

Desenvolvimento de um biossensor para monitorização de acetilcolina, um biomarcador associado à Doença de Alzheimer

Ana Isabel Silva Sacramento

Novembro 2014

Orientação: Doutora Goreti Sales

Co-orientação: Doutora Felismina Moreira

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu irmão e ao meu querido avô que partiu recentemente

Agradecimentos

À Doutora Goreti Sales por toda a ajuda, disponibilidade, motivação e, principalmente, por todos os conselhos.

À Doutora Felismina Moreira pela sua incansável supervisão e constante disponibilidade e paciência.

A toda a equipa do Biomark que me ajudou e facilitou a integração.

Aos meus pais e irmão, por acreditarem em mim, por me apoiarem e pelo amor demonstrado.

Resumo

A presente dissertação teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de sensores potenciométricos com base em polímeros de impressão molecular (MIP, do inglês, *Molecularly Imprinted Polymer*) para a determinação da molécula alvo, a acetilcolina. A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor que está associado à doença de Alzheimer.

Os materiais biomiméticos desenvolvidos para a interação com a ACh foram obtidos por polimerização em *bulk*, recorrendo a uma combinação de nanotubos de carbono com monómeros de anilina, dispersos em solvente plastificante oNFOE e PVC. Para aferir sobre o efeito da impressão de ACh na resposta dos materiais MIP, foram igualmente preparados e avaliados materiais de controlo, ou seja, materiais sem impressão molecular (NIP). O controlo da constituição química destes materiais foi realizado recorrendo a Espectroscopia de Raman e Espectroscopia de Infravermelho com transformada de *Fourier* (FTIR, do inglês *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*).

Os materiais desenvolvidos foram integrados em membranas seletivas de ião, preparadas com ou sem aditivo iónico lipófilo, de carga negativa ou positiva. A avaliação das características gerais das membranas baseou-se na comparação das características dos diversos elétrodos. Estas características foram obtidas a partir de curvas de calibração, conseguidas para valores de pH diferentes. Em meio ácido, mais precisamente para pH 4, as membranas com materiais impressos e aditivo aniónico foram as que apresentaram as melhores características analíticas, quer em termos de sensibilidade ($+83,86 \text{ mV década}^{-1}$) quer em gama de linearidade (de $3,52 \times 10^{-5}$ a $1,73 \times 10^{-3} \text{ M}$). O estudo de seletividade realizado aos sensores revelou que os elétrodos cuja membrana possuía aditivo aniónico apresentavam menores valores de $\log K^{\text{POT}}$. A presença desse constituinte fez com que a seletividade aumentasse nesses mesmos elétrodos. A espécie menos interferente foi a creatina e a mais interferente a creatinina.

Os elétrodos foram, ainda, aplicados em amostras de soro sintético. A qualidade dos resultados obtidos dependeu do nível de concentração em estudo, sendo possível identificar uma região onde os resultados foram exatos e precisos. De uma forma geral, os

biossensores com MIP e aditivo aniónico apresentaram um desempenho adequado à prossecução deste estudo em amostras reais.

Palavras-chave: Polímero de impressão molecular; Acetilcolina; Neurotransmissor; Potenciometria; Eléttodos seletivos de ião.

Abstract

The main goal of this thesis was to develop and characterize potentiometric sensors, based on molecularly imprinted polymers (MIP), for the determination of Acetylcholine (ACh). Acetylcholine is a neurotransmitter associated with Alzheimer's disease.

The biomimetic materials assembled to interact with ACh were obtained by bulk polymerization, combining carbon nanotubes with monomers of aniline dispersed in PVC that was plasticized with oNFOE. To measure the effect of the imprinted sites on the response of the MIP materials, non-imprinted materials (NIP) were prepared and evaluated as control materials. The chemical characterization of these materials was made by means of Raman Spectroscopy and Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR).

The developed materials were fed into ion-selective membranes, prepared with or without lipophilic ionic additive, of positive or negative charge. The evaluation of the membranes in terms of ACh recognition was made by comparing the characteristics of the various electrodes. These characteristics were obtained from calibration curves, made in different controlled pH conditions. The best analytical performance was found in acid medium, specifically pH 4, with membranes containing MIP material and anionic additive, showing a sensitivity of + 83,86 mV decade⁻¹ from 3,52×10⁻⁵ to 1,73×10⁻³ M. The best selectivity behavior was found for membranes with an anionic additive, showing lower values of log K^{POT}. The least interfering species was creatine and the most interfering one was creatinine.

The electrodes were also applied to the analysis of synthetic serum samples. The quality of the obtained results was linked to the concentration level of ACh in the sample, and it was possible to identify a concentration range where results were accurate and precise. In general, the biosensors containing MIP and anionic additive showed a suitable behavior to extend this study to real samples.

Keywords: Molecularly imprinted polymers; Acetylcholine; Neurotransmitter; Potentiometry; Ion-selective electrodes.

1. Introdução	1
1.1. Doenças neurológicas	1
1.1.1. Doença de Alzheimer	3
1.2. Neurotransmissores	5
1.2.1. Acetilcolina	6
1.3. Detecção de acetilcolina	8
1.4. Polímeros de impressão molecular	10
1.4.1. Impressão molecular de proteínas	11
1.4.2. Síntese do MIP	12
1.4.3. MIP versus recetores naturais	13
1.4.4. Biossensores	14
1.5. Potenciometria	15
1.5.1. Considerações teóricas	17
1.5.2. Eléctrodo de Referência	17
1.5.3. Eléctrodo indicador	19
1.5.4. Características gerais da resposta potenciométrica	20
1.5.5. Seletividade	22
2. Descrição Experimental	25
2.1. Material e equipamentos utilizados	25
2.2. Reagentes e soluções	27
2.3. Preparação das soluções	27
2.4. Preparação do sensor	28
2.5. Preparação das membranas	29
2.6. Avaliação comparativa dos eléctrodos	30
2.7. Avaliação da seletividade dos eléctrodos	31
2.8. Análise das amostras	31
3. Resultados e Discussão	33
3.1. O material biomimético	33
3.2. Análise de superfície dos materiais sensores	34
3.3. Características de funcionamento dos sensores	36
3.3.1. Tampão de pH 3	37
3.3.2. Tampão de pH 4	38
3.3.3. Tampão de pH 6	40
3.3.4. Tampão de pH 8,5	41
3.3.4. Efeito do pH resumido	43
3.3.5. Tempo de resposta e estabilidade	43

3.4. Seletividade do sensor	43
3.5. Análise de Amostras	49
4. Conclusões	51
5. Referências Bibliográficas	53

Índice de Figuras

Figura 1.	Passos envolvidos na síntese e libertação de acetilcolina	7
Figura 2.	Processo de formação do polímero de impressão molecular	11
Figura 3.	Célula eletroquímica relativa à potenciometria.....	16
Figura 4.	Representação esquemática de um eletrodo de referência AgCl/Ag de dupla junção	19
Figura 5.	Características gerais da curva de calibração.....	21
Figura 6.	Representação gráfica do tempo de resposta, $t (\Delta E/\Delta t)$, de ESI	21
Figura 7.	Montagem utilizada na leitura potenciométrica	26
Figura 8.	Fotografia relativa ao eletrodo indicador	26
Figura 9.	Síntese do polímero de impressão molecular	28
Figura 10.	Eletrodos seletivos de ACh.....	29
Figura 11.	Espectros de Raman para o MIP/NIP	34
Figura 12.	Espectros de FTIR/ATR no MIP/NIP	35
Figura 13.	Curva de calibração em tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M, a pH 3	38
Figura 14.	Curva de calibração em tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M, a pH 4	39
Figura 15.	Curva de calibração em tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M, a pH 6	41
Figura 16.	Curva de calibração em tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M, a pH 8,5	42
Figura 17.	Curvas de calibração obtidas para a ACh e para cada um dos interferentes, no ESI A	45
Figura 18.	Curvas de calibração obtidas para a ACh e para cada um dos interferentes, no ESI B	46
Figura 19.	Curvas de calibração obtidas para a ACh e para cada um dos interferentes, no ESI C	47
Figura 20.	Curvas de calibração obtidas para a ACh e para cada um dos interferentes, no ESI D	47
Figura 21.	Curvas de calibração obtidas para a ACh e para cada um dos interferentes, no ESI F.....	48

Figura 22.Curvas de calibração obtidas para a ACh e para cada um dos interferentes,
no ESI G.....49

Índice de Tabelas

Tabela 1. Fatores de risco da doença de Alzheimer [5].....	4
Tabela 2. Constituintes relativos às membranas seletivas.....	30
Tabela 3. Parâmetros potenciométricos das membranas de ACh, a pH 3.....	37
Tabela 4. Parâmetros potenciométricos das membranas de ACh, a pH 4.....	39
Tabela 5. Parâmetros potenciométricos das membranas de ACh, a pH 6.....	40
Tabela 6. Parâmetros potenciométricos das membranas de ACh, a pH 8,5.....	42
Tabela 7. Limites de detecção obtidos através das curvas de calibração realizadas para a acetilcolina e para cada interferente	44
Tabela 8. Log de K^{POT} calculado pelo método das soluções mistas, em HEPES a pH 4.....	45
Tabela 9. Resultados obtidos para a análise em soro sintético	50

Índice de Acrónimos

Acetil-coA	Acetil-coenzima A
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChEIs	Inibidores de Acetilcolinesterase
APFADA	Associação Portuguesa das Famílias e Amigos dos Doentes de Alzheimer
APS	Persulfato de Amónio
CG	Cromatografia Gasosa
ChAT	Acetiltransferase
CNTs	Nanotubos de Carbono
CO	Monóxido de Carbono
DA	Doença de Alzheimer
ESI	Eléctrodo Seletivo de Ião
f.e.m.	Força eletromotriz
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FET	<i>Field-Effect Transistors</i>
FTIR	Espectrómetro de infravermelho com transformada de Fourier
GABA	<i>Gamma-AminoButyric Acid</i>
HCl	Ácido Clorídrico
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfónico
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LD	Limite de deteção
LIRL	Limite Inferior de Resposta Linear
LSRL	Limite Superior de Resposta Linear
MIP	<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>

NaOH	Hidróxido de Sódio
NIP	<i>Non-Imprinted Polymer</i>
NO	Monóxido de Azoto
NT	Neurotransmissor
OMS	Organização Mundial de Saúde
oNFOE	2-Nitrofeniloctiléter
PVC	Policloreto de vinilo
RIA	Radioimunoensaio
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
TOB	Brometo de tetraoctilamonio
THF	Tetrahidrofurano
TpCIPB	Tetrakis(4-clorofenil)borato
UV/Vis	Ultravioleta/ Visível

1. Introdução

Neste capítulo são apresentados todos os conceitos teóricos necessários à compreensão do trabalho realizado ao longo desta dissertação. Assim sendo, abordam-se aspetos relacionados com as doenças neurológicas, bem como com o biomarcador que é o objeto de estudo, a acetilcolina e a sua importância no contexto clínico das doenças neurológicas, particularmente na doença de Alzheimer. Numa fase posterior referem-se as técnicas necessárias ao desenvolvimento de um biossensor para monitorização do biomarcador alvo.

1.1. Doenças neurológicas

As doenças neurológicas são aquelas que afetam o sistema nervoso central (SNC) e o sistema nervoso periférico (SNP). Por outras palavras, são doenças que estão relacionadas com o cérebro, a espinal medula, os tecidos que constituem todo o sistema nervoso, as junções neuromusculares e os músculos. Os distúrbios do foro neurológico incluem a epilepsia, a esclerose múltipla, a enxaqueca e outras cefaleias, a doença de Alzheimer (DA) e outras demências, as doenças cerebrovasculares como o acidente vascular cerebral, doenças do movimento como a doença de Parkinson, neuropatias periféricas, entre outras [1].

Centenas de milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de problemas neurológicos, segundo um relatório divulgado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) [1]. Aproximadamente 6,2 milhões de pessoas morrem, por ano, fruto de acidentes vasculares cerebrais e mais de 80% das mortes ocorrem em países pouco desenvolvidos. Estima-se que 50 milhões de pessoas terão epilepsia e que existam em todo o mundo mais de 35 milhões de pessoas com demência, com 7,7 milhões de novos casos todos os anos, sendo a DA a causa mais comum de demência. As doenças neurológicas em geral, fruto da incapacidade cognitiva e motora a que se associam, são responsáveis pela maior contribuição para o impacto global das doenças na sociedade a nível mundial (6,3%). A DA

e outras demências são responsáveis por cerca de 20% desse contributo, segundo dados da OMS [1].

Diversos são já os fatores conhecidos para o aparecimento das doenças do foro neurológico, sendo que estas podem provocar a morte cerebral e a degeneração, em maior ou menor escala, do sistema nervoso. Como tal, é importante fazer uma abordagem às doenças neurodegenerativas, para que se possa compreender como se processa o declínio do sistema nervoso de uma pessoa afetada [2].

As doenças neurodegenerativas são aquelas em que ocorre a destruição progressiva e/ou irreversível das células que constituem o sistema nervoso, tanto o central como o periférico. A degradação das células provoca problemas a nível muscular e também cerebral, conduzindo à demência [2].

A demência é essencialmente um declínio progressivo ou crónico da função cognitiva, afetando a memória, a linguagem, a aprendizagem, a orientação e concentração, ou seja, a inteligência em geral, a perceção e o julgamento. Os indivíduos que sofrem de demência podem sofrer alterações de personalidade e veem as suas tarefas diárias e o seu envolvimento social afetado, perdendo, portanto, autonomia. De entre as demências conhecidas, salientam-se as doenças de Alzheimer, a doença de *Parkinson*, a doença de *Pick*, a doença de *Creutzfeldt-Jakob* e a doença de *Huntington* [2]. O envelhecimento da população mundial está claramente a aumentar e, conseqüentemente há um aumento na probabilidade dessa mesma população vir a sofrer de distúrbios ao nível da saúde mental ou de demência [3].

De acordo com a OMS, 5% dos homens e 6% das mulheres com mais de 60 anos sofrem de Alzheimer [3]. Esta mesma organização estimou que 35,6 milhões de pessoas vivem e lidam, atualmente, com demência. Os valores têm tendência a aumentar uma vez que, para 2030, se prevê que o valor se situe nos 65,7 e em 2050 nos 115,4 milhões de pessoas [4]. Tendo em conta não só as pessoas que sofrem de demência, mas também os prestadores de cuidados, na sua maioria familiares de doentes, o número de vidas que são afetadas aumenta abruptamente [3].

Neste contexto, o rastreio e o diagnóstico precoce são passos essenciais para que as demências sejam atempadamente diagnosticadas, contribuindo, assim, para o abrandamento da evolução da doença e o adiamento dos sintomas mais severos nos doentes [3].

A DA é a terceira causa de morte nos países desenvolvidos, sendo apenas precedida pelo cancro e pelas doenças cardiovasculares [5]. Dado que a DA é também responsável pela maioria dos casos de demência (50 a 70% dos casos), torna-se imprescindível compreender a sua definição e quais os fatores que promovem o seu aparecimento [4].

1.1.1. Doença de Alzheimer

Em 1907, na Alemanha, o Dr. Alois Alzheimer, ao estudar um caso clínico, definiu-o como uma patologia neurológica que cursa com demência, onde havia sintomas de perda de memória, dificuldade em raciocinar e perda de capacidade em realizar as tarefas diárias mais simples [5].

Numa fase inicial, os sintomas da DA podem ser impercetíveis, mas começam normalmente por lapsos de memória e dificuldade em encontrar as palavras certas para descrever os objetos do quotidiano. Estes sintomas agravam-se à medida que as células cerebrais vão morrendo e a comunicação entre elas fica alterada. Existem, ainda, outros sintomas característicos e, são eles: dificuldades de memória constantes, especialmente de acontecimentos recentes; apresentar um discurso incoerente durante uma conversa; perder o entusiasmo na realização de tarefas, anteriormente apreciadas; demorar mais tempo na execução de atividades diárias; esquecer-se de pessoas e lugares conhecidos; incapacidade para compreender questões e cumprir instruções; deterioração de competências sociais; imprevisibilidade emocional [5].

Os sintomas e a progressão da doença variam consoante as pessoas e as áreas cerebrais afetadas. As capacidades do doente podem variar de dia para dia ou mesmo dentro do próprio dia, podendo piorar em períodos de stress, fadiga e problemas de saúde. Todavia, a única certeza é a de que vai existir uma deterioração ao longo do tempo. A DA é mesmo assim, progressiva, degenerativa e, atualmente, irreversível [5].

De uma forma geral, na DA há uma deterioração progressiva e degenerativa das células presentes no cérebro. Esta inicia-se com alterações de memória para factos recentes e incapacidade para realizar as tarefas habituais. Seguidamente, avança para uma total deterioração das funções mentais, com desintegração da personalidade, problemas de comportamento e incapacidade de viver pelos seus próprios meios. Os doentes com DA acabam por morrer desorientados, podendo não reconhecer os seus familiares mais próximos [6].

A DA afeta cerca de 5-10% da população com mais de 65 anos de idade, duplicando a sua incidência a cada 5 anos. Em média, na Europa e na América do Norte, dois em cada três doentes que apresentam demência são diagnosticados com a DA [6,7].

Desde o início do século que se sabe que a DA se encontra ligada a duas características histopatológicas de lesões cerebrais: placas senis e tranças neurofibrilares, causando ambos os processos danos irreversíveis a nível neuronal. Os neurónios sofrem uma degeneração progressiva, perdendo, os doentes, gradualmente, a capacidade para pensar, compreender, falar e a sua independência. A duração média da doença é de cerca de 10 anos, com uma variação entre 3 e 20 anos [8].

Segundo a Associação Portuguesa das Famílias e Amigos dos Doentes de Alzheimer (APFADA), estima-se que, em Portugal, mais de 70000 pessoas sofram com a doença de Alzheimer, embora não exista nenhum estudo epidemiológico. Relativamente à Europa, as estimativas apontam para que em 2040, 14 milhões de cidadãos europeus terão esta doença [5].

Neste âmbito, torna-se imprescindível conhecer os vários fatores que predispõem o desenvolvimento da DA e que se listam na tabela seguinte, de acordo com a referência [5].

Tabela 1. Fatores de risco da Doença de Alzheimer.

Fatores de risco da doença de Alzheimer
Idade
Sexo
Obesidade
Diabetes
Fumador
Consumidor de álcool em demasia
Historial Familiar
Fatores Genéticos
Hipertensão
Lesões cerebrais graves ou repetidas
Indivíduos com Síndrome de Down
Níveis elevados de homocisteína
Baixo estímulo intelectual
Pouca prática de exercício físico

A idade continua a ser o principal fator de risco e, é uma doença que pode atingir ambos os sexos e a maioria das pessoas afetadas têm mais de 60 anos de idade, embora

possa também manifestar-se a partir dos 40 anos. Observa-se uma diferença significativa entre os dois sexos a partir dos 90 anos de idade, embora se acredite que esta diferença esteja relacionada com a maior esperança média de vida do sexo feminino [8].

As doenças neurodegenerativas resultam do mau funcionamento do SNC, ou seja, as células que o constituem, os neurónios, não conseguem comunicar entre si, isto é, não conseguem transmitir o seu potencial de ação. Esta comunicação é feita através de sinapses, sendo maioritariamente baseada em neurotransmissores (NTs), e uma deficiente transmissão do impulso pode estar na base do aparecimento das doenças neurológicas [9].

1.2. Neurotransmissores

Os NTs são substâncias químicas produzidas pelos neurónios e que possibilitam a comunicação entre eles. Esta comunicação dá-se ao nível das sinapses, que podem ser elétricas ou químicas [9]. Nas primeiras, menos numerosas, a transmissão do impulso dá-se pela passagem da corrente elétrica entre duas células através de estruturas chamadas junções de hiato. Já nas sinapses químicas, mais numerosas, a transmissão do impulso envolve a libertação por uma célula pré-sináptica de uma substância química chamada NT que após ligar-se à célula pós-sináptica, vai alterar o seu potencial de membrana [9].

É, portanto, nas sinapses químicas que se encontram os NTs e estas são compostas por três estruturas principais: o terminal pré-sináptico (rico em mitocôndrias e vesículas com o NT e com zonas ativas que são os locais da membrana onde preferencialmente se dá a libertação dos NT); a fenda sináptica (composta por várias proteínas) e a densidade pós-sináptica (zona da membrana pós-sináptica aposta ao terminal pós-sináptico onde se localizam recetores, proteínas e enzimas ativados pelo NT) [9].

A transmissão do impulso através de uma sinapse química envolve 4 passos principais: a síntese e armazenamento do NT; a libertação do NT; a ligação do NT aos recetores e a inativação do NT. Todos os NT, com exceção dos NT peptídicos, são sintetizados e armazenados em vesículas no terminal pré-sináptico [10].

Existem vários NTs que se encontram divididos nos seguintes grupos: (i) moléculas de baixo peso molecular (acetilcolina, por exemplo); (ii) aminas: catecolaminas (dopamina, noradrenalina, adrenalina), serotonina e histamina; (iii) aminoácidos: excitatórios

(glutamato e aspartato) e inibitórios (GABA e glicina); (iv) gases: NO e CO; (v) e peptídeos [9]. O primeiro NT a ser descoberto no cérebro foi a ACh.

1.2.1. Acetilcolina

A acetilcolina (ACh) encontra-se em vertebrados e artrópodes e é um dos principais compostos responsáveis pela sinalização do nervo para o músculo nas sinapses especializadas designadas junções neuromusculares [11]. No entanto, para além da sua função no sistema nervoso periférico (SNP), também apresenta um papel importante no sistema nervoso central (SNC), no qual está envolvida na memória e na aprendizagem [12,13].

A ACh é uma molécula simples sintetizada numa única reação, a partir de colina e da acetil-coenzima A (acetil-CoA). Além do seu baixo peso molecular, tem, ainda, um custo comercial reduzido o que faz dela uma molécula bastante utilizada em estudos científicos [10]. A inativação dos recetores musculares da ACh está na base de uma doença caracterizada por paralisia muscular (miastenia grave), enquanto o défice de ACh ao nível do SNC está na base da doença de Alzheimer. Em ambos os casos é necessário realizar estudos e apurar quais as técnicas que permitem aumentar a disponibilidade de ACh na neurotransmissão e que inibem a enzima responsável pela inativação da ACh [9].

A ACh exerce os seus efeitos através de dois tipos de recetores: os recetores muscarínicos e os recetores nicotínicos. O primeiro é assim chamado porque é ativado pela muscarina e atualmente existem cinco subtipos destes recetores designados M1, M2, M3, M4, M5, embora a atividade funcional dos dois últimos seja ainda pouco clara. Os recetores muscarínicos estão presentes no SNC e na mucosa gástrica (M1), no coração (M2) e em glândulas e músculo liso (M3). O segundo é ativado pela nicotina e encontra-se dividido em duas classes: musculares e neuronais. Os musculares são encontrados na junção neuromuscular esquelética, enquanto que os neuronais estão presentes em gânglios autónomos. Tanto os musculares como os neuronais são canais iónicos regulados por NTs como a acetilcolina e a nicotina e dependendo da sua localização diferem farmacologicamente entre si. O recetor muscular é uma estrutura pentamérica constituído por cinco subunidades, designadas alfa (α), beta (β), delta (δ), gama (γ) e épsilon (ϵ). Já os recetores neuronais são diversos e complexos, podendo ser constituídos por oito subunidades diferentes, porém o significado funcional desta diversidade permanece incerto [9].

A ACh é, quimicamente, um éster de colina e é sintetizada no terminal pré-sináptico a partir da colina e da acetil-CoA, sendo a reação catalisada pela enzima acetiltransferase (ChAT) [10]. O mecanismo do processo está representado na Figura 1.

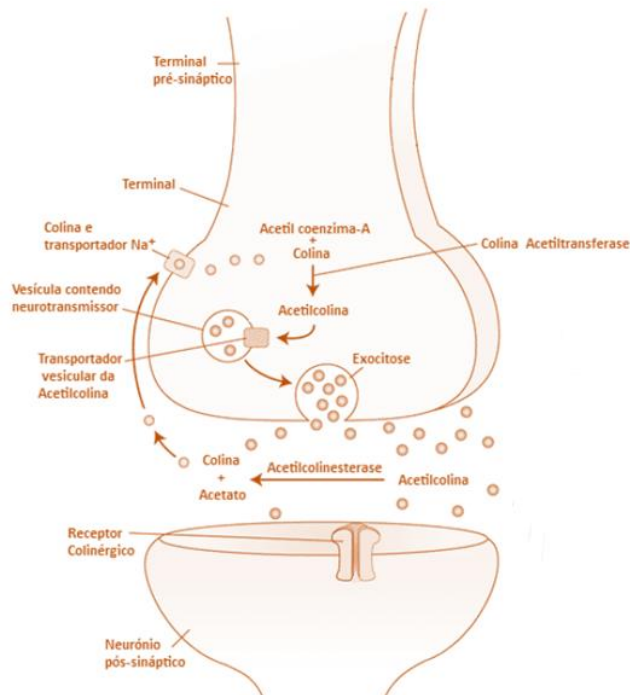


Figura 1. Passos envolvidos na síntese e liberação de acetilcolina [10]

A ACh sintetizada é armazenada em vesículas que se fundem com a membrana celular e liberta o seu conteúdo na fenda sináptica. A liberação da ACh no nervo terminal pode ser efetuada através dos canais de Ca^{2+} dependentes da voltagem, que existem no terminal nervoso. Após a abertura desses canais, o Ca^{2+} intracelular estimula a fusão das vesículas com a membrana do nervo terminal e estas libertam elevadas quantidades de ACh por excitação. As moléculas de ACh difundem-se através da fenda e ativam os receptores nicotínicos, localizados na membrana pós-sináptica. A ligação de ACh com os receptores nicotínicos resulta da difusão de Na^+ e K^+ em toda a membrana, conduzindo à sua despolarização. A ACh libertada tem um tempo de semi-vida muito curto devido à presença de grandes quantidades da enzima acetilcolinesterase (AChE) na superfície externa do nervo terminal [11,12,13]. Esta enzima degrada rapidamente a ACh em acetato e colina, o que provoca uma perda de atividade estimuladora. A colina é retomada pelo terminal pré-sináptico para nova síntese de ACh [10,14].

A descoberta inicial da neurotransmissão colinérgica levou à chamada “Hipótese Colinérgica”, elaborada por vários investigadores. Esta hipótese abrange várias funções cerebrais e disfunções, desde desordens afetivas, como a depressão, a esquizofrenia e o delírio, à regulação do sono e danos cerebrais traumáticos [15,16]. A hipótese colinérgica sugere que a perda seletiva de neurónios colinérgicos na DA resulta de um défice relativo da ACh em regiões específicas do cérebro que medeiam as funções de aprendizagem e memória, sendo a ACh necessária para as mesmas [17,18,19].

Esta primeira teoria proposta para explicar a DA, foi aquela que conduziu ao desenvolvimento das únicas drogas aprovadas, pela *Food and Drug Administration* (FDA), para o tratamento da doença leve a moderada. Assim sendo, com base nesta ideia deu-se início a uma série de ensaios clínicos, utilizando agonistas colinérgicos como a fisostigmina, inibidores da Acetilcolinesterase (AChEIs), polifenóis, entre outros [20].

1.3. Deteção de acetilcolina

Muitos métodos analíticos têm sido descritos para a determinação de acetilcolina em diferentes matrizes e a diferentes níveis de concentração. É, então, possível referenciar alguns métodos que recorrem às técnicas óticas, separativas e electroanalíticas.

Os métodos óticos envolvem uma interação da matéria com a radiação eletromagnética. Quando a radiação eletromagnética atinge a matéria analisada verifica-se uma alteração no seu comportamento, podendo ser absorvida, dispersa ou reemitida, com ou sem variação do comprimento de onda. Podem, verificar-se, igualmente, variações nas propriedades da radiação absorvida como, por exemplo, uma mudança de direção no estado de polarização. Dos fenómenos óticos fazem parte a absorção, emissão, difração, reflexão e polarização, em toda a gama do espectro eletromagnético. Alguns exemplos deste tipo de método são a fluorimetria, colorimetria e espectrofotometria UV/VIS [21]. Para a determinação de ACh é possível encontrar, na literatura, a colorimetria que se destaca pela sua simplicidade e rapidez. O método colorimétrico permite detetar com facilidade a concentração de ACh em amostras biológicas como o soro, a urina e a saliva e, ainda permite perceber quais os efeitos dos fármacos no metabolismo da acetilcolina [22].

Relativamente aos métodos separativos, estes visam uma separação dos constituintes de interesse ou o interferente da amostra antes de efetuar a sua quantificação. Para que a separação seja eficaz, deve haver pelo menos uma diferença significativa entre a substância química ou propriedades físicas da substância a analisar e a interferente [23].

Na literatura são várias as técnicas descritas para determinar a ACh como a cromatografia gasosa (CG) [24] e *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) [24]. De uma forma geral, estes métodos fornecem resultados analíticos de boa precisão e exatidão mas a sua aplicação ao controlo de rotina acaba por ser impossibilitada uma vez que são métodos morosos, dispendiosos e tóxicos para o meio ambiente [23].

No que diz respeito aos métodos electroanalíticos, a informação sobre a solução em estudo é obtida pela medida de uma propriedade de natureza elétrica, muitas vezes para quantidades vestigiais. Estas são consideradas técnicas poderosas e versáteis que oferecem alta sensibilidade, precisão, bem como grande alcance dinâmico linear, com custo baixo de instrumentação [25,26]. Para além disso não necessitam de grandes volumes de amostra e os tempos de análise são relativamente curtos quando comparado com outros métodos [27]. Outra das grandes vantagens destes métodos relaciona-se com a possibilidade de estabelecer relações entre a concentração do analito e a propriedade elétrica [28]. Alguns métodos utilizados para determinar a ACh são a voltametria [29], potenciometria [30] e amperometria [31]. Relativamente a outros métodos instrumentais de análise, estes métodos apresentam como vantagens: i) seletividade e especificidade para um determinado analito; ii) utilização de equipamento pouco dispendioso e de fácil monitorização; iii) apresentam grande sensibilidade a baixos limites de deteção [28,29].

O recurso a reações anticorpo/antígeno também se encontra descrito na literatura e são altamente seletivos e precisos mas de elevado custo e baixa estabilidade. Para a deteção de ACh apenas é conhecido o radioensaio (RIA) em que é usado o anticorpo anticolinesterase e o soro como material biológico. Este ensaio permite detetar a ACh em concentrações muito baixas no plasma [32].

O custo dos ensaios imunológicos pode ser minimizado pela substituição dos anticorpos naturais por recetores artificiais (materiais biomiméticos) e, ao empregá-los numa interface de um transdutor adequado, estes podem oferecer várias vantagens, tais como a especificidade, a robustez, relação custo-eficácia, reutilização e boa resistência a condições extremas, como pH e temperatura [32].

Uma das técnicas de natureza elétrica ainda por explorar é a deteção potenciométrica direta da ACh com recurso a materiais biomiméticos. Esta combinação inovadora é, em seguida, descrita tendo em conta as características associadas às técnicas de impressão molecular e ao desenvolvimento do biossensor propriamente dito, associando-se à sua deteção potenciométrica.

1.4. Polímeros de impressão molecular

Ao longo dos últimos anos, a técnica de impressão molecular tem recebido grande atenção por parte da comunidade científica devido à sua seletividade para uma determinada molécula modelo, à sua estabilidade e à reprodutibilidade na preparação do polímero [33].

Os polímeros de impressão molecular designados MIP (do inglês, “*Molecular Imprinted Polymers*”) têm como base a impressão de locais específicos de reconhecimento numa estrutura rígida tridimensional (um polímero), de forma a facilitar a interação entre a molécula alvo e o seu molde nessa mesma estrutura. Esta interação por ser feita recorrendo a uma ligação covalente, não covalente ou semi-covalente [34].

A síntese de materiais MIP tem início com a formação de um complexo entre os monómeros funcionais e a molécula alvo. Os monómeros funcionais que, participam na polimerização, são escolhidos tendo em conta a sua interação com a molécula molde para que seja possível a formação de um complexo estável. A fase seguinte diz respeito à polimerização desses monómeros na presença de um agente de reticulação e de um iniciador, tipicamente radicalar, com o objetivo de desencadear a reação que dá origem à formação de uma rede polimérica tridimensional. Após o processo de polimerização, é necessário remover a molécula que se encontra aprisionada na matriz polimérica, criando assim locais de ligação complementares em forma, tamanho e com a mesma funcionalidade da molécula molde (Figura 2). Os polímeros resultantes têm elevada afinidade e seletividade para a molécula de interesse [34].

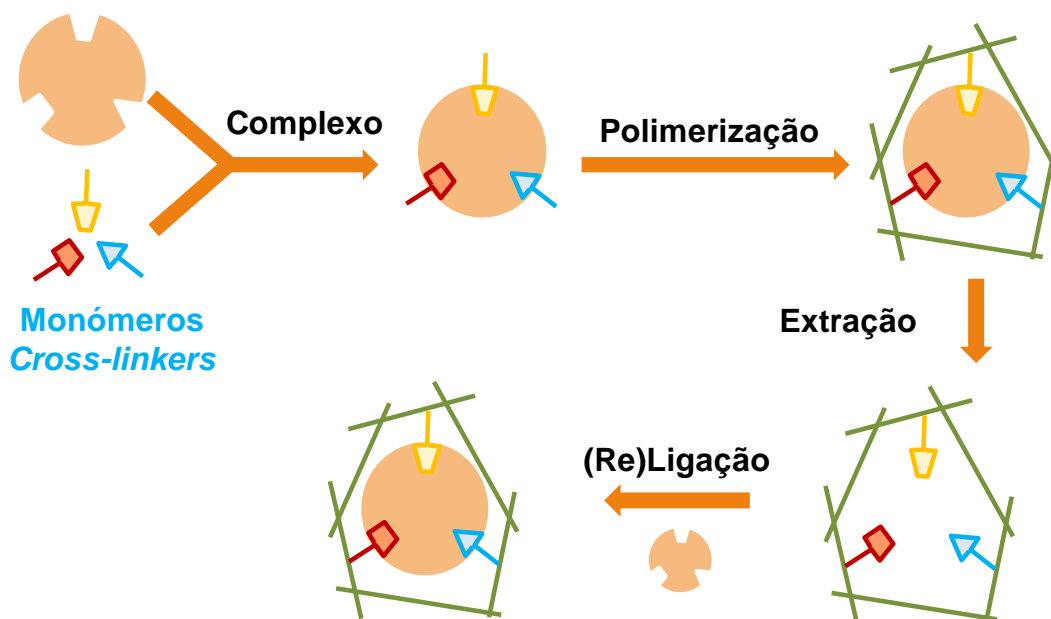


Figura 2. Processo de formação do polímero de impressão molecular e ligação posterior à molécula impressa

O MIP permite efetuar o reconhecimento da molécula removida, pois dispõem de cavidades complementares a essa molécula, mantendo assim a capacidade de reter seletivamente essa mesma molécula presente numa amostra, como é possível visualizar na Figura 2.

A determinação da concentração da molécula de interesse adsorvida pelo MIP pode ser feita através dos seguintes métodos eletroquímicos: amperometria, voltametria, condutimetria e potenciometria [35].

1.4.1. Impressão molecular de proteínas

A impressão de proteínas tem sido cada vez mais utilizada e recebido particular interesse nas aplicações biomédicas e de diagnóstico [35]. Quando se trata da impressão molecular de proteínas é comum que o MIP resultante adquira o nome de anticorpo plástico. Geralmente, estes anticorpos não possuem a especificidade intrínseca aos anticorpos naturais mas são consideravelmente mais estáveis e mais baratos [35]. Por outro lado, é necessário ter em consideração que cada uma delas apresenta uma gama de pH ótima na qual as suas propriedades de ligação ou catalíticas são maximizadas [36].

A interação entre a biomolécula impressa e o seu local de ligação no polímero resulta, normalmente, de uma distribuição tridimensional dos grupos funcionais nas cavidades de

reconhecimento da proteína, através de fracas interações complementares, tais como ligações de hidrogénio, forças de *Van der Waals*, ligações iónicas e interações hidrófobas. Contudo, esta impressão é ainda um desafio na medida em que as proteínas são hidrófilas, geralmente solúveis em água e tampões aquosos e, além disso, são sensíveis à temperatura, pH e natureza do solvente, apresentando fraca solubilidade em solventes apolares [37].

Neste sentido, a técnica de impressão molecular de proteínas oferece algumas dificuldades, que se prendem com a elevada dimensão destas biomoléculas, o que dificulta a sua remoção dos locais de ligação complementares, e com a sua elevada flexibilidade estrutural, o que pode conduzir a um reconhecimento limitado da proteína por parte do MIP [37].

1.4.2. Síntese do MIP

O desenvolvimento de polímeros de impressão para proteínas tem aumentado ao longo da última década, havendo hoje diferentes abordagens disponíveis para a sua síntese. As mais comuns são a impressão em *bulk* ou a impressão em superfície, cada uma com as suas vantagens e desvantagens.

Convencionalmente, a síntese do MIP é realizada usando o método da polimerização em *bulk*, conduzindo à produção de elevadas quantidades de material polimerizado [38]. Este processo tem início numa reação de polimerização na presença de espécies de monómero e de iniciador. Na generalidade dos casos, a remoção do molde é realizada por hidrólise ou extração, deixando, desta forma, locais complementares em tamanho e forma da molécula alvo. O polímero que daqui resulta é, assim, pulverizado e peneirado, para que seja possível produzir partículas de recetores impressos de tamanho adequado [38,39].

Como referido anteriormente, a polimerização em *bulk* é a mais popular uma vez que se trata de uma técnica simples. Tem, porém, como inconveniente a demora na obtenção de partículas com o tamanho e forma apropriados. Além disso, aquando do processo de moagem da estrutura obtida, alguns dos locais de interação são destruídos, o que reduz significativamente o desempenho da técnica de análise da solução de interesse e a eficiência de ligação do MIP. Esta técnica apresenta transferência de massa reduzida, imobilização permanente da molécula molde no polímero e baixa integridade da estrutura do mesmo, devido à complexidade geométrica e química que caracteriza as proteínas. Por

sua vez, tem como vantagens o facto de produzir grandes quantidades de material biomimético e de a sua concretização ser relativamente simples no laboratório [40,41].

Já a polimerização em superfície é, vulgarmente, direcionada para a impressão de proteínas de elevada dimensão [42]. Nesta técnica, os locais de ligação impressos ficam situados na superfície do polímero que é sintetizado usando abordagens semelhantes às descritas na impressão em *bulk* ou, então, ligando o modelo da proteína sobre a superfície (plana ou esférica) de um substrato procedendo posteriormente à polimerização. A eficácia dos locais de ligação depende de vários fatores, entre eles, a maneira como a molécula alvo se liga à superfície recetora e se expõe para a superfície externa, e a capacidade de controlar a espessura da camada de polímero formada [43]. A polimerização em superfície, comparada com a anterior, tem a vantagem de apresentar uma maior percentagem de recuperação dos locais de receção, uma resposta rápida, alta seletividade e sensibilidade, bem como uma rápida transferência de massa. Assim sendo, a preparação deste tipo de MIP é mais rentável já que a quantidade de moléculas molde necessárias é muito menor. Esta polimerização tem sido muito utilizada na impressão de proteínas, em resposta às dificuldades apresentadas por estas durante o processo de impressão molecular [39].

1.4.3. MIP *versus* recetores naturais

A forma como a natureza controla a interação molecular, como por exemplo, antígeno-anticorpo ou interações enzima-substrato sempre despertou a curiosidade da comunidade científica. A curiosidade e a atenção despertada visam, não só a compreensão teórica do processo em causa, mas também a aplicação deste conhecimento teórico na construção de recetores artificiais que mimetizam os naturais [44]. Efetivamente, os recetores biológicos são tipicamente muito seletivos, mas instáveis e dispendiosos, enquanto os seus análogos sintéticos podem oferecer afinidades de ligação comparáveis (ou próximas) para uma maior estabilidade química e um menor custo [35].

De uma forma geral, os MIPs têm sido muito utilizados como materiais de reconhecimento em biossensores (ou sensores biomiméticos), pois são muito estáveis, menos dispendiosos, mais fáceis de produzir e de utilizar, em comparação com os seus análogos biológicos, como enzimas e anticorpos [33,40].

1.4.4. Biossensores

Um biossensor é um dispositivo analítico que combina um elemento de reconhecimento biológico com um componente físico-químico, o transdutor. Desta forma, a informação química proveniente da concentração do analito é transformada num sinal de reconhecimento apropriado. O principal objetivo do elemento de reconhecimento biológico é proporcionar ao sensor um elevado grau de seletividade para o analito a ser medido. Os biossensores podem ser classificados de acordo com o mecanismo que confere a especificidade biológica, ou pelo modo de transdução do sinal ou, em alternativa, uma combinação dos dois. A facilidade de utilização, a portabilidade, o custo reduzido e os baixos limites de deteção são as particularidades que tornam estes dispositivos interessantes [45].

Como referido anteriormente, os biossensores podem ser classificados segundo o elemento de reconhecimento ou, então, segundo o modo como a transdução de sinal é realizada. Na primeira classificação são utilizados componentes biológicos imobilizados, como enzimas, células ou tecidos e sensores de afinidade, com base em anticorpos, recetores de membrana ou ácidos nucleicos. Relativamente à segunda, a transdução do sinal pode ser feita recorrendo a métodos eletroquímicos como a potenciometria, amperometria e condutimetria; métodos óticos como a colorimetria, a fluorescência e a luminescência; métodos calorimétricos ou magnéticos [46]. Segundo a literatura, os biossensores mais frequentemente utilizados são os enzimáticos e os imunossensores.

Os biossensores enzimáticos possuem como elemento de reconhecimento biológico, tal como o nome indica, uma enzima que precisa de ser imobilizada e acoplada a um transdutor. As enzimas conseguem conferir a seletividade desejada à resposta que se obtém com base na sua atividade catalítica sobre o analito ou sobre um reagente, promovendo, desta forma, uma alteração no sinal de transdução. As enzimas têm sido amplamente utilizadas como catalisadores em reações orgânicas em solventes orgânicos. No entanto, estas reações quando catalisadas por enzimas, geralmente apresentam algumas desvantagens, tais como a baixa solubilidade dos reagentes e produtos em meios biológicos, dificuldades em recuperar as enzimas a partir de sistemas de reação e reações secundárias indesejadas. As atividades catalíticas das enzimas em solventes orgânicos são fortemente enfraquecidas por vários fatores, tais como a formação de ligações fracas entre o substrato e a enzima, variações de pH e alterações relativas à sua conformação “ativa” [47,48].

Os imunossensores têm como base fundamental a especificidade do reconhecimento molecular de um antígeno por meio de anticorpos para formar um complexo estável, sendo semelhante à metodologia de um imunoenensaio [49]. Para a formação deste complexo é necessário que a sua detecção seja realizada em condições que minimizem as interações não-específicas, sendo que cada determinação do antígeno exige a produção de um anticorpo, nomeadamente o seu isolamento, e, geralmente, a sua purificação [48]. Os mecanismos de detecção da interação deste complexo podem ser diretos ou indiretos, recorrendo a um marcador enzimático acoplado ao anticorpo ou ao antígeno, tendo como objetivo aumentar a sensibilidade destes imunossensores, exigindo assim etapas de síntese adicionais [50,51].

Os dispositivos baseados em materiais MIP são, hoje, uma alternativa real, nos quais a concentração da molécula alvo é monitorizada através da sua adsorção ao material impresso e imobilizado na superfície do transdutor. Esta adsorção promove uma variação no sinal registado, relativamente ao qual a escolha da detecção elétrica oferece a vantagem de permitir uma elevada sensibilidade para concentrações baixas de analito. Se for de natureza potenciométrica, esta detecção oferece ainda a vantagem de ser mais barata, mais simples e mais expedita, do que as demais técnicas eletroquímicas convencionais.

1.5. Potenciometria

Quando o método eletroquímico utilizado não requer processos de transferência de natureza eletrónica (corrente zero), a técnica toma o nome particular de potenciometria. A potenciometria pressupõe a existência de uma célula eletroquímica constituída por dois eléctrodos para a medição de uma diferença de potencial (Figura 3). Um dos eléctrodos é designado eléctrodo de referência e mantém o seu potencial constante, o outro é o eléctrodo indicador e a sua função prende-se com o fornecimento de potenciais que, por sua vez, variam com a composição da solução em estudo [48,51].

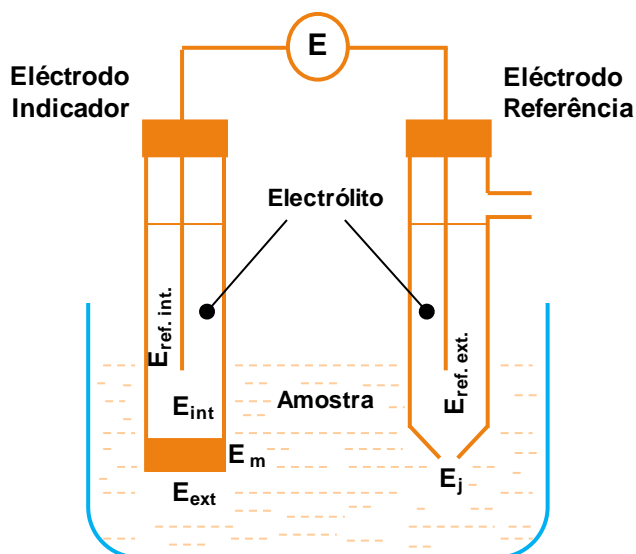


Figura 3. Célula eletroquímica relativa à potenciometria - $E_{ref. int.}$: potencial de contacto do eléctrodo de referência interno; E_{int} : potencial da fase interna junto da membrana; E_{ext} : potencial da fase externa junto da membrana; $E_{ref. ext.}$: potencial de contacto do eléctrodo de referência externo; E_j : potencial de junção líquida da ponte salina; E_m : potencial de assimetria da membrana.

Os eléctrodos seletivos de ião (ESIs, em inglês *Ion-Selective Electrodes*), os mais comuns, e os *Field-Effect Transistors* (FET) são exemplos de eléctrodos que se baseiam num elemento de reconhecimento, a membrana, que consiste em materiais condutores de iões de permeabilidade seletiva, que separa a amostra do interior do eléctrodo. As membranas devem apresentar baixa solubilidade, condutividade elétrica e interação seletiva com o analito. Estes eléctrodos têm sido utilizados em diversas áreas de análise, sendo de baixo custo, seletivos para um dado ião, sensíveis e aplicáveis numa ampla gama de condições experimentais. Neste sentido, ocorre uma redução do tempo e do custo envolvidos numa determinação analítica baseada em eléctrodos seletivos de membrana. Além disso, os ESIs possuem características que tornam a sua aplicação bastante abrangente e interessante [52,53,54], tais como não serem afetados pela cor ou turvação das amostras, serem fáceis de operar e a sua construção ser facilmente conseguida no laboratório. Estes eléctrodos permitem apresentar uma resposta simples, direta, seletiva, exata e precisa [54].

A chave da seletividade destes eléctrodos centra-se, sobretudo, no ionóforo utilizado na membrana. Recentemente, os materiais MIP têm sido utilizados como sensores potenciométricos, uma fusão que se tem revelado promissora e vantajosa [33].

1.5.1. Considerações teóricas

Segundo as recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), 1994, as diferenças de potencial medidas entre a atividade do íão na solução e o potencial desenvolvido no ESI são linearmente dependentes do logaritmo da atividade de um dado íão em solução e definida pela equação de *Nernst-Nicolski* (Equação 1.1), em que E: valor experimental de potencial de um ESI (mV); R: constante dos gases perfeitos, 8.3144 J/(K×mol); T: temperatura termodinâmica, K; F: constante de Faraday, 9.64846×10⁴ C/mol; z_A: carga do íão principal; a_A: atividade do íão principal, mol/L ou mol/kg; “constante”: inclui o potencial normal do elétrodo seletivo, o potencial do elétrodo de referência e o potencial de junção líquida, mV) [55].

$$E = \text{“Constante”} + \frac{2,303RT}{z_A F} \times \log a_A \quad (1.1)$$

A equação de *Nernst-Nicolski* é calculada através da atividade, contudo é possível utilizar a concentração do íão de interesse em vez desta, sendo necessário proceder-se ao ajuste da força iónica das soluções. Assim sendo, a força iónica, I, traduz, de forma simples, a intensidade do campo elétrico devido à presença de íões em solução (Equação 1.2), tendo em consideração todos os íões presentes na solução, por meio da concentração do íão, c_i (mol L⁻¹) e da carga do mesmo, z_i [55].

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n c_i z_i^2 \quad (1.2)$$

1.5.2. Elétrodo de Referência

O elétrodo de referência é aquele que apresenta um potencial constante, ou seja, o seu potencial é função de uma espécie cuja concentração permanece inalterada durante toda a determinação. Este elétrodo deve ser, ainda, irreversível e o seu comportamento deve seguir a equação de *Nernst*. Para que um elétrodo possa ser usado como elétrodo

de referência deve apresentar certas características, tais como a já referida invariabilidade do potencial durante o processo; ser de fácil preparação; possuir um ajuste rápido a um determinado e exato potencial; reduzida histerese, ou seja, o potencial do eletrodo deve responder a uma variação de temperatura, retomando o valor inicial do potencial assim que a temperatura inicial for restabelecida; e baixa polarizabilidade, isto é, deve manter o potencial, independentemente da corrente que passe pelo eletrodo [53].

Os eletrodos de referência utilizados em métodos potenciométricos são os eletrodos de calomelanos (mercúrio/ cloreto de mercúrio), os de cloreto de prata/prata, os de padrão de hidrogénio e os de talamida (cloreto de tálio/amálgama de tálio) [53].

O eletrodo de cloreto de prata/prata é o eletrodo de referência mais utilizado, devido à sua fácil construção, baseada em materiais de baixo custo. Este eletrodo é constituído por um fio de prata, com um revestimento eletrolítico de uma fina camada de cloreto de prata. O fio é mergulhado numa solução de cloreto de potássio, com concentração conhecida e com cloreto de prata [56]

Relativamente às reações envolvidas na formação de potencial, o eletrodo de AgCl/Ag é denominado de eletrodo de segunda espécie, uma vez que o potencial gerado depende da concentração de cloreto. Esta concentração controla a concentração disponível de Ag^+ , de acordo com o equilíbrio químico relativo ao produto de solubilidade de AgCl , e que na realidade é a espécie que determina o potencial do eletrodo (Ag/Ag^+) [56].

A manutenção do valor de concentração de cloreto em contacto com o fio de Ag recoberto de AgCl é por isso determinante para o bom desempenho do eletrodo de referência. Uma das estratégias mais utilizadas para este efeito é a introdução de um compartimento externo, que evita o contacto direto entre a solução em análise e o eletrodo de referência (Figura 4).

Se as soluções de medida não possuírem cloreto ou se a concentração de uma determinada espécie se mantiver constante, o uso de um compartimento externo no eletrodo de referência deixa de ser necessária [56].

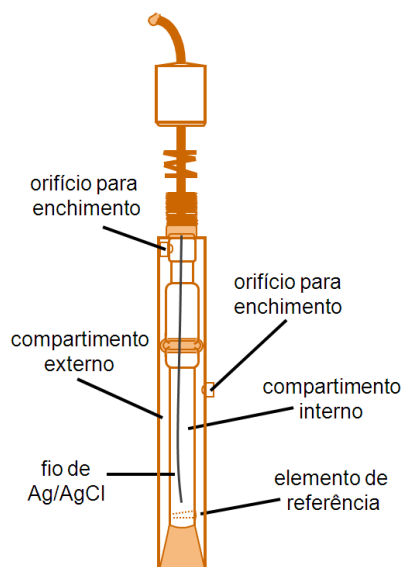


Figura 4. Representação esquemática de um eletrodo de referência AgCl/Ag de dupla junção

1.5.3. Eletrodo indicador

Para que estejam criadas as condições necessárias para se medir a força eletromotriz (f.e.m) da célula, é preciso associar o eletrodo indicador, através de uma ponte salina ao eletrodo de referência. Esta necessidade de associação deve-se à impossibilidade de medir o potencial de um eletrodo indicador de forma direta [53].

O eletrodo indicador é, portanto, um eletrodo sensível à espécie a ser determinada, ou seja, o seu potencial será função da concentração dessa espécie. O eletrodo indicador deve apresentar uma elevada sensibilidade à espécie a ser determinada; um alto grau de reprodutibilidade e uma resposta rápida à variação da concentração em estudo [53]. Existem vários tipos de eletrodos indicadores, sendo possível subdividi-los em dois grupos: os eletrodos metálicos e os ESIs.

Os eletrodos metálicos podem ser de Primeira Classe, Segunda Classe, Terceira Classe ou inertes. Os de Primeira Classe são utilizados na medição da atividade de um íon metálico em solução; os de Segunda Classe são usados para medir a atividade de um anião ou de um ligante; e os de Terceira Classe caracterizam-se por apresentar baixa seletividade e respondem à atividade do segundo íon presente em solução. Nos eletrodos inertes o sistema de oxidação-redução encontra-se em contacto com um metal inerte, como a platina ou o ouro [53].

Os ESIs podem ser classificados em elétrodos cristalinos, que podem ser homogêneos ou heterogêneos, e em não cristalinos, que podem ser elétrodos de vidro ou com locais móveis. Os elétrodos de membrana homogênea são constituídos por uma membrana de material cristalino preparada a partir de um único composto ou de uma mistura homogênea de compostos. Os de membrana heterogênea são formados quando uma substância ou mistura de substâncias ativas é misturada com uma matriz inerte, tal como borracha ou silicone, para formar a membrana seletiva. No que diz respeito aos elétrodos não cristalinos, estes são constituídos por uma membrana de matriz que pode ser rígida, no caso de ser de vidro, ou apresentar locais móveis, sendo normalmente colocada entre duas soluções aquosas. A matriz pode ainda ser porosa (éster de celulose) ou não porosa (vidro ou PVC). Os elétrodos de vidro são constituídos por uma membrana de detecção que é um pedaço de vidro fino, no qual a composição química deste determina a seletividade da membrana. Por fim os elétrodos não cristalinos e com locais móveis são compostos pelo permutador, solvente mediador e matriz de incorporação. O permutador é um material eletroquímico, sendo responsável pela resposta do eletrodo podendo apresentar carga positiva, negativa ou ser neutro, a matriz de incorporação é baseada em polímeros em que as características da borracha à temperatura ambiente dependem da presença de um solvente mediador plastificante [53,57].

1.5.4. Características gerais da resposta potenciométrica

A atividade de um dado ião em função da diferença de potencial medido entre o eletrodo de referência e o ESI é representado através de uma curva de calibração (Figura 5). Esta curva de calibração apresenta informações sobre o limite de detecção (LD), o limite inferior de resposta linear (LIRL) e a sensibilidade determinada pelo declive dessa mesma curva. O LD é definido como a concentração ou atividade de um dado ião no ponto de intersecção entre os segmentos que prolongam o comportamento linear e não linear. Existem vários fatores que afetam o LD, devendo ter-se em conta as condições experimentais utilizadas, nomeadamente a composição da solução, a utilização anterior do eletrodo, a velocidade de agitação, entre outros. O LIRL é definido como o valor de concentração ou atividade de um dado ião a partir do qual a resposta potenciométrica exibe um comportamento linear. O declive indica a qualidade da resposta potenciométrica, assumindo teoricamente e sob as condições normais de temperatura e pressão, um valor de $59.16/z_A$ mV/década [57,58].

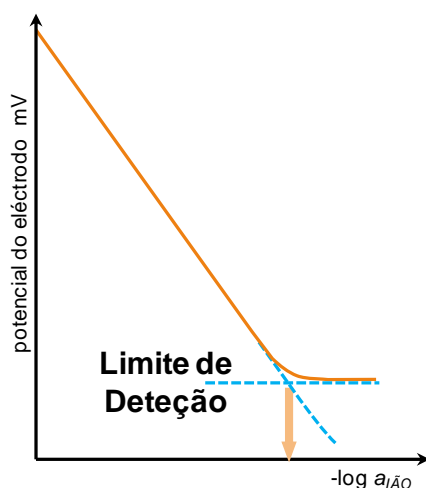


Figura 5. Características gerais da curva de calibração [58]

A curva de calibração para além das características já mencionadas apresenta outras propriedades resultantes da atividade do ESI, como o tempo de resposta e a seletividade, ambas descritas pelas recomendações da IUPAC, 1994. O tempo de resposta dos eléctrodos é calculado a partir do instante em que o ESI e o eléctrodo de referência são colocados em contacto com uma amostra de solução, ou a partir do qual a atividade do ião de interesse em solução é alterada, e o primeiro instante em que o declive $\Delta E/\Delta t$ iguala o tempo limite estabelecido (Δt) (Figura 6). Este valor limite é estabelecido com base em questões de ordem experimental ou, então, tendo em conta a exatidão pretendida na leitura potenciométrica [58].

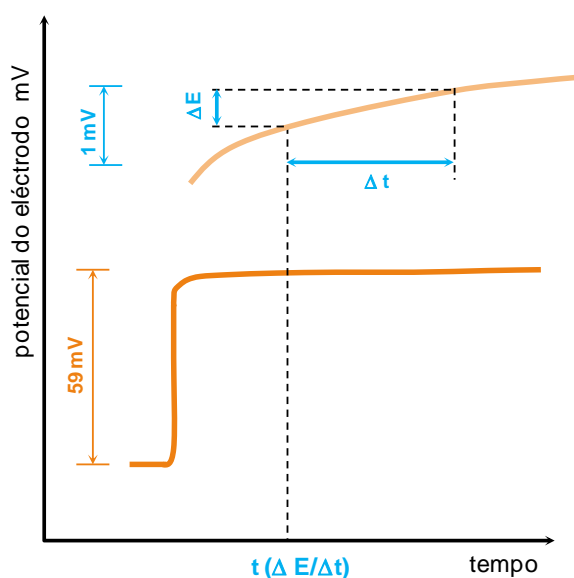


Figura 6. Representação gráfica do tempo de resposta, $t(\Delta E/\Delta t)$, de ESI [47]

Considerando que a especificidade dos ESI tem sido tecnicamente impossível, torna-se necessário caracterizar a seletividade da célula potenciométrica para o ião alvo.

1.5.5. Seletividade

A capacidade que um ESI tem para distinguir o ião de interesse, presente na solução em estudo, dos outros é designada por seletividade e é calculada através do coeficiente de seletividade potenciométrico, $K_{A,B}^{pot}$. O coeficiente de seletividade é avaliado tendo em conta a resposta da célula do ESI relativamente ao ião principal, A, e ao ião interferente, B. As atividades do ião principal e do ião interferente são consideradas na equação modificada de *Nikolsky-Eisenman* (Equação 1.3), na qual, E: valor experimental de potencial de um ESI (mV); R: constante dos gases perfeitos, 8.3144 J/(Kxmol); T: temperatura termodinâmica, K; F: constante de Faraday, 9.64846x10⁴ C/mol; a_A : atividade do ião principal, mol/L ou mol/kg; a_B : atividade de espécie iônica interferente; z_A : número inteiro de sinal e magnitude da carga do ião principal; z_B : número inteiro de sinal e magnitude da carga de iões interferentes; “constante”: inclui o potencial normal do eletrodo seletivo, o potencial do eletrodo de referência e o potencial de junção líquida, mV; e K: coeficiente de seletividade potenciométrica relativamente ao ião interferente) [58].

$$E = \text{“Constante”} + \frac{2,303RT}{z_A F} \times \log \left[a_A + \sum_{i=1}^n K_{A,B}^{pot} [a_{Bi}]^{z_A/z_{Bi}} \right] \quad (1.3)$$

A existência de uma espécie interferente numa amostra faz com que a resposta potenciométrica seja adulterada. Do ponto de vista prático, é possível verificar o grau de adulteração observando o valor de LD, uma vez que a espécie interferente aumenta o sinal de base, fazendo com que a resposta face ao ião principal seja detetada apenas para concentrações superiores. Do ponto de vista numérico, existem vários métodos para calcular os coeficientes de seletividade potenciométrica: i) o das soluções separadas; ii) o das soluções mistas e iii) e o *matched potential* [58].

No método das soluções separadas são comparados os potenciais de uma célula de ESI quando imersa numa solução de ião principal (A) ou numa solução de ião interferente (B), ambas com o mesmo valor de atividade (ou concentração), sendo o valor de coeficiente de seletividade potenciométrico calculado de acordo com a Equação 1.4.

$$\log K_{A,B}^{pot} = \frac{(E_B - E_A)z_A F}{2,303RT} + \left[1 - \frac{z_A}{z_B}\right] \log a_A \quad (1.4)$$

Teoricamente, o valor $(z_A F)/(2,303RT)$ corresponde ao inverso do valor do declive teórico de um ESI e que deve ser substituído pelo declive da curva de calibração da célula potenciométrica nas condições experimentais. Este método tem como desvantagem o facto de não existir competição entre o ião principal e o interferente, considerando que estes iões se encontram individualizados em solução, algo que não se verifica na realidade [58,59].

No método das soluções mistas a diferença de potencial entre o eléctrodo de referência e o ESI é medida em soluções em que a atividade dos iões interferentes é constante e a atividade do ião principal é variável. Para o cálculo do respetivo coeficiente de seletividade potenciométrico utiliza-se a expressão matemática representada pela Equação 1.5. Nesta equação, a atividade do ião principal, a_A , corresponde à atividade mínima deste ião capaz de promover uma resposta linear. Este método pode ser realizado de forma inversa, no qual o ião principal é mantido numa concentração fixa e é adicionada uma quantidade crescente de ião interferente, até a célula eletroquímica apresentar uma resposta com padrão linear relativamente à espécie adicionada. Existem, porém, algumas limitações práticas, decorrentes, respetivamente, do facto de não se conseguir aplicar a equação de *Nernst* e de o ião interferente não possuir a capacidade de igualar o potencial do ião principal [58,59].

$$K_{A,B}^{pot} = \frac{a_A}{a_B^{z_A/z_B}} \quad (1.5)$$

No método *matched potential* é determinada a atividade do ião interferente na qual a variação de potencial é a mesma para uma dada atividade do ião de interesse numa solução de referência. Para o cálculo do respetivo coeficiente de seletividade potenciométrico, utiliza-se a expressão matemática representada pela Equação 1.6, na qual se usam duas medidas potenciométricas independentes: (1) a variação de potencial promovida por um aumento de concentração de ião principal, desde a menor atividade, a_A , à maior, a'_A e (2) a concentração de ião interferente que é necessária adicionar a a_A para que se observe a mesma variação de potencial. Este método é o que se assemelha mais a uma condição experimental inerente à análise de uma amostra, embora tenha como

limitação não apresentar qualquer relação com os pressupostos teóricos decorrentes da equação de *Nernst* [58,59].

$$K_{A,B}^{pot} = \frac{a'_A - a_A}{a_B} \quad (1.6)$$

Como cada um destes métodos oferece valores diferentes, deve ter-se em consideração que os mesmos só podem ser interpretados como valores meramente orientadores do grau de seletividade dos ESI [59].

Tendo em conta o exposto anteriormente, optou-se neste trabalho pelo desenvolvimento de elétrodos seletivos a ACh, recorrendo a materiais MIP como ionóforo e a deteção potenciométrica. O biossensor a desenvolver foi sujeito a vários processos de optimização, cujos detalhes experimentais se descrevem na secção seguinte.

2. Descrição Experimental

Ao longo deste capítulo são apresentados os materiais, os equipamentos e as metodologias envolvidas no desenvolvimento, na avaliação e na aplicação de biossensores para a determinação de ACh, um NT associado à DA.

2.1. Material e equipamentos utilizados

As soluções foram todas preparadas em balões volumétricos de classe A, com capacidades de 25,00 a 250,00 mL. Para medições de volumes rigorosos iguais ou superiores a 5,00 mL foram usadas pipetas volumétricas de vidro, classe A. Para volumes inferiores recorreu-se a pipetas automáticas VWR, de volume regulável (2-20 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL e de 1000-5000 μL).

As pesagens foram efetuadas na balança RADWAG XA 110/X, com uma precisão de $\pm 0,0001$ g e em gobelés com capacidades entre 10 e 50 mL.

A diferença de potencial entre o eletrodo de referência e o eletrodo indicador foi obtida com um decimilivoltímetro *Crison* GLP 21 (sensibilidade $\pm 0,1$ mV), à temperatura ambiente, e sob agitação constante. O sinal de saída foi ligado a um ponto de comutação com seis saídas, permitindo a leitura simultânea de seis eletrodos seletivos. A montagem experimental encontra-se na figura 7.



Figura 7. Montagem utilizada na leitura potenciométrica

A célula potenciométrica apresentava um elétrico indicador ESI que continha a membrana seletiva aplicada sobre um condutor baseado em grafite (Figura 8) e, ainda, um elétrico de referência constituído por um fio de prata, previamente imerso numa solução de cloreto de ferro (III) e ligado a um fio de cobre com terminal elétrico apropriado.



Figura 8. Fotografia relativa ao elétrico indicador

Para caracterizar quimicamente os materiais ionóforos sintetizados (MIPs), utilizaram-se duas técnicas: espectroscopia de Raman e FTIR. As medidas de espectroscopia de Raman com microscopia focal foram realizadas no equipamento *Thermo Scientific Nicolet, DXR*, e as medidas de FTIR no equipamento *Thermo Scientific Nicolet iS10*, acoplado com um acessório de reflexão difusa atenuada (ATR).

2.2. Reagentes e soluções

Na preparação das soluções aquosas foi utilizada água desionizada com uma condutividade inferior a $0,1 \mu\text{S/cm}$. As soluções aquosas foram preparadas por pesagem rigorosa dos sólidos correspondentes, ou por medição rigorosa do volume necessário, e posterior diluição em meio apropriado.

Vários foram os reagentes utilizados ao longo deste trabalho, tendo sido obtidos a partir de várias fontes comerciais. O ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanossulfónico (HEPES), o cloreto de acetilcolina e os nanotubos de carbono (CNTs) foram produzidos pela *Sigma*; o 2-nitrofeniloctil éter (oNFOE), *tetrakis*(4-clorofenil)borato (aditivo aniónico), o poli(cloreto de vinilo) (PVC) e a creatinina foram adquiridos à *Fluka*; o brometo de tetraoctilamónio (aditivo catiónico) foi comercializado pela *Acros*; o tetrahidrofurano (THF) e a anilina foram adquiridos à *Sigma-Aldrich*; o ácido clorídrico (HCl) e o etanol foram produzidos pela *Panreac*; o hidróxido de sódio (NaOH) e o persulfato de amónio (APS) foram adquiridos à *Scharlau* e à *Analar*, respectivamente. A creatina foi comercializada pela *AppliChem*; a cisteína pela *Merck* e a ureia pela *Fragon*. A glucose foi produzida em laboratório.

2.3. Preparação das soluções

As soluções padrão de ACh, necessárias à realização deste trabalho, tinham uma concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$. A solução tampão foi de HEPES com uma concentração de $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$. O pH desta solução foi alterado pela adição de quantidades adequadas de ácido clorídrico concentrado ou solução saturada de hidróxido de sódio recém-preparado.

A interferência de outros compostos químicos foi avaliada para $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ de ACh. As soluções de espécies interferentes foram de concentrações variáveis e preparadas em tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ de pH 4. A creatina apresentava uma concentração de $9,3 \times 10^{-5} \text{ g/mL}$; a creatinina de $1,2 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$; a cisteína de $5,0 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$; a ureia de $4,0 \times 10^{-4} \text{ g/mL}$ e a glucose de $1,05 \times 10^{-3} \text{ g/mL}$.

2.4. Preparação do sensor

No sentido de desenvolver o sensor foi preparado o MIP. Inicialmente foi necessário proceder a um pré-arranjo monomérico. Para tal, pesaram-se 0,01 g de CNTs que foram dispersos em 6 mL de HCl 1M, num frasco de vidro. À suspensão obtida foram adicionados 2,5 mL de etanol e 500 μ L de anilina, promovendo-se a agitação da mesma por 40 minutos. Este pré-arranjo foi bastante importante, na medida em que, os monómeros funcionais de anilina estabeleceram nesta altura uma interação com os grupos carboxílicos dos nanotubos, tendo em vista a formação de um complexo estável entre estes. Seguidamente, foi adicionada a molécula molde (ACh, 50 mmol) e deixou-se a agitar cerca de cinco minutos. Posto isto, preparou-se o iniciador, pesando-se 0,1 g de persulfato de amónio (APS) em 2 mL de HCl 1M. Foi indispensável preparar o iniciador APS uma vez que a polimerização dos monómeros é desencadeada por este componente. Adicionou-se, então, a solução de polimerização à solução anteriormente preparada, com um tempo de agitação de 20 minutos. A mistura obtida foi colocada durante dois dias no congelador, onde a polimerização em *bulk* se deu a -5°C . Depois de formado, o polímero foi filtrado e lavado com etanol e água, de forma a remover as estruturas poliméricas que cresceram em solução desligadas dos CNTs. O sólido foi entretando seco a 50°C . O esquema genérico da síntese do material MIP encontra-se representado na Figura 9.

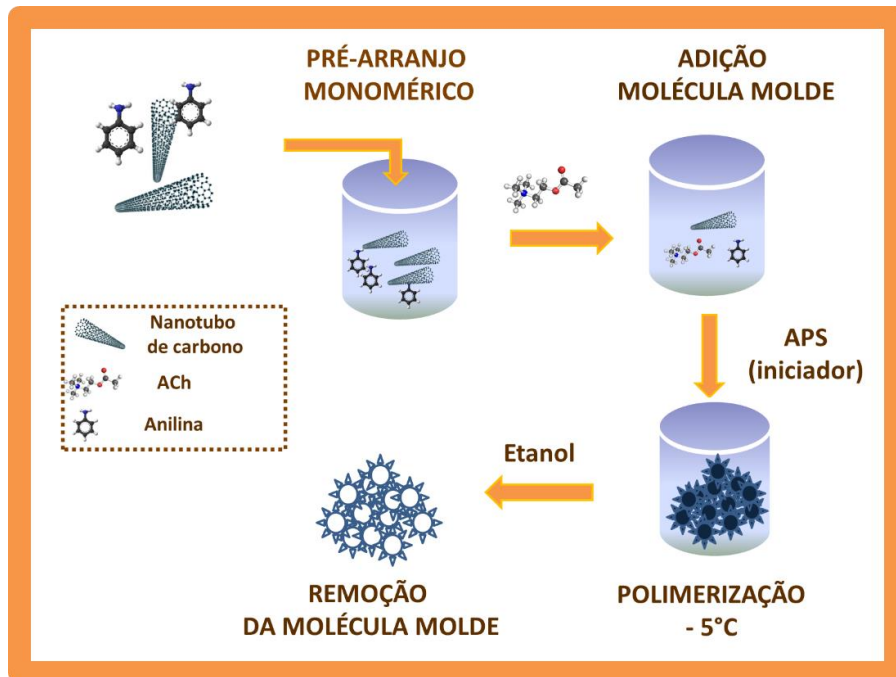


Figura 9. Síntese do polímero de impressão molecular

Em paralelo, preparou-se um polímero sem impressão molecular (NIP, do inglês *non-imprinted polymer*). Este material foi preparado de modo similar ao descrito para o MIP, excluindo-se no entanto a molécula molde do procedimento.

2.5. Preparação das membranas

As membranas seletivas foram obtidas por mistura de 0,07 g de PVC, 0,12 g de solvente mediador, oNFOE, e 0,005 g de material MIP (ESI A,C,D) ou NIP (ESI B). As membranas usadas como controlo não apresentavam qualquer tipo de material sensor (ESI E,F,G). Em algumas membranas foram, ainda, adicionadas 0,003 g de TOB (brometo de tetraoctilamonio), agindo como aditivo catiónico (ESI C,G) e, nas outras 0,003 g de um aditivo aniónico, TpCIPB (ESI D,F). A mistura foi agitada até o PVC estar dissolvido e o ionóforo disperso em 2 mL de THF (tetrahidrofurano).

As soluções das membranas preparadas foram aplicadas de seguida sobre o suporte condutor de grafite. A aplicação das membranas permitiu formar uma película na cavidade superior do suporte condutor e cada aplicação foi efetuada após a película anteriormente aplicada ter evaporado (Figura 10). Uma vez terminada a sua deposição, as membranas foram deixadas a secar, durante 24h, à temperatura ambiente. Posteriormente procedeu-se à hidratação das mesmas.



Figura 10. Elérodos seletivos de ACh

Na Tabela 2 é apresentada a constituição e a composição de cada tipo de membrana, identificando-se os elérodos que as continham pelas letras A a G. Apesar de terem sido

preparadas 7 membranas, foram utilizadas apenas 6; o ESI E acabou por não ser utilizado, mas a resposta potenciométrica deste eletrodo seria muito instável, uma vez que a sua membrana não apresentava nenhum material como ionóforo. Além disso, para cada uma das membranas foi preparado, em paralelo, um eletrodo duplicado.

Tabela 2. Constituintes relativos às membranas seletivas

Componente	Quantidade						
	ESI A	ESI B	ESI C	ESI D	ESI E	ESI F	ESI G
MIP, g	0,0051	—	0,0053	0,0053	—	—	—
NIP, g	—	0,0052	—	—	—	—	—
Aditivo catiónico (TOB), g	—	—	0,0030	—	—	—	0,0031
Aditivo aniónico (TpCIPB), g	—	—	—	0,0038	—	0,0034	—
Solvente mediador (oNFOE), g	0,1229	0,1209	0,1238	0,1245	0,1237	0,1236	0,1238
PVC, g	0,0707	0,0706	0,0728	0,0717	0,0718	0,0714	0,0715
THF, mL	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

2.6. Avaliação comparativa dos eletrodos

O funcionamento dos eletrodos foi avaliado através da realização de várias curvas de calibração, efetuadas a diferentes valores de pH e seguindo as recomendações da IUPAC.

As medições potenciométricas foram realizadas à temperatura ambiente e sob agitação constante. Para cada eletrodo foi anotado o respetivo valor da f.e.m., a um valor constante de pH e de força iónica. As concentrações crescentes de ACh foram obtidas por transferência de alíquotas, compreendidas entre 0,02 e 5 mL de solução aquosa de ACh com concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ M, num gobelé de 100 mL contendo 50,0 mL de tampão (HEPES) com uma concentração de $1,0 \times 10^{-2}$ M. Os potenciais provenientes das soluções aquosas de ACh foram medidos à temperatura ambiente e registados com uma estabilização de $\pm 0,2$ mV. Entre os ensaios, os sensores foram colocados a agitar em água por um breve período, tendo em vista proceder à limpeza da sua superfície.

Com os valores obtidos experimentalmente efetuou-se o traçado gráfico das curvas de calibração referentes aos pHs (3, 4, 6 e 8,5) em estudo. Esse traçado foi realizado utilizando um programa de computador, o *Microsoft Excel 2013*. Relativamente às curvas de calibração, foram avaliados parâmetros como o LIRL, LD e o declive. Esses parâmetros foram determinados com base no traçado de, pelo menos, 3 curvas de calibração nas mesmas condições experimentais. A reprodutibilidade foi obtida através da média do desvio padrão relativo (%) dos potenciais das soluções aquosas de ACh.

2.7. Avaliação da seletividade dos elétrodos

O cálculo dos valores de coeficiente de seletividade potenciométrica, $K_{A,B}^{pot}$, foi efetuado pelo método das soluções mistas. Neste método mantém-se a concentração de interferente fixa e faz-se variar a concentração do ião principal, neste caso a ACh.

Para tal, foi efetuada uma curva de calibração para a ACh onde esta foi adicionada numa concentração $1,0 \times 10^{-2}$ M, a 50 mL de solução tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M de pH 4. Posteriormente, fez-se uma outra calibração mas, desta vez, foi adicionada ACh $1,0 \times 10^{-2}$ M a 50 mL de solução de interferente com a concentração desejada, também em HEPES e pH 4. Repetiu-se este processo para todos os interferentes estudados e verificou-se a resposta do eletrodo na presença dos mesmos.

2.8. Análise das amostras

A análise de amostras de ACh foi realizada em soro sintético cuja constituição mineral era muito variada. Para tal, foram adicionados volumes rigorosos e consecutivos, compreendidos entre 150 e 1500 μ L, de uma solução padrão de ACh de concentração igual a $1,0 \times 10^{-2}$ M. Estes volumes foram adicionados a 50 mL de tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M de pH 4. O volume de soro sintético utilizado nesta análise foi de 1,00 mL, tendo a solução um volume inicial de 51 mL.

A determinação da concentração de ACh foi baseada no traçado prévio de uma curva calibração, tendo-se substituído os valores de potencial obtidos na equação de regressão linear correspondente. Os resultados das análises apresentadas correspondem sempre, à média de, pelo menos três leituras. A precisão dos resultados foi calculada por intermédio do desvio padrão correspondente.

3. Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados dados relativos à interação da ligação entre os materiais biomiméticos e a acetilcolina, e à avaliação comparativa dos elétrodos preparados tendo em conta a influência do pH nos mesmos. As características gerais de funcionamento dos elétrodos são, igualmente, avaliadas, comparadas e comentadas. Apresentam-se, ainda, análises de superfície dos materiais sensores, estudos de seletividade às membranas que constituem os elétrodos e, por fim, a sua aplicação em amostras de soro sintético.

3.1. O material biomimético

Para se obter um material biomimético para a ACh usando técnicas de impressão molecular, optou-se pela polimerização em *bulk*, uma vez que a molécula a ser impressa era de pequena dimensão e não havia restrições relativas à sua disponibilidade. Por outro lado, considerando que era objetivo uma leitura elétrica do sinal, recorreu-se à utilização de um material que oferecesse boas características elétricas: uma combinação de CNTs e de anilina. Os CNTs foram escolhidos tendo em conta as suas extraordinárias propriedades elétricas e o facto de o seu uso ser compatível com várias nanoestruturas. Já a anilina possui uma elevada condutividade e uma boa estabilidade elétrica. A combinação destes dois compostos permitiu obter um complexo estável e compatível com a molécula molde (ACh), sendo o arranjo pré-monomérico de extrema importância. Aquando da adição de ACh e do iniciador APS, formou-se um polímero com boas propriedades condutoras.

É importante referir que ainda não existem, na literatura, trabalhos publicados sobre este material biomimético. A obtenção deste material foi, portanto, uma experiência e que possibilitou a monitorização da ACh via deteção potenciométrica.

3.2. Análise de superfície dos materiais sensores

Os espectros de RAMAN foram traçados tendo em vista o estabelecimento de algumas considerações sobre a ocorrência da polimerização e a eficiência da remoção da molécula molde. Esse traçado foi efetuado para os materiais sensores MIP e NIP. As imagens dos espectros obtidos estão representados na Figura 11.

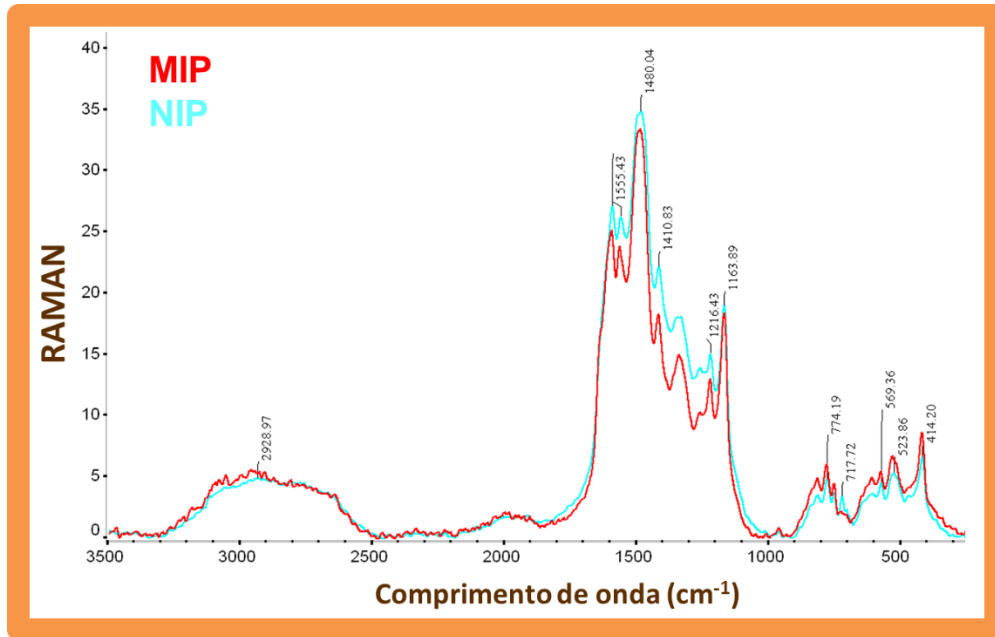


Figura 11. Espectros de RAMAN para o MIP/NIP

A Figura 11 apresenta os espectros RAMAN para os materiais sensores MIP e NIP. São visíveis várias bandas representativas do complexo formado entre os nanotubos de carbono e a anilina.

O pico centrado ao comprimento de onda $1628,0 \text{ cm}^{-1}$ foi característico do estiramento C-C do anel benzenóide e o pico a $1555,5 \text{ cm}^{-1}$ correspondeu à elongação C=C do anel quinóide. Estas bandas são típicas da associação íntima de carbonos com hibridação sp^3 e sp^2 na mesma estrutura. A banda observada a $1480,0 \text{ cm}^{-1}$ foi atribuída ao estiramento C=N, resultado da anilina oxidada, a banda $1410,8 \text{ cm}^{-1}$ ao estiramento C-C do anel quinóide, a banda a $1216,4 \text{ cm}^{-1}$ ao estiramento C-N e a deformação C-H quinóide apareceu em $1163,8 \text{ cm}^{-1}$. Estes resultados permitiram confirmar a ocorrência de polimerização, uma vez que foi possível observar nos espectros bandas características de CNTs e da anilina.

Além disso, os espectros permitiram comprovar a eficácia da remoção da ACh do material MIP, pois o registo espectral dos materiais poliméricos com e sem impressão molecular foi idêntico. A única diferença esperada para estes espectros seria a presença/ausência de ACh na sua constituição. Neste sentido, foi possível afirmar que, por comparação direta dos espectros dos materiais MIP e NIP, a molécula molde (ACh) foi removida com êxito.

Posteriormente, foram traçados os espectros FTIR para os materiais sensores MIP e NIP. As imagens relativas a esses espectros estão representados na Figura 12.

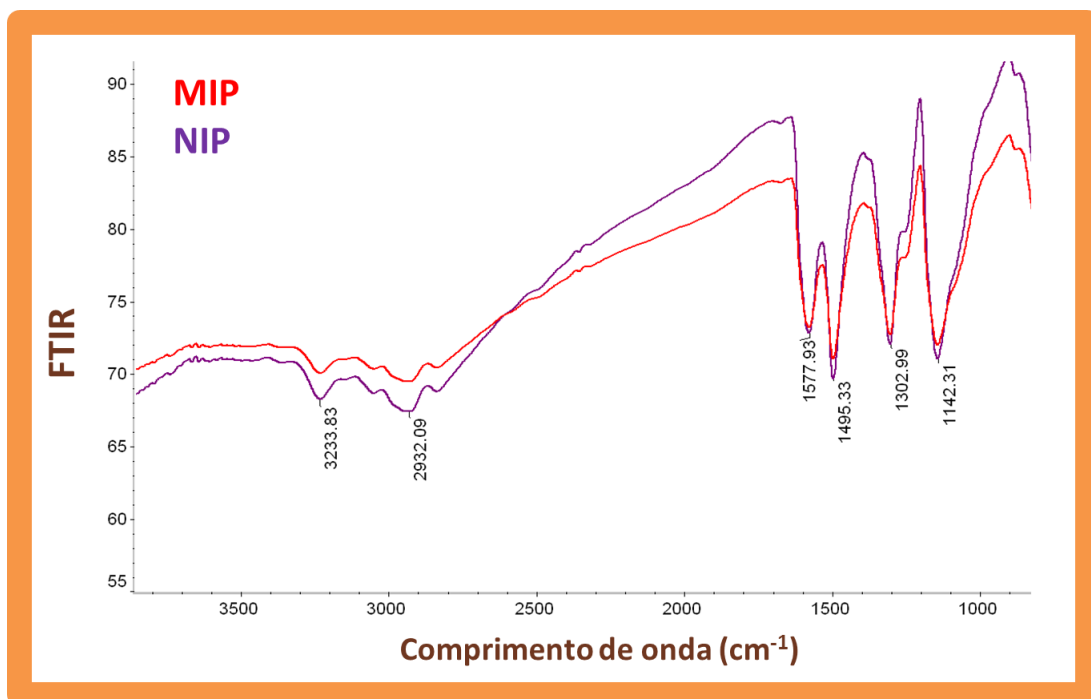


Figura 12. Espectros de FTIR/ATR no MIP/NIP

Observam-se vários picos típicos do complexo formado pela anilina e pelos nanotubos de carbono no material MIP e NIP, localizados a 1142,3; 1303,0; 1495,3 e 1577,9 cm^{-1} . Estes picos estão associados a diferentes modos vibracionais, incluindo: ligações C-H (fora do plano) nos anéis benzeno, anéis N=quinóide, estiramento da ligação N-Caromático, estiramento do N-B-N e N=Q=N, respetivamente.

Em detalhe, o pico centrado em 1303,0 cm^{-1} foi atribuído ao estiramento C-N na vizinhança do anel quinóide e benzenóide. Já a banda em 1142,3 cm^{-1} foi atribuída à deformação no plano de ligações N=Q=N (Q refere-se ao anel quinóide). As bandas a

1577,9 e 1495,3 cm^{-1} estão associadas ao estiramento das ligações C=C aromáticas dos anéis quinóides e ao estiramento das ligações C=C aromáticas dos anéis benzenóides. A magnitude destes dois picos corrobora com a hipótese de uma proporção aproximada de 50% de unidades quinóides e 50% de unidades benzenóides, características do polímero de anilina. Existem ainda duas bandas de absorção no espectro, uma centrada a 3233,8 cm^{-1} e atribuída a vibrações de estiramento da ligação N-H e outra centrada a 2932,1 cm^{-1} e associada à deformação angular de ligações C-H saturadas.

Mais uma vez, foi possível confirmar da análise dos espectros FTIR a ocorrência de polimerização e a eficiente remoção da ACh. Tal como nos espectros de Raman, os espectros FTIR dos materiais MIP e NIP foram idênticos, sendo este registo expectável uma vez que a única diferença na preparação destes materiais foi a presença da ACh no MIP, removida na fase final da sua síntese.

3.3. Características de funcionamento dos sensores

A preparação de membranas seletivas da ACh com composições diferentes foi realizada com o intuito de descobrir qual a composição que originaria um melhor desempenho analítico. De uma forma simples, as membranas seletivas de ACh foram preparadas com materiais biomiméticos MIP ou NIP, dispersas em solvente plastificante (oNFOE) e PVC. Estes dois últimos componentes são tipicamente comuns a todas as membranas seletivas e não foram objeto de otimização. A comparação direta de membranas cuja diferença seria o material MIP ou NIP permitiria aferir o contributo da impressão da molécula molde para a resposta potenciométrica.

Além disso, as membranas requerem muitas vezes a presença de um aditivo lipofílico iónico, tendo em vista aumentar a permeabilidade desta fase lipófila a espécies iónicas. Neste sentido, adicionou-se às membranas que continham MIP como ionóforo, um composto lipofílico aniónico, TpCIPB, ou um composto lipofílico catiónico, TOB. Tipicamente, a adição deste composto iónico de natureza lipofílica nos sensores potenciométricos reduz ainda a interferência das cargas negativas, além de diminuir a resistência elétrica das membranas. Para avaliar a interferência destes aditivos durante o desempenho do analito foram preparados controlos, ou seja, membranas sem material sensor e que apresentavam apenas estes aditivos com função de ionóforo.

A avaliação dos parâmetros das membranas preparadas baseou-se na comparação das características operacionais dos diversos eléctrodos preparados com base nessas

membranas. Estas características foram obtidas a partir de curvas de calibração, de acordo com o indicado na secção 2.6. Esta avaliação seguiu as recomendações da IUPAC [75], tendo sido realizada a diferentes valores de pH (3,4, 6 e 8,5), uma vez que estes são determinantes para a resposta potenciométrica. Os valores médios dos parâmetros de calibração obtidos foram calculados com base em três ensaios.

As membranas seletivas de ião A, B, C, D, F e G, correspondem, respetivamente, ao MIP, NIP, MIP com aditivo catiónico (TOB), MIP com aditivo aniónico (TpCIPB), aditivo aniónico (TpCIPB) e aditivo catiónico (TOB).

3.3.1. Tampão de pH 3

Da calibração com HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M a pH 3 verificou-se que todos os elétrodos apresentavam declives inferiores ao estabelecido teoricamente ($59 \text{ mV década}^{-1}$) tal como se pode ver na Tabela 3. O ESI D foi o único que apresentou um declive minimamente aceitável, sendo esse valor igual a $41,35 \text{ mV década}^{-1}$. Este elétrodo exibiu um comportamento linear a partir de $3,49 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, apresentando um limite de deteção de $1,16 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. O ESI A (MIP) não funcionou, porém ao ter sido adicionado TpCIPB a este MIP (ESI D), houve uma melhoria bastante significativa do declive. O mesmo não se pode dizer da adição de TOB (aditivo catiónico) que não produziu quaisquer melhorias, em termos de declive, no MIP (ESI C).

Tabela 3. Parâmetros potenciométricos das membranas de ACh em HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M, a pH 3

Parâmetro	ESI A	ESI B	ESI C	ESI D	ESI F	ESI G
Declive, mV década^{-1}	$17,58 \pm 13,6$	$11,62 \pm 9,5$	$-5,61 \pm 5,9$	$41,35 \pm 9,7$	$21,37 \pm 11,0$	$-7,03 \pm 5,9$
R^2 , (n =4)	0,988	0,997	0,993	0,998	0,995	0,993
LD, mol L^{-1}	$7,84 \times 10^{-5}$	$9,32 \times 10^{-5}$	$4,96 \times 10^{-5}$	$1,16 \times 10^{-5}$	$2,72 \times 10^{-5}$	$6,93 \times 10^{-5}$
LIRL, mol L^{-1}	$9,84 \times 10^{-5}$	$1,81 \times 10^{-4}$	$6,07 \times 10^{-5}$	$3,49 \times 10^{-5}$	$3,49 \times 10^{-5}$	$1,10 \times 10^{-4}$
LSRL, mol L^{-1}	$1,05 \times 10^{-3}$	$8,65 \times 10^{-4}$	$8,55 \times 10^{-4}$	$7,56 \times 10^{-4}$	$5,67 \times 10^{-4}$	$1,27 \times 10^{-3}$

Na Figura 13 encontram-se representadas as curvas de calibração típicas relativas aos sensores MIP, NIP, MIP com aditivos e apenas aditivos. Fazendo a análise desta figura,

foi possível verificar que os declives mais elevados foram obtidos para os elétrodos com materiais sensores MIP com aditivo TpCIPB e para o elétrodo que continha apenas o aditivo TpCIPB, apresentando o MIP com aditivo o declive mais elevado. Quando comparados com os sensores correspondentes sem este aditivo, comprovou-se o referido anteriormente; houve um aumento significativo em termos de declive, já em termos de limite inferior de zona linear não se notou uma melhoria evidente. Os restantes sensores que continham ionóforos MIP, NIP, MIP com aditivo catiónico TOB ou apenas TOB, exibiram fracas sensibilidades, apresentando baixos declives.

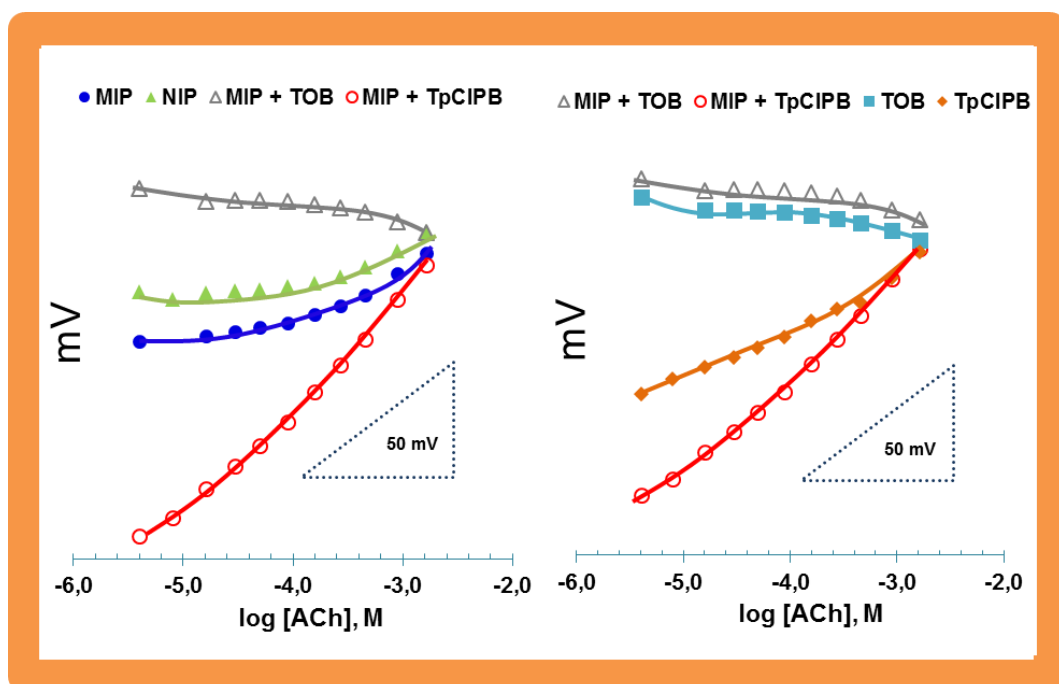


Figura 13. Curva de calibração em tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M, a pH 3

3.3.2. Tampão de pH 4

A calibração realizada em tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ mol/L de pH 4 demonstrou que os ESIs funcionaram melhor nestas condições. Verificou-se que todos os elétrodos apresentavam, na generalidade, declives acima dos valores teóricos, à excepção dos elétrodos (ESI C e G) que apresentaram um valor de 32,97 e de 23,12 mV década⁻¹, respetivamente (Tabela 4). Tendo em conta os valores apresentados na Tabela 4, foi possível afirmar que a adição de TpCIPB ao MIP (ESI D) fez aumentar a sensibilidade deste elétrodo quando comparado somente com o MIP (ESI A). Para o ESI D obteve-se

um declive de 83,86 mV década⁻¹ e um limite de detecção de 3,45×10⁻⁵ mol/L. Na Figura 14 encontram-se representadas as curvas de calibração típicas obtidas neste estudo.

Tabela 4. Parâmetros potenciométricos das membranas de ACh em HEPES 1,0 × 10⁻² M, a pH 4

Parâmetro	ESI A	ESI B	ESI C	ESI D	ESI F	ESI G
Declive, mV década ⁻¹	75,99±10,7	60,80±6,6	32,97±16,0	83,86±8,8	71,95±4,9	23,12±36,5
R ² , (n =3)	0,991	0,991	0,996	0,997	0,991	0,993
LD, mol L ⁻¹	3,45×10 ⁻⁵	2,33×10 ⁻⁵	5,23×10 ⁻⁵	3,45×10 ⁻⁵	1,70×10 ⁻⁵	1,98×10 ⁻⁵
LIRL, mol L ⁻¹	3,13×10 ⁻⁵	3,82×10 ⁻⁵	7,28×10 ⁻⁵	4,52×10 ⁻⁵	2,64×10 ⁻⁵	3,13×10 ⁻⁴
LSRL, mol L ⁻¹	1,73×10 ⁻³	1,73×10 ⁻³	1,73×10 ⁻³	1,73×10 ⁻⁴	1,47×10 ⁻³	1,73×10 ⁻³

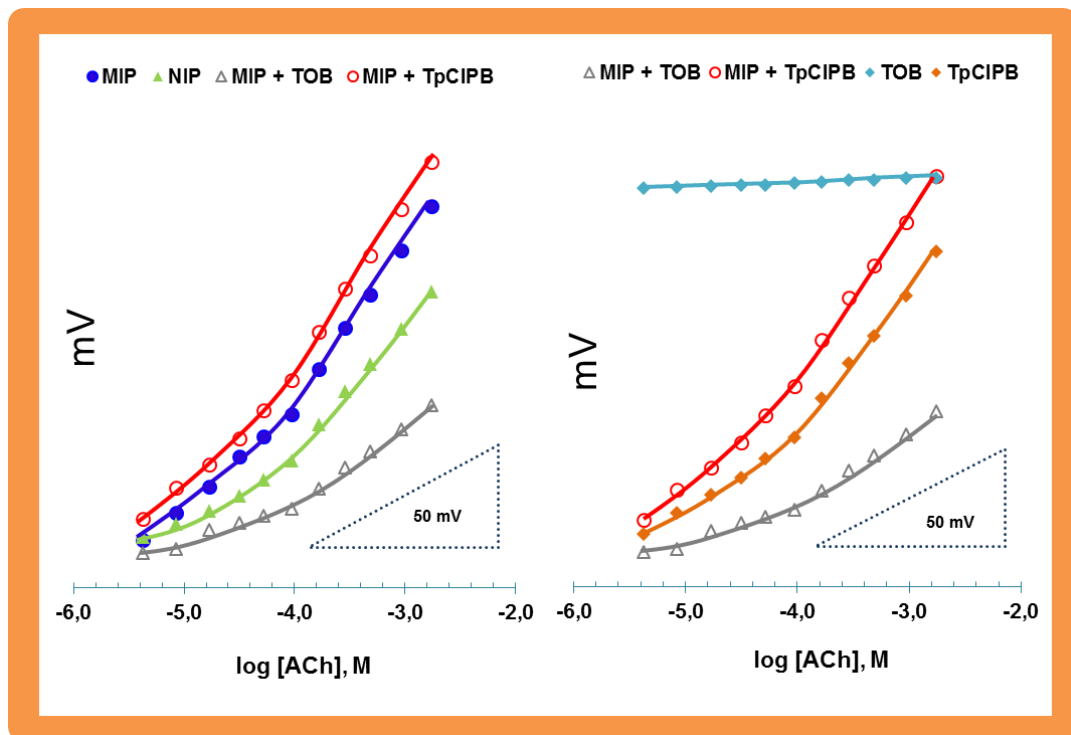


Figura 14. Curva de calibração em tampão HEPES 1,0×10⁻² M, a pH 4

Analisando a Figura 14, pode dizer-se que a adição do aditivo aniônico (TpCIPB) provocou, uma melhoria moderada em termos de declive do ESI com apenas MIP. Este aumento era esperado uma vez que este componente atrai espécies carregadas

positivamente, como é o caso da ACh a pH 4. Já o NIP, MIP com aditivo catiónico (TOB) e o TOB apresentam declives baixos, o que se traduz numa menor sensibilidade quando comparados com os restantes.

3.3.3. Tampão de pH 6

A calibração a pH 6 foi realizada nas mesmas condições que as anteriores e verificou-se que apenas os ESIs A, B, D e F funcionaram. Todos os elétrodos, nestas condições, apresentaram declives inferiores aos teóricos. Os elétrodos D e F apresentaram os valores de declive mais próximos dos teóricos, sendo estes de 49,21 e 47,60 mV década⁻¹, respetivamente. Os sensores MIP com TpCIPB e TpCIPB exibiram um comportamento linear a partir de $3,86 \times 10^{-5}$ mol/L e limites de deteção de $2,08 \times 10^{-5}$ e de $2,91 \times 10^{-5}$ mol/L, respetivamente (Tabela 5). O sensor MIP foi o que apresentou o declive mais baixo. Apesar das condições já estarem perto da neutralidade, a adição do aditivo aniónico fez com que o declive do MIP aumentasse significativamente.

Tabela 5. Parâmetros potenciométricos das membranas de ACh em HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M, a pH 6

Parâmetro	ESI A	ESI B	ESI C	ESI D	ESI F	ESI G
Declive, mV década ⁻¹	36,24±5,0	38,60±5,2	-19,86±2,1	49,21±2,4	47,60±2,3	-22,53±3,1
R ² , (n =3)	0,990	0,993	0,996	0,993	0,995	0,996
LD, mol L ⁻¹	$4,63 \times 10^{-5}$	$1,14 \times 10^{-4}$	$6,58 \times 10^{-5}$	$2,08 \times 10^{-5}$	$2,91 \times 10^{-5}$	$4,46 \times 10^{-5}$
LIRL, mol L ⁻¹	$5,95 \times 10^{-5}$	$1,83 \times 10^{-4}$	$8,04 \times 10^{-5}$	$3,16 \times 10^{-5}$	$3,86 \times 10^{-5}$	$5,95 \times 10^{-5}$
LSRL, mol L ⁻¹	$1,33 \times 10^{-3}$	$1,48 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-3}$

A Figura 15 diz respeito ao traçado da curva de calibração dos diversos sensores em tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M, a pH 6. Observando esta Figura, foi possível afirmar que os sensores MIP com aditivo catiónico (TOB) e TOB não funcionaram de todo nestas condições, apresentando possivelmente uma interferência do anião hidroxilo, face ao declive aniónico registado. A pH 6 as membranas com apenas MIP e NIP apresentaram sensibilidades semelhantes, mas a adição de TpCIPB ao MIP promoveu um aumento significativo do declive da resposta potenciométrica. Já em termos de LD e de

comportamento linear, houve uma melhoria mas nada de relevante. Comparando o sensor NIP com os restantes, este foi o que obteve melhor LD e LIRL, sendo esses valores de $1,14 \times 10^{-4}$ e $1,83 \times 10^{-4}$ mol/L, respetivamente.

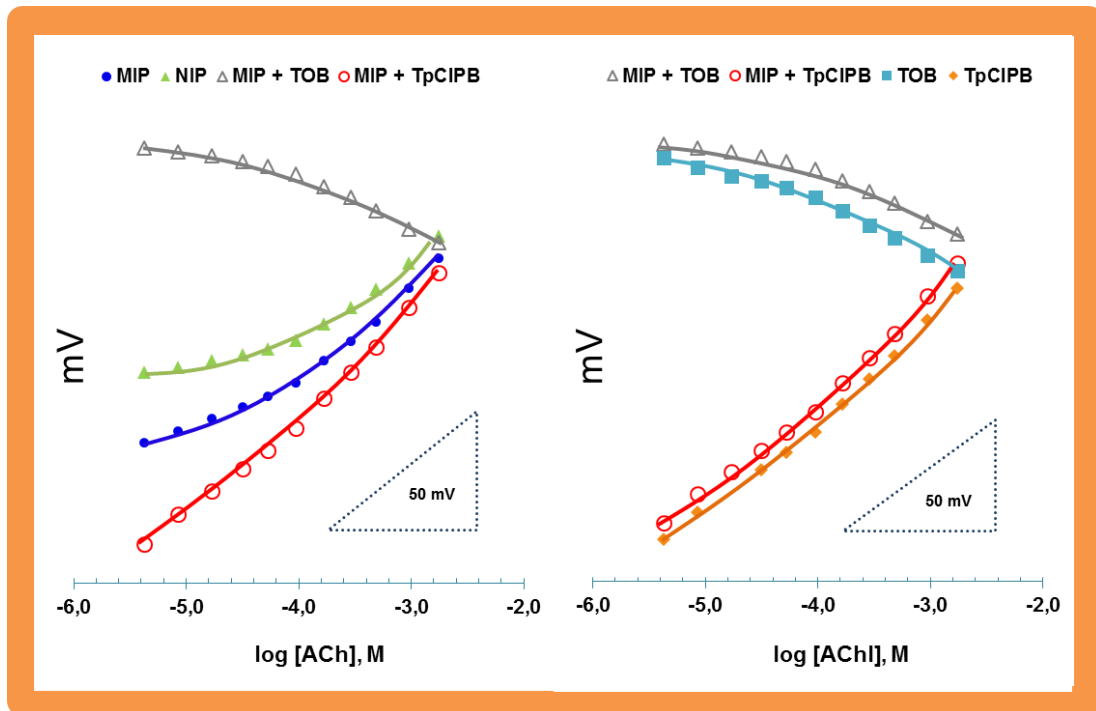


Figura 15. Curva de calibração em tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M, a pH 6

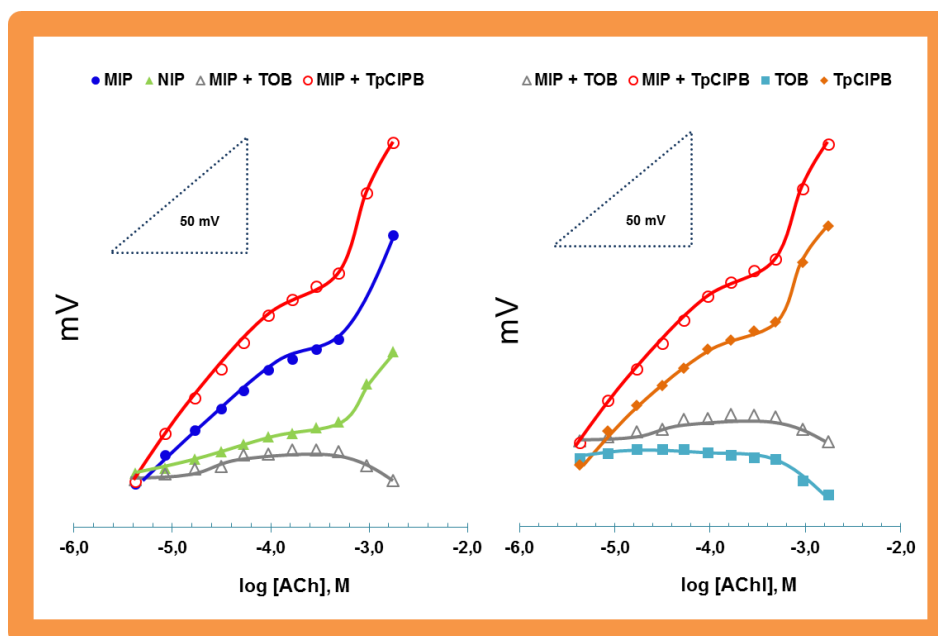
3.3.4. Tampão de pH 8,5

A pH 8,5 todos os elétrodos apresentaram valores de declive abaixo dos teóricos, o que significou que estas condições não seriam as mais apropriadas. Aliás, só o elétrodo D originou um declive considerado aceitável e foi o único considerado como “funcional”. Para este elétrodo obteve-se um declive de $39,03 \text{ mV década}^{-1}$, um LD de $9,87 \times 10^{-6}$ mol/L e um LIRL de $2,19 \times 10^{-5}$ mol/L (Tabela 6). O declive dos elétrodos com aditivo catiónico (TOB) confirmou novamente a presença de uma interferência aniónica, associada à desprotonação de uma outra espécie, uma vez que o seu declive aniónico é menos acentuado do que o registado a pH 6.

Tabela 6. Parâmetros potenciométricos das membranas de ACh em HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M, a pH 8,5

Parâmetro	ESI A	ESI B	ESI C	ESI D	ESI F	ESI G
Declive, mV década ⁻¹	18,92 ± 11,5	6,01 ± 3,8	-13,63 ± 8,1	39,03 ± 17,9	19,66 ± 14,3	-3,74 ± 1,8
R ² , (n =3)	0,992	0,997	0,998	0,997	0,993	0,997
LD, mol L ⁻¹	4,15×10 ⁻⁶	8,15×10 ⁻⁶	2,62×10 ⁻⁴	9,87×10 ⁻⁶	6,59×10 ⁻⁶	3,93×10 ⁻⁵
LIRL, mol L ⁻¹	4,15×10 ⁻⁶	8,15×10 ⁻⁶	3,45×10 ⁻⁴	2,19×10 ⁻⁵	1,42×10 ⁻⁵	6,55×10 ⁻⁵
LSRL, mol L ⁻¹	2,39×10 ⁻⁴	2,24×10 ⁻⁴	1,29×10 ⁻³	3,45×10 ⁻⁴	2,80×10 ⁻⁴	4,75×10 ⁻⁴

Na Figura 16 encontram-se as curvas de calibração em HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M realizadas a pH 8,5. Da análise desta figura, pode dizer-se que os sensores não exibiram uma resposta linear em toda a gama de concentração estudada. O MIP com TpCIPB foi o que apresentou a maior sensibilidade, tendo a adição de TpCIPB melhorado de forma significativa as características potenciométricas do material sensor MIP, nomeadamente em termos de declive e de gama de linearidade. Relativamente aos restantes sensores, estes mostraram fracas sensibilidades nestas condições.

**Figura 16.** Curva de calibração em tampão HEPES $1,0 \times 10^{-2}$ M, a pH 8,5

3.3.4. Efeito do pH resumido

As melhores características operacionais em termos de sensibilidade foram obtidas em pH 4 (Figura 14), daí este ter sido selecionado para estudos posteriores e considerado o pH ótimo. Nestas condições, o sensor exibiu declives Nernstianos bastante elevados e uma alta gama de linearidade, quando comparado com os outros valores de pH.

Para valores de pH mais ácido, o valor do potencial poderia ser influenciado pela presença de H^+ em solução, promovendo, assim, uma interferência adicional. Relativamente ao funcionamento dos elétrodos em pH básico, verificou-se que estes praticamente não reproduziram uma resposta aceitável e houve, também, um estreitamento na gama de linearidade, o que significou que o sensor seria mais sensível a valores de pH na região ácida.

3.3.5. Tempo de resposta e estabilidade

O tempo de resposta correspondeu ao tempo que foi necessário para que o potencial fosse constante e, neste estudo, considerou-se igual a ± 1 mV. Esta resposta foi conseguida para soluções de ACh de 1×10^{-2} mol/L, verificando-se a estabilização do sinal em apenas 60 segundos, mesmo para as concentrações mais elevadas. O valor de potencial inicial demorou cerca de 10 min a estabilizar.

As baixas variações de potencial e estabilidade a longo prazo foram observados dentro de calibrações feitas em dias consecutivos. De uma forma geral, as variações de potencial em calibrações consecutivas foi pouco significativa.

3.4. Seletividade do sensor

A análise de seletividade dos sensores foi uma das particularidades mais importantes no que diz respeito à sua aplicação analítica. Um componente da membrana seletiva que evidenciou grande influência nesta propriedade foi o material eletroativo, uma vez que o mecanismo de seletividade foi, maioritariamente, definido por aspetos estereoespecíficos e eletrostáticos. Desta forma, os elétrodos podem ser seletivos para um ião, mas não específico para ele, podendo detetar outros iões na solução. O perfil de cada sensor foi avaliado através dos coeficientes de seletividade potenciométrica pelo método das soluções mistas. Este método baseia-se na medição do potencial numa solução com um nível constante de interferente, fazendo-se variar a concentração de ACh. O potencial

obtido nestas condições *versus* a concentração de ACh, permitiu a interceção das regiões lineares de calibração, indicando o valor da concentração a ser usado para calcular o K^{POT} .

A seletividade do sensor foi testada contra a Creatina, a Creatinina, a Cisteína, a Glucose e a Ureia. Os limites de deteção relativos à ACh e aos interferentes foram apresentados na tabela 7, já os valores obtidos para o logaritmo de K^{POT} encontram-se na tabela 8.

Observando a tabela 7 e fazendo a correspondência na tabela 8, verificou-se que o limite de deteção estava ligado à ocorrência de interferência e que era afetado pela seletividade dos elétrodos. Desta forma, um aumento do limite de deteção foi associado à presença de interferência, o que se traduziu também num valor mais elevado de K^{POT} . Quanto mais negativos fossem os valores do coeficiente de seletividade, menor seria a interferência causada pelo composto em estudo.

Tabela 7. Limites de deteção obtidos através das curvas de calibração realizadas para a acetilcolina e para cada interferente

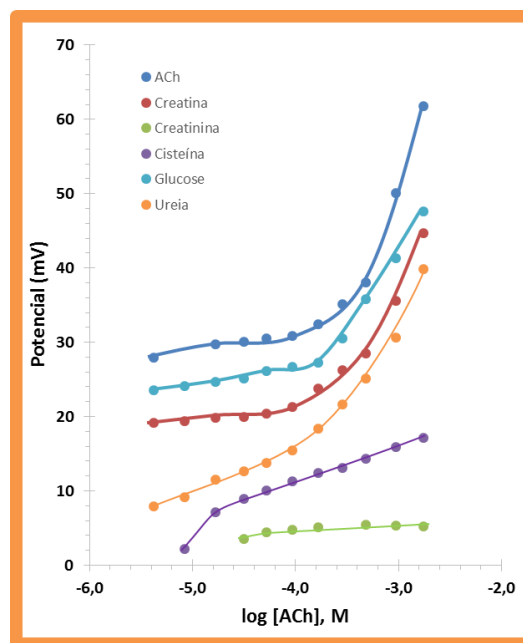
Espécie	Limite de Deteção					
	ESI A	ESI B	ESI C	ESI D	ESI F	ESI G
Acetilcolina	$2,29 \times 10^{-4}$	$1,20 \times 10^{-4}$	$2,82 \times 10^{-5}$	$8,13 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-4}$	$4,57 \times 10^{-4}$
Creatina	$2,51 \times 10^{-4}$	$4,57 \times 10^{-5}$	$2,57 \times 10^{-5}$	$6,16 \times 10^{-5}$	$1,29 \times 10^{-4}$	$4,26 \times 10^{-5}$
Creatinina	$3,16 \times 10^{-5}$	$5,01 \times 10^{-4}$	$6,31 \times 10^{-5}$	$2,09 \times 10^{-5}$	$2,04 \times 10^{-5}$	$8,13 \times 10^{-5}$
Cisteína	$7,08 \times 10^{-5}$	$7,24 \times 10^{-5}$	$4,27 \times 10^{-5}$	$2,45 \times 10^{-5}$	$3,98 \times 10^{-5}$	$3,72 \times 10^{-5}$
Glucose	$1,48 \times 10^{-4}$	$1,20 \times 10^{-4}$	$1,15 \times 10^{-4}$	$2,51 \times 10^{-5}$	$2,46 \times 10^{-5}$	$5,01 \times 10^{-5}$
Ureia	$7,41 \times 10^{-5}$	$7,59 \times 10^{-5}$	$3,98 \times 10^{-5}$	$4,07 \times 10^{-5}$	$2,63 \times 10^{-5}$	$2,51 \times 10^{-5}$

Analisando os valores da tabela 8 foi possível constatar que o elétrodo mais seletivo foi o ESI D e A, pois apresentou, relativamente aos restantes, os valores mais baixos de $\log K^{POT}$ para todos os interferentes. É importante salientar que alguns destes valores podem conduzir a considerações ilusórias, uma vez que decorrem da utilização de concentrações de interferente baixas relativas à concentração do ião principal, ACh. Os gráficos relativos às calibrações efetuadas neste estudo foram apresentados em seguida e permitiram retirar algumas conclusões sobre a interferência observada nos ESIs.

Tabela 8. Log de K^{POT} calculado pelo método das soluções mistas, em HEPES a pH 4

Interferente	ESI A	ESI B	ESI C	ESI D	ESI F	ESI G
Creatina	-0,04	0,19	0,07	0,12	0,07	1,03
Creatinina	0,82	-1,10	-0,35	0,30	-0,82	-0,57
Cisteína	0,08	0,22	0,28	0,01	-0,16	-0,11
Glucose	-0,35	-0,69	0,54	-0,03	0,71	-0,24
Ureia	-0,23	0,16	0,47	-0,21	0,02	0,28

Relativamente ao ESI A, cujo comportamento geral se assinala na Figura 17, a ureia, a creatina e a glucose pareceram não promover interferência, uma vez que o LD se manteve praticamente inalterado ou a sua melhoria foi impercetível. A sensibilidade com que a resposta potenciométrica foi registada diminuiu ligeiramente, mas as variações de potencial observadas na região linear foram ainda significativas.

**Figura 17.** Curvas de calibração obtidas para a ACh e para cada um dos interferentes, no ESI A

A interferência da cisteína foi moderada, considerando a redução de sensibilidade, embora fosse impercetível em termos de LD (que foi até inferior à curva de calibração com

ACh). A interferência da creatinina foi a mais significativa, uma que vez que o elétrodo não conseguiu produzir variações de potencial na sua presença.

Observando a Figura 18, foi possível afirmar que, para o ESI B, espécies como a glucose e a creatina não originaram interferência. A interferência da creatinina, da cisteína e da ureia foi bastante significativa. Esta interferência, apesar de significativa, foi imperceptível em termos de declive para a creatinina, já a cisteína e a ureia causaram perda de sensibilidade no elétrodo.

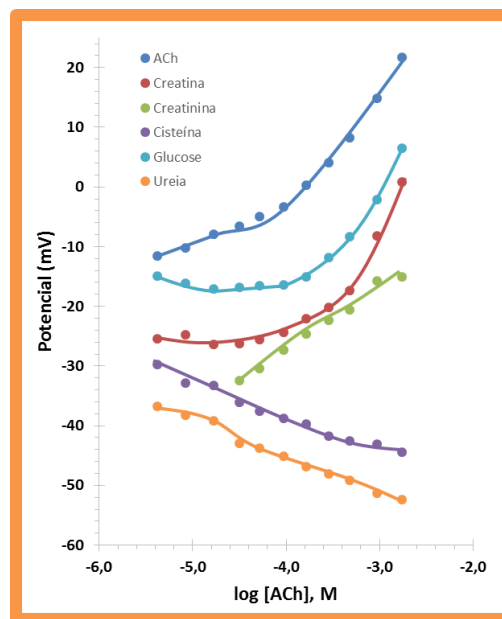


Figura 18. Curvas de calibração obtidas para a ACh e para cada um dos interferentes, no ESI B

Quanto ao ESI C, cujo comportamento pode ser observado na Figura 19, apenas a creatinina não causou interferência uma vez que possuiu um comportamento muito semelhante ao da ACh. As restantes espécies promoveram baixas seletividades embora pouco perceptíveis em termos de LD. A interferência da cisteína foi a mais significativa, uma que vez que o elétrodo não conseguiu responder corretamente na sua presença.

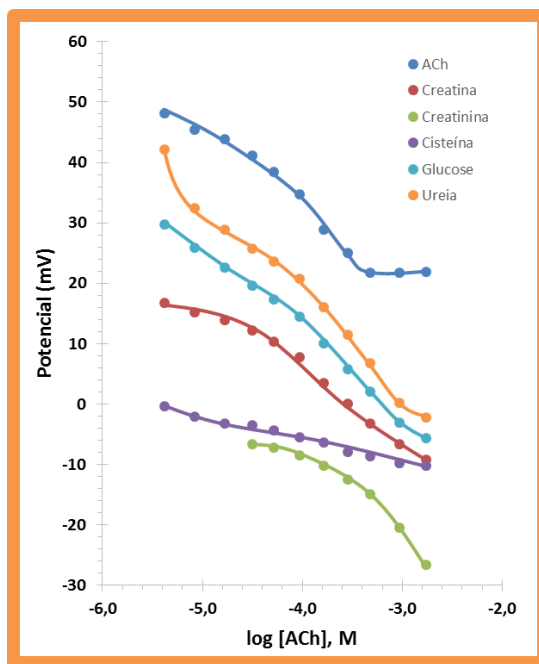


Figura 19. Curvas de calibração obtidas para a ACh e para cada um dos interferentes, no ESI C

Na figura 20 está representado o comportamento do ESI D. Analisando e comparando com os elétrodos anteriores, este foi o que apresentou o menor conjunto de interferências.

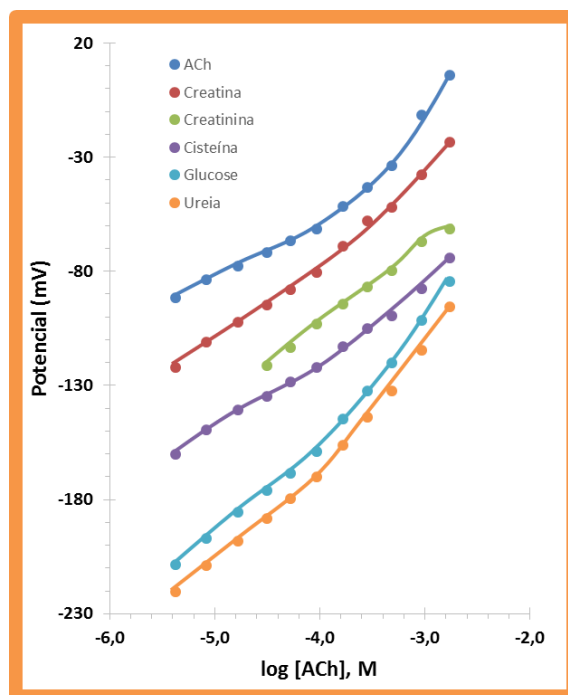


Figura 20. Curvas de calibração obtidas para a ACh e para cada um dos interferentes, no ESI D

Todos os interferentes apresentaram comportamentos semelhantes quando comparados com o íon principal e, também, não se verificaram variações consideráveis de LD. Visto que se tratou de um sensor com aditivo aniônico, significou que este constituinte aumentou a seletividade neste mesmo elétrodo.

Relativamente à Figura 21, o ESI F não sofreu interferência por parte de espécies como a glucose e a ureia. Quanto à creatina, à cisteína e à creatinina, estas promoveram interferências moderadas neste elétrodo, tendo reduzido a sua sensibilidade.

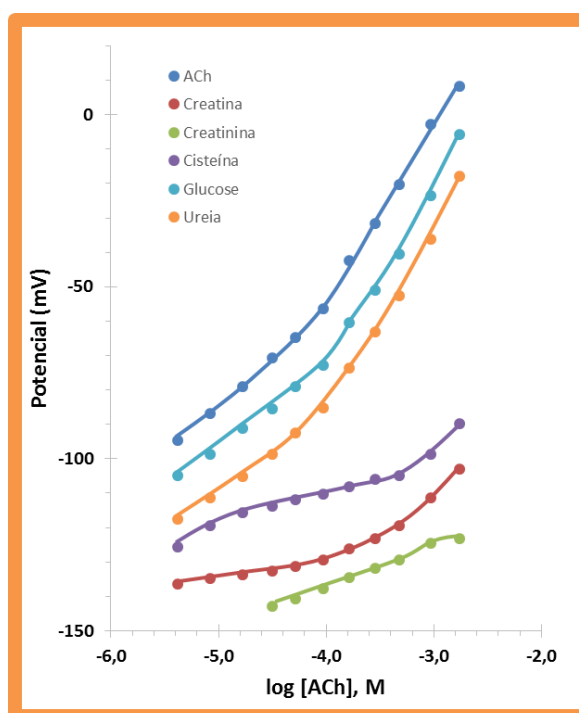


Figura 21. Curvas de calibração obtidas para a ACh e para cada um dos interferentes, no ESI F

Por último, as espécies menos interferentes no ESI G, foram a glucose, a ureia e a creatina. O ESI G não conseguiu responder corretamente na presença de cisteína e creatinina, sendo, portanto, as mais interferentes.

De uma maneira geral pode-se dizer que os sensores com aditivo aniônico revelaram ter um menor valor de $\log K^{POT}$ do que os correspondentes sem aditivo e com aditivo catiónico, o que significou que este constituinte presente na membrana aumentou a seletividade do elétrodo. Os elétrodos mais seletivos foram, portanto, o ESI D e F. Pela

análise das figuras anteriores, verificou-se que a espécie menos interferente foi a creatina e a mais interferente a creatinina.

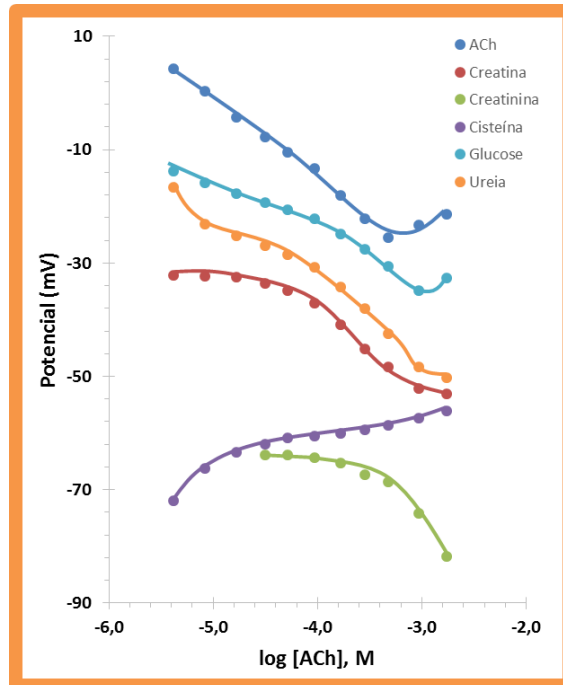


Figura 22. Curvas de calibração obtidas para a ACh e para cada um dos interferentes, no ESI G

3.5. Análise de Amostras

Na ausência de soluções de amostras reais de fluido cerebrospinal de doentes com DA e valores de ACh anormais, optou-se pela aplicação dos elétrodos em soro sintético, dopado com ACh. Para este efeito, foram efetuadas calibrações com diferentes concentrações de ACh em fundo de soro sintético com o objetivo de encontrar qual a menor concentração da mesma que é possível detetar. As concentrações de ACh, em estudo, variaram entre $2,02 \times 10^{-4}$ e $2,93 \times 10^{-5}$ M.

Na Tabela 9 está representada a concentração de ACh detetada, a percentagem de recuperação e o erro associado. Além destes resultados, foram obtidos outros valores com erros muito elevados, localizados numa região de calibração diferente (ordem 10^{-5}). Este resultado sugeriu a importância de proceder à diluição da amostra até encontrar valores de concentração incluídos nesta região.

Tabela 9. Resultados obtidos para a análise em soro sintético

Concentração de ACh (mol/L)	Recuperação (%)	Erro (%)
$2,02 \times 10^{-4}$	$89,44 \pm 1,76$	$-10,56 \pm 1,76$
$3,86 \times 10^{-4}$	$91,97 \pm 9,36$	$-9,38 \pm 8,03$
$6,51 \times 10^{-4}$	$98,81 \pm 8,92$	$-8,92 \pm 1,19$

Através dos valores dados pelo eletrodo MIP com aditivo aniônico, foi possível detectar a presença de ACh a partir de $2,02 \times 10^{-4}$ M. Para concentrações de ordem 10^{-5} M, os erros obtidos foram absurdos e, como tal, não se encontram na tabela 7.

Os valores de recuperação, fruto desta análise, variaram entre 89,44 e os 98,91%, correspondendo a erros relativos entre -11 e -9 %. Considerando os níveis de concentração em causa e o tipo de amostra em estudo, estes erros parecem ser, porém, aceitáveis.

De uma forma geral, os resultados indicaram um desvio sistemático negativo, sugerindo a necessidade de estudar com maior profundidade as condições capazes de fornecer resultados mais exatos. Em alternativa, e após verificação contra amostras validadas, seria sempre possível implementar um fator de correção apropriado.

4. Conclusão

A técnica de polimerização por impressão molecular foi utilizada para produzir sensores para transdução potenciométrica. Esta técnica foi aplicada com sucesso no que diz respeito à produção de materiais biomiméticos sensíveis à ACh.

De uma forma geral, a adição de aditivo aniônico ao MIP originou dispositivos com características de resposta adequadas, sugerindo que a presença destes compostos iônicos aumentaram a afinidade entre o material biomimético e a ACh.

A resposta potenciométrica foi definida pelas características do meio em que as membranas se encontravam, ou seja, o pH exerceu uma grande influência. Em meio ácido, mais precisamente para pH 4, as membranas apresentaram boas características analíticas. Assim sendo, as membranas apresentaram, como vantagem, uma concepção simples, baixo tempo de resposta, boa precisão, alta precisão, baixo limite de detecção e boa seletividade.

Apesar de o método proposto ser simples, barato, preciso e de baixo custo em relação ao consumo de reagentes e equipamento envolvidos, há, ainda, todo um trabalho a desenvolver. Para isso, é necessário realizar estudos exaustivos para que se possa detetar a ACh em amostras biológicas com erros aleatórios e inferiores.

Em suma, e tendo em conta uma perspetiva futura, seria interessante tentar reproduzir a metodologia de impressão molecular baseada em nanotubos de carbono e anilina, não apenas para monitorizar a ACh mas, para estender essa monitorização a outros compostos. Esta combinação apresenta boas características condutoras que podem promover o estudo dos parâmetros potenciométricos dos ESIs.

A ACh não é um biomarcador específico da DA e, portanto, seria desafiador aplicar este estudo a outro tipo de biomarcadores mais característicos desta doença.

5. Referências Bibliográficas

1. World Health Organization, www.who.int/topics/neurology/en, acessado a 12-03-2014.
2. Association, A.P., Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders- DSMIV. 4th ed. 1994, Washington, D.C.
3. Fratiglioni L., De Ronchi D., Aguero-Torres H., Worldwide prevalence and incidence of dementia. *Drugs Aging*, 1999. 15: 376-75.
4. Wimo A., Prince M., The Global Economic Impact of Dementia, 2010. Alzheimer's disease International, World Alzheimer Report 2010.
5. Associação Portuguesa de Familiares e Amigos dos Doentes de Alzheimer, <http://alzheimerportugal.org/pt/text-0-9-30-14-a-doenca-de-alzheimer>, acessado a 14-03-2014.
6. Hofman, A., et al., The prevalence of dementia in Europe: a collaborative study of 1980-1990 findings, Eurodem Prevalence Research Group, *Int J Epidemiol*, 1991, 20(3): p. 736-48.
7. Rocca, W.A., et al., The prevalence of vascular dementia in Europe: facts and fragments from 1980-1990 studies, EURODEM-Prevalence Research Group, *Ann Neurol*, 1991, 30(6): p. 817-24.
8. Larson, E., Management of Alzheimer's disease in a primary care setting, *Ann J Geriatr Psychiatry*, 1998, 6(1): p. 534.
9. Serviço de Fisiologia da FMUP, http://fisiologia.med.up.pt/Textos_Apoio.html, 29-03-2014.
10. Siegel, A., Sapru, H., The autonomic nervous system, *Essential Neuroscience*, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006, p. 397-407.
11. Contestabile, A., The history of the cholinergic hypothesis, *Behavioural Brain Research*, 2011, 221: p. 334-340.
12. Tümtürk, H., Şahin, F., Demirel, G., A new method for immobilization of acetylcholinesterase, *Bioprocess Biosyst Eng*, 2007, 30: p.141-145.

13. Kamal, M., Greig, N., Alhomida, A., Al-Jafari, A., Kinetics of Human Acetylcholinesterase Inhibition by the Novel Experimental Alzheimer Therapeutic Agent, Tolserine, *Biochemical Pharmacology*, 2000, 60: p. 561-570.
14. Shen, T., Tai, K., Henchman, R., McCammon, J., Molecular Dynamics of Acetylcholinesterase, *Acc Chem Res*, 2002, 35: p. 332-40.
15. García-Ayllón, M., Silveyra, M., Sáez-Valero, J., Association between acetylcholinesterase and β -amyloid peptide in Alzheimer's cerebrospinal fluid, *Chemico-Biological Interactions*, 2008, 175: p. 209-215.
16. Gil-Bea, F., García-Alloza, M., Domínguez, J., Marcos, B., Ramírez, M., Evaluation of cholinergic markers in Alzheimer's disease and in a model of cholinergic deficit, *Neuroscience Letters*, 2005, 375: p. 37-41.
17. Williams, B., Eriksdotter-Jonhagen, M., Granholm, A., Nerve growth factor in treatment and pathogenesis of Alzheimer's disease, *Progress in Neurobiology*, 2006, 80: p.114-128.
18. Fu, A., Zhang, X., Sun, M., Antisense inhibition of acetylcholinesterase gene expression for treating cognition deficit in Alzheimer's disease model mice, *Brain Research*, 2005, 1066: p.10-15.
19. Ferreira, A., Proença, C., Serralheiro, M., Araújo, M., The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal, *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, 108: p. 31-37.
20. Perry, N., Bollen, C., Perry, E., Ballard, C., Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2003, 75: p.651-659.
21. Olsen, E., *Métodos ópticos de análisis*, Barcelona, Editoria Reverté, 1990.
22. Beattie, F., A colorimetric method for the determination of choline and acetylcholine in small amounts, *Biochem*, 1936, 30 (9): p.1554-1559.
23. Harvey D, *Electrochemical Methods*, Modern analytical chemistry, McGraw-Hill Higher, 2000.
24. Tsai, T., Separation methods used in th determination of choline and acetylcholine, *Jornal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 2000, 747 (1): p.111-122.
25. Uslu, B., Ozkan, S., Electroanalytical methods for the determination of pharmaceuticals: a review of recent trends and developments, *Electrochemistry*, 2011, 4: p. 2644-2702.

26. Ozkan, S., Principles and techniques of electroanalytical stripping methods for pharmaceutically active compounds in dosage forms and biological samples, *Current Pharmaceutical Analysis*, 2009, 5: p.127-143.
27. Dogan-Topal, B., Bozal, B., Demircigil, B., et al, Electroanalytical studies and simultaneous determination of amlodipine besylate and atorvastatine calcium in binary mixtures using first derivative of the ratio-voltammetric methods, *Electroanalysis*, 2009, 21:p. 2427-2439.
28. Lubert, K., Kalcherb, K.,History of electroanalytical methods, *Electroanalysis*, 2010, 22: p. 1937-1946.
29. Meulemans, A., Mothet, J.,Schirar, A.,Fossier, P., Tauc, L., Baux, G., A nitric oxide synthase activity is involved in the modulation of acetylcholine release inAplysia ganglion neurons: A histological, voltammetric and electrophysiological study, *Neuroscience*, 1995, 69 (3): p. 985-995.
30. Khaled, E., Hassan, H., Mohamed, G., Ragab, F., Seleim, A., β -Cyclodextrin-Based Potenciometric Sensors for Flow-Injection Determination of Acetylcholines, *Electrochem*, 2010, p.448-458.
31. Bundel, D., Sarre, S., Eeckhaut, A., Smolders, I., Michotte, Y., Critical Evaluation of Acetylcholine Determination in Rat Brain Microdialysates using Ion-Pair Liquid Chromatography with Amperometric Detection, *Sensors*, 2008, 8(8): p.5171-5185.
32. http://www.ibl-international.com/media/catalog/product/R/E/RE21031_IFU_pt_ARAb_Blocking_RIA_V2013_03_sym3_1.pdf, Acedido a 08-04-2014.
33. Lianga, R., Zhanga, R., Qin, W., Potentiometric sensor based on molecularly imprinted polymer for determination of melamine in milk, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2009,141:p. 544-550.
34. Ye, L., Mosbach, K., The Technique of Molecular Imprinting – Principle, State of the Art, and Future Aspects, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 2001, 41:p. 107-113.
35. Fuchiwaki, Y., Kubo, I.,Electrochemical Sensor Based on Biomimetic Recognition Utilizing Molecularly Imprinted Polymer Receptor, *Biomimetics Learning from Nature*,Tech, 2010.
36. Piletsky, S., Turner, A., Molecular Imprinting of Polymers, *Bioscience*, 2006.
37. Wang, Y., Zhou, Y., Sokolov, J., et al, A potentiometric protein sensor built with surface molecular imprinting method, *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24: p. 162-166.

38. Merkoçi, A., Alegret, S., New materials for electrochemical sensing IV. Molecular imprinted polymers, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2002, 21: p. 717-725.
39. Qiao, F., Sun, H., Yan H. et al, Molecularly Imprinted Polymers for Solid Phase Extraction, *Chromatographia*, 2006, 64: p. 625-634.
40. Moreira, F., Dutra, R. , Noronhad, J., et al, Artificial antibodies for troponin T by its imprinting on the surface of multiwalled carbon nanotubes: Its use as sensory surfaces, *Biosensors and Bioelectronics*, 2011, 28: 243-250.
41. Lin, L., Xiwen, H., Langxing, C., et al, Preparation of novel bovine hemoglobin surface imprinted polystyrene nanoparticles with magnetic susceptibility, *Science in China Series B: Chemistry*, 2009, 52:1402-1411.
42. Wang, Y., Z.Z., Jain V., et al, Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: Detection of cancer biomarkers and viruses, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010, 146: p. 381-387.
43. Kryscio, D., Peppas, N., Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers, *Acta Biomaterialia*, 2012, 8: p. 461-473.
44. Mirsky, V., Yatsimirsky, A., Artificial receptors for chemical sensors, Germany: WILEY-VCH, 2011.
45. Turner, A., Biosensors: sense and sensibility, *Chem Soc Rev*, 2013, 42(8): p. 3184-96.
46. Tothill, I., Biosensors for cancer markers diagnosis, *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009, 20: p. 55-62.
47. Pohanka M., Electrochemical biosensors - principles and applications, *Journal of Applied Biomedicine*, 2008, 6: p. 57-64.
48. Thevenot, D., et al., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosens Bioelectron*, 2001, 16(1-2): p. 121-31.
49. Lippa, P., Sokoll, L., Chan, D., Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry, *Clinica Chimica Acta*, 2001, 314: p. 1-26.
50. Holford, T., Davis, F., Higson, S., Recent trends in antibody based sensors, *Biosens Bioelectron*, 2012, 34(1): p. 12-24.
51. Moreira, F., Determinação de Norfloxacin em aquacultura, Tese de Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar, Faculdade de Ciências Universidade do Porto, 2009.
52. Uslu, B., Ozkan, S., Solid Electrodes in Electroanalytical Chemistry: Present Applications and Prospects for High Throughput Screening of Drug Compounds, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 2007, p. 495-513.

53. Abbas, M., Mostafa, G., Homoda, A., PVC membrane ion selective electrode for the determination of pentachlorophenol in water, wood and soil using tetrazolium pentachlorophenolate, *Talanta*, 2001, p. 647-656.
54. Buck, R., Lindner, E., Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes, International Union of Pure and Applied Chemistry, 1994, 66: p. 2527-2536.
55. Moreira, F., Fast screening for diagnostic of heart ischemic episodes, Dissertação de Doutorado, Universidade Nova de Lisboa, 2013.
56. Burnett, R., Covington, A., Fogh-Andersen, N., et al, Use of Ion-Selective Electrodes for Blood-Electrolyte Analysis, Recommendations for Nomenclature, Definitions and Conventions, International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2000, p. 363-370.
57. Buck, R., Lindner, E., Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes, International Union of Pure and Applied Chemistry, 1994, 66: 2527-2536.
58. Bakker, E., Pretsch, E., Modern potentiometry, *Angew Chem Int Ed Engl*, 2007, 46(30): p. 5660-8.
59. Umezawa, Y., Umezawa, K., Sato, H., Selectivity coefficients for ion-selective electrodes: recommended methods for reporting $K_{potA,B}$ values, International union of pure and applied chemistry, 1995, 67: 507-518.