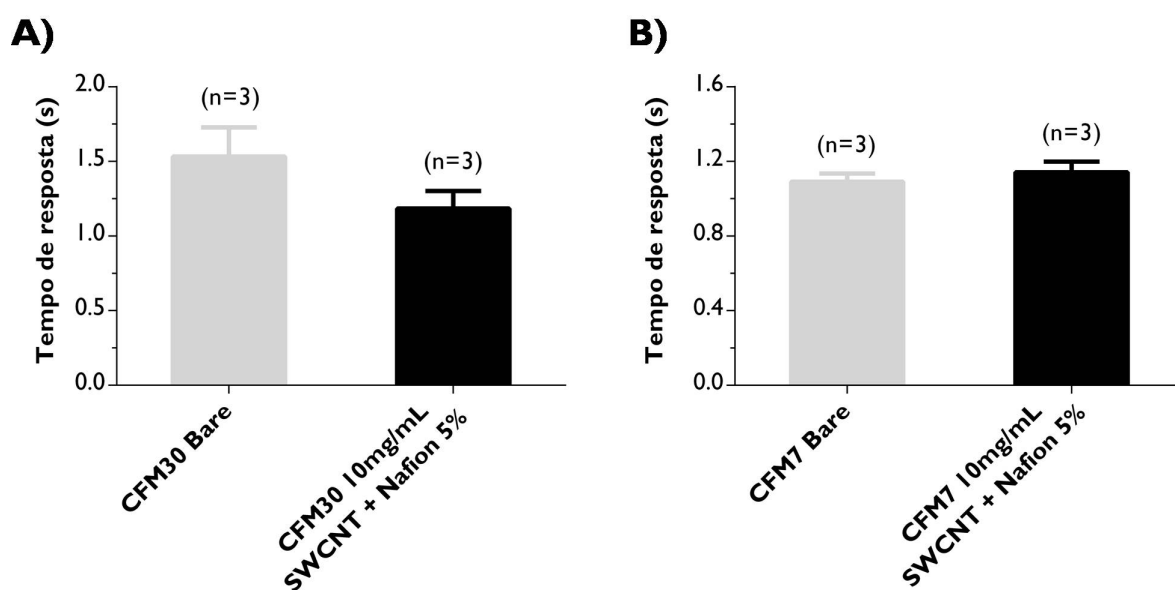
**Figura 3.22.** Gráficos de seletividade para o ascorbato e para o DOPAC para os CFM30 (A) e C), respetivamente) e para os CFM7 (B) e D), respetivamente) obtidos em *bare* e com o revestimento de nanotubos de carbono expressos em barras através de média  $\pm$  SEM (\* $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos com os CFM7 foram surpreendentes se tivermos em atenção os que foram obtidos com o revestimento apenas de Nafion<sup>®</sup>. Apesar da grande maioria das diferenças observadas não ter sido estatisticamente significativa, os incrementos de seletividade conjugados com o aumento da sensibilidade e com a diminuição do LOD são

indicadores das eventuais potencialidades que este filme compósito pode ter, o que justificaria a continuação deste estudo com vista à otimização dos procedimentos.

### 3.3.4 Tempo de resposta

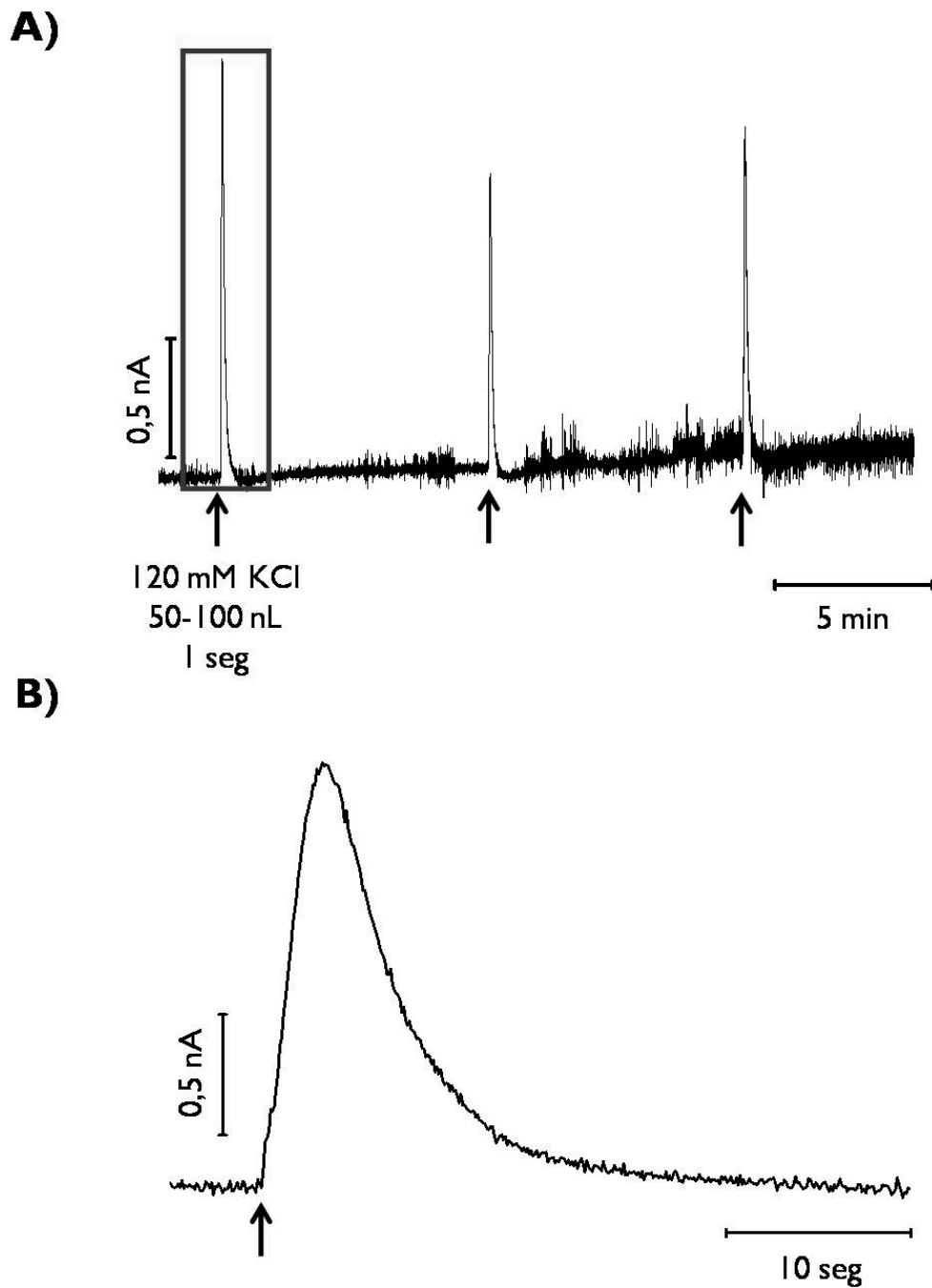
Os tempos de resposta dos CFM30 e dos CFM7 revestidos com SWCNTs em Nafion<sup>®</sup> 5% são semelhantes aos obtidos previamente com os revestimentos de Nafion<sup>®</sup> (Figura 3.23.). No caso dos CFM30 observou-se uma ligeira diminuição de 1,5 para 1,2s nos eléctrodos em *bare* e revestidos, respetivamente. No caso dos CFM7, o tempo de resposta manteve-se inalterado com o revestimento em 1,1s. O facto de não se terem registado diferenças estatisticamente significativas nos tempos de resposta nos dois grupos de eléctrodos significa que estes resultados se encontram em linha com o que está descrito na literatura (Ferreira, N. [et al.], 2013, Jacobs, C.B. [et al.], 2010, Xiao, N. and Venton, B.J., 2012).



**Figura 3.23.** Gráficos do tempo de resposta para a dopamina nos CFM30 (A) e nos CFM7 (B), obtidos em *bare* e revestidos com o filme compósito de nanotubos de carbono expressos em barras através de média  $\pm$  SEM (\* $p < 0.05$ ).

### 3.4 Medição da libertação de dopamina endógena no estriado em ratos anestesiados

Dos resultados apresentados anteriormente, considerou-se que os CFM30 com 4 camadas de Nafion<sup>®</sup> apresentariam as características eletroanalíticas mais apropriadas para a monitorização de alterações da concentração de dopamina endógena no SNC. Neste sentido, foi realizado um ensaio de prova de conceito (*“proof of concept”*) *in vivo*, num rato *wistar* anestesiado. Após cirurgia para introdução de um arranjo CFM30/micropipeta no estriado dorsal, a libertação de dopamina endógena foi induzida por aplicação de um volume reduzido (50nL) de uma solução despolarizante de KCl a 120mM. Como se pode observar na Figura 3.24., este procedimento resultou num aumento transiente da concentração de dopamina no espaço extracelular, seguida de um rápido regresso para valores basais. O tecido respondeu a estímulos sucessivos intervalados entre si em 10 minutos.



**Figura 3.24. A)** Registo amperométrico de libertação de dopamina no estriado dorsal de um rato *wistar* anestesiado. A libertação repetida de dopamina foi evocada por aplicação local de uma solução de KCl 120mM (setas). A despolarização resultante induziu um aumento transitório rápido da concentração extracelular de dopamina, que rapidamente regressa a valores basais. O tecido responde a estímulos sucessivos (intervalados em 10 minutos) com respostas idênticas. **B)** Neste painel pode observar-se em mais detalhe a região realçada com um retângulo preto em A). Esta experiência foi realizada em estreita colaboração com a Doutora Ana Ledo, no Centro de Neurociências e Biologia Celular, Universidade de Coimbra.

---

## **4 Conclusões**

---



A dopamina está envolvida em diversos processos neuronais fisiológicos e fisiopatológicos de grande relevância e, por conseguinte, a sua medição *in vivo* ou *ex vivo* com elevada resolução temporal e espacial é de grande interesse no estudo da dinâmica deste neurotransmissor. A utilização de microelétrodos de fibra de carbono (CFMs) conjugada com a utilização de técnicas eletroquímicas rápidas possibilita estas medições de forma sensível e seletiva, com um dano mínimo no tecido cerebral e em geral com elevada biocompatibilidade.

O objetivo principal deste trabalho consistiu na fabricação de microelétrodos de fibra de carbono com fibras de 7 e 30 $\mu$ m de diâmetro, na caracterização das suas propriedades eletroquímicas, na avaliação dos parâmetros analíticos em resposta à dopamina em termos da sensibilidade, limite de deteção (LOD), seletividade aos principais interferentes presentes no espaço extracelular e também quanto ao tempo de resposta, sempre com vista à sua aplicação *in* ou *ex vivo*.

Os resultados do estudo do comportamento eletroquímico da dopamina demonstraram que a reação redox é característica de um sistema quasi-reversível, no qual a reação de oxidação é controlada por adsorção para velocidades de varrimento inferiores a 50mV/s e por difusão a velocidades de varrimento acima deste valor, em ambos os tipos de microelétrodos estudados. Em contrapartida, a reação de redução é controlada exclusivamente por adsorção em toda a gama de velocidades de varrimento testada. Adicionalmente, verificou-se que os potenciais de oxidação e de redução variam linearmente e inversamente com o pH, aproximando-se dos valores teóricos de -0,059V/pH o que indica o envolvimento de um número idêntico de prótons e eletrões, i.e. dois eletrões e dois prótons.

Os voltamogramas registados por voltametria de onda quadrada mostraram um pico de oxidação a +182mV vs. Ag/AgCl nos CFM30 e de +160mV vs. Ag/AgCl nos CFM7, porém a linearidade entre a intensidade da corrente e a concentração de dopamina verificou-se apenas para as concentrações mais baixas (<2 $\mu$ M). Estes resultados sugerem que o desvio de linearidade pode estar associado à adsorção dos produtos de oxidação da dopamina na superfície da fibra de carbono.

Nas calibrações efetuadas por amperometria a um potencial de +0,55V vs. Ag/AgCl comprovou-se o efeito do Nafion<sup>®</sup> na seletividade dos elétrodos registando-se um aumento significativo da seletividade para ambos os interferentes testados (AA e DOPAC). No

---

entanto, o revestimento com Nafion<sup>®</sup> aumentou o tempo de resposta nos dois tipos de microelétrodos. Observou-se ainda uma diminuição estatisticamente não significativa da sensibilidade dos microelétrodos à dopamina e um aumento do limite de detecção.

No sentido de melhorar a sensibilidade e o LOD, utilizaram-se nanotubos de carbono explorando as propriedades eletrocatalíticas exibidas pela generalidade dos nanomateriais e porque é aparentemente mais reduzida a obstrução da superfície ativa pela adsorção de produtos de oxidação da dopamina. A sensibilidade e o LOD foram melhorados no caso dos CFM7, ao contrário do que se verificou nos CFM30 onde o LOD aumentou. O revestimento dos microelétrodos com o filme compósito de nanotubos de carbono aumentou significativamente a seletividade dos CFM30 para o DOPAC e dos CFM7 para o ascorbato quando comparados com microelétrodos não revestidos (*bare*). No entanto, a seletividade nos CFM30 foi inferior à obtida com o revestimento de quatro camadas de Nafion<sup>®</sup>. Devido à ausência de melhorias significativas da sensibilidade e do LOD em relação aos microelétrodos revestidos com Nafion<sup>®</sup>, pode concluir-se que a utilização do filme compósito carece de mais estudos tendo em vista a otimização dos procedimentos inerentes ao revestimento e às proporções de nanotubos de carbono e Nafion<sup>®</sup> utilizadas.

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho permitiu concluir que os microelétrodos de fibra de carbono fabricados com fibra de carbono de 7 e 30 $\mu$ m e revestidos com quatro camadas de Nafion<sup>®</sup>, possuem as propriedades analíticas adequadas em termos de sensibilidade, LOD, seletividade e tempo de resposta para efetuar medições de dopamina com elevada resolução temporal e espacial. Os resultados deixam assim antever a possibilidade de realização com sucesso de experiências *in vivo* e *ex vivo*, visando o estudo a dinâmica da dopamina em regiões como o *striatum* e *nucleus accumbens* onde este neurotransmissor desempenha um papel crucial no controlo motor e no circuito de recompensa do cérebro.

---

## **5 Referências Bibliográficas**

---

Adams, R. N. - In vivo electrochemical measurements in the CNS. *Prog Neurobiol*. Vol. 35. n.º 4 (1990). p. 297-311.

Bajjalieh, S. M. - Synaptic vesicle docking and fusion. *Curr Opin Neurobiol*. Vol. 9. n.º 3 (1999). p. 321-8.

Bannon, M. J. - The dopamine transporter: role in neurotoxicity and human disease. *Toxicol Appl Pharmacol*. Vol. 204. n.º 3 (2005). p. 355-60.

Beaulieu, J. M.; Gainetdinov, R. R. - The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacol Rev*. Vol. 63. n.º 1 (2011). p. 182-217.

Beaulieu, J. M.; Tirotta, E.; Sotnikova, T. D.; Masri, B.; Salahpour, A.; Gainetdinov, R. R.; Borrelli, E.; Caron, M. G. - Regulation of Akt signaling by D2 and D3 dopamine receptors in vivo. *J Neurosci*. Vol. 27. n.º 4 (2007). p. 881-5.

Beckstead, M. J.; Grandy, D. K.; Wickman, K.; Williams, J. T. - Vesicular dopamine release elicits an inhibitory postsynaptic current in midbrain dopamine neurons. *Neuron*. Vol. 42. n.º 6 (2004). p. 939-46.

Borland, L. M.; Michael, A. C. - Electrochemical Methods for Neuroscience. Boca Raton (FL): 2007.

Brazell, M. P.; Kasser, R. J.; Renner, K. J.; Feng, J.; Moghaddam, B.; Adams, R. N. - Electrocoating carbon fiber microelectrodes with Nafion improves selectivity for electroactive neurotransmitters. *J Neurosci Methods*. Vol. 22. n.º 2 (1987). p. 167-72.

Brett, CM; Brett, AM - Electrochemistry: Principles, Methods, and Applications. Oxford: Oxford University Press, 1993. 0-19-855388-9

Brett, CM; Brett, AM - Encyclopedia of electrochemistry. Ist. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. - Step and Pulse Techniques. 9783527610426

Britto, P.; Santhanan, K.; Ajayan, P. - Carbon nanotube electrode for oxidation of dopamine. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. Vol. 41. (1996). p. 121-125.

Brodal, P. - The Central Nervous System. 4th. New York: Oxford University Press, Inc., 2010. 978-0-19-538115-3

Bucher, E. S.; Wightman, R. M. - Electrochemical Analysis of Neurotransmitters. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. (2015).

Budai, D.; Hernádi, I; Mészáros, B.; Bali, Z.K.; Gulya, K. - Electrochemical responses of carbon fiber microelectrodes to dopamine in vitro and in vivo. *Acta Biologica Szegediensis*. Vol. 54. n.º 2 (2010). p. 155-160.

Calabresi, P.; Picconi, B.; Tozzi, A.; Ghiglieri, V.; Di Filippo, M. - Direct and indirect pathways of basal ganglia: a critical reappraisal. *Nat Neurosci*. Vol. 17. n.º 8 (2014). p. 1022-30.

Chakravarthy, V. S.; Joseph, D.; Bapi, R. S. - What do the basal ganglia do? A modeling perspective. *Biol Cybern*. Vol. 103. n.º 3 (2010). p. 237-53.

Chefer, V. I.; Thompson, A. C.; Zapata, A.; Shippenberg, T. S. - Overview of brain microdialysis. *Curr Protoc Neurosci*. Vol. Chapter 7. (2009). p. Unit7 I.

Chen, N.; Reith, M. E. - Structure and function of the dopamine transporter. *Eur J Pharmacol*. Vol. 405. n.º 1-3 (2000). p. 329-39.

Church, W.; Justice, J.; Neill, D. - Detecting behaviorally relevant changes in extracellular dopamine with microdialysis. *Brain Research*. Vol. 412. (1987). p. 397-399.

Ciliax, B. J.; Heilman, C.; Demchyshyn, L. L.; Pristupa, Z. B.; Ince, E.; Hersch, S. M.; Niznik, H. B.; Levey, A. I. - The dopamine transporter: immunochemical characterization and localization in brain. *J Neurosci*. Vol. 15. n.º 3 Pt I (1995). p. 1714-23.

Ciszewski, A.; Milczarek, G. - Preparation and General Properties of Chemically Modified Electrodes Based on Electrosynthesized Thin Polymeric Films Derived from Eugenol. *Electroanalysis*. Vol. 13. (2001). p. 860-867.

Corona-Avendaño, S.; Alarcón-Angeles, G.; Ramírez-Silva, M.; Rosquete-Pina, G.; Romero-Romo, M.; Palomar-Pardavé, M. - On the electrochemistry of dopamine in aqueous solution. Part I: The role of [SDS] on the voltammetric behavior of dopamine on a carbon paste electrode. *Electroanalytical Chemistry*. Vol. 609. n.º 1 (2007). p. 17-26.

Daws, L. C.; Toney, G. M. - Electrochemical Methods for Neuroscience. Boca Raton (FL): 2007. 9780849340758

Dudman, J.; Gerfen, C. - The rat 4th. London: Elsevier, Inc, 2015. - The Basal Ganglia. 978-0-12-374245-2

Elsworth, J. D.; Roth, R. H. - Dopamine synthesis, uptake, metabolism, and receptors: relevance to gene therapy of Parkinson's disease. *Exp Neurol*. Vol. 144. n.º 1 (1997). p. 4-9.

Felix, F. S.; Angnes, L. - Fast and accurate analysis of drugs using amperometry associated with flow injection analysis. *J Pharm Sci*. Vol. 99. n.º 12 (2010). p. 4784-804.

Ferreira, N. - Detecção electroquímica de óxido nítrico em fatias de hipocampo de rato com microelctrodos de fibra de carbono. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2006.

Ferreira, N.; Ledo, A; Frade, J.; Gerhardt, G.; Laranjinha, J.; Barbosa, R. M. - Electrochemical measurement of endogenously produced nitric oxide in brain slices using Nafion/o-phenylenediamine modified carbon fiber microelectrodes. *Analytica Chimica Acta*. Vol. 535. (2005). p. 1-7.

Ferreira, N.; Santos, R.; Laranjinha, J.; Barbosa, R. - Real Time In Vivo Measurement of Ascorbate in the Brain Using Carbon Nanotube-Modified Microelectrodes. *Electroanalysis*. Vol. 25. (2013). p. 1757-1763.

Friedemann, M. N.; Robinson, S. W.; Gerhardt, G. A. - o-Phenylenediamine-modified carbon fiber electrodes for the detection of nitric oxide. *Anal Chem*. Vol. 68. n.º 15 (1996). p. 2621-8.

Gardoni, F.; Bellone, C. - Modulation of the glutamatergic transmission by Dopamine: a focus on Parkinson, Huntington and Addiction diseases. *Front Cell Neurosci*. Vol. 9. (2015). p. 25.

Gerfen, C.; Bolam, J. - Handbook of Basal Ganglia Structure and Function. 1st. London: Elsevier Inc., 2010. - The Neuroanatomical Organization of the Basal Ganglia. 978-0-12-374767-9

Gerhardt, G. A.; Hoffman, A. F. - Effects of recording media composition on the responses of Nafion-coated carbon fiber microelectrodes measured using high-speed chronoamperometry. *J Neurosci Methods*. Vol. 109. n.º 1 (2001). p. 13-21.

Gerhardt, G. A.; Oke, A. F.; Nagy, G.; Moghaddam, B.; Adams, R. N. - Nafion-coated electrodes with high selectivity for CNS electrochemistry. *Brain Res.* Vol. 290. n.º 2 (1984). p. 390-5.

Gonon, F.; Cespuglio, R.; Ponchon, J. L.; Buda, M.; Jouvet, M.; Adams, R. N.; Pujol, J. F. - [In vivo continuous electrochemical determination of dopamine release in rat neostriatum]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* Vol. 286. n.º 16 (1978). p. 1203-6.

Gonon, F. G.; Navarre, F.; Buda, M. J. - In vivo monitoring of dopamine release in the rat brain with differential normal pulse voltammetry. *Anal Chem.* Vol. 56. n.º 3 (1984). p. 573-5.

Halbach, O.; Dermietzel, R - Neurotransmitters and Neuromodulators. 2nd. (s/n): Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2002. 3-527-30318-9

Han, D.; Han, T.; Shan, C.; Ivaska, A.; Niu, L. - Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid with chitosan-graphene modified electrode. *Electroanalysis.* Vol. 22. n.º 17-18 (2010). p. 2001-2008.

Harreither, W.; Trouillon, R.; Poulin, P.; Neri, W.; Ewing, A. G.; Safina, G. - Carbon nanotube fiber microelectrodes show a higher resistance to dopamine fouling. *Anal Chem.* Vol. 85. n.º 15 (2013). p. 7447-53.

Harsing Jr, L. - Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Neurotransmitter Systems. (s/n): 2008. - Dopamine and the Dopaminergic Systems of the Brain. 978-0-387-30351-2

Hawley, M. D.; Tatawawadi, S. V.; Piekarski, S.; Adams, R. N. - Electrochemical studies of the oxidation pathways of catecholamines. *J Am Chem Soc.* Vol. 89. n.º 2 (1967). p. 447-50.

Heien, M. L.; Phillips, P. E.; Stuber, G. D.; Seipel, A. T.; Wightman, R. M. - Overoxidation of carbon-fiber microelectrodes enhances dopamine adsorption and increases sensitivity. *Analyst.* Vol. 128. n.º 12 (2003). p. 1413-9.

Hervé, D.; Girault, J. - Signal transduction of dopamine receptors. *Handbook of Chemical Neuroanatomy.* Vol. 21. (2005). p. 109-151.

Hsueh, C.; Brajter-Toth, A. - Electrochemical Preparation and analytical Applications of Ultrathin Overoxidized Polypyrrole Films. *Anal Chem*. Vol. 66. (1994). p. 2458-2464.

Huffman, M. L.; Venton, B. J. - Carbon-fiber microelectrodes for in vivo applications. *Analyst*. Vol. 134. n.º 1 (2009). p. 18-24.

Huotari, M.; Santha, M.; Lucas, L. R.; Karayiorgou, M.; Gogos, J. A.; Mannisto, P. T. - Effect of dopamine uptake inhibition on brain catecholamine levels and locomotion in catechol-O-methyltransferase-disrupted mice. *J Pharmacol Exp Ther*. Vol. 303. n.º 3 (2002). p. 1309-16.

Jacobs, C. B.; Peairs, M. J.; Venton, B. J. - Review: Carbon nanotube based electrochemical sensors for biomolecules. *Anal Chim Acta*. Vol. 662. n.º 2 (2010). p. 105-27.

Jacobs, C. B.; Vickrey, T.; Venton, B. J. - Neurotransmission, Measuring Chemical Events. 1st. [s.l.]: Wiley, 2009. 978-0-471-75477-0

John, C. E.; Jones, S. R. - Electrochemical Methods for Neuroscience. Boca Raton (FL): 2007. Disponível em WWW: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204393>>.Cap. - Fast Scan Cyclic Voltammetry of Dopamine and Serotonin in Mouse Brain Slices. 978-0-849-34075-8

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*. Vol. 387. n.º 8 (2007). p. 2793-800.

Kawagoe, K. T.; Zimmerman, J. B.; Wightman, R. M. - Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *J Neurosci Methods*. Vol. 48. n.º 3 (1993). p. 225-40.

Kelly, R. B. - Storage and release of neurotransmitters. *Cell*. Vol. 72 Suppl. (1993). p. 43-53.

Kennedy, R. T. - Emerging trends in in vivo neurochemical monitoring by microdialysis. *Curr Opin Chem Biol*. Vol. 17. n.º 5 (2013). p. 860-7.

Kissinger, P. T.; Hart, J. B.; Adams, R. N. - Voltammetry in brain tissue--a new neurophysiological measurement. *Brain Res*. Vol. 55. n.º 1 (1973). p. 209-13.



Kita, J. M.; Wightman, R. M. - Microelectrodes for studying neurobiology. *Curr Opin Chem Biol*. Vol. 12. n.º 5 (2008). p. 491-6.

Kiyatkin, E. A.; Wakabayashi, K. T.; Lenoir, M. - Physiological fluctuations in brain temperature as a factor affecting electrochemical evaluations of extracellular glutamate and glucose in behavioral experiments. *ACS Chem Neurosci*. Vol. 4. n.º 5 (2013). p. 652-65.

Koester, J.; Siegelbaum, S. - Principles of Neural Science. New York: 2000. - Membrane Potential and the Passive Electrical Properties of the Neuron. 978-0-07-181001-2

Kristensen, E. W.; Kuhr, W. G.; Wightman, R. M. - Temporal characterization of perfluorinated ion exchange coated microvoltammetric electrodes for in vivo use. *Anal Chem*. Vol. 59. n.º 14 (1987). p. 1752-7.

Kundys, M.; Szot, K.; Rozniecka, E.; Johnsson-Niedziółka, M.; Lawrence, R.; Bull, S. D.; Marken, F.; Opallo, M. - Electrochemical determination of selected neurotransmitters at electrodes modified with oppositely charged carbon nanoparticles. *Analytical Methods*. Vol. 6. (2014). p. 7532-7539.

Lanciego, J. L.; Luquin, N.; Obeso, J. A. - Functional neuroanatomy of the basal ganglia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. Vol. 2. n.º 12 (2012). p. a009621.

Ledo, A.; Barbosa, R. M.; Frade, J.; Laranjinha, J. - Nitric oxide monitoring in hippocampal brain slices using electrochemical methods. *Methods Enzymol*. Vol. 359. (2002). p. 111-25.

Ledo, A.; Barbosa, R. M.; Gerhardt, G. A.; Cadenas, E.; Laranjinha, J. - Concentration dynamics of nitric oxide in rat hippocampal subregions evoked by stimulation of the NMDA glutamate receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 102. n.º 48 (2005). p. 17483-8.

Ledo, A.; Frade, J.; Barbosa, R. M.; Laranjinha, J. - Nitric oxide in brain: diffusion, targets and concentration dynamics in hippocampal subregions. *Mol Aspects Med*. Vol. 25. n.º 1-2 (2004). p. 75-89.

Liu, Y.; Huang, J.; Hou, H.; You, T. - Simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid with electrospun carbon nanofibers modified electrode. *Electrochemistry Communications*. Vol. 10. (2008). p. 1431-1434.

Llaudet, E.; Botting, N. P.; Crayston, J. A.; Dale, N. - A three-enzyme microelectrode sensor for detecting purine release from central nervous system. *Biosens Bioelectron*. Vol. 18. n.º 1 (2003). p. 43-52.

Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. - Molecular Cell Biology. 4th. New York: W. H. Freeman, 2000. 0-7167-3136-3

Matsuda, W.; Furuta, T.; Nakamura, K. C.; Hioki, H.; Fujiyama, F.; Arai, R.; Kaneko, T. - Single nigrostriatal dopaminergic neurons form widely spread and highly dense axonal arborizations in the neostriatum. *J Neurosci*. Vol. 29. n.º 2 (2009). p. 444-53.

Matsumoto, M.; Weickert, C. S.; Akil, M.; Lipska, B. K.; Hyde, T. M.; Herman, M. M.; Kleinman, J. E.; Weinberger, D. R. - Catechol O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience*. Vol. 116. n.º 1 (2003). p. 127-37.

Michael, A.; Borland, L. - Electrochemical Methods for Neuroscience. 1. Boca Raton: CRC Press, 2007. 0-8493-4075-6

Missale, C.; Nash, S. R.; Robinson, S. W.; Jaber, M.; Caron, M. G. - Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. Vol. 78. n.º 1 (1998). p. 189-225.

Mitala, J.J.; Michael, A.C. - Improving the performance of electrochemical microsensors based on enzymes entrapped in a redox hydrogel. *Anal Chem*. Vol. 556. (2006). p. 326-332.

Morgan, P. - Carbon Fibers and Their Composites. 1st. Boca Raton: CRC Press, 2005. 0-8247-0983-7

Nestler, E.; Hyman, S.; Malenka, R. - Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience. 2009. 0-07-148127-3

Neve, K. A.; Seamans, J. K.; Trantham-Davidson, H. - Dopamine receptor signaling. *J Recept Signal Transduct Res*. Vol. 24. n.º 3 (2004). p. 165-205.

Nguyen, M. D.; Venton, B. J. - Fast-scan Cyclic Voltammetry for the Characterization of Rapid Adenosine Release. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. Vol. 13. (2015). p. 47-54.

Nikolaus, S.; Antke, C.; Kley, K.; Poeppel, T. D.; Hautzel, H.; Schmidt, D.; Muller, H. W. - Investigating the dopaminergic synapse in vivo. I. Molecular imaging studies in humans. *Rev Neurosci.* Vol. 18. n.º 6 (2007). p. 439-72.

Olanow, C.; Stocchi, F.; Lang, A. - Parkinson's Disease: Non-Motor and Non-Dopaminergic Features. Ist. UK: Blackwell Publishing Ltd, 2011. - The Dopaminergic and Non-Dopaminergic Features of Parkinson's Disease. 978-1-4051-9185-2

Patel, A. N.; Tan, S. Y.; Miller, T. S.; Macpherson, J. V.; Unwin, P. R. - Comparison and reappraisal of carbon electrodes for the voltammetric detection of dopamine. *Anal Chem.* Vol. 85. n.º 24 (2013). p. 11755-64.

Paxinos, G.; Watson, C. - The rat Brain in Stereotaxic Coordinates. China: Elsevier Inc., 2007. 978-0-12-374121-9

Peairs, M. J.; Ross, A.; Venton, B. J. - Comparison of Nafion- and overoxidized polypyrrole-carbon nanotube electrodes for neurotransmitter detection. *Analytical Methods.* Vol. 3. (2011). p. 2379-2386.

Perez, X. A.; Andrews, A. M. - Chronoamperometry to determine differential reductions in uptake in brain synaptosomes from serotonin transporter knockout mice. *Anal Chem.* Vol. 77. n.º 3 (2005). p. 818-26.

Perl, D. - Parkinson's Disease: Non-Motor and Non-Dopaminergic Features. Ist. UK: Blackwell Publishing Ltd, 2011. - Neuropathologic Involvement of the Dopaminergic Neuronal Systems in Parkinson's Disease. 978-1-4051-9185-2

Perry, M.; Li, Q.; Kennedy, R. T. - Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters. *Anal Chim Acta.* Vol. 653. n.º 1 (2009). p. 1-22.

Peters, J. L.; Miner, L. H.; Michael, A. C.; Sesack, S. R. - Ultrastructure at carbon fiber microelectrode implantation sites after acute voltammetric measurements in the striatum of anesthetized rats. *J Neurosci Methods.* Vol. 137. n.º 1 (2004). p. 9-23.

Pihel, K.; Walker, Q. D.; Wightman, R. M. - Overoxidized polypyrrole-coated carbon fiber microelectrodes for dopamine measurements with fast-scan cyclic voltammetry. *Anal Chem.* Vol. 68. n.º 13 (1996). p. 2084-9.

Ping, J.; Wu, J.; Wang, Y.; Ying, Y. - Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using high-performance screen-printed graphene electrode. *Biosens Bioelectron*. Vol. 34. n.º 1 (2012). p. 70-76.

Ponchon, J. L.; Cespuglio, R.; Gonon, F.; Jouvét, M.; Pujol, J. F. - Normal pulse polarography with carbon fiber electrodes for in vitro and in vivo determination of catecholamines. *Anal Chem*. Vol. 51. n.º 9 (1979). p. 1483-6.

Purves, D.; Augustine, G.; Fitzpatrick, D.; Katz, L.; LaMantia, A.; MaNamara, J.; Williams, S. - Neuroscience. Sunderland: Sinauer Associates, 2001. 10: 0-87893-742-0

Rice, M. E.; Patel, J. C. - Somatodendritic dopamine release: recent mechanistic insights. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. Vol. 370. n.º 1672 (2015).

Robinson, D. L.; Hermans, A.; Seipel, A. T.; Wightman, R. M. - Monitoring rapid chemical communication in the brain. *Chem Rev*. Vol. 108. n.º 7 (2008). p. 2554-84.

Robinson, D. L.; Wightman, R. M. - Electrochemical Methods for Neuroscience. Boca Raton (FL): 2007. 978-0-849-34075-8

Santos, R. M.; Lourenco, C. F.; Piedade, A. P.; Andrews, R.; Pomerleau, F.; Huettl, P.; Gerhardt, G. A.; Laranjinha, J.; Barbosa, R. M. - A comparative study of carbon fiber-based microelectrodes for the measurement of nitric oxide in brain tissue. *Biosens Bioelectron*. Vol. 24. n.º 4 (2008). p. 704-9.

Santos, R. M.; Rodrigues, M. S.; Laranjinha, J.; Barbosa, R. M. - Biomimetic sensor based on hemin/carbon nanotubes/chitosan modified microelectrode for nitric oxide measurement in the brain. *Biosens Bioelectron*. Vol. 44. (2013). p. 152-9.

Sasso, L.; Heiskanen, A.; Diazi, F.; Dimaki, M.; Castillo-Leon, J.; Vergani, M.; Landini, E.; Raiteri, R.; Ferrari, G.; Carminati, M.; Sampietro, M.; Svendsen, W. E.; Emneus, J. - Doped overoxidized polypyrrole microelectrodes as sensors for the detection of dopamine released from cell populations. *Analyst*. Vol. 138. n.º 13 (2013). p. 3651-9.

Schultz, K. N.; Kennedy, R. T. - Time-resolved microdialysis for in vivo neurochemical measurements and other applications. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif)*. Vol. 1. (2008). p. 627-61.

Schwartz, J.; Javitch, J. - Neurotransmitters. New York: 2000. - Principles of Neural Science. 978-0-07-181001-2

Sesack, S. R.; Hawrylak, V. A.; Matus, C.; Guido, M. A.; Levey, A. I. - Dopamine axon varicosities in the prelimbic division of the rat prefrontal cortex exhibit sparse immunoreactivity for the dopamine transporter. *J Neurosci*. Vol. 18. n.º 7 (1998). p. 2697-708.

Siegelbaum, S.; Kandel, E. - Principles of Neural Science. New York: 2000. - Signaling at the Nerve-Muscle Synapse: Directly Gated Transmission. 978-0-07-181001-2

Sossi, V.; de la Fuente-Fernandez, R.; Schulzer, M.; Troiano, A. R.; Ruth, T. J.; Stoessl, A. J. - Dopamine transporter relation to dopamine turnover in Parkinson's disease: a positron emission tomography study. *Ann Neurol*. Vol. 62. n.º 5 (2007). p. 468-74.

Stulík, K.; Amatore, C.; Holub, K.; Mecersek, V.; Kutner, W. - Microelectrodes. Definitions, characterization, and applications. *Pure Appl. Chem*. Vol. 72. n.º 8 (2000). p. 1483-1492.

Sudhof, T. C.; Rizo, J. - Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Vol. 3. n.º 12 (2011).

Sujaritvanichpong, S.; Aoki, K.; Tokuda, K.; Matsuda, H. - Electrochemical behavior of fopamine at carbon fiber electrodes. *Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. Vol. 198. n.º 1 (1986). p. 195-203.

Swamy, B. E.; Venton, B. J. - Carbon nanotube-modified microelectrodes for simultaneous detection of dopamine and serotonin in vivo. *Analyst*. Vol. 132. n.º 9 (2007). p. 876-84.

Takmakov, P.; Zachek, M. K.; Keithley, R. B.; Walsh, P. L.; Donley, C.; McCarty, G. S.; Wightman, R. M. - Carbon microelectrodes with a renewable surface. *Anal Chem*. Vol. 82. n.º 5 (2010). p. 2020-8.

Turner, A. P. - Biosensors: sense and sensibility. *Chem Soc Rev*. Vol. 42. n.º 8 (2013). p. 3184-96.

Vaughan, R. A.; Foster, J. D. - Mechanisms of dopamine transporter regulation in normal and disease states. *Trends Pharmacol Sci*. Vol. 34. n.º 9 (2013). p. 489-96.

Venton, B. J.; Zhang, H.; Garris, P. A.; Phillips, P. E.; Sulzer, D.; Wightman, R. M. - Real-time decoding of dopamine concentration changes in the caudate-putamen during tonic and phasic firing. *J Neurochem.* Vol. 87. n.º 5 (2003). p. 1284-95.

Wang, Z.; Liu, J.; Liang, Q.; Wang, Y.; Luo, G. - Carbon nanotube-modified electrodes for the simultaneous determination of dopamine and ascorbic acid. *Analyst.* Vol. 127. n.º 5 (2002). p. 653-8.

Watson, C. J.; Venton, B. J.; Kennedy, R. T. - In vivo measurements of neurotransmitters by microdialysis sampling. *Anal Chem.* Vol. 78. n.º 5 (2006). p. 1391-9.

Wayment, H. K.; Schenk, J. O.; Sorg, B. A. - Characterization of extracellular dopamine clearance in the medial prefrontal cortex: role of monoamine uptake and monoamine oxidase inhibition. *J Neurosci.* Vol. 21. n.º 1 (2001). p. 35-44.

Weimer, R. M.; Richmond, J. E. - Synaptic vesicle docking: a putative role for the Munc18/Sec1 protein family. *Curr Top Dev Biol.* Vol. 65. (2005). p. 83-113.

Wiedemann, D. J.; Basse-Tomusk, A.; Wilson, R. L.; Rebec, G. V.; Wightman, R. M. - Interference by DOPAC and ascorbate during attempts to measure drug-induced changes in neostriatal dopamine with Nafion-coated, carbon-fiber electrodes. *J Neurosci Methods.* Vol. 35. n.º 1 (1990). p. 9-18.

Wightman, R. M. - Detection technologies. Probing cellular chemistry in biological systems with microelectrodes. *Science.* Vol. 311. n.º 5767 (2006). p. 1570-4.

Wightman, R. M. - Monitoring molecules: insights and progress. *ACS Chem Neurosci.* Vol. 6. n.º 1 (2015). p. 5-7.

Wilson, C. - Synaptic Organization of the Brain. 5th. New York: Oxford University Press, 2004. - Basal Ganglia. 0-19-515956-X

Wilson, G. S.; Johnson, M. A. - In-vivo electrochemistry: what can we learn about living systems? *Chem Rev.* Vol. 108. n.º 7 (2008). p. 2462-81.

Xiao, N.; Venton, B. J. - Rapid, sensitive detection of neurotransmitters at microelectrodes modified with self-assembled SWCNT forests. *Anal Chem.* Vol. 84. n.º 18 (2012). p. 7816-22.

Xu, Z.; Chen, X.; Qu, X.; Dong, S. - Electrocatalytic oxidation of catechol at multi-walled carbon nanotubes modified electrode. *Electroanalysis*. Vol. 16. n.º 8 (2004). p. 684-687. 1040-0397

Zahniser, N. R.; Larson, G. A.; Gerhardt, G. A. - In vivo dopamine clearance rate in rat striatum: regulation by extracellular dopamine concentration and dopamine transporter inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther*. Vol. 289. n.º 1 (1999). p. 266-77.

Zhang, Y.; Pan, Y.; Su, S.; Zhang, L.; Li, S.; Shao, M. - A Novel Functionalized Single-Wall Carbon Nanotube Modified Electrode and Its Application in Determination of Dopamine and Uric Acid in the Presence of High Concentrations of Ascorbic Acid. *Electroanalysis*. Vol. 19. n.º 16 (2007). p. 1695-1701.

Zhao, Y.; Gao, Y.; Zhan, D.; Liu, H.; Zhao, Q.; Kou, Y.; Shao, Y.; Li, M.; Zhuang, Q.; Zhu, Z. - Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid and uric acid by a carbon nanotubes-ionic liquid gel modified electrode. *Talanta*. Vol. 66. n.º 1 (2005). p. 51-57.