

## MONITORAMENTO DE EPINEFRINA, NOREPINEFRINA E TIROSINA A PARTIR DE CHIP SENSORES ELETROQUÍMICOS DE LIG MODIFICADO, PARA ANÁLISES RÁPIDAS

LUCAS M. GONÇALVES<sup>1</sup>; BRUNO V. LOPES<sup>2</sup>; BÁRBARA C. B. SAMPAIO<sup>3</sup>; GUILHERME K. MARON<sup>4</sup>; RAPHAEL C. BALBONI<sup>5</sup>; NEFTALÍ L. V. CARRENO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas– lucasmingon@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas– lopesbruno13@gmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas– carolbilhalva0022@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas– g\_maron@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas– raphael.balboni@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas– neftali@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

Os hormônios epinefrina e norepinefrina são neurotransmissores do sistema nervoso central e periférico, obtidos através do aminoácido da tirosina que sintetiza a L-Dopa. Essa por sua vez sintetiza Dopamina capaz de gerar Norepinefrina e Epinefrina (STANDAERT, 2008), sendo ainda atuante como precursor na biossíntese de diversas moléculas do corpo, incluindo as três principais catecolaminas citadas. Estas catecolaminas são as, responsáveis por serem hormônios reguladores de humor, de respostas ao estresse e de motivação (GOLDSTEIN, 1972).

A epinefrina, liberada pelo organismo a partir das glândulas suprarrenais, atua como neurotransmissor regulador de desempenho físico e mental, gerando características como aumento de frequência cardíaca, redistribuição de fluxo sanguíneo, dilatação de vias aéreas e estímulos de liberação de glicose no sangue para fornecimento de energia (RIZZA, 1980), gerando resposta rápida ao corpo, e capacidade de resposta rápida a ações de alerta, força e agilidade (LIN, 2024).

A norepinefrina é o hormônio do controle de alerta mental e regulação cardiovascular, sendo suas principais atribuições vasoconstrição, aumento de frequência cardíaca, modulação de atenção, foco e preparação para estresse com maior ênfase em controle de pressão sanguínea (FROESE, 2020). É amplamente aplicado em tratamentos de pacientes com doenças neurológicas críticas para controle da pressão e circulação sanguínea cerebral (STEINER, 2002).

De modo geral, a faixa normal de concentração de epinefrina no plasma sanguíneo está entre 8 e 32 ng/L (0,1746 nmol/L). e a faixa de norepinefrina no plasma sanguíneo está entre 29 e 185 ng/L (1,093 nmol/L) (YUI, 1980). As análises convencionais de determinação desses hormônios são agressivas ao corpo humano, com elevado custo monetário e com resultados com alto tempo de espera (MANAVALAN, 2019). Dentre as principais técnicas utilizadas, estão a, cirurgia de aplicação de eletrodo em cérebro, análises em plasma sanguíneo, e cromatografia líquida do plasma sanguíneo (LI, 2022).

Uma alternativa viável para o monitoramento de EP, NE e TY seria a aplicação de chips sensores eletroquímicos de baixo custo e capazes de realizarem análises rápidas. No entanto, a variação de concentração de hormônio, em cada fluido humano é diferente (DONG, 2020). Desse modo, foi proposta a análise em diversos fluidos produzidos sinteticamente, sendo eles: lágrimas, suor, saliva e urina, por se tratarem de coletas menos invasivas.

Diante disso, foi desenvolvido um chip sensor eletroquímico não-enzimático de baixo custo, capaz de realizar análises rápidas para detecção dos analitos EP, NE e TY em ambiente controlado, e futuramente em fluídos sintéticos. Produzido com grafeno por indução a Laser de CO<sub>2</sub>, modificado com nanotubos de carbono funcionalizados com grupos hidroxila e carboxila via drop-casting, e utilizando técnicas de voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial para obtenção de resposta do sensor.

## 2. METODOLOGIA

No processo de obtenção dos sensores foram desenvolvidos chips com 3 eletrodos, sendo eles, eletrodo de referência, eletrodo de trabalho e contra-eletrodo. O formato dos eletrodos foi definido utilizando o software Inkscape para trabalhar com imagens vetoriais. Para a obtenção dos eletrodos do chip, foi utilizado uma dupla camada de filme polimérico de poliimida (comercialmente fita Kapton®), colada em uma placa de polietileno (PE), que é submetida a gravação direta a laser (GDL) (LIN, 2014) em uma máquina de gravação a laser de CO<sub>2</sub> da marca Visutec cujo, modelo é o Router VS3020P. Este equipamento queima a fita com elevadas temperaturas (>2500 °C.) a velocidade de 100 mms<sup>-1</sup> e potência de 9% da capacidade do laser de 40 W (utilizado 3,6 W). A fita é queimada uma primeira vez, dando forma a todo sensor, e posteriormente, são aplicadas técnicas de modificação do LIG via drop-casting, na circunferência do eletrodo de trabalho. Por fim, o LIG modificado (circunferência) é queimado.

Na técnica de drop-casting, pingam-se 10 µL (microlitros), da solução de cada composto modificante da estrutura do LIG na circunferência do eletrodo de trabalho e espera-se secar em temperatura ambiente. Posteriormente é realizada uma segunda queima nas circunferências onde foi realizada a técnica de drop-casting. Baseado na literatura, foram produzidos sensores com diversos compostos para a detecção de EP e NE, dentre eles, sensores contendo LIG puro, LIG modificado com nanotubo de carbono (CNT) e LIG modificado com óxido grafeno com nanopartículas de platina (GO Pt).

Após serem queimados, os sensores são lavados com água destilada para retirada do excesso de solução no eletrodo de trabalho e secos em temperatura ambiente. Como tinta estabilizante para o eletrodo, foi utilizada uma tinta de prata cloreto de prata no eletrodo de referência. Para obtenção de uma boa interação elétrica entre eletrodos e potenciostato, foi aplicada nos 3 eletrodos uma tinta de prata supercondutora. Em seguida é utilizada cola-quente para a obtenção de uma circunferência onde serão depositados os eletrólitos de análise dos sensores eletroquímicos.

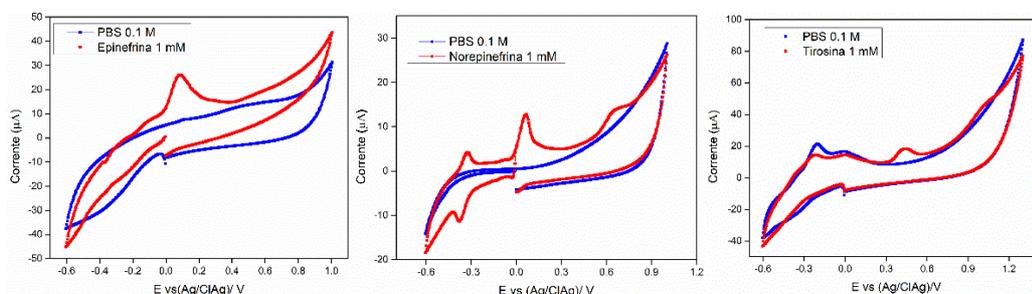
Para a solução branco das amostras dos sensores foi utilizado 500 mL de solução tampão fosfato (PBS) 0,1 M, utilizando Fosfato de Sódio MonoB. P.A. – ACS (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O) 0,1 M, Fosfato de Sódio BIB. Anidro (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 0,1 M. Os reagentes foram diluídos em água e posteriormente deixados em ultrassom por 10 minutos. Para a preparação das soluções dos analitos. foram produzidas soluções de 10 mL de epinefrina, norepinefrina e L-tirosina com concentrações de 1 mM, os reagentes foram diluídos em PBS 0,1 M, e posteriormente deixados em ultrassom por 5 minutos.

Para as análises e testes nos sensores desenvolvidos para detecção de DA, foram realizadas voltametrias cíclicas onde foi possível determinar a faixa de trabalho dos sensores eletroquímicos, observar a faixa de detecção da dopamina e as correntes geradas por essa detecção.

Nas análises de VC da epinefrina e norepinefrina foram utilizados os seguintes parâmetros: potencial de início em 0 V, faixa de potencial aplicado entre -0,6 V e 1 V com potencial final em 0 V, taxa de Varredura 0,05 V/s, passo potencial de -0,005 V. Após a aplicação da solução, foram aguardados 200 segundos para inicialização da análise. Para a L-tirosina, o potencial de início em 0 V, faixa de potencial aplicado entre -0,6 V e 1,4 V com potencial final em 0 V.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com todas as análises dos diversos sensores fabricados foi possível observar o desempenho de cada sensor nos respectivos picos oxidativos da epinefrina (-0,2 V, 0,2 V), norepinefrina (-0,4 V, 0,0 V, 0,6 V) e tirosina (0,4 V), e então determinar qual possui o melhor rendimento para a detecção de epinefrina, norepinefrina e tirosina. Como sensor usado para referência foi utilizado o sensor de LIG sem modificações para servir de grupo controle em todos os testes de obtenção de resultados pelos sensores modificados.



**Figura 1.** Gráficos de Voltametria Cíclica de epinefrina, norepinefrina e tirosina.

### 4. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram estudados chips sensores eletroquímicos para detecção de epinefrina, norepinefrina e tirosina pela técnica de grafeno induzido por laser, que se destacam em relação às técnicas de detecção comerciais e convencionais, pois sua preparação é rápida, fácil e com reduzido custo de obtenção, permitindo a fabricação em larga escala. Foi concluído a partir deste trabalho que o óxido de grafeno com nanopartículas de platina se mostrou um bom modificante para o LIG visando a detecção de epinefrina, o nanotubo de carbono funcionalizado com grupos carboxila e hidroxila para detecção de norepinefrina e o sulfato de cobre, para detecção de tirosina em sensores eletroquímicos não enzimáticos, todos apresentando um excelente desempenho de detecção de EP, NE e TY.

### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- STANDAERT, David G.; GALANTER, Joshua M. **Farmacologia da Neurotransmissão Dopaminérgica**. 4<sup>a</sup> edição. Ano 2008. Cap.12. Pg 166 a 185.
- GOLDSTEIN, M., **Enzymes Involved in the Catalysis of Catecholamine Biosynthesis**, Research Methods in Neurochemistry, pg. 317-340, 1972.
- RIZZA, R., et al., **Adrenergic Mechanisms for the Effects of Epinephrine on Glucose Production and Clearance in Man**, The Journal of clinical Investigation, n. 65, pg. 682-689, 1980.

LIN, T., et al., **Effects of resistance exercises on inhibitory control and plasma epinephrine levels: A registered report of a cross over randomized controlled trial**, *Psychophysiology*, pg. 1-24, 2024.

FROESE, L., et al., **The cerebrovascular response to norepinephrine: A scoping systematic review of the animal and human literature**, *British Pharmacological Society*, pg. 1-49, 2020.

STEINER, L., et al., **Continuous monitoring of cerebrovascular pressure reactivity allows determination of optimal cerebral perfusion pressure in patients with traumatic brain injury**, *Critical Care Medicine*, n. 30, pg. 733-738, 2002.

YUI, Y., et al., **Liquid-Chromatographic Determination of Norepinephrine and Epinephrine in Human Plasma**, *Clinical Chemistry*, n. 26, pg. 194, 1980.

MANAVALAN, S., et al., **Sonochemical synthesis of bismuth (III) oxide decorated reduced graphene oxide nanocomposite for detection of hormone (epinephrine) in human and rat serum**, *Ultrasonics – Sonochemistry*, n.51, pg. 103-110, 2019.

LI, Z. Kannan, K., **Determination of 19 Steroid Hormones in Human Serum and Urine Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry**, *Toxics*, n. 10, pg. 1-15, 2022.

DONG, Y., et al., **3D hierarchical hollow microrod via in-situ growth 2D SnS nanoplates on MOF derived Co, N co-doped carbon rod for electrochemical sensing**, *Sensors and Actuators B: Chemical*, n. 303, pg. 1-10, 2020.

LIN, J. et al. **Laser-induced porous graphene films from commercial polymers**, *Nature Communications*, [S.I.], v. 5, p. 1-8, 2014.