

Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto  
Instituto Politécnico do Porto

---

Sónia Cláudia Silva Ribeiro

---

# **Desenvolvimento de um anticorpo plástico para a deteção potenciométrica de um biomarcador da Doença de Alzheimer**

---

Dissertação submetida à Escola Superior da Tecnologia a Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde – ramo de Biotecnologia, realizada sob orientação da Doutora Maria Goreti F. Sales, Professora Adjunto, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto, do Professor Doutor Rúben Fernandes, Professor Adjunto das Ciências Químicas e das Biomoléculas da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, Instituto Politécnico do Porto, e da Doutora Felismina Moreira, Investigadora, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Instituto Politécnico do Porto

setembro de 2016

## **Agradecimentos**

A todos os docentes da área técnico-científica das Ciências Químicas e Biomoléculas da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto, disponibilidade, atenção, compreensão e amizade, foi tudo o que sempre recebi da vossa parte.

A toda a equipa do Biomark, com um cumprimento especial à Doutora Goreti Sales e Doutora Felismina Moreira, orientadoras da minha tese de mestrado, agradeço toda a paciência e compreensão. Sem dúvida que o apoio que recebi foi imprescindível para que conseguisse realizar este trabalho.

Aos meus amigos que sempre me deram a força que precisava, Diana Silva, Joana Gonçalves, Maria Coelho, Carla Seixal, Gonçalo Branco, Filipe Morim, Joana Dias, Joana Cordeiro e Ana Luísa Pereira.

Quero também deixar o meu agradecimento ao Pedro Martins pelo apoio e palavras de incentivo.

À minha família, em especial os meus pais e irmã! Obrigada por me permitirem seguir o caminho que escolhi sempre com as palavras de confiança “faz o que é melhor para ti”.

## Resumo

A presente dissertação descreve o desenvolvimento de um dispositivo que se pretende que contribua para o diagnóstico da Doença de Alzheimer *point-of-care*, construído com base na preparação de um novo material biomimético e na sua incorporação em membranas poliméricas de poli(cloreto de vinilo), PVC, plastificado para subsequente deteção potenciométrica. Para este estudo foi considerado o biomarcador de interesse clínico convencional no contexto da Doença de Alzheimer (DA), o péptido  $\beta$ -Amiloide 42 ( $A\beta$ -42).

O material biomimético foi preparado por ligação do péptido ( $A\beta$ -42) a uma superfície com nanotubos de carbono, seguindo-se de um pré-arranjo monomérico com monómeros de carga positiva. A mistura reacional utilizada para polimerização continha acrilamida  $5,0 \times 10^{-4}$  mol/L (monómero), *N,N'*-metilenobisacrilamida  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L (reticulante) e persulfato de amónio (iniciador). O biomarcador foi removido da matriz polimérica por ação proteolítica da proteinase K.

O material biomimético preparado foi aplicado na construção de sensores potenciométricos e testado relativamente à sua afinidade e seletividade de ligação ao péptido  $A\beta$ -42, por avaliação do desempenho analítico dos elétrodos resultantes. Para este efeito, o material biomimético foi disperso em membranas de PVC plastificado, que continham ou não um aditivo iónico lipofílico, e aplicado em suporte condutor sólido. A análise morfológica do biossensor foi avaliada por RAMAN e Espetroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

O desempenho analítico foi avaliado inicialmente em meio tampão e posteriormente em soro humano. As melhores características de resposta analítica foram obtidas com membranas preparadas com material impresso e com aditivo catiónico, brometo de tetraoctilamónio. O valor médio do limite de deteção (LD) foi  $0,72 \mu\text{g/mL}$  e o declive  $+59,04$  mV/década. O biossensor foi aplicado com sucesso na análise preliminar de amostras de soro humano.

## Palavras-chave

Doença de Alzheimer, biossensores, biomarcador,  $\beta$ -Amiloide, potenciometria.

## Abstract

This research presents the development of a new sensor device for the diagnosis of Alzheimer Diseases (AD) in point-of-care, made with new synthetic biomimetic materials that were incorporated in plasticized poly(vinyl chloride), PVC, membranes, for subsequent potentiometric detection. This concept was applied to target a conventional biomarker in Alzheimer diagnosis:  $\beta$ -Amyloid 42 ( $A\beta$ -42).

The biomimetic material was designed by attaching the peptide  $A\beta$ -42 (0.01  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) to a surface of carbon nanotubes, and filling the vacant spaces by polymerizing acrylamide  $5.0 \times 10^{-4}$  mol/L (monomer), *N,N'*-methylenebisacrylamide  $1.0 \times 10^{-4}$  mol/L (cross-linker) and ammonium persulphate (initiator), under mild conditions. The template was removed by proteolytic action of an enzyme (Proteinase K). The stereochemical recognition of  $A\beta$ -42 of this material was confirmed by the non-rebinding ability displayed by non-imprinted (NIP) materials, obtained by imprinting without a template.

The biomimetic material was employed in the construction of potentiometric sensors and tested with regard to its affinity and selectivity for binding  $A\beta$ -42, by checking the analytical performance of the obtained electrodes. For this purpose, the biomimetic material was dispersed in plasticized PVC membranes, including or not a lipophilic ionic additive, and applied on a solid conductive support made of graphite. The morphological analysis of materials was evaluated by RAMAN and Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopies.

The analytical behaviour of the devices was evaluated first in buffer and later in human serum. The best analytical performance in buffer was obtained with membranes including biomimetic material and lipophilic cationic additive, *tetra-n*-octylammonium bromide. The average limit of detection was 0.72  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and the slope was +59.04 mV/decade. The biosensor was successfully applied to the preliminary analysis of human serum samples.

### Keywords:

Alzheimer disease, biosensor, biomarker,  $\beta$ -amiloid, potenciometry.

# Índice

Agradecimentos .....	II
Resumo .....	III
Abstract.....	IV
Índice .....	V
Índice de Abreviaturas.....	VIII
Índice de Figuras .....	X
Índice de tabelas .....	XI
Capítulo 1 – Introdução .....	1
1.1 Doenças Neurológicas e demência .....	1
1.1.1 Doença de Alzheimer .....	2
1.1.2 Fisiopatologia da Doença de Alzheimer.....	4
1.2 Biomacadores da DA .....	8
1.2.1 Proteína tau Total .....	10
1.2.2 Proteína tau fosforilada.....	10
1.2.3 Péptido A $\beta$ -42.....	11
1.2.3.1 Detecção do péptido A $\beta$ -42.....	11
1.3 Polímeros de impressão molecular .....	13
1.3.1 Impressão molecular de proteínas .....	15
1.3.2 Síntese do MIP .....	15
1.3.3 Recetores sintéticos vs recetores naturais.....	17
1.3.4 Biossensores .....	18
1.4 Potenciometria .....	20
1.4.1 Considerações teóricas .....	21
1.4.2 Elétrodo de referência.....	22
1.4.2.1 Eléttodos de calomelanos .....	22

1.4.2.2 Eléttodos de prata/cloreto de prata .....	23
1.4.3 Eléttodo indicador .....	23
1.4.3.1 Eléttodos metálicos .....	24
1.4.3.2 Eléttodos de membrana .....	25
1.4.4 Características gerais da resposta potenciométrica .....	26
1.4.4.1 Tempo de resposta .....	27
1.4.4.2 Seletividade .....	28
1.4.4.3 Efeito do pH .....	30
1.4.5 Sensores Potenciométricos .....	31
Capítulo 2 – Métodos .....	32
2.1 Material e Equipamentos .....	32
2.2 Reagentes.....	34
2.3 Preparação das soluções .....	35
2.4 Preparação do sensor .....	36
2.5 Preparação das membranas seletivas .....	37
2.6 Avaliação comparativa dos eléttodos .....	39
2.7 Avaliação seletiva dos eléttodos .....	39
2.8 Análise da superfície .....	40
2.9 Análise de amostras .....	40
Capítulo 3 – Resultados.....	41
3.1 O material biomimético .....	41
3.2 Análise da superfície dos materiais sensores.....	42
3.3 Características de funcionamento dos sensores.....	46
3.3.1 Tampão de pH 6 .....	46
3.3.2 Tampão de pH 8 .....	48
3.3.3 Tempo de resposta, tempo de vida e estabilidade .....	50

3.4 Seletividade do sensor .....	50
3.5 Análise de amostras .....	52
Capítulo 4 – Discussão .....	53
4.1 Análise da superfície dos materiais sensores.....	53
4.2 Calibração com tampão a pH 6 e 8.....	54
4.6 Seletividade do sensor .....	55
4.7 Análise de amostras .....	55
Conclusão .....	56
Referências Bibliográficas.....	57

## Índice de Abreviaturas

<b>AAM</b>		<b>Acrilamida</b>
<b>Abreviatura</b>	Nome	
<b>AEMH</b>	Cloridrato de 2-aminoetilmetacrilato	
<b>APOE</b>	Apolipoproteína E	
<b>APP</b>	<i>Amyloid Precursor Protein</i>	
<b>APS</b>	Persulfato de amónio	
<b>ATR</b>	<i>Attenuated Total Reflectance</i>	
<b>A<math>\beta</math>-42</b>	$\beta$ -Amilóide 42	
<b>CNT</b>	<i>Carbon Nanotube</i>	
<b>CNT-COOH</b>	Nanotubos de carbono carboxilados	
<b>DA</b>	Doença de Alzheimer	
<b>EDAC</b>	<i>N</i> -Etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)carbodiimida	
<b>ESI</b>	Eléctrodo seletivo de iões	
<b>FTIR</b>	Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier	
<b>HEPES</b>	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino-etanosulfónico	
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	
<b>IL1</b>	Interleucina 1	
<b>IL6</b>	Interleucina 6	
<b>IUPAC</b>	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	
<b>LCR</b>	Líquido Cefalorraquidiano	
<b>LD</b>	Limite de deteção	
<b>LIRL</b>	Limite inferior de resposta linear	
<b>LSRL</b>	Limite superior de resposta linear	
<b>MIP</b>	<i>Molecularly imprinting polymer</i>	
<b>MOPS</b>	Ácido 3-( <i>N</i> -morfolino)propanosulfónico	

<b>NHS</b>	<i>N-Hidroxissuccinimida</i>
<b>NIP</b>	<i>Non-imprinted polymer</i>
<b>NNMBA</b>	<i>N,N-Metileno-bis-acrilamida</i>
<b>oNFOE</b>	<i>2-Nitrofeniloctil éter</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered-Saline</i>
<b>PSEN 2</b>	<i>Presenilina-2</i>
<b>PSEN1</b>	<i>Presenilina-1</i>
<b>p-tau</b>	<i>Proteína tau fosforilada</i>
<b>PVC</b>	<i>Poli(cloreto de vinilo)</i>
<b>RBM</b>	<i>Radial Breathing Mode</i>
<b>SWCNT</b>	<i>Single Walled Carbon Nanotube</i>
<b>TEMED</b>	<i>1,2-Bis(Dimethylamino)ethane</i>
<b>THF</b>	<i>Tetrahidrofurano</i>
<b>TOB</b>	<i>Brometo de tetraoctilamonio</i>
<b>TOMM40</b>	<i>Translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog</i>
<b>TpCIPB</b>	<i>Tetrakis-p-(clorofenil)borato</i>

## Índice de Figuras

Figura 1 - Principais características neurodegenerativas da DA .....	2
Figura 2 - Via não amiloidogénica .....	5
Figura 3 - Via amiloidogénica .....	6
Figura 4 - Síntese do polímero de impressão molecular .....	14
Figura 5 - Processo de reconhecimento do MIP .....	14
Figura 6 - Célula eletroquímica de potenciometria com ESI de membrana (Godinho, 2005) .....	21
Figura 7 - Eléctrodo de calomelanos (Godinho, 2005) .....	23
Figura 8 - Eléctrodo Ag/AgCl (Godinho, 2005).....	24
Figura 9 - Características gerais da curva de calibração (Burnett et al., 2000).....	27
Figura 10 - Representação gráfica do tempo de resposta, $t$ ( $\Delta E/\Delta t$ ), de ESI (Buck & Lindner, 1994) .....	28
Figura 11 - Equipamento de medida e acessórios utilizados na leitura potenciométrica (Santos, 2014).....	33
Figura 12 - ESI preparado no laboratório.....	33
Figura 13 - Eléctrodo de referência Ag/AgCl preparado no laboratório .....	34
Figura 14 - Esquema geral da síntese do MIP .....	37
Figura 15 - Eléctrodos seletivos de ião com diferentes composições .....	38
Figura 16 – Análise RAMAN dos diferentes materiais i) MWCNT, ii) MWCNT-COOH, iii) MIP e iv) NIP.....	43
Figura 17 - Espetro de RAMAN para os CNT, CNT-COOH, MIP e NIP separados e rácio das intensidades G/D .....	44
Figura 18 - Espetro de FTIR para os CNT, CNT-COOH, MIP e NIP .....	45
Figura 19 - Curva de calibração em tampão MOPS $1,0 \times 10^{-4}$ M, pH 6.....	47
Figura 20- Curva de calibração em tampão MOPS $1,0 \times 10^{-4}$ M, pH 8.....	49

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Lista de reagentes utilizados .....	35
Tabela 2- Composição das membranas seletivas de ião.....	38
Tabela 3- Parâmetros potenciométricos em MOPS $1,0 \times 10^{-4}$ M, pH 6.....	48
Tabela 4- Parâmetros potenciométricos em MOPS $1,0 \times 10^{-3}$ M, pH 8.....	49
Tabela 5 - Comparação dos limites de detecção nos diferentes interferentes relativamente ao soro. ....	51
Tabela 6 - Log de $K^{POT}$ calculado pelo método das soluções mistas, em MOPS pH 8,0....	52
Tabela 7- Resultados obtidos para a análise em soro humano .....	52

## Capítulo 1 – Introdução

Neste capítulo são apresentados os vários aspetos teóricos que sustentam o trabalho realizado ao longo desta dissertação. São abordados aspetos relacionados com a Doença de Alzheimer (DA) e com o péptido alvo deste estudo, a fisiopatologia, biomarcadores e respetiva importância. São ainda apresentadas técnicas de impressão molecular e de potenciométrica.

### 1.1 Doenças Neurológicas e demência

As doenças neurológicas englobam um conjunto de patologias que afetam o sistema nervoso. Estas doenças podem manifestar-se de diversas formas fisiopatológicas, caracterizando-se frequentemente por fatores comuns como alterações comportamentais (por exemplo, na fala e no humor), mentais, de equilíbrio, atenção, entre outros. Podem ser causadas por diversos fatores, tipicamente relacionados com aspetos genéticos, falhas no desenvolvimento do sistema nervoso, infeções ou tumores. ("Neurologic Diseases", 2015) Existem centenas de doenças neurológicas, no entanto há algumas que se destacam pela sua elevada frequência, como a epilepsia, a demência, as doenças cerebrovasculares (como acidente vascular cerebral), a esclerose múltipla e a doença de Parkinson. (World Health Organization, 2014)

A nível mundial, os afetados pelas doenças do foro neurológico chegam às centenas de milhões: mais de 50 milhões sofrem de epilepsia; 47,5 milhões de demência; e 6,2 milhões apresentam acidente vascular cerebral. (World Health Organization, 2014) A demência, crónica ou progressiva, apresenta um padrão de deterioração da função cognitiva e mais tarde do controlo emocional, comportamental e motivacional. (World Health Organization, 2015) Existem vários distúrbios que contribuem para o desenvolvimento de demência, uns para os quais é conhecido tratamento, como no caso da hidrocefalia de pressão normal, e outros não, como a DA e a demência com corpos de Lewy. (National Institutes of Health, 2013)

As demências podem ser originadas tipicamente por taupatias, em que há acumulação da proteína tau, e temos como exemplo a DA; por sinucleinopatias, associadas à acumulação da proteína  $\alpha$ -sinucleína, como a demência por corpos de Lewy; ou por demência vascular e demência cognitiva em que há lesões nos vasos que irrigam o cérebro. Outras patologias

que podem causar demência são, por exemplo, a doença de Huntington, a doença de Parkinson, a doença de Wilson e a meningite. (National Institutes of Health, 2013) De uma forma geral, as alterações moleculares associadas à demência aparecem, contudo, relacionadas com idade, uma vez que o aumento da prevalência de demências surge, maioritariamente, em pessoas mais velhas, associando-se por isso ao envelhecimento da população mundial.

A organização *Alzheimer's Disease International* estima que 46,8 milhões de pessoas viviam com demência no ano de 2015 e que este número duplique a cada 20 anos, chegando a 74,7 milhões em 2030 e a 131,5 milhões em 2050. (ADI, 2015) Estima-se ainda que em cada ano surjam 9,9 milhões de novos casos mundiais de demência e que, no total, 70% dos casos correspondam à Doença de Alzheimer (DA). (ADI, 2015) Apesar de alguma controvérsia em torno do diagnóstico inequívoco da DA, esta doença assume, assim, um papel relevante no contexto das doenças associadas a demência. (Prince et al., 2013)

### 1.1.1 Doença de Alzheimer

A doença de Alzheimer é uma patologia neurodegenerativa caracterizada pelo declínio progressivo da função cognitiva, em particular no domínio da memória, acompanhada por perturbações afetivas e de comportamento, levando à completa dependência nas funções básicas da vida diária até à morte. (Bateman et al., 2012; Reitz & Mayeux, 2014)

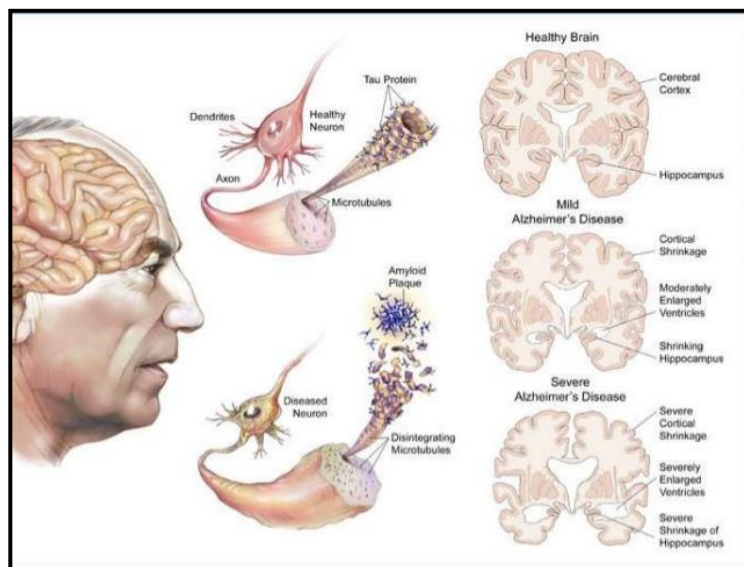


Figura 1 - Principais características neurodegenerativas da DA. ("Memeron," 2009)

A DA foi descrita pela primeira vez em 1907, pelo médico alemão Alois Alzheimer, quando na autópsia de uma mulher com morte por doença mental identificou vários danos no tecido cerebral. (Alves, Correia, Miguel, Alegria, & Bugalho, 2012; Parihar & Hemnani, 2004)

Atualmente, a nível mundial, cerca de 35 milhões de pessoas são afetadas pela DA e estima-se que em 2050 a prevalência possa ser de 115 milhões. (Povova et al., 2012; Santana, Farinha, Freitas, Rodrigues, & Carvalho, 2015) Em 2013, em Portugal, existiam cerca de 110 000 pessoas diagnosticadas com esta demência. (Santana et al., 2015)

As principais alterações patológicas observadas na DA são a perda de células em determinadas áreas do cérebro, associadas à deposição extracelular de placas amiloides e à formação de tranças neurofibrilares nos neurónios, com filamentos helicoidais pela hiperfosforilação da proteína tau ou p-tau (figura 1). (Kumar, Singh, & Ekavali, 2015; Reitz & Mayeux, 2014)

A DA pode ter início numa fase precoce, ocorrendo entre os 30 e os 60 anos, devendo ser associada a mutações hereditárias. Esta tipologia de DA está relacionada com mutações em 3 genes: presenilina-1 (PSEN1), localizada no cromossoma 14; presenilina-2 (PSEN2) no cromossoma 1; e proteína precursora amiloide (APP, *Amyloid Precursor Protein*) no cromossoma 21. As mutações nestes genes são raras e têm alta penetrância, sendo na sua maioria herdadas com padrão autossómico dominante e representando 2 a 5% dos afetados. Os genes envolvidos estão associados à clivagem da APP e à deposição de  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). A DA de início precoce progride mais rapidamente que a DA associada à idade (Mayeux & Stern, 2012; Reitz & Mayeux, 2014)

A DA apresenta-se tipicamente com um início tardio, após os 60 anos. Esta tipologia resulta da combinação de fatores genéticos, ambientais e psicossociais. (“Alzheimer's Disease Genetics” 2015; Reitz & Mayeux, 2014), estando relacionada com múltiplos fatores. Sabe-se hoje que a presença da expressão do alelo APOE  $\epsilon$ 4 no gene da apolipoproteína E (APOE), localizado no cromossoma 19q13, se associa a um aumento do risco de desenvolver a patologia, principalmente quando se verificam duas cópias do alelo, diminuindo a idade em que a patologia começa a manifestar-se. (Reitz & Mayeux, 2014) A suscetibilidade genética é preponderante para o desenvolvimento da doença, mas existem outros fatores de risco que predisõem ao aparecimento da DA, como doença cerebrovascular, hipertensão, colesterol, diabetes tipo II, síndrome metabólico, consumo de tabaco e álcool e peso desadequado. (Imtiaz, Tolppanen, Kivipelto, & Soininen, 2014; Reitz & Mayeux, 2014) Assim, a DA é observada hoje como uma doença multifatorial complexa, cujos diversos fatores se relacionam e interatuam, tornando-se mais evidentes com o aumento da idade. Por outro lado, existem também fatores que protegem os

indivíduos ao longo da vida como a atividade física e intelectual, o alto nível de escolaridade e consumo de dieta mediterrânea. (Imtiaz et al., 2014; Reitz & Mayeux, 2014) O diagnóstico para a DA tem sido definido pelo *National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke and the Alzheimer's Disease and Related Disorders Association* (NINCDS–ADRDA), combinando uma série de características clínicas e neuropatológicas que classificam a doença em possível, provável e definitiva e cujos critérios estão em constante atualização. (Reitz & Mayeux, 2014)

Os vários mecanismos incluídos na patogénese dificultam a produção de tratamentos eficientes. (Imtiaz et al., 2014) Para o tratamento da doença é permitida a administração de alguns fármacos, que promovem a amenização dos sintomas mas não alteram o curso da patologia. Ainda assim, decorrem vários estudos para a identificação de terapias que atuem na origem do processo da doença DA. (Imtiaz et al., 2014; Kumar et al., 2015)

Um dos aspetos críticos no tratamento da DA resulta da ocorrência de processos patológicos cerca de uma década antes do aparecimento dos primeiros sintomas, o que aumenta a importância da investigação nos estadios precoces da doença. (Rosén, Hansson, Blennow, & Zetterberg, 2013)

### **1.1.2 Fisiopatologia da Doença de Alzheimer**

A disfunção progressiva do cérebro dá-se por um processo sequencial associado à perda das funções celulares. Inicialmente existe uma lesão nos neurónios, seguida por uma falha na neurotransmissão, culminando na morte neuronal. (Kumar et al., 2015; Swerdlow, 2007)

A DA é patologicamente caracterizada pela presença do péptido A $\beta$  em placas amiloides depositadas extracelularmente e pela hiperfosforilação da proteína tau que origina tranças neurofibrilares nos neurónios com filamentos helicoidais. A evidência macroscópica destas patologias traduz-se pela atrofia do hipocampo e do córtex cerebral. Outros mecanismos que podem estar associados à degeneração neuronal, mas com menor influência são as respostas pró-inflamatórias, a disfunção mitocondrial, o stresse oxidativo, os fatores genéticos e ambientais e a apoptose. (Chu, 2012; Humpel, 2011)

A proteína APP é um ponto fulcral no desenvolvimento da DA. Esta proteína, codificada por um gene no cromossoma 21, é uma proteína transmembranar dos neurónios e de outras células, cuja função ainda é desconhecida. É sintetizada pelos constituintes celulares dos neurónios e metabolizada por clivagens alternativas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ , que recorrem a vias não amiloidogénica (figura 2) ou amiloidogénica (figura 3). O péptido A $\beta$  é parte do domínio transmembranar da APP, sendo constituído por 36 a 43 aminoácidos em resultado de clivagens enzimáticas. A clivagem pelas enzimas  $\beta$  e  $\gamma$ -secretase representa a via amiloidogénica e é relevante do ponto de vista patológico, enquanto a clivagem pela  $\alpha$ -secretase representa a via não amiloidogénica e apresenta um carácter inofensivo. (Kumar et al., 2015; Swerdlow, 2007) Estas clivagens são controladas por vários mecanismos: a  $\alpha$ -secretase é mediada pelo gene ADAM10 e pela enzima de conversão do TNF $\alpha$ ; a  $\beta$ -secretase pela BACE1; e a  $\gamma$ -secretase pelo gene PSEN1, pela nicastrina, Aph1 e Pen-2. (Hooper, Lovestone, & Sainz-Fuertes, 2008)

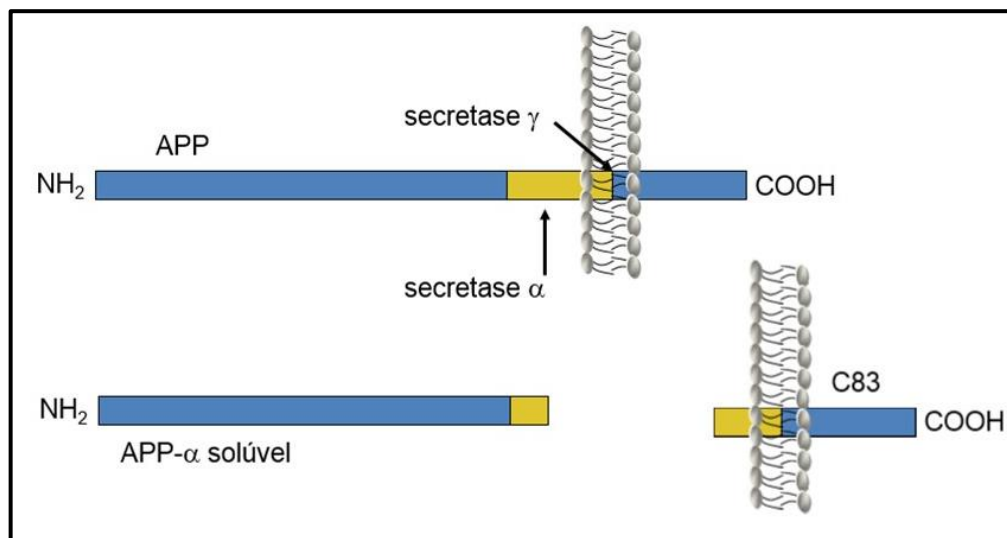


Figura 2 - Via não amiloidogénica (Fernandes, 2013)

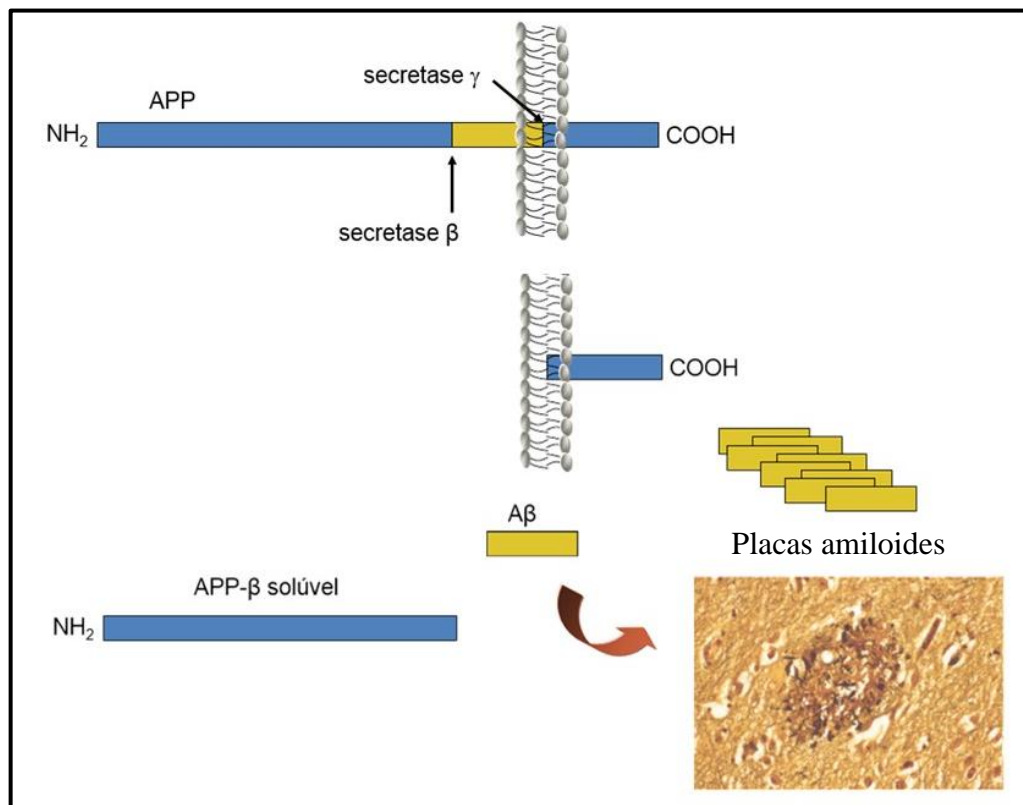


Figura 3 - Via amiloidogénica (Fernandes, 2013)

As isoformas do péptido A $\beta$  variam conforme o comprimento na extremidade terminal C, pela clivagem da  $\gamma$ -secretase. As mais frequentes são a A $\beta$ -40 (40 aminoácidos), seguida da A $\beta$ -42 (42 aminoácidos), que devido às suas propriedades hidrofóbicas têm bastante facilidade em agregar e polimerizar. (Humpel, 2011) Este péptido é posteriormente segregado pelos neurónios e, como não sofre degradação proteolítica, é responsável pela formação das placas amiloides. Inicialmente agrega em oligómeros solúveis, progredindo até formar estruturas fibrilares insolúveis em conformação de folhas  $\beta$  depositadas em placas senis difusas. Segundo a hipótese da cascata amiloide, esta alteração patológica marca a fase inicial da DA, uma vez que a acumulação e posterior inflamação em torno destas placas insolúveis contribui para a destruição dos neurónios vizinhos, levando à degeneração neuronal e vascular. (Holtzman, Morris, & Goate, 2011; Kumar et al., 2015; Swerdlow, 2007) A degeneração vascular pode levar a uma hemorragia lobar, isquemia cerebral e vasculite inflamatória. (Holtzman et al., 2011; Kumar et al., 2015; Swerdlow, 2007) Os danos oxidativos que daí advêm promovem a hiperfosforilação da proteína tau, causam efeitos tóxicos nas sinapses e mitocôndrias e destroem a oligodendroglia. Além disso, a libertação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) pela ativação microglial, estimula os astrócitos a produzir mais péptido, resultando em maiores

quantidades de oligómeros de A $\beta$ -42. A oligodendroglia, suscetível ao stresse oxidativo, apresenta baixa quantidade de glutatona na forma reduzida e alto teor em ferro, tendo pouca capacidade de eliminar radicais de oxigénio. (Kumar et al., 2015) Em condições normais há um equilíbrio entre a produção e a depuração de A $\beta$ -42 no cérebro, o que não se verifica em casos de patologia, tornando o péptido A $\beta$ -42 um potencial biomarcador para a DA. (Marilyn et al, 2011; Reitz & Mayeux, 2014) A nível sinático, os principais efeitos tóxicos do péptido A $\beta$  são a inibição da potenciação a longo prazo, a remoção de recetores de glutamato e a eliminação das respetivas sinapses que estão diretamente relacionadas com a memória e a aprendizagem. (Zetterberg, Blennow, & Hanse, 2010)

A segunda característica da DA é a formação de tranças neurofibrilares que aparecem nos neurónios como filamentos helicoidais, pela hiperfosforilação da proteína tau. (Holtzman et al., 2011) Esta proteína, sintetizada pelos neurónios, tem como função ligar-se à tubulina e conferir estabilidade à célula participando no transporte axoplasmático. No entanto, na sua forma fosforilada esta ligação não acontece, formando-se tranças neurofibrilares. (Holtzman et al., 2011) As fosfoquinases envolvidas neste processo podem ser a GSK3 $\beta$ , a CDK5 e ERK2. Além da proteína tau, as tranças neurofibrilares podem ter na sua constituição ubiquitina, colinesterase e APP. Estas alterações patológicas promovem a interrupção do transporte axonal e de organelos intracelulares. Em situações normais, esta função é regulada por um balanço entre a expressão e a fosforilação de isoformas da proteína tau. (Alves et al., 2012) Este processo pode ser dependente ou independente da A $\beta$ -42 e tem relação direta com a progressão da DA, bem como com os oligómeros A $\beta$  solúveis, extremamente tóxicos para os neurónios. (Holtzman et al., 2011)

O processo de neurodegeneração e deposição da proteína tau ocorre em seis estágios diferentes: fases I/II assintomáticas, onde apenas existem lesões no córtex transentorrinal; III/IV indicativas de declínio cognitivo ligeiro com lesões no córtex entorrinal e transentorrinal; e V/VI onde há evidência de demência e destruição neocortical acentuada. (Holtzman et al., 2011)

Apesar dos grandes avanços na fisiopatologia da DA, há muitas dúvidas sobre o verdadeiro percurso da doença, cujo período de instalação na fase assintomática é muito longo. (Alves et al., 2012) No essencial, é hoje consensual a necessidade de encontrar biomarcadores que permitam identificar a presença da doença quando esta ainda não oferece evidências de lesões neuronais progressivas.

## 1.2 Biomarcadores da DA

Um biomarcador (marcador biológico) é uma característica biológica que pode ser medida e indicativa de um processo biológico normal ou patológico, ou seja, permite diferenciar uma pessoa afetada de uma sem doença, ou então representar uma resposta farmacológica aquando da aplicação de uma terapia. (Henry & Hayes, 2012; Mayeux, 2004)

Os biomarcadores são muito úteis do ponto de vista clínico, uma vez que podem auxiliar no rastreio, causa, diagnóstico, progressão, monitorização terapêutica e na remissão de determinada patologia. (Henry & Hayes, 2012; Mayeux, 2004) Há várias gerações que os biomarcadores são importantes na medicina e investigação em saúde e a sua aplicação tem vindo a crescer no âmbito das doenças cardiovasculares, infecciosas, oncológicas, genéticas e imunológicas, uma vez que proporcionam uma medida mais exata na prestação de determinadas informações, que serão úteis no diagnóstico e tratamento. Os crescentes avanços na biologia molecular têm aumentado a pesquisa em biomarcadores moleculares, tornando-os poderosos decisores na manutenção de patologias, incluindo a epidemiologia, prevenção e diagnóstico. (Mayeux, 2004)

No contexto do sistema nervoso, os biomarcadores são utilizados tanto em testes bioquímicos como em testes imagiológicos, permitindo que se detetem alterações na sua função ou composição. Estes podem ser pesquisados no sangue, líquido cefalorraquidiano (LCR), músculos, nervos, cérebro, urina e pele, consoante o biomarcador pretendido, havendo sempre preferência pela utilização de técnicas não invasivas. (Henry & Hayes, 2012; Mayeux, 2004)

Para que seja considerado útil no diagnóstico de DA, o biomarcador deve ser indicativo de um processo de envelhecimento fisiopatológico do cérebro, ser sensível e específico para a patologia, permitindo a distinção de outras demências, seguir a progressão natural da doença, reagir à terapia e ser mensurável ao longo do tempo. A amostra deve ser estável, de fácil colheita e de transporte. Adicionalmente, a análise deve ser rápida, simples, barata e reprodutível. (Hampel et al., 2010; Humpel, 2011)

Quando divididos em categorias, os biomarcadores podem ser (i) de exposição, representando os fatores de risco de desenvolver a patologia e não se alterando com a presença da doença, como a presença de APOE  $\epsilon$ 4 (Galasko & Golde, 2013), ApoJ (Snyder et al., 2014), CR1, PICALM, SORL1 (Cummings, 2011), CLU (Snyder et al., 2014), ou TOMM40, entre outros (Cummings, 2011; Holtzman et al., 2011; Snyder et al., 2014); (ii)

de doença, e por isso poderão ser utilizados no diagnóstico ou na monitorização da entidade nosológica em causa. Por exemplo, a atrofia medial do lobo temporal, visível através de ressonância magnética, a presença de A $\beta$  e da proteína tau no LCR apontam para AD; e (iii) biomarcadores relacionados com a gravidade da doença, indicando a sua progressão, como a atrofia progressiva e o hipometabolismo, verificados por ressonância magnética e tomografia por emissão de positrões (PET) no caso particular da DA. (Cummings, 2011; Dickerson & Sperling, 2005; Mayeux, 2004) Os biomarcadores que auxiliam na fase pré-clínica permitem a aplicação do tratamento antes que os sintomas agravem e são muito úteis no desenvolvimento de novas terapias, enquanto os relacionados com a doença permitem que se selecionem pacientes e se prevejam a evolução e a gravidade da doença. (Cummings, 2011; Hampel et al., 2010)

Atualmente, para o diagnóstico da DA, são considerados três biomarcadores no LCR: péptido A $\beta$ -42, proteínas tau total e p-tau. Apenas a combinação destes três biomarcadores aumenta significativamente a validade de um diagnóstico de DA. (Rosén et al., 2013) A identificação destes biomarcadores implica, porém, a realização de uma punção lombar, um procedimento que acarreta efeitos colaterais, principalmente quando há necessidade de seguir o paciente por vários anos. Por outro lado, os biomarcadores por imagem, apesar de úteis, têm um preço muito elevado para se constituírem como exames de rotina. De uma forma geral, a ressonância magnética funcional permite aferir o volume cerebral e assim detetar a presença de neurodegeneração; a espectroscopia por ressonância magnética mede a quantidade de *N*-acetil aspartato que está inversamente relacionado com a viabilidade neuronal; e a fluorodesoxiglicose (FDG) em PET indica a utilização de glicose pelas diversas zonas do cérebro, distinguindo-se assim os locais onde esse consumo é reduzido, associado à detioração neuronal. (Chu, 2012; Hooper et al., 2008). Fica assim clara a necessidade de encontrar biomarcadores em diferentes fluídos corporais como soro, saliva e urina, que possam ser associados à DA e a procedimentos não invasivos. (Humpel, 2011) Existem efetivamente alguns biomarcadores não específicos que se podem associar à DA, especialmente marcadores inflamatórios que são indicativos do processo neuroinflamatório do cérebro, que resulta na morte celular neuronal. Estes marcadores (quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento e proteínas de ligação) podem ser encontrados no plasma, permitindo auxiliar o diagnóstico de DA e de comprometimento cognitivo leve. (Humpel, 2011) Outros marcadores relacionados com a patologia e encontrados no sangue podem ser

a ubiquitina pela associação de uma falha na função da ubiquitina-proteossoma à toxicidade do péptido A $\beta$ ; a presença do marcador p53 mutante em fibroblastos, associada a uma conformação anormal, aumento da apoptose em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e *natural killer*, acompanhado por um aumento de Bcl-2 (*anti-apoptotic protein B-cell lymphoma 2*); a SOD1 (*superoxide dismutase 1*) e diferentes subtipos de caspases; o aumento de proteína C reativa, VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*), ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*), cortisol, fator de von Willebrand (CD31) e anticorpos anti-LDL oxidada. (Humpel, 2011; Snyder et al., 2014) Outros biomarcadores incluem a enzima quinase 3 do glicogénio sintase (GSK3), que se encontra aumentada nas leucócitos de portadores de DA, homocisteína, p97, interleucina 1 (IL1), interleucina 6 (IL6),  $\alpha$ -1 antiqumotripsina,  $\alpha$ -2-macroglobulina e fator H do complemento. (Hooper et al., 2008)

De uma forma geral, a combinação dos níveis dos três biomarcadores no LCR (A $\beta$ -42, tau total e p-tau) é hoje o procedimento mais consensual tendo em vista promover o diagnóstico e a monitorização da DA. Já os níveis dos vários biomarcadores no sangue potencialmente associados à DA são apenas relevantes para auxiliarem o diagnóstico, uma vez que os seus níveis não se encontram estabelecidos (Humpel, 2011; Snyder et al., 2014; Galasko & Golde, 2013)

### **1.2.1 Proteína tau Total**

A quantidade da proteína tau total está relacionada com a intensidade da degeneração neuronal. (Rosén et al., 2013) Com o avançar da idade, é comum que os seus níveis aumentem no LCR (<300 pg/mL 21–50 anos; <450 pg/mL 51–70 anos; e <500 pg/mL mais de >70 anos), sendo que em casos de DA esse valor é ainda maior comparado com as mesmas faixas etárias. Este parâmetro pode ser bastante útil no prognóstico de um comprometimento cognitivo leve, uma vez que quando é detetado em níveis elevados, grande parte das pessoas progridem para DA. (Humpel, 2011)

### **1.2.2 Proteína tau fosforilada**

A proteína p-tau resulta na disfunção do transporte axonal. Esta proteína apresenta trinta e nove locais possíveis para fosforilação, e na sua isoforma 181 aparece aumentada no LCR (>60 pg/mL) comparativamente com indivíduos saudáveis. (Humpel, 2011) Este parâmetro é útil na diferenciação entre outras demências, uma vez que é específico da DA. (Rosén et al., 2013)

### 1.2.3 Péptido A $\beta$ -42

No LCR o péptido A $\beta$ -42 aparece significativamente reduzido devido à sua agregação no cérebro e consequente não depuração para o sangue e LCR. (Humpel, 2011; Rosén et al., 2013) O péptido A $\beta$ -42 pode encontrar-se aumentado no plasma em casos de DA familiar e Síndrome de Down, mas não na DA esporádica. Os estudos também indicam que há um aumento significativo em mulheres com comprometimento cognitivo leve, mas o mesmo não se verifica nos homens. Apesar de se considerar que o aumento de A $\beta$ -42 no sangue é um fator de risco para o desenvolvimento de DA, o mesmo não é considerado suficientemente sensível e específico para o diagnóstico precoce. (Humpel, 2011)

Os níveis plasmáticos de A $\beta$ -42 aparentam ser bastante instáveis, chegando a ser diferentes entre os vários tipos de DA. Alguns dos motivos relacionados com esta instabilidade dos níveis plasmáticos centram-se na dependência de outros tratamentos, na sua afinidade para se ligar a outras proteínas e na sua presença nas plaquetas em elevadas quantidades. Outra evidência relaciona-se com a degradação autofágica anormal dos componentes intracelulares pela via lisossomal, ou seja, os macrófagos e os monócitos das pessoas com DA têm uma fagocitose deficiente do péptido A $\beta$ . Este evento pode ser visualizado *in vitro* utilizando técnicas de imunofluorescência ou imunohistoquímica. (Humpel, 2011)

#### 1.2.3.1 Detecção do péptido A $\beta$ -42

Para a detecção do péptido A $\beta$ -42 existem vários métodos analíticos descritos na literatura e que envolvem técnicas óticas, separativas e eletroanalíticas. Os nomes atribuídos a estas técnicas são inerentes ao fenómeno principal associado à medida.

Alguns dos exemplos dos métodos óticos são a turbidimetria, fluorimetria, colorimetria e espectrofotometria UV/vis ou infravermelho. Neste tipo de métodos existe uma interação entre a amostra e a radiação eletromagnética, sendo que das várias técnicas disponíveis, as mais utilizadas são as de absorção (medem a quantidade de energia radiante absorvida a determinado comprimento de onda) e de emissão (medem a quantidade de energia emitida a determinado comprimento de onda). (Denadai, 2011; Olsen, 1990) Neste sentido, para a determinação do péptido A $\beta$ -42 é possível encontrar na literatura métodos que envolvem a colorimetria (Teich, Patel, & Arancio, 2013), a fluorimetria (Hudson, Ecroyd, Kee, & Carver, 2009) e a espectrofotometria UV/vis. (Cook & Martí, 2012)

As técnicas separativas permitem remover o analito de interesse ou a interferência da matriz, antes da quantificação. Esta separação é baseada nas diferenças físicas e químicas entre estes (analito/interferência e matriz). Apesar dos bons resultados fornecidos por este tipo de análise, os métodos inerentes requerem muito tempo de processamento, são dispendiosos e tóxicos para o ambiente. (Harvey, 2000) Alguns dos métodos separativos utilizados para a detecção do péptido A $\beta$ -42 são a eletroforese capilar (Varesio, Rudaz, Krause, & Veuthey, 2002; Verpillot et al., 2011), a cromatografia gasosa com espectroscopia de massa (Damasceno, Ventura, Ortuño, & Segura, 2000) e o HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*). (Du, Ramaley, McLean, Leonard, & Miller, 2005) As técnicas eletroanalíticas são também utilizadas no contexto da DA. Estas técnicas recorrem à medição de uma propriedade de natureza elétrica, tendo em vista a obtenção de várias informações sobre a amostra. De uma forma geral, os métodos associados são altamente versáteis, apresentam grande precisão, exatidão e sensibilidade, e requerem materiais de baixo custo. (Ozkan, 2009; Uslu & Ozkan, 2011) Em comparação com outros métodos, apresentam um tempo de resposta curto e, por vezes, permitem reduzir significativamente o volume de amostra necessário. (Dogan-Topal, Bozal, Tolga Demircigil, Uslu, & Ozkan, 2009) Exemplos deste tipo de técnicas são a voltametria cíclica, a potenciometria e a amperometria. (Lubert & Kalcher, 2010) Na literatura podemos encontrar a utilização da voltametria cíclica para a quantificação da A $\beta$ -42. (Liua et al., 2013; Rama, González-García, & Costa-García, 2014)

De uma forma geral, as técnicas anteriores recorrem a uma interação do biomarcador de interesse com alguma espécie química ou bioquímica, de modo a promover uma variação na propriedade medida. A forma mais utilizada de interação baseia-se em reações antigénio-anticorpo. A utilização desta interação biológica torna as técnicas muito seletivas e precisas. Exemplos de métodos que utilizam este princípio são o ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (Teich et al., 2013) e o RIA (*Radioimmunoassay*). (DeMattos et al., 2002)

De forma a reduzir os custos associados à utilização de anticorpos naturais, podem utilizar-se anticorpos artificiais ou plásticos (biomiméticos) que além de menor custo podem oferecer outras vantagens, como por exemplo elevada seletividade, estabilidade e possibilidade de reutilização. (Mayes & Mosbach, 1997)

### 1.3 Polímeros de impressão molecular

A teoria de Pauling, em que o objetivo era utilizar um antígeno como molécula molde para criar o anticorpo complementar, deu origem ao conceito de impressão molecular. Este conceito consiste na síntese de uma estrutura rígida tridimensional a partir de uma molécula molde, simulando uma interação antígeno-anticorpo. (Tarley, Sotomayor, & Kubota, 2005)

Os Polímeros de Impressão Molecular (MIP, do inglês *Molecularly Imprinted Polymer*) são materiais biomiméticos com elevada estabilidade, ao contrário do material biológico que, quando se encontra fora do ambiente natural, pode perder as suas características. Além disso, são também menos caros e mais fáceis de produzir do que os seus análogos de origem natural. (Liang, Zhang, & Qin, 2009; Newman & Setford, 2006) Outras características vantajosas são a seletividade para o alvo, a afinidade e robustez. (Liang et al., 2009) A importância dos materiais MIP revela-se sobretudo pela sua aplicação em várias áreas, com especial relevância nas análises clínicas, no diagnóstico médico, na monitorização ambiental e no controlo de drogas. (Bossi, Bonini, Turner, & Piletsky, 2007)

Para a construção de materiais MIP são necessários monómeros funcionais, moléculas molde, agentes de reticulação e iniciador. (Liang et al., 2009) Inicialmente, a molécula molde, idêntica ou semelhante em tamanho e funcionalidade à molécula alvo, interage com os monómeros através de ligações covalentes ou não covalentes, formando um complexo. Os monómeros devem ser escolhidos consoante as suas propriedades, para que interajam com a molécula molde. De seguida, para iniciar a polimerização, é adicionado um agente de reticulação e um iniciador que, ao promover ligações cruzadas no polímero, forma uma matriz polimérica rígida tridimensional. (Tarley et al., 2005; Wizeman & Kofinas, 2001) Posteriormente, é removida a molécula molde utilizando agentes apropriados, que podem até envolver a clivagem química nos casos de ligação covalente com o monómero (figura 4). (Tarley et al., 2005; Wizeman & Kofinas, 2001) Após a remoção surgem cavidades estáveis com as funcionalidades, forma e dimensão da molécula molde. (Wizeman & Kofinas, 2001)

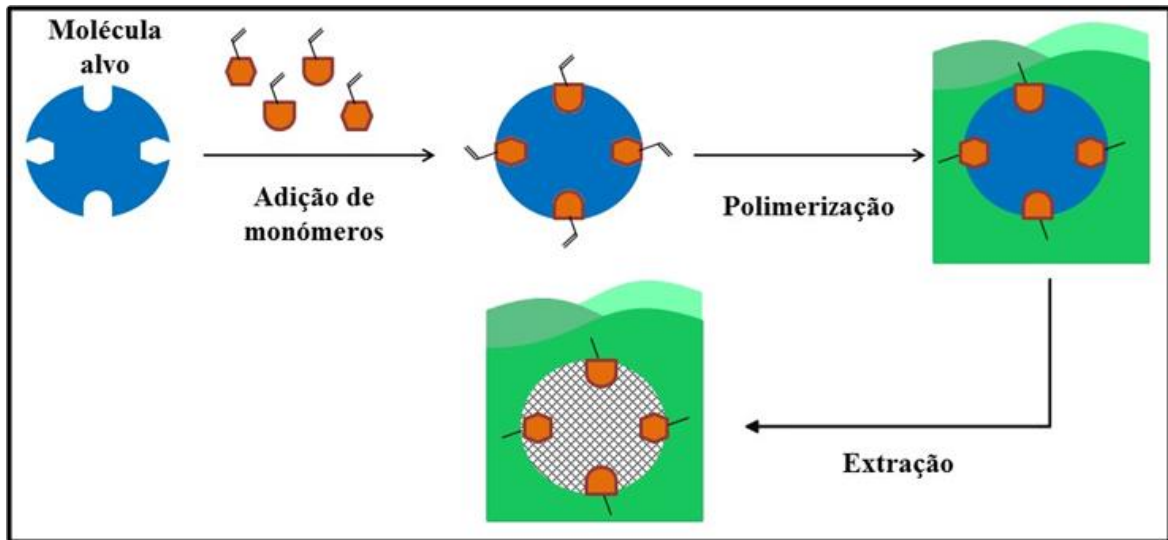


Figura 4 - Síntese do polímero de impressão molecular

São essas cavidades formadas na matrix polimérica que fazem a captura do analito de interesse na amostra ou da molécula removida, mesmo que em quantidades reduzidas (figura 5). (Bezbaruah & Kalita, 2010) De uma forma geral, quando a interação entre monómero e molécula molde é de natureza não-covalente, esta associação pode ser revertida através de lavagens apropriadas, permitindo a reversão do processo e a recuperação do material original. (Bergmann & Peppas, 2008; Wizeman & Kofinas, 2001)



Figura 5 - Processo de reconhecimento do MIP

A detecção utilizando materiais MIP pode ser feita por métodos eletroquímicos, piezoelétricos, óticos e por impedância, sendo que a forma preferencial para obter um

sensor comercial é através da eletroquímica utilizando métodos amperométricos, o método subjacente à monitorização de glucose pelos diabéticos. (Chen et al., 2009)

### **1.3.1 Impressão molecular de proteínas**

Alguns dos modelos para os quais foram criados locais de reconhecimento através de materiais MIP incluem compostos de baixo peso molecular, como drogas, e proteínas. A síntese de moldes para proteínas apresenta um grau de dificuldade superior ao do desenho de moldes para espécies iónicas ou moleculares de menor dimensão. (Bossi et al., 2007) Esta dificuldade decorre das características típicas das proteínas, como serem compostos solúveis em água, com uma estrutura flexível e cuja conformação se altera consoante as condições ambientais (temperatura, pH e natureza do solvente) em que se encontra. Mas nem tudo são desvantagens... As proteínas apresentam muitos grupos funcionais onde é possível estabelecer interações na fase de pré-arranjo monomérico, uma característica que é uma vantagem relativamente às espécies de menor dimensão. (Bossi et al., 2007; Hansen, 2007)

Neste sentido, para que a impressão molecular de proteínas tenha sucesso é essencial que na síntese do MIP se utilizem moléculas com afinidade elevada para a proteína alvo e condições experimentais que permitam conservar a conformação da proteína no seu ambiente nativo. (Singh & Yadav, 2014)

### **1.3.2 Síntese do MIP**

Na síntese do MIP existem alguns fatores a ter em conta. Um deles diz respeito aos monómeros e ao agente reticulante utilizados. Estes reagentes devem ser escolhidos consoante o tipo de ligações existentes entre o monómero/agente reticulante e a molécula alvo. Por exemplo, reagentes com grupos ácidos interagem melhor com analitos a imprimir com grupos básicos e vice-versa. Além disso, o solvente não deve interferir com a interação analito-monómero. Apesar dos solventes que possuem características apolares e baixa constante dielétrica serem tipicamente os mais indicados para a síntese do MIP, esta condição não se aplica quando as proteínas são utilizadas como molde, uma vez que estas alteram grandemente a sua conformação em ambiente apolar. (Tarley et al., 2005)

A interação entre os monómeros e a espécie a imprimir pode ser de natureza covalente ou meramente eletrostática. Apesar dos polímeros que envolvem interações com ligações

covalentes serem mais seletivos e estáveis, pela sua uniformidade nos locais de ligação, a sua utilidade é limitada a poucos analitos. Neste sentido, decorre uma preferência clara por fenómenos de interação associados a ligações não covalentes, onde a aplicabilidade é maior e a escolha dos monómeros mais flexível. (Haupt & Mosbach, 2000; Tarley et al., 2005) Além disso, as ligações não covalentes representam o que acontece na realidade. Há ainda investigadores que propõem a combinação de um protocolo que reúna as vantagens de cada um dos tipos de ligação. (Haupt & Mosbach, 2000)

Existem várias técnicas para a síntese do MIP, cada uma envolvendo o controlo de diferentes parâmetros, que resultam em polímeros com propriedades diferentes. Alguns dos métodos são a polimerização em *bulk*, precipitação e *core-shell* em emulsão (Pérez-Moral & Mayes, 2004; Qiao, Sun, Yan, & Row, 2006) Dada a sua importância, as proteínas são os compostos mais estudados na impressão macromolecular e para as quais existem técnicas adequadas para a sua impressão molecular. Além da polimerização em *bulk*, existe ainda a polimerização em superfície, *particle-based imprinting* e *epitope imprinting*. (Kryscio & Peppas, 2012; Qiao et al., 2006)

O método mais simples para sintetizar materiais MIP é o método em *bulk*, no qual se aplicam as características anteriormente referidas. (Kryscio & Peppas, 2012; Tarley et al., 2005) Na reação de polimerização, a quantidade de solvente e de iniciador deve ser igual e a molécula molde removida por extração ou hidrólise. Para que se obtenham polímeros de tamanho adequado, após a remoção do molde, o bloco polimérico deve ser triturado e peneirado. (Kryscio & Peppas, 2012; Pérez-Moral & Mayes, 2004) Apesar de ser o método mais simples e comum, este apresenta algumas desvantagens como a irregularidade das partículas obtidas, a destruição dos locais de interação e perda de material no processo de trituração e o elevado tempo reacional. (Qiao et al., 2006; Tarley et al., 2005) A complexidade química e geométrica das proteínas, leva a que os polímeros sintetizados por este método apresentem locais de ligação heterogêneos, transferência de massa reduzida, fixação permanente da molécula molde, baixa integridade do polímero e restringe a escolha do solvente. (Gai et al., 2008; Moreira, Dutra, Noronha, Cunha, & Sales, 2011)

No entanto, no contexto da impressão de proteínas a polimerização em superfície é o método mais utilizado. Neste caso, e tal como o nome indica, as proteínas são ligadas a uma superfície, onde se desencadeia posteriormente a reação de polimerização. Os locais de ligação resultantes deste processo encontram-se à superfície do polímero (plano ou

esférico), sendo o processo de polimerização genericamente idêntico ao do método anterior. (Kryscio & Peppas, 2012) A impressão molecular em superfície apresenta uma elevada taxa de eficiência na recuperação dos locais de ligação, tendo em conta que estes se encontram à superfície facilitando a remoção e a absorção da molécula molde. (Li, He, Chen, & Zhang, 2009; Wang et al., 2010) Apesar de ser menos específica, esta técnica apresenta uma rápida transferência de massa e diminui a probabilidade da proteína ficar aprisionada. (Kryscio & Peppas, 2012; Li et al., 2009) No essencial, este método de impressão de proteínas é amplamente utilizado para colmatar as desvantagens da polimerização em *bulk*. (Kryscio & Peppas, 2012)

### **1.3.3 Recetores sintéticos vs recetores naturais**

Atualmente, tanto os recetores sintéticos como os recetores naturais têm uma vasta gama de aplicações. Os recetores naturais podem ser induzidos por qualquer molécula estranha ao hospedeiro, envolvendo na maioria dos casos a utilização de animais, enquanto os recetores sintéticos são sintetizados por manipulação de biomoléculas ou síntese total. (Hansen, 2007)

De uma forma geral, a impressão molecular é uma forma rápida de obter recetores sintéticos, possivelmente para qualquer molécula alvo, funcionando como anticorpos artificiais (ou plásticos). (Hansen, 2007) As ligações dos recetores sintéticos são comparáveis às dos naturais, mas com a vantagem de suportarem condições adversas como temperatura e pressão elevadas, extremos de pH e solventes orgânicos. Além disso, são menos caros e podem ser sintetizados em série com boa reprodutibilidade. (Bossi et al., 2007)

Existem algumas desvantagens associadas aos recetores sintéticos como a fraca acessibilidade aos locais de ligação, baixa capacidade de ligação e a existência de ligações não específicas, no entanto, para compensar, apresentam elevada estabilidade de armazenamento, são de fácil preparação e podem estar sujeitos a operações repetidas sem perda de atividade. (Bossi et al., 2007; Piletsky, Alcock, & Turner, 2001; Qiao et al., 2006) Apesar de tipicamente mais seletivos, os recetores naturais exigem mão-de-obra qualificada, implicando trabalho intensivo e caro. Isto, aliado a todas as vantagens dos recetores sintéticos e acrescido ao facto da impressão molecular sintetizar polímeros robustos, a baixo custo e com afinidade e especificidade adequadas, faz com que os

trabalhos que usam estes materiais, como os biossensores, tenham cada vez mais interesse. (Piletsky et al., 2001)

#### **1.3.4 Biossensores**

A necessidade de análise rápida de múltiplas amostras e de uma deteção em tempo real gerou a necessidade de criar novas metodologias, miniaturadas e portáteis. (Bezbaruah & Kalita, 2010) Os biossensores constituem uma possibilidade de resposta a esta necessidade. A necessidade de obter resultados rápidos, fiáveis, com poucos gastos, principalmente sem a necessidade de recorrer ao espaço físico de um laboratório, levou a que a investigação em biossensores crescesse exponencialmente. Além disso, é hoje notório o elevado número de áreas em que se utilizam estes dispositivos, tornando esta investigação um processo contínuo, onde há sempre espaço para melhorias. (Saleem, 2013)

Os biossensores são dispositivos utilizados para reconhecer e determinar a concentração de analitos. São constituídos por material biológico, material biologicamente derivado ou biomimético intimamente ligado a um transdutor que transforma o sinal recebido num facilmente quantificado. A deteção das alterações biológicas e fisiológicas emite um sinal que o transdutor converte em dados eletrónicos proporcionais à concentração do composto. (Rodríguez-Mozaz, et al., 2004; Saleem, 2013) A aplicação dos biossensores existe desde 1962 e atualmente tem aplicações em várias áreas como a medicina, investigação biomédica, farmacêutica, agricultura, entre outras. (Rodríguez-Mozaz et al., 2004; Saleem, 2013) Os avanços tecnológicos permitiram que os biossensores se tornassem dispositivos de análise rápida, seletivos e sensíveis. O bom desempenho analítico e a robustez destes dispositivos levaram ao desenvolvimento de uma grande variedade de biossensores com base em componentes de reconhecimento artificial, amplificando a sua aplicabilidade a vários compostos e melhorando a sua seletividade e sensibilidade. (Saleem, 2013)

Uma das formas de caracterizar os biossensores é com base no elemento de bioreconhecimento que utilizam. Estes elementos podem ser anticorpos, enzimas, aptâmeros, oligonucleótidos ou polímeros de impressão molecular. Os elementos de bioreconhecimento são a chave central dos biossensores, permitindo que estes façam a deteção do analito alvo. (Chambers et al., 2008)

Grande parte dos biossensores com sistemas de deteção rápida tem na sua constituição anticorpos como elemento de bioreconhecimento. A sensibilidade e especificidade das

ligações antigénio-anticorpo são a grande vantagem deste elemento de bioreconhecimento, não havendo também a necessidade de purificação do alvo antes da sua deteção. (Chambers et al., 2008) Os biossensores com anticorpos, também conhecidos como imunossensores, constituem hoje uma alternativa a outros métodos analíticos tais como HPLC ou ELISA. (Saerens et al., 2008) Para um melhor desempenho do sensor, o complexo antigénio-anticorpo deve encontrar-se em condições de minimizar as ligações não específicas. A deteção pelos imunossensores pode ser de forma direta, através da ligação antigénio-anticorpo ou então de forma indireta pela medição de um sinal que indique a ocorrência da ligação, normalmente um marcador enzimático acoplado ao antigénio ou ao anticorpo. (Holford et al., 2012; Thévenot et al, 2001) De uma forma geral, o anticorpo utilizado deve satisfazer alguns requisitos como elevada especificidade num meio complexo, propriedades de ligação bem definidas, estabilidade, características de imobilização à superfície do sensor e possibilidade de produção em massa. (Saerens et al., 2008) Para este tipo de biossensores é necessário ter em atenção as condições de ensaio que podem interferir na ligação do antigénio ao anticorpo, como por exemplo, o pH e a temperatura. (Chambers et al., 2008)

A grande variedade de enzimas disponíveis, bem como a sua especificidade, também tornam este composto um bom e frequente elemento de bioreconhecimento. A base catalítica dos biossensores enzimáticos faz com que estes sejam muito utilizados, resultando em produtos mensuráveis tal como prótons, eletrões, luz e calor. (Chambers et al., 2008) Este tipo de biossensores foi o primeiro a ser descrito através da monitorização dos níveis da glicose em diabéticos, utilizando a glicose oxidase. Atualmente, é também muito comum para a determinação da ureia em indivíduos com doenças renais, produtos fermentativos e compostos fenólicos. (Ronkainen, Halsall, & Heineman, 2010) A enzima reage seletivamente com o substrato e a resposta é dada pela concentração do produto dessa mesma reação. Tal como os imunossensores, estes também podem fazer deteção diretamente a partir do analito ou indiretamente quando há interação com produtos que promovam a geração de sinal. As enzimas também podem participar em sensores de afinidade quando utilizadas como marcadores. (Amine, Mohammadi, Bourais, & Palleschi, 2006; Pohanka & Republic, 2008)

Em concreto, os biossensores que utilizam MIP constituem uma associação mais recente na literatura e proliferam grandemente pela elevada acessibilidade, elevada especificidade,

boa sensibilidade e baixo custo. (Chambers et al., 2008) A sua associação a métodos de natureza elétrica é também cada vez mais frequente. Neste contexto, a utilização da potenciometria associada a materiais MIP é também uma possibilidade que permite implementar métodos a baixo custo, nunca descrito na literatura para algum biomarcador do Alzheimer.

## 1.4 Potenciometria

A potenciometria é uma técnica eletroanalítica utilizada nas mais variadas áreas. Esta técnica é frequentemente utilizada na determinação do pH em meios líquidos e apresenta como principais vantagens ser um método simples e não poluente. (Noyhouzer, Valdinger, & Mandler, 2013; Bakker & Pretsch, 2013) A potenciometria tem-se revelado adequada para medir baixas concentrações em pequenos volumes de amostra, uma vez que, idealmente, tem a vantagem de não influenciar quimicamente a amostra, tornando-se assim uma técnica de grande interesse. (Grieshaber, MacKenzie, Vörös, & Reimhult, 2008) Além disso, pode facilmente tornar-se portátil, dá uma resposta rápida, seletiva, exata e precisa, sem necessidade de manipulação da amostra. (Ganjali et al., 2010)

Na sua execução são necessários dois tipos de elétrodos, um indicador que varia consoante a composição da amostra e outro de referência cujo potencial se mantém constante (figura 6). Estes elétrodos são ligados por uma ponte salina, que é responsável pelo fecho do circuito elétrico. (Ganjali et al., 2010)

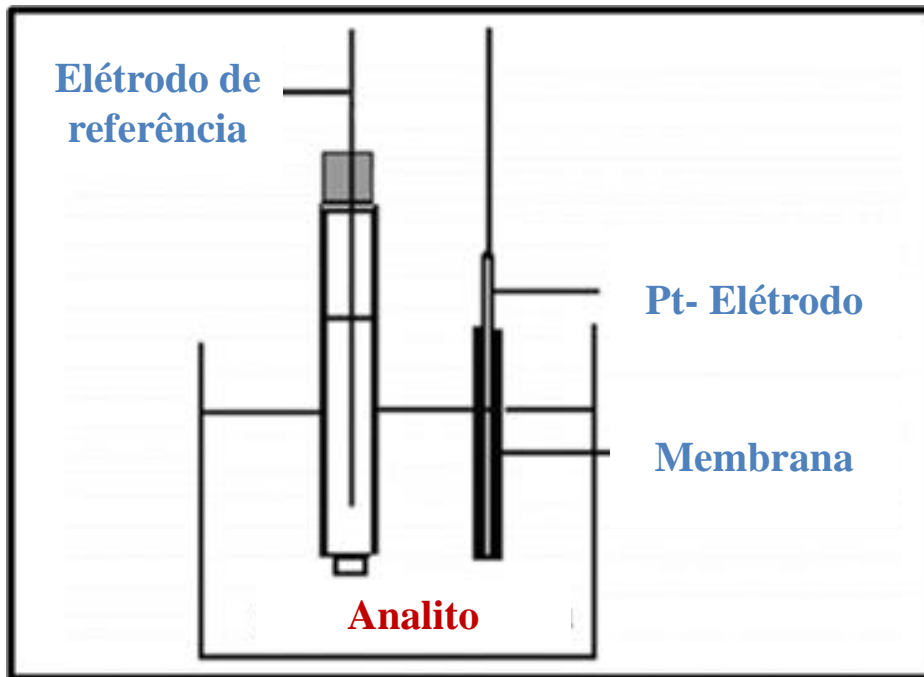


Figura 6 - Célula eletroquímica de potenciometria com ESI de membrana (Godinho, 2005)

#### 1.4.1 Considerações teóricas

O objetivo da potenciometria é determinar a diferença de potencial existente entre o eletrodo indicador e o eletrodo de referência, na ausência de fluxo de corrente. Esse potencial fornece informações sobre a atividade do íon (no caso dos eletrodos seletivos de íon, ESIs), sendo proporcional ao logaritmo da sua atividade na amostra. Assim, é possível determinar a variação da concentração do analito quando adicionado a uma solução. (Ganjali et al., 2010; Perumal & Hashim, 2014)

A relação entre o potencial e a concentração é traduzido pela Equação de Nernst-Nicolski representada na equação 1.1,

$$E = \text{"constante"} + \frac{2,30RT}{Z_A F} \log a_A \quad (1.1)$$

Nesta equação, E é valor experimental de potencial de um eletrodo seletivo de íon ou força eletromotriz (mV); R a constante dos gases perfeitos (8,314 J/K × mol); T a temperatura termodinâmica, K; F a constante de Faraday (96485 C/mol); Z<sub>A</sub> a carga do íon; a<sub>A</sub> a atividade do íon principal (mol/L ou mol/Kg); e “constante” a conjugação do potencial

normal do eletrodo seletivo, do potencial do eletrodo de referência e do potencial de junção líquida (mV). (“Electrochemistry (potentiometry),” 2015; Pohanka & Republic, 2008; Grieshaber et al., 2008)

O cálculo através da atividade do íão, tal como indica a Equação de Nernst-Nicolski, antevê o conhecimento de alguns parâmetros que, para um grande número de espécies iônicas orgânicas, são impossíveis de se obter informação, como o tamanho iônico do íão alvo. Assim, é frequente alterar-se a atividade do íão de interesse pela sua concentração, quando a força iônica,  $I$ , se encontra ajustada. A força iônica traduz-se pela equação abaixo indicada (equação 1.2), quantificando a intensidade do campo elétrico tendo em conta a concentração de todos os íões em solução, pela concentração do íão ( $C_i$ , mol/L) e a carga do mesmo ( $Z_i$ ) (Buck & Lindner, 1994; Sales, 1999).

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

#### **1.4.2 Eletrodo de referência**

O eletrodo de referência tem um potencial conhecido, preciso e constante, totalmente independente da temperatura e da concentração dos íões na solução. (“Electrochemistry (potentiometry),” 2015)

Para que um eletrodo possa ser usado e considerado como de referência, é necessário que cumpra algumas características, permitindo o bom desempenho da medição. Assim, o eletrodo deve obedecer à Equação de Nernst, manter um potencial constante durante o processo, ser de fácil preparação, passível de acerto rápido a um determinado potencial, reagir à variação de temperatura, sendo capaz de repor o potencial quando este volta ao valor inicial e não reagir a pequenas correntes que passem pelo eletrodo, ou seja baixa polarizabilidade. (Godinho, 2005; Moreira, 2009)

Os eletrodos de referência mais comuns são os eletrodos de calomelanos (mercúrio/cloreto de mercúrio) e os de prata/cloreto de prata. (Delgado, 1993)

##### **1.4.2.1 Eletrodos de calomelanos**

Os eletrodos de calomelanos são constituídos por um fio de platina em contacto com uma solução de mercúrio/cloreto de mercúrio em cloreto de potássio de concentração conhecida

(0,1 M, 1 M ou concentração da solução saturada), dentro de um tubo de vidro, estando em contacto com uma solução de cloreto de potássio do tudo exterior, através de uma pequena abertura (figura 7). (Godinho, 2005; Moreira, 2009)

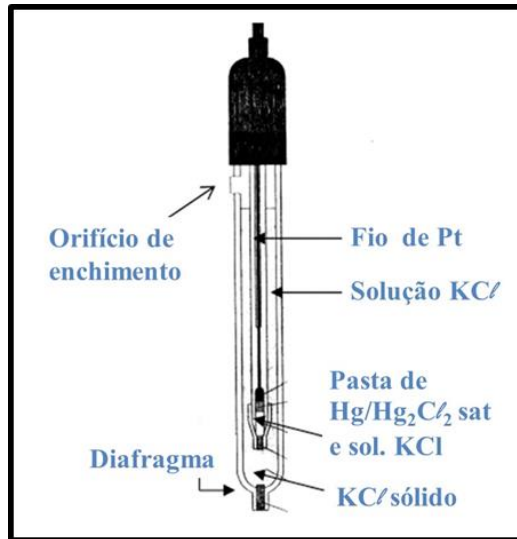


Figura 7 - Eléttrodo de calomelanos (Godinho, 2005)

Apesar da fácil construção, as variações de solubilidade do cloreto de potássio com a variação da temperatura fazem com que este eléttrodo apresente um potencial variável, constituindo assim uma desvantagem à sua utilização. Nos casos em que é necessário mais rigor, utilizam-se os eléttrodos com KCl 0,1 M ou 1 M, uma vez que são menos afetados pelas alterações da temperatura. (Godinho, 2005; Moreira, 2009)

#### 1.4.2.2 Eléttrodos de prata/cloreto de prata

Os eléttrodos de prata/cloreto de prata são constituídos por um fio de prata mergulhado numa solução saturada de cloreto de potássio, com concentração conhecida, saturada por cloreto de prata. (“Electrochemistry (potentiometry),” 2015; Moreira, 2009) Este tipo de eléttrodo é talvez o mais utilizado pela facilidade de preparação, baixo custo e grande resistência à variação da temperatura. (Godinho, 2005; Moreira, 2009)

#### 1.4.3 Eléttrodo indicador

O eléttrodo indicador, depois de mergulhado na solução, gera um potencial que dependerá da atividade iónica da amostra uma vez que se pretende que seja sensível à espécie a

determinar. Este eletrodo deve obedecer a determinadas características como ser rápido a responder e reprodutível na presença de variações na concentração do analito. Além disso, deve ser seletivo ao íon para o qual foi construído quando se encontra na presença de um grande número de outras espécies iônicas. Existem dois tipos de eletrodos indicadores, os metálicos e os de membrana. (“Electrochemistry (potentiometry),” 2015; Moreira, 2009)

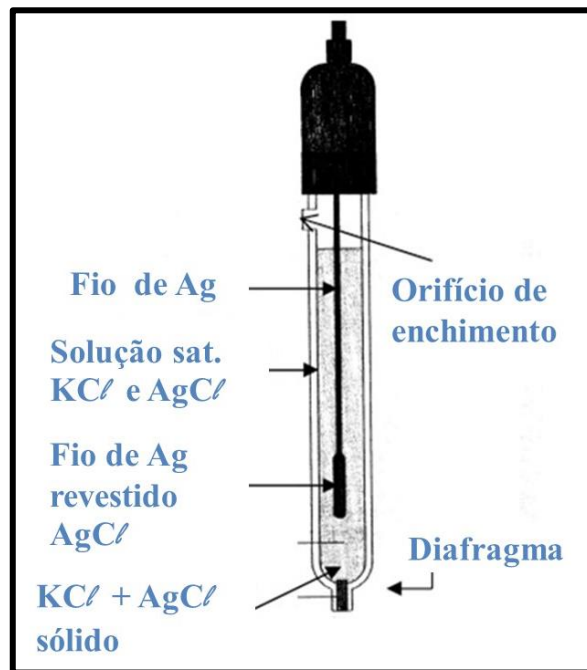


Figura 8 - Eletrodo Ag/AgCl (Godinho, 2005)

#### 1.4.3.1 Eletrodos metálicos

Os eletrodos metálicos podem classificar-se em inertes, de primeira classe, segunda classe e terceira classe. Os eletrodos inertes são caracterizados pela participação do metal apenas como condutor na reação eletrônica, ou seja, o seu único papel é aceitar ou fornecer elétrons. São particularmente utilizados quando se pretende estudar o equilíbrio reversível de oxidação-redução. Apenas os eletrodos de prata e de mercúrio são classificados como primeira classe. Na sua constituição têm um metal puro imerso numa solução contendo íons da mesma espécie do metal, medindo assim a atividade do íon metálico em solução. Os eletrodos de segunda classe respondem diretamente ao íon a dosear e consistem num metal imerso numa solução com aniões que formam um sal pouco solúvel com íons metálicos, ou também pode ser um metal recoberto com o referido sal, determinando

assim a atividade do anião em solução. São exemplos desta classe os elétrodos de Ag/AgCl. Os de terceira classe além de serem pouco utilizados, apresentam baixa seletividade. Na sua constituição têm um metal em contacto com um sal pouco solúvel do próprio metal e um sal ligeiramente mais solúvel de um segundo metal, os dois envolvendo um ião comum. (Godinho, 2005; Moreira, 2009)

#### **1.4.3.2 Eléttodos de membrana**

Os eléttodos de membrana são fundamentalmente diferentes dos eléttodos metálicos, tanto no seu aspeto como no seu princípio de funcionamento. O eléttodo de membrana mais comum é o eléttodo de pH. Estes eléttodos, comumente conhecidos como eléttodos seletivo de ião (ESI) possuem uma membrana seletiva semi-permeável que discrimina a espécie alvo. Esta membrana deve também apresentar baixa solubilidade, condutividade elétrica e reagir seletivamente ao analito. (Delgado, 1993; Perumal & Hashim, 2014)

Algumas das grandes vantagens destes dispositivos prendem-se com o facto de serem muito estáveis, responderem a uma gama de concentrações alargada, não serem afetados pela cor ou turvação da amostra, serem de fácil construção e operação com material de baixo custo, tornando a sua utilização muito ampla. (Godinho, 2005; Moreira, 2009)

Na sua constituição o eléttodo está imerso numa solução que se encontra separada da amostra por uma membrana seletiva de iões. A diferença de potencial dá-se pela passagem dos iões da solução para a membrana, através de reações de complexação, de cristalização ou de permuta iónica. (Godinho, 2005; Moreira, 2009)

Estes eléttodos podem classificar-se com cristalinos e não cristalinos. Os cristalinos subdividem-se em homogéneos, nos quais a membrana é um material cristalino feito de um único composto ou uma mistura homogénea de compostos, e heterogéneos, formados por uma substância ativa ou mistura de substâncias ativas com uma matriz inerte (como por exemplo, a borracha e o silicone) para formar a membrana de detecção. Os não cristalinos têm uma membrana rígida que contém um permutador de iões intercalada entre duas soluções aquosas, sendo que a matriz da membrana pode ser porosa (éster de celulose) ou não porosa (vidro ou PVC). Os eléttodos não cristalinos podem também subdividir-se e são classificados como eléttodos de vidro ou de locais móveis. Tal como o nome indica, os eléttodos de vidro têm uma membrana de vidro em que as suas características são determinantes para a seletividade da membrana. Os eléttodos com locais móveis têm na

sua constituição um permutador, um solvente mediador e uma matriz. Neste caso, o material constituinte do permutador será o responsável pela resposta do eletrodo. (Godinho, 2005; Moreira, 2009) O permutador será um composto com interação favorável para o íon a medir, tais como um composto iônico lipófilo ou um material MIP desenvolvido especificamente para o íon alvo.

#### **1.4.4 Características gerais da resposta potenciométrica**

A diferença de potencial medida entre o eletrodo de referência e o eletrodo indicador é representada pela curva de calibração. Esta representação gráfica traduz a atividade do íon, em que a força eletromotriz e o logaritmo da atividade (ou concentração) se encontram na ordenada e na abcissa, respetivamente. Informações importantes como o limite de detecção (LD), limite inferior de resposta linear (LIRL) e o declive podem ser retiradas a partir deste traçado experimental (figura 9). O LD é definido como sendo o valor mais baixo em que o analito pode ser distinguido da sua ausência e é determinado pelo ponto de interseção do prolongamento das retas do comportamento linear e não linear da curva de calibração, correspondendo à concentração ou atividade de um íon. O LIRL corresponde ao valor mínimo, da concentração ou atividade do íon, a partir do qual a resposta potenciométrica tem um comportamento linear. O declive dá-nos informações sobre a sensibilidade e qualidade da resposta potenciométrica. Em condições normais de temperatura e pressão o declive deve representar  $59,16/zA$  mV/década. (Buck & Lindner, 1994; Burnett et al., 2000)

Do ponto de vista experimental, existem vários parâmetros que podem afetar os valores obtidos como LD, LIRL e declive. Entre estes incluem-se a composição da solução e sua concentração iónica, as utilizações anteriores do eletrodo seletivo, a temperatura e a agitação (Buck & Lindner, 1994; Burnett et al., 2000).

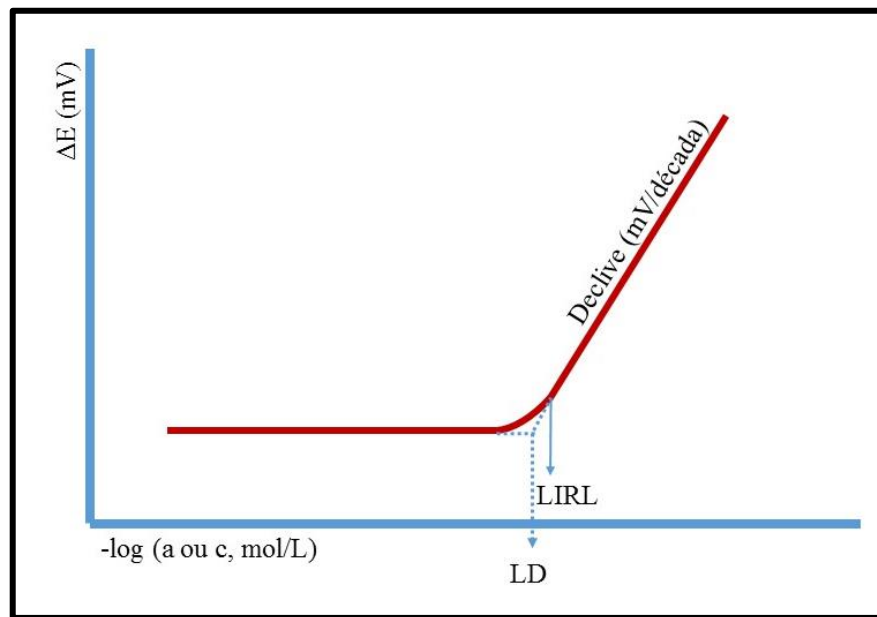


Figura 9 - Características gerais da curva de calibração (Burnett et al., 2000)

A seletividade e o tempo de resposta são propriedades de um ESI também obtidas a partir de curvas de calibração, descritas pelas recomendações da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). (Buck & Lindner, 1994)

#### 1.4.4.1 Tempo de resposta

O tempo de resposta é calculado pelo tempo decorrido entre o momento em que os eletrodos estão em contacto com a amostra ou quando há alteração da atividade do íão até ao momento em que  $\Delta E/\Delta t$  iguala o tempo limite estabelecido ( $\Delta t$ ) (figura 10). Este tempo limite deve ser definido segundo questões relacionadas com a experiência ou pela exatidão desejada nos resultados potenciométricos.

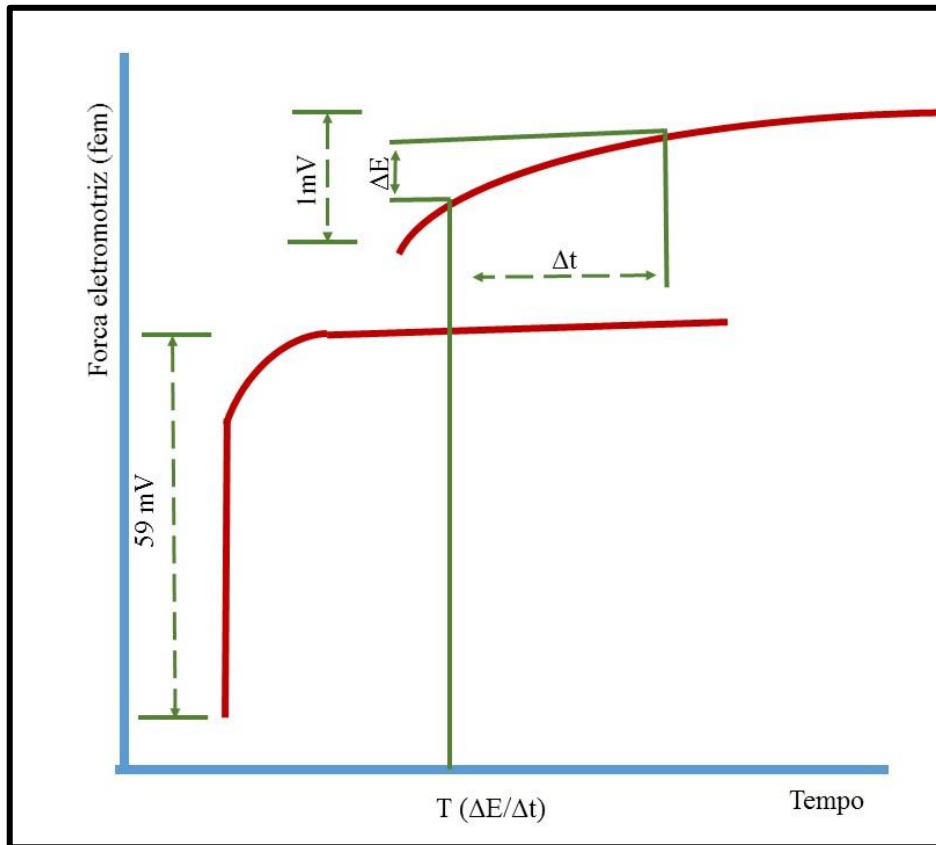


Figura 10 - Representação gráfica do tempo de resposta,  $t(\Delta E/\Delta t)$ , de ESI (Buck & Lindner, 1994)

O tempo de resposta do ESI é influenciado pela concentração absoluta do íon presente na amostra bem como pela variação a que este é sujeito, desde a concentração inicial à concentração final do íon. (Buck & Lindner, 1994; Burnett et al., 2000)

#### 1.4.4.2 Seletividade

A seletividade de um eletrodo é caracterizada pela sua capacidade de distinguir e responder ao íon alvo perante a presença de outros íons na mesma solução. O coeficiente de seletividade potenciométrico,  $K_{A,B}^{pot}$ , é avaliado através da força eletromotriz do ESI na presença de uma solução com o íon principal (A) e íons interferentes (B) ou então em soluções em que A e B se encontram separados. Atualmente são estudados variados materiais da membrana, que possuam diferentes propriedades de reconhecimento de íons, para que possam conferir elevada seletividade. (Bakker & Pretsch, 2007)

As atividades do íon principal e íon interferente são definidas pela equação modificada de Nikolsky-Eisenman, expressa na equação 1.3.

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

Nesta equação, E é o valor experimental de potencial de um eléctrodo seletivo de ião ou força eletromotriz (mV); R a constante dos gases perfeitos (8,314 J/K x mol); T a temperatura termodinâmica, K; F a constante de Faraday (96485 C/mol); Z<sub>A</sub> a carga do ião; Z<sub>B</sub> a carga do ião interferente; a<sub>A</sub> a atividade do ião principal (mol/L ou mol/Kg); a<sub>B</sub> a atividade do ião interferente (mol/L ou mol/Kg); e “constante” a conjugação do potencial normal do eléctrodo seletivo, do potencial do eléctrodo de referência e do potencial de junção líquida (mV). (Bakker & Pretsch, 2007; Umezawa, Umezawa, & Sato, 1995)

Os coeficientes de seletividade potenciométrica podem ser determinados por 3 métodos distintos, sendo eles o método de interferência fixada, o das soluções separadas e o do *matched potential*. Quanto menor for o valor, maior é a seletividade do ESI para o ião de interesse.

No método de interferência fixada, a medição da diferença de potencial faz-se com a concentração do ião interferente constante enquanto a concentração do ião principal na solução varia (ou vice-versa, testando-se a resposta do ESI ao ião interferente até obtenção de um padrão linear). No cálculo do coeficiente de seletividade potenciométrico é utilizada a equação 1.4. As limitações deste método prendem-se pelo 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. (Bakker & Pretsch, 2007; Buck & Lindner, 1994)

$$K_{A,B}^{pot} = \frac{a_A}{\frac{Z_A}{Z_B} a_B} \quad (1.4)$$

No método das soluções separadas, a diferença de potencial é medida separadamente. Uma solução contém apenas o ião principal e a outra o ião interferente, sendo que a<sub>B</sub>=a<sub>A</sub>, ou seja, devem apresentar o mesmo valor de atividade. Neste caso e após a medição da diferença de potencial registada pelo ião principal (E<sub>A</sub>) e do ião interferente (E<sub>B</sub>), calcula-se o coeficiente de seletividade potenciométrica através da equação 1.5. Na teoria, o valor (Z<sub>A</sub>F)/(2,303RT) corresponde ao inverso do valor do declive teórico de um ESI e, em condições experimentais, deve ser substituído pelo declive da curva de calibração. O facto

de as medições serem efetuadas em separado é considerado uma desvantagem ao método, impedindo a competição entre os iões, que por sua vez não corresponde à realidade.

$$\log K_{A,B}^{pot} = \frac{(E_B - E_A)Z_A F}{2,303RT} + \left[1 - \frac{Z_A}{Z_B}\right] \log a_A \quad (1.5)$$

No *matched potential* é utilizada uma solução de referência para a determinação da atividade do ião interferente, e promovida uma variação de potencial pelo ião principal que deve ser igualada pelo ião interferente. Neste caso o coeficiente de seletividade potenciométrica obtém-se a partir da equação 1.6. Neste método existem duas medidas potenciométricas independentes, uma delas é o valor da variação de potencial máximo ( $a'_A$ ) e mínimo ( $a_A$ ) pelo aumento da concentração do ião principal e a concentração de ião interferente necessária para que se obtenha a mesma variação de potencial. Apesar de não ter relação com os pressupostos teóricos da equação de Nernst, este é o método que mais se identifica com uma condição experimental inerente à análise de uma amostra. (Bakker & Pretsch, 2007; Buck & Lindner, 1994)

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

É importante salientar que os valores obtidos por estes três métodos são apenas indicativos do grau de seletividade, uma vez que em cada um destes são gerados valores tipicamente diferentes. (Umezawa et al., 1995) Entre todos, o método mais próximo da realidade (aquando da análise de uma amostra real) é o *matched potential*, mas este não conta com a ausência de resposta *Nernstiana* gerada pela espécie interferente.

#### 1.4.4.3 Efeito do pH

Atentando à elevada força iónica das soluções utilizadas, é certo que, entre os iões da amostra, estarão presentes aqueles que influenciam o pH. É de ter em conta que o pH condiciona a resposta da membrana e a carga das proteínas e, por isso, é necessário ter atenção a sua variação no decorrer de uma avaliação experimental. Para este efeito, recorre-se a soluções tampão, que permitem controlar a atividade dos iões de hidrogénio, em que o pH pode ser escolhido e ajustado ao valor que proporcione melhor resposta

potenciométrica e que os sinais analíticos não dependam deste parâmetro. Para se identificar qual o valor de pH ideal, o procedimento mais adequado baseia-se no traçado de curvas de calibração obtidas a valores de pH distintos. (Buck & Lindner, 1994)

#### **1.4.5 Sensores Potenciométricos**

Os sensores potenciométricos apresentam uma série de vantagens que aumentam a sua aplicabilidade, como o baixo custo e portabilidade do equipamento de medição, a simplicidade, a alta seletividade, e deteção direta, rápida e seletiva, sem necessidade de destruição da amostra. (Ganjali et al., 2010; Koncki, 2007) De uma forma geral, todos os sensores potenciométricos têm-se revelado bem-sucedidos, mas principalmente os baseados em MIP, pelo facto de as moléculas molde não precisarem de se difundir pela membrana para gerar uma resposta analítica, diminuindo assim o tempo de resposta. (Liang et al., 2009; Newman & Setford, 2006)

Segundo a IUPAC os biossensores potenciométricos apresentam duas características importantes: uma delas é o facto de o componente biológico ser parte integrante do recetor do sensor e a outra pelo facto do sinal gerado ser um valor de potencial. (Koncki, 2007)

Considerando todo o enquadramento teórico anteriormente descrito, o trabalho que se segue destinou-se à construção de um biossensor potenciométrico para um biomarcador da DA, utilizando membranas seletivas de polímeros molecularmente impressos em nanotubos de carbono carboxilados.

## Capítulo 2 – Métodos

Este capítulo descreve todos os aspetos experimentais relacionados com o desenvolvimento de um sensor potenciométrico para a detecção de um biomarcador da DA através de um polímero de impressão molecular. Incluem-se aqui a descrição dos materiais, dos equipamentos e das metodologias utilizados, bem como da avaliação e da aplicação dos eléctrodos preparados.

### 2.1 Material e Equipamentos

Na preparação de soluções foram utilizados balões volumétricos de classe A, com capacidades entre 10,00 a 250,00 mL. Os volumes rigorosos, superiores a 5,00 mL, foram medidos com recurso a pipetas de vidro classe A, e os volumes inferiores, com pipetas automáticas de volume regulável da VWR de 2-20  $\mu\text{L}$ , 20-200  $\mu\text{L}$ , 100-1000  $\mu\text{L}$  e de 1000-5000  $\mu\text{L}$ .

Os reagentes foram pesados com recurso a uma balança RADWAG XA 110/X, com precisão de  $\pm 0,0001$  g, utilizando gobelés com capacidades entre 10 e 50 mL.

Em alguns passos do procedimento foi necessário utilizar o banho de ultrassons termostaticado, BANDELIN Sonorex Digitec, reduzindo o tempo de dissolução de alguns reagentes sólidos.

Na medição da diferença de potencial entre o eléctrodo de referência e o eléctrodo indicador foi utilizado um decimilivoltímetro Crison  $\mu\text{pH}$  2002 (sensibilidade  $\pm 0,1$  mV), à temperatura ambiente, e sob agitação constante, por meio de um Crison, micro ST 2038. O sinal de saída foi ligado a um ponto de comutação com seis saídas, permitindo a leitura simultânea de seis eléctrodos seletivos, como se pode visualizar na figura 11.

Na célula potenciométrica foi utilizado um eléctrodo indicador ESI, constituído por uma mistura de grafite com uma resina epoxídica (figura 12) e um eléctrodo de referência constituído por um fio de prata imerso numa solução de cloreto de ferro (III), ligado a um fio de cobre com terminal eléctrico apropriado (figura 13) para determinar a variação da concentração do analito.

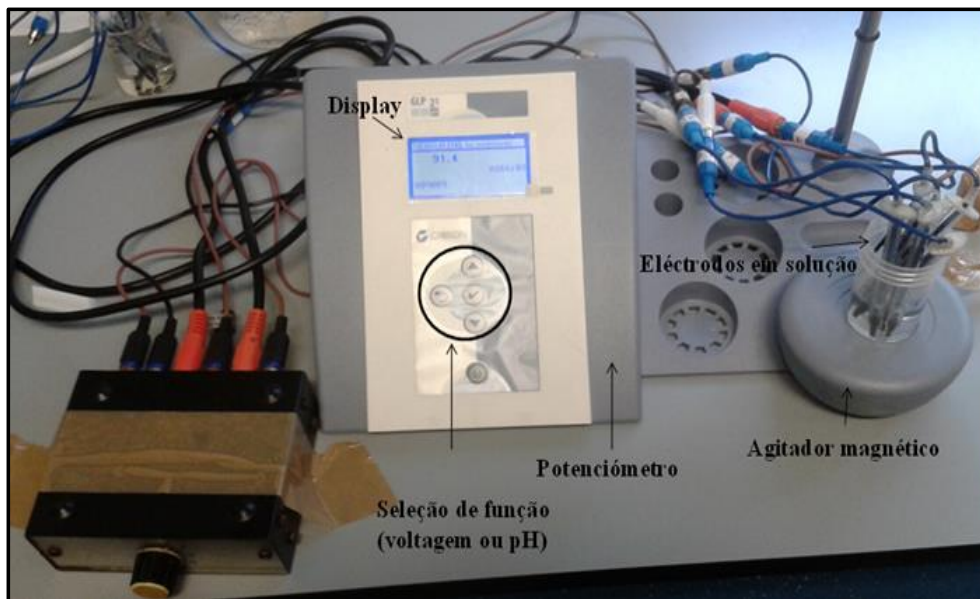
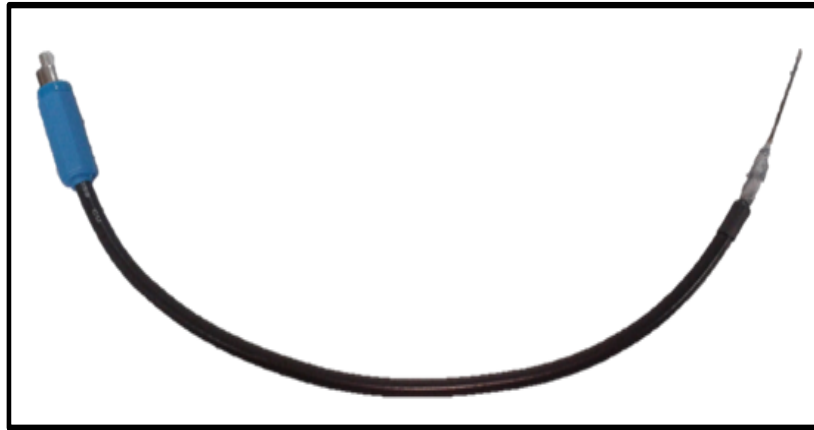


Figura 11 - Equipamento de medida e acessórios utilizados na leitura potenciométrica (Santos, 2014)



Figura 12 - ESI preparado no laboratório.



*Figura 13 - Eléctrodo de referência Ag/AgCl/preparado no laboratório*

A superfície das membranas foi analisada por espectroscopia de Raman no equipamento Thermo Scientific, DXR; e por espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), no equipamento Thermo Scientific Nicolet iS10, com um acessório de reflexão total atenuada (ATR).

## **2.2 Reagentes**

As soluções foram preparadas com a água desionizada com condutividade inferior a 0,1  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . A pesagem dos reagentes sólidos e medição dos reagentes líquidos foi rigorosa e com posterior diluição. Os reagentes utilizados foram adquiridos a várias fontes comerciais, tal como descrito na tabela 1.

Tabela 1 – Lista de reagentes utilizados

	<b>Reagente</b>	<b>Fabricante</b>
1	<i>N</i> -Etil- <i>N'</i> -(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC)	Alfa Aesar
2	Brometo de tetraoctilamonio (TOB)	Acros organics
3	Proteínase K	AMRESCO
4	Ácido 3-( <i>N</i> -morfolino)propanosulfónico (MOPS)	AppliChem
5	2-Nitrofenilooctil éter (oNFOE)	Fluka
6	Policloreto de vinilo (PVC)	
7	<i>N</i> -Hidroxissuccinimida (NHS)	
8	<i>Tetrakis-p</i> -(clorofenil)borato (TpCIPB)	
9	Péptido $\beta$ -Amilóide 42 (A $\beta$ -42)	GenScript
10	Persulfato de amónio (APS)	JVP
11	Peróxido de hidrogénio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck
12	Cloreto de potássio (KCl)	
13	Cloreto de potássio (NaCl)	Panreac
14	Fosfato monopotássico (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	
15	Nanotubos de Carbono, single walled (SWCNTs)	Sigma
16	Ácido 4-(2-Hidroxietyl)-1-piperazino-etanosulfónico (HEPES)	
17	Acrilamida (AAM)	
18	<i>N,N</i> -metileno-bis-acrilamida (NNMBA)	
19	Tetrahidrofurano (THF)	
20	Cloridrato de 2-aminoetilmetacrilato (AEMH)	
21	Ácido Sulfúrico (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	
22	Fosfato de sódio dibásico diidratado (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Riedel Haen
23	Tetrametilenodiamina (TEMED)	TCI

### 2.3 Preparação das soluções

O tampão PBS (*Phosphate Buffer Solution*) foi preparado com a seguinte composição: NaCl, 8 g/L; KCl, 0,2 g/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,42 g/L; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,24 g/L. O pH desta solução foi ajustado a 7,2 pela adição de quantidades adequadas de ácido clorídrico concentrado ou solução saturada de hidróxido de sódio recém-preparados.

As soluções padrão de A $\beta$ -42, necessárias à realização deste trabalho, tinham uma concentração de 0,005 mg/mL. A solução tampão foi de MOPS com uma concentração de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L, sendo que o pH resultante não foi alterado.

As soluções de espécies interferentes foram de concentrações variáveis e preparadas em tampão MOPS  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L de pH 8. A creatinina apresentava uma concentração de  $1,2 \times 10^{-5}$  g/mL, a acetilcolina  $8,2 \times 10^{-7}$  g/mL, albumina  $5,2 \times 10^{-3}$  g/mL e ureia  $4,0 \times 10^{-4}$  g/mL.

## 2.4 Preparação do sensor

Na fase inicial do desenvolvimento do sensor foi necessário oxidar nanotubos de carbono de forma a criar locais de ligação para o péptido. Para isso, pesaram-se 0,5 g de SWCNT para um eppendorf, ao qual foi adicionado 1,5 mL de uma solução H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4:1). A solução ficou em agitação durante a noite e posteriormente foi centrifugada, decantada e lavada com água destilada, repetindo-se este procedimento três vezes. De seguida, adicionou-se 1,5 mL de tampão PBS, de pH 7,2, e a solução ficou em agitação durante duas horas, com o objetivo de aumentar o pH até à neutralidade. A solução foi novamente centrifugada, decantada e lavada três vezes. Os nanotubos foram colocados na estufa durante a noite a uma temperatura de 40°C para que pudessem secar.

Para a preparação do sensor pesou-se 0,01 g de nanotubos de carbono carboxilados (CNT-COOH) para dois eppendorfs e suspendeu-se em 1 mL de água desionizada, levando-se depois ao banho de ultrassons durante um minuto. Após centrifugar e decantar foi necessário tornar os nanotubos mais reativos, facilitando, posteriormente, a ligação do péptido. Para isso, adicionou-se 1 mL de uma solução de NHS com a concentração de 5 mmol/L e 1 mL de uma solução EDAC com uma concentração de 2 mmol/L, durante quarenta e cinco minutos, em banho de ultrassons.

Na etapa seguinte do procedimento adicionou-se o péptido molde (A $\beta$ -42, 0,01 mg/mL), aos SWCNTs ativados previamente. A solução foi incubada durante duas horas a 4°C. Foi preparado em paralelo um polímero sem impressão molecular (sem a molécula molde), denominado por NIP (*non-imprinted polymer*).

Após a ligação da molécula molde o material foi lavado, decantado e centrifugado. De seguida adicionou-se 1,0 mL do monómero carregado AEMH, com o objetivo de interagir

com os grupos carboxílicos do péptido e os nanotubos onde não houve ligação da proteína, com uma concentração de  $5,0 \times 10^{-2}$  mol/L, durante duas horas a  $4^\circ\text{C}$ .

A mistura reacional de polimerização foi constituída por 0,5 mL de uma solução do monómero, AAM ( $5,0 \times 10^{-4}$  mol/L) e agente reticulante NNMBA ( $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L). Após incubar 60 minutos à temperatura ambiente e de forma a iniciar a reação de polimerização, adicionou-se 0,5 mL de APS ( $1 \times 10^{-4}$  mol/L) e 0,5 mL de TEMED (10%), durante 2 horas à temperatura ambiente. O sensor foi novamente lavado e centrifugado.

Para remoção da proteína, adicionou-se proteinase K, 500  $\mu\text{g/mL}$  e deixou-se incubar durante três horas a uma temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . O sensor foi lavado, decantado e seco na estufa a  $40^\circ\text{C}$  (figura 14).

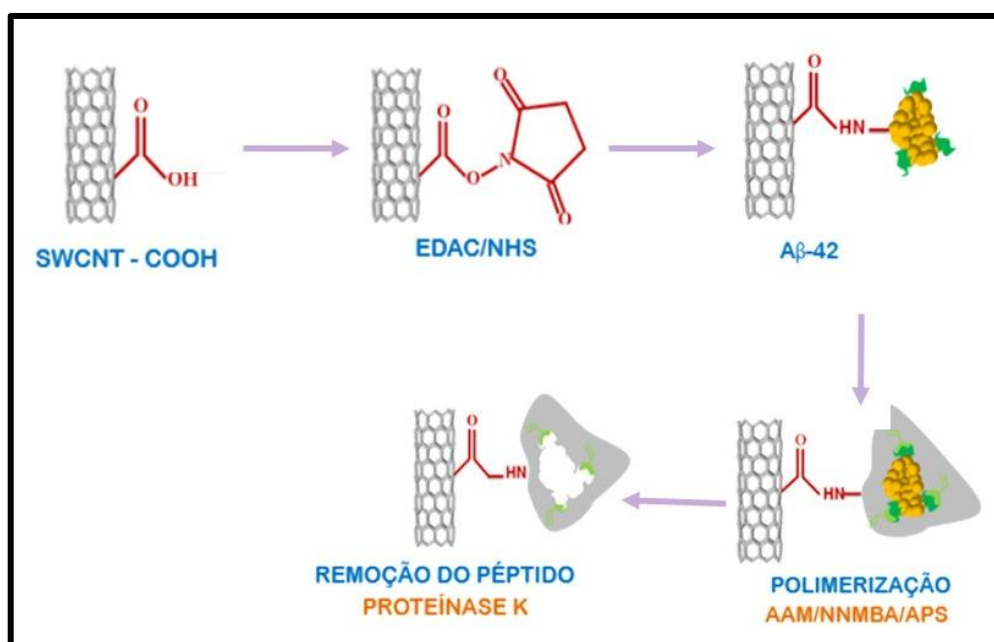


Figura 14 - Esquema geral da síntese do MIP

## 2.5 Preparação das membranas seletivas

Foram preparadas seis membranas com diferentes composições (figura 15) com o objetivo de avaliar a resposta potenciométrica derivada da interação com os diferentes componentes. As membranas seletivas foram obtidas por mistura de 0,05 g de PVC, 0,06 g de solvente mediador oNFOE e 0,002 g de material MIP (ESIs I, III e IV) ou NIP (ESI II) (Tabela 2). Foram ainda preparadas membranas sem qualquer tipo de material sensor, usadas como controlo (ESIs V e VI). Foram adicionados aditivos a duas das membranas,

0,001 g de TOB, atuando como aditivo catiónico (ESI V), e 0,001 g de TpCIPB, atuando como aditivo aniónico (ESI VI).



Figura 15 - Eléttodos seletivos de ião com diferentes composições

Tabela 2- Composição das membranas seletivas de ião

Componente	Quantidade					
	I	II	III	IV	V	VI
MIP (g)	0,002	—	0,002	0,002	—	—
NIP (g)	—	0,002	—	—	—	—
Aditivo catiónico, TOB (g)	—	—	0,001	—	0,001	—
Aditivo aniónico, TpCIPB (g)	—	—	—	0,001	—	0,001
Solvente mediador, oNFOE (g)	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
Polímero, PVC (g)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Solvente, THF (mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

A mistura foi colocada a agitar até à dissolução de todos os reagentes. As membranas foram aplicadas em duplicado e de modo a permitir a formação de uma película na cavidade do suporte condutor. Entre cada aplicação esperou-se o tempo suficiente para que

toda a solução aplicada anteriormente secasse (+/- uma hora). Após a última aplicação, as membranas ficaram a secar durante vinte e quatro horas, à temperatura ambiente, tendo sido posteriormente colocadas a hidratar em água destilada.

## 2.6 Avaliação comparativa dos elétrodos

Os elétrodos foram avaliados através de curvas de calibração e segundo as recomendação da IUPAC. As medições potenciométricas realizaram-se a diferentes valores de pH (6 e 8), à temperatura ambiente, em agitação constante e o registo dos potenciais deu-se aquando de uma estabilização de  $\pm 0,2$  mV. O valor da f.e.m. foi medido a valores constantes de força iónica e pH.

As concentrações decrescentes de A $\beta$ -42 foram obtidas pela adição do tampão (MOPS) com uma concentração de  $1,0 \times 10^{-4}$  M a pH 6 e  $1,0 \times 10^{-3}$  M a pH 8 em quantidades entre 0,4 e 15 mL, num gobelé de 100,0 mL contendo 1,75 mL de tampão e 0,25 mL de proteína com concentração de 0,01  $\mu$ /mL.

Através dos coeficientes de seletividade foi também determinada a interferência de alguns compostos. Entre as diferentes medições os elétrodos foram lavados em água desionizada para remoção do péptido aprisionado na superfície da membrana sensora.

Os resultados finais correspondem a pelo menos três ensaios nas mesmas condições que se traduziram em curvas de calibração representadas através do programa Microsoft Excel 2013, onde foram também calculados todos os parâmetros em estudo: LIRL, limite superior de resposta linear (LSRL), LD e declive.

O desvio padrão relativo (%) da média dos potenciais das soluções de A $\beta$ -42 permitiu calcular a reprodutibilidade.

## 2.7 Avaliação seletiva dos elétrodos

O coeficiente de seletividade potenciométrica,  $K_{A,B}^{pot}$ , foi obtido para vários interferentes através do método das soluções mistas. Neste método foi mantida a concentração do interferente enquanto se fez variar a concentração do ião principal, o péptido A $\beta$ -42.

Assim, para efetuar o estudo, foram adicionados 200  $\mu$ L de uma solução de interferente cuja concentração se encontra dentro dos níveis fisiológicos, 250  $\mu$ L de A $\beta$ -42 a  $5 \times 10^{-3}$

mg/mL e 1550 $\mu$ L de MOPS  $1\times 10^{-3}$  mol/L. Posteriormente, através da calibração do eletrodo, verificou-se a resposta à presença do interferente.

## 2.8 Análise da superfície

Os diferentes materiais (SWCNT, SWCNT-COOH, MIP e NIP) foram submetidos à espectroscopia de Raman com microscopia confocal. Os espectros de Raman foram obtidos para um laser de 532 nm, com uma potência de 8 mW e de 50  $\mu$ m *slit* em abertura de fenda. Os espectros Raman foram registados à temperatura ambiente, tanto para os SWCNT simples como para os carboxilados, SWCNT-COOH. As medidas de FTIR foram realizadas entre 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$  números de onda, com uma resolução de 32 e refletindo a recolha de 100 espectros.

## 2.9 Análise de amostras

As amostras de soro humano foram avaliadas através dos parâmetros da curva de calibração do péptido A $\beta$ -42. Para a análise de amostras procedeu-se à dopagem de soro com diferentes concentrações de A $\beta$ -42. Esta dopagem foi efetuada por adição de 250  $\mu$ L de uma solução de A $\beta$ -42 (5  $\mu$ g/mL), a uma solução contendo 1750 $\mu$ L de soro diluído 100 vezes em tampão MOPS.

A determinação da concentração de A $\beta$ -42 foi baseada no traçado prévio de uma curva calibração, onde os valores de potenciais obtidos para diferentes concentrações de amostra dopada foram substituídos na equação de regressão linear correspondente. Os ensaios foram efetuados em triplicado. A precisão dos resultados foi calculada através do cálculo desvio padrão.

## Capítulo 3 – Resultados

Neste capítulo são apresentados os resultados da caracterização dos elétrodos com diferentes membranas sensoras e da sua aplicação. A caracterização apresentada descreve a análise morfológica dos respetivos materiais e o desempenho analítico dos vários elétrodos, relativamente ao pH, LIRL, LSRL, LD e declive. Apresentam-se estudos de seletividade às membranas que constituem os elétrodos e, por fim, a sua aplicação em amostras de soro humano.

### 3.1 O material biomimético

Os anticorpos plásticos foram sintetizados por impressão molecular na superfície de SWCNT de forma a obter um grande número de locais impressos. Os SWCNT foram selecionados devido à sua grande área superficial, capacidade reconhecida de adsorção da molécula molde ( $A\beta$ -42) e compatibilidade com grande parte de transdutores.

O processo geral da síntese do anticorpo plástico consiste na ligação do péptido/proteína na superfície do SWCNT, preenchimento dos locais disponíveis em torno da molécula molde com uma estrutura adequada rígida e remoção da proteína/péptido de forma a obter a respetiva impressão molecular. A polimerização deverá ocorrer sempre em condições próximas daquelas patentes no sistema fisiológico (de pH e de força iónica, por exemplo) e não devem impor um estímulo externo que conduza à sua alteração conformacional (alteração conformacional ou química por ação física ou química, como temperatura ou agentes radicalares). A figura 14 apresenta um esquema geral das reações ocorridas para a ligação covalente do  $A\beta$ -42 aos SWCNT.

Os ácidos carboxílicos na superfície dos SWCNT foram ativados inicialmente pela sua reação com EDAC. Esta reação forma um intermediário altamente reativo (*O*-acylisourea) que rapidamente reage com NHS e dá origem a um éster estável (succinimidil intermediário). Este éster permite a realização da substituição nucleofílica com um grupo amina prontamente disponível no péptido  $A\beta$ -42, resultando assim na formação de uma ligação amida entre os SWCNTs e o  $A\beta$ -42.

O compósito  $A\beta$ 42-SWCNT foi incubado primeiramente com monómeros de carga positiva, de forma a promover locais específicos de interação entre a proteína e o material polimérico, melhorando assim a especificidade do sensor. O material sensor foi lavado

com tampão pH 7,4 e incubado posteriormente em AAM (monómero vinílico) e em NNMBA (agente reticulante), ambos preparados na mesma solução tampão. Após um período de incubação que permitiu a orientação de monómeros e agentes de reticulação em torno do A $\beta$ -42 através de interações eletrostáticas, adicionou-se APS para iniciar a polimerização. A polimerização ocorreu à temperatura ambiente durante uma hora, de forma a evitar qualquer alteração na conformação do péptido. Os SWCNT modificados foram novamente lavados.

O péptido foi então removido da matriz polimérica, por ação de uma enzima proteolítica (proteínase K). De seguida, o material sensor foi submetido a várias lavagens com água desionizada e tampão, com o objetivo de remover fragmentos peptídicos presentes na superfície sensora e de aumentar o pH a um nível próximo da neutralidade.

### 3.2 Análise da superfície dos materiais sensores

O perfil químico dos diferentes materiais foi avaliado através da análise dos espectros de Raman e FTIR. A análise foi efetuada para os materiais: i) SWCNT, ii) SWCNT-COOH, iii) MIP e iv) NIP. Estes traçados permitiram obter algumas considerações sobre a eficiência da carboxilação dos nanotubos, polimerização, bem como da remoção da molécula molde.

A espectroscopia de Raman é uma técnica que permite caracterizar e determinar a pureza dos SWCNT. (Singh & Yadav, 2014) As diferentes bandas visíveis representam as principais características do espectro de Raman dos nanotubos de carbono.

As bandas de *radial breathing mode* (RBM), correspondem ao movimento simétrico no qual todos os átomos vibram em fase no sentido radial e têm um valor de frequência entre 100 e 500  $\text{cm}^{-1}$ . Estas bandas estão relacionadas com o do diâmetro do nanotubo permitindo aferir sobre a homogeneidade/heterogeneidade do tamanho das amostras.

A banda relativa à frequência de deslocamento tangencial (G) próxima de 1590  $\text{cm}^{-1}$ , bem como a banda associada ao pico de segunda ordem (G') são sensíveis à transferência de carga entre os nanotubos e a mistura reacional (Graupner, 2007). A banda (G) está relacionada com o modo tangencial (no plano) de dois átomos de carbono numa célula de grafeno unitária vibrando um contra o outro. Este modo é denominado por simetria da camada interna E<sub>2</sub>G e representa o grau de cristalinidade dos nanotubos. (Burghard, 2005)

As frequências atingidas pelo modo tangencial são aproximadamente  $1590\text{ cm}^{-1}$  (G) e  $2600\text{ cm}^{-1}$  (G') e são sensíveis às alterações entre os nanotubos e as suas modificações. (Dresselhaus et al., 2005; Nelson et al., 2007)

O formato e intensidade da banda (D), entre  $1290$  e  $1350\text{ cm}^{-1}$ , estão relacionados com hibridização  $sp^3$  dos átomos de carbono. Esta banda está associada aos defeitos e modificações químicas da estrutura hexagonal dos CNT, enquanto a intensidade relativa das bandas D e G' é um indicador importante na quantidade de defeitos induzidos por tratamento químico. (Burghard, 2005)

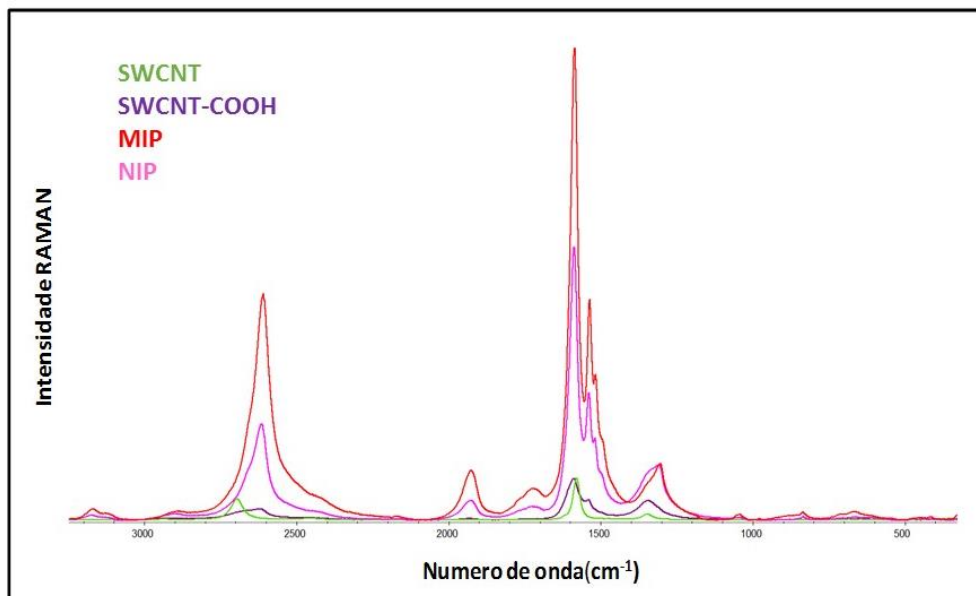


Figura 16 – Análise RAMAN dos diferentes materiais i) MWCNT, ii) MWCNT-COOH, iii) MIP e iv) NIP

A estrutura geral do espectro destaca quatro picos muito distintos (figura 16 e 17), o primeiro na região à volta dos  $1300\text{ cm}^{-1}$  (D), o segundo dos  $1600\text{ cm}^{-1}$  (G), o terceiro nas altas frequências à volta dos  $2600\text{ cm}^{-1}$  (G') e o quarto a  $1930\text{ cm}^{-1}$ . A figura 17 apresenta os espectros de Raman individual de cada material analisado. Além disso, indica também a razão da intensidade entre os picos G e D, uma informação que permite determinar a pureza e o grau de modificação química da amostra. É possível visualizarmos diferenças significativas de intensidade e deslocamento dos picos entre os diferentes materiais. Os deslocamentos são essencialmente perceptíveis para as bandas G e D.

Comparando a presença e deslocamento de bandas entre SWCNT e SWCNT-COOH, os últimos apresentam duas bandas adicionais a, aproximadamente, 1540,7 e a 267,7  $\text{cm}^{-1}$  bem como o deslocamento das bandas G' e G, em cerca de 60 e 9  $\text{cm}^{-1}$  para a direita. Estas alterações estão associadas aos defeitos presentes nas paredes dos nanotubos, provocados por modificações químicas resultantes da oxidação química dos SWCNT e que originaram o aparecimento de grupos -OH, -CHO e -COOH na sua superfície. É observado um decréscimo na razão entre as bandas G e D dos SWCNT em relação aos SWCNT-COOH ( $I_G/I_D$ ) de 7,9 para 2,1, significando que os defeitos aumentam após modificação química.

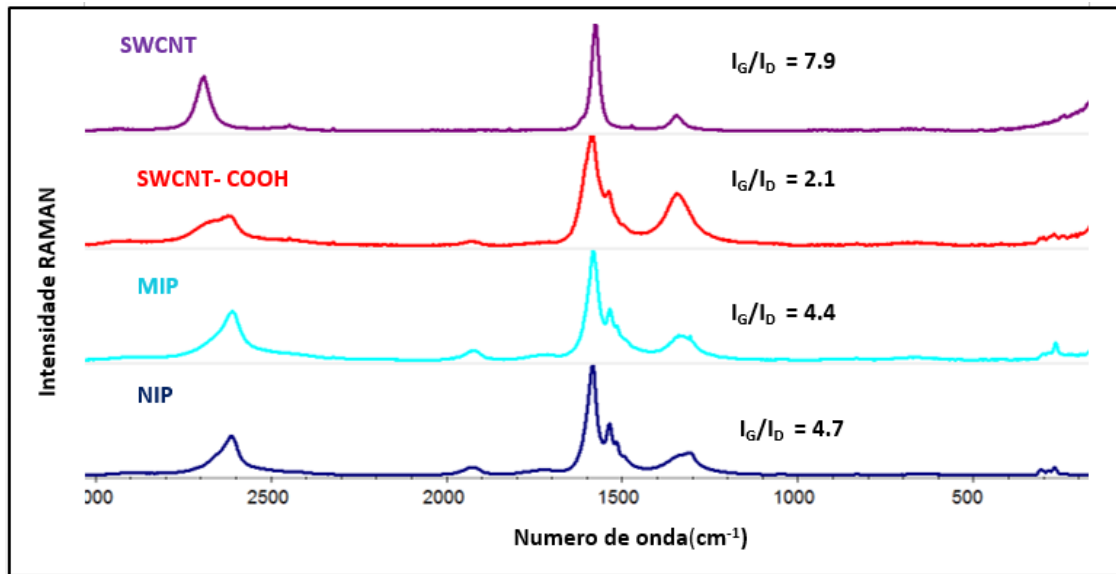


Figura 17 - Espectro de RAMAN para os CNT, CNT-COOH, MIP e NIP separados e rácio das intensidades G/D

Relativamente aos espectros Raman dos materiais MIP e NIP, as informações mais relevantes envolvem alterações ao nível das bandas G e D, bem como a razão dos seus picos (figura 16 e 17). As razões  $I_G/I_D$  para os materiais MIP e NIP foram iguais a 4,4 e a 4,7, respetivamente. Estes valores foram muito próximos, o que era de esperar uma vez que a matriz polimérica é idêntica. Por outro lado, esta razão aumentou relativamente aos SWCNT-COOH, significando que os defeitos diminuíram e implicando, genericamente, uma maior prevalência de ligações  $\text{sp}^2$  de carbono. Foi ainda possível observar um deslocamento dos picos G', G e D para a direita, comparativamente ao passo precedente da modificação química (SWCNT-COOH) e evidenciar a banda adicional a cerca de 1900  $\text{cm}^{-1}$ . O deslocamento das bandas foi igual a cerca de 13, 9 e 12  $\text{cm}^{-1}$ , respetivamente.

Comparando os polímeros MIP e NIP entre si, observaram-se também ligeiras diferenças. Entre elas, verificou-se um deslocamento ligeiro das bandas G', G e D, em cerca de  $2,0\text{ cm}^{-1}$ , e um aumento em 0,3 da razão  $I_G/I_D$  do NIP.

Os espectros de FTIR/ATR foram traçados para os mesmos materiais com o objetivo de identificar os grupos funcionais ligados à superfície dos SWCNT. Este tipo de análise é bastante utilizado para a determinação estrutural de moléculas, permitindo que se estude a superfície química e as interações e perturbações que nela ocorrem (figura 18). (Titus et al., 2006)

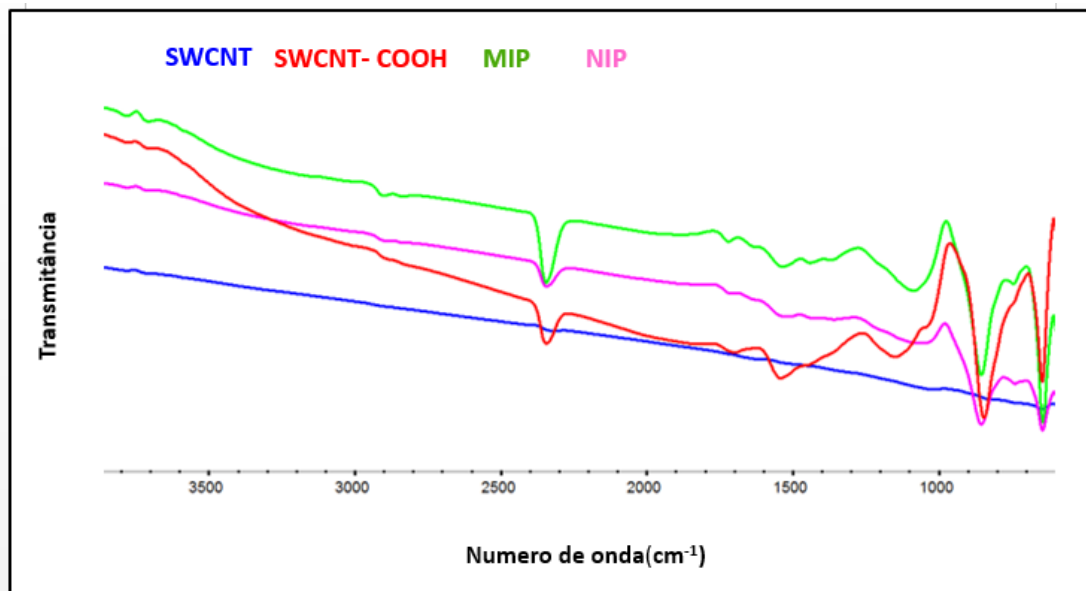


Figura 18 - Espectro de FTIR para os CNT, CNT-COOH, MIP e NIP

A figura 18 mostra a comparação entre os diferentes materiais e, tal como se pode observar, na amostra de SWCNT quase que não há evidências de picos de absorção. No entanto, após o tratamento com ácido verificou-se o aparecimento de um grande número de novos picos. O pico observado para os SWCNT-COOH a  $1701\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído ao estiramento da ligação C=O presente no ácido carboxílico; o pico a  $1545\text{ cm}^{-1}$  pode estar relacionado com o estiramento da ligação C=C dos SWCNTs; e o pico a  $1150\text{ cm}^{-1}$  estará ligado ao estiramento da ligação C-O (epoxi ou álcool, tipicamente). (Dyke & Tour, 2004; Titus et al., 2006).

Os materiais MIP e NIP apresentaram perfis de espectro FTIR semelhantes entre si, com picos de absorção centrados a 1723, 1539, 1444, 1087,67 e 856  $\text{cm}^{-1}$ . Estes picos evidenciaram também o estiramento do grupo carbonilo C=O, ligação C=C e da ligação C–O. Comparando com os CNT-COOH, estes picos encontram-se igualmente presentes, tendo-se deslocado ligeiramente em valor de número de onda (para valores superiores ou inferiores), sugerindo assim a ocorrência de modificação na superfície dos SWCNTs carboxilados.

### **3.3 Características de funcionamento dos sensores**

As membranas foram preparadas com diferentes características para que fosse possível perceber qual a composição que corresponde ao melhor desempenho potenciométrico, baseado nas características operacionais dos diferentes elétrodos. As curvas de calibração foram obtidas pela média dos valores de três ensaios permitindo tirar as conclusões pretendidas.

Além do material biomimético (MIP ou NIP), os sensores de A $\beta$ -42 foram também preparados com e sem aditivos. Esta precaução deve-se ao facto de os materiais sensores poderem comportar-se como substâncias ionóforas e haver necessidade de um aditivo iónico para desencadear a resposta potenciométrica. Os aditivos iónicos utilizados foram o TpCIPB como aditivo de carga negativa e o TOB como aditivo de carga positiva, em diferentes membranas contendo o sensor MIP. A estes compostos foram adicionados solvente plastificante (oNFOE) e PVC, comum a todas as membranas. Foram também preparadas membranas que continham apenas aditivos iónicos, permitindo identificar o efeito individual destes componentes no desempenho dos elétrodos.

Assim, na tentativa de identificar o pH mais adequado à resposta destes elétrodos, foram realizados ensaios a diferentes valores de pH.

#### **3.3.1 Tampão de pH 6**

A calibração com  $1,0 \times 10^{-4}$  mol/L de tampão MOPS revelou que todos os ESIs com material sensor apresentaram uma resposta catiónica nestas condições (tabela 3), e que esta resposta poderia ser de melhor ou de pior qualidade em termos de extensão da resposta linear e da qualidade dessa resposta consoante a composição da membrana seletiva.

As diferentes concentrações de A $\beta$ -42 utilizadas neste estudo tiveram como objetivo aferir qual a gama em que este péptido originaria uma melhor resposta potenciométrica. Considerando a reduzida concentração da solução A $\beta$ -42 comercializada, tornou-se necessário realizar o procedimento de calibração no sentido “descendente”, promovendo uma variação decrescente de A $\beta$ -42, entre 2,34 a 0,1138  $\mu$ g/mL.

De uma forma geral, verificou-se que a grande parte dos elétrodos apresentou declives abaixo dos valores teóricos para uma espécie de carga +1, à exceção dos elétrodos I e II, que apresentaram um valor de declive igual a 62,15 e de 58,71 mV/década, respetivamente (Tabela 3). O ESI I apresentou um comportamento linear a partir dos 1,23  $\mu$ g/mL e um limite de detecção de 1,2  $\mu$ g/mL. O elétrodo MIP com aditivo catiónico (ESI III) apresentou o declive mais baixo, de 48,75 mV/década.

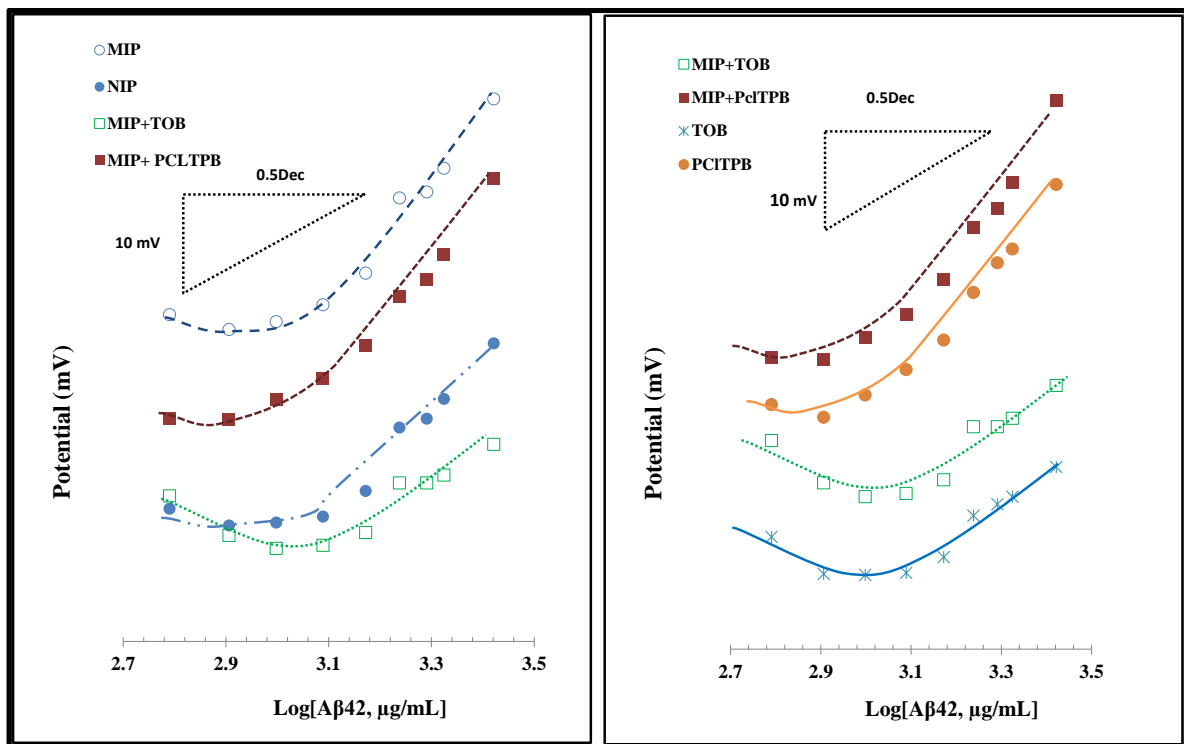


Figura 19 - Curva de calibração em tampão MOPS  $1,0 \times 10^{-4}$  M, pH 6.

Além disso, alguns dos elétrodos não apresentaram linearidade na gama de concentração estudada, tal como se pode verificar pelos coeficientes de correlação muito baixos presentes na tabela 3.

Tabela 3- Parâmetros potenciométricos em MOPS  $1,0 \times 10^{-4}$  M, pH 6

Característica	<b>I</b>	<b>II</b>	<b>III</b>	<b>IV</b>	<b>V</b>	<b>VI</b>
	MIP	NIP	MIP+TOB	MIP+TpCIPB	TOB	TpCIPB
<b>Declive</b> , mV/década	62,15	58,71	24,30	48,75	24,79	46,75
<b>LIRL</b> $\mu\text{g/mL}$	1,23	1,15	0,82	0,81	0,91	0,79
<b>LSRL</b> $\mu\text{g/mL}$	2,16	2,64	2,64	2,64	1,835	2,64
<b>LD</b> $\mu\text{g/mL}$	1,2	1,2	1,1	1,0	1,2	1,0
<b>R<sup>2</sup></b> (n=3)	0,97	0,92	0,98	0,93	0,96	0,98

### 3.3.2 Tampão de pH 8

A calibração com  $1,0 \times 10^{-3}$  mol/L de tampão MOPS indicou que todos os ESIs foram capazes de promover uma resposta catiónica nestas condições (tabela 4). Verificou-se que os ESIs I, V e VI apresentam declives superiores aos valores teóricos (dados pela equação de Nernst). Os declives foram iguais a cerca de 75, 64 e 66 mV/década, respetivamente.

Em contraste, os elétrodos II e IV apresentaram baixos declives, de 43,97 e de 39,34 mV/década, correspondendo ao NIP e MIP com aditivo aniónico, respetivamente. Estes elétrodos apresentaram LDs próximos entre si, com variações entre 0,68 e 0,76  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente.

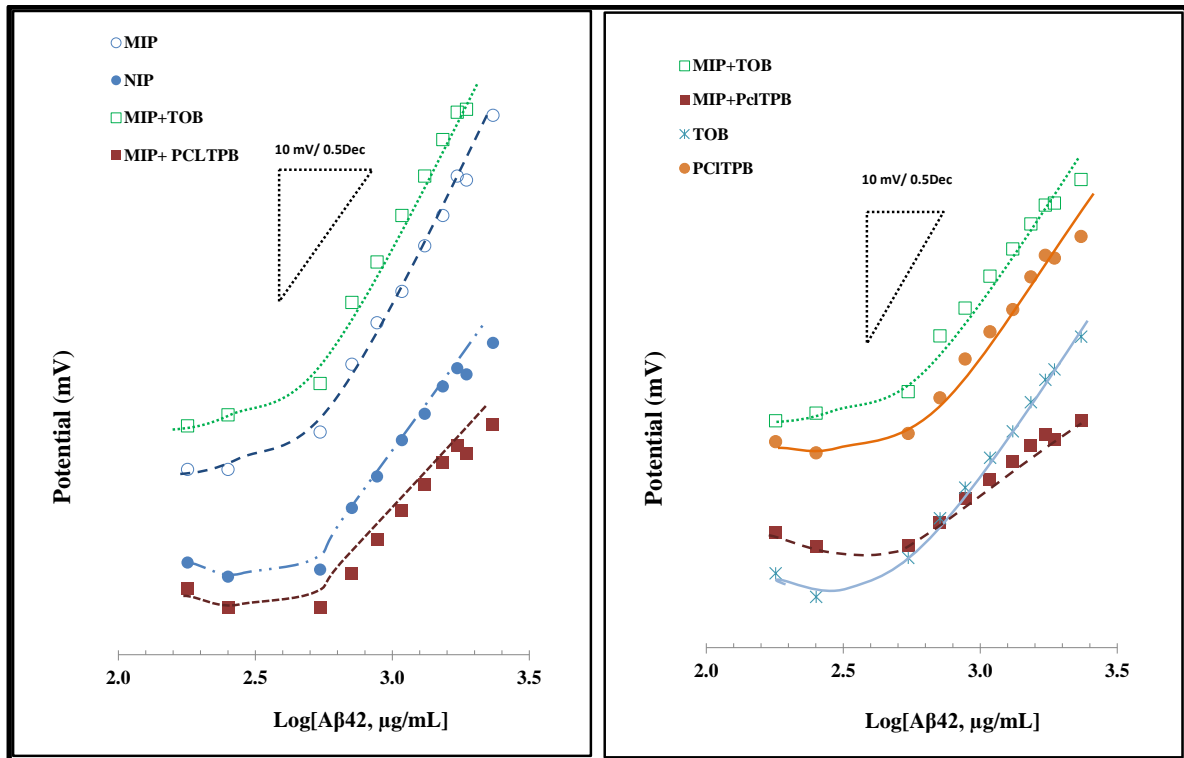


Figura 20- Curva de calibração em tampão MOPS  $1,0 \times 10^{-4}$  M, pH 8.

O ESI III (MIP com aditivo catiónico) apresentou características próximas das *Nernstianas* e menor LD. Os valores médios de declive e de LD foram iguais a 59,04 mV/década e 0,72  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente. O elétrodo que demonstrou piores características operacionais foi o ESI IV (MIP com aditivo aniónico), com um declive de 39,34 mV/década e um LD de 0,76  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabela 4- Parâmetros potenciométricos em MOPS  $1,0 \times 10^{-3}$  M, pH 8

	<i>I</i>	<i>II</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>V</i>	<i>VI</i>
	MIP	NIP	MIP+TOB	MIP+TpCIPB	TOB	TpCIPB
<b>Declive, mV/década</b>	75,13	43,97	59,04	39,34	64,00	66,21
<b>LIRL <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	0,97	0,89	0,77	0,82	0,77	0,77
<b>LSRL <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	2,34	2,34	2,33	2,34	2,34	2,34
<b>LD <math>\mu\text{g/mL}</math></b>	0,79	0,75	0,72	0,76	0,72	0,68
<b><math>R^2</math> (<math>n=3</math>)</b>	0,99	0,97	0,98	0,97	0,97	0,97

Dos resultados obtidos, foi possível aferir que os elétrodos em que a matriz imobilizadora de PVC continha material sensor de impressão molecular, MIP, foram aqueles com melhores características operacionais e que a presença do aditivo catiónico na membrana

contribuiu para a melhoria do valor de LD obtido. No entanto, esta melhoria do declive de uma espécie catiónica pela adição de um aditivo catiónico não é consistente, uma vez que a presença de cargas iguais às do péptido A $\beta$ -42 dentro da membrana não promove a sua interação com os locais de ligação. Nesta fase, optou-se pela utilização de materiais MIP, capazes de gerar resposta potenciométrica de qualidade sem qualquer aditivo, ou de materiais MIP com aditivo aniónico, capaz de promover o aumento da interação entre a proteína alvo e o material biomimético presente na membrana.

### **3.3.3 Tempo de resposta, tempo de vida e estabilidade**

O tempo necessário para que um valor de potencial seja constante corresponde ao tempo de resposta, sendo que, neste trabalho, esse potencial foi definido em  $\pm 3$  mV. A concentração inicial de A $\beta$ -42 neste estudo foi igual a 5  $\mu$ g/mL. A estabilização inicial do valor de potencial demorou cerca de 5 minutos, verificando-se um tempo de estabilização de cerca de 30 segundos após o início da diminuição da concentração.

A reprodutibilidade e repetibilidade dos resultados foram avaliadas por calibrações consecutivas, com pouco tempo entre si (horas ou 1 dia). De uma forma geral, as calibrações registadas revelaram que as características potenciométricas gerais dos ESIs com melhores características de resposta se mantiveram por um período de cerca de 3 semanas.

## **3.4 Seletividade do sensor**

A análise da seletividade dos sensores é das características mais importantes no que diz respeito à aplicação analítica dos ESIs. Um importante componente que evidência grande influencia nesta propriedade é o material eletroativo, uma vez que o mecanismo de seletividade é determinado, maioritariamente, por aspetos estereo-específicos e electroestáticos. O facto de os ESIs serem seletivos apenas para um ião mas não específicos para essa espécie indica que estes eléctrodos podem detetar outros iões na solução, mas que a sua resposta é sempre dominada pelo ião principal.

O estudo de seletividade foi realizado recorrendo ao método das soluções misturadas, avaliando a variação do LD decorrente das curvas de calibração observadas. Neste estudo foram utilizadas como espécies interferentes a acetilcolina, a albumina, a creatinina e a

ureia. As concentrações utilizadas para estas espécies foram os níveis máximos admitidos no soro para cada uma destas, não sendo provável a sua presença acima desses valores limite.

De uma forma geral, os LDs obtidos foram muito semelhantes aos da calibração com o analito de interesse A $\beta$ -42 (tabela 5). Os resultados obtidos sugerem que a presença destes compostos não interferiu nos resultados analíticos em termos de gama operacional de trabalho.

Tabela 5 - Comparação dos limites de detecção nos diferentes interferentes relativamente ao soro.

Espécie interferente	Concentração de interferente, $\mu\text{g/mL}$	LD, $\mu\text{g/mL}$		
		ESI I	ESI II	ESI IV
Acetilcolina	$8,20 \times 10^{-8}$	0,54	0,54	0,40
Creatinina	$1,20 \times 10^{-5}$	0,54	0,54	0,54
Albumina	$5,20 \times 10^{-3}$	0,54	0,45	0,42
Ureia	$4,00 \times 10^{-4}$	0,54	0,54	0,54
Soro (comb)	—	0,52	0,52	0,52

Da análise dos coeficientes de seletividade foi também possível concluir que os sensores apresentaram baixos valores de  $\log K^{\text{POT}}$  (tabela 6) e que o sensor MIP apresentou para todos os interferentes um menor valor de coeficiente de seletividade potenciométrica do que o material NIP e ou o MIP com aditivo aniónico. Além disso, o ESI com material NIP apresentou uma elevada interferência da albumina e o ESI com material MIP e aditivo aniónico foi grandemente afetado pela acetilcolina.

Tabela 6 - Log de  $K^{POT}$  calculado pelo método das soluções mistas, em MOPS pH 8,0

Espécie interferente	Log $K^{POT}$		
	ESI I	ESI II	ESI IV
Acetilcolina	-0.016	-0.016	0.114
Creatinina	-0.016	-0.016	-0.016
Albumina	-0.016	0.063	-0.016
Ureia	-0.016	-0.016	-0.016

### 3.5 Análise de amostras

A aplicação dos ESIs foi testada através do traçado de calibrações com diferentes concentrações de A $\beta$ -42 em soro humano diluído, tendo por objetivo identificar qual o impacto do soro humano nos parâmetros gerais da curva de calibração. As concentrações de A $\beta$ -42, em estudo, variaram entre 2,34 e 0,55  $\mu\text{g/mL}$ .

Para este estudo foi usado apenas o sensor MIP uma vez que para os restantes sensores com aditivo as características de desempenho registadas não foram consistentes. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 7, indicando-se aí os valores de recuperação e os erros associados.

Tabela 7- Resultados obtidos para a análise em soro humano

Concentração de A $\beta$ -42 ( $\mu\text{g/mL}$ )	Recuperação (%)	Erro (%)
<b>1,31</b>	103,5 $\pm$ 0,083	3,54 $\pm$ 0,08
<b>1,08</b>	107,5 $\pm$ 0,22	7,49 $\pm$ 0,11
<b>0,71</b>	102,3 $\pm$ 0,08	2,34 $\pm$ 0,08

Foram obtidos resultados concordantes entre a concentração adicionada e a obtida de A $\beta$ -42, com índices de recuperação situados entre os 102,3 e os 107,5% e erros relativos entre 2,34 e 7,49. O desvio padrão relativo entre cada ensaio foi inferior a 5%.

## Capítulo 4 – Discussão

Neste capítulo são abordadas as principais observações retiradas sobre os resultados obtidos e mencionados no capítulo anterior, nomeadamente sobre a análise da superfície dos sensores, bem como os resultados das calibrações realizadas a diferentes valores de pH.

### 4.1 Análise da superfície dos materiais sensores

A análise superficial dos materiais foi avaliada por RAMAN e FTIR e permitiu confirmar a modificação química dos diferentes materiais.

As diferenças entre os espectros RAMAN permitiram comprovar a oxidação química dos SWCNT. Este tratamento gerou defeitos nas paredes dos mesmos atribuindo-lhes grupos funcionais que se presumem ser  $-OH$ ,  $-CHO$  e  $-COOH$ , segundo a literatura. (Burghard, 2005) Esta alteração é confirmada pela diminuição da razão da intensidade das bandas G/D entre os SWCNT e os CNT-COOH (7,9 para 2,1).

Em relação à ocorrência de polimerização dos materiais MIP e NIP, esta é confirmada através da alteração na razão dos picos entre as bandas G e D e pelo deslocamento dos picos  $G'$ , G e D para valores inferiores de deslocamento Raman. O aumento da razão das bandas  $I_G/I_D$  revelou uma diminuição dos defeitos dos materiais poliméricos relativamente à modificação anterior e, por conseguinte, confirmou a presença de um material cristalino e com maiores ligações de carbono  $sp^3$  presentes na superfície dos CNT-COOH.

A análise FTIR permitiu confirmar a oxidação química dos SWCNT através de bandas adicionais presentes na superfície dos nanotubos oxidados quimicamente (SWCNT-COOH). A polimerização dos materiais MIP e do NIP foi também confirmada, uma vez que as bandas presentes no material oxidado sofreram um deslocamento ligeiro, sinal de modificação e alteração da superfície. Além disso, o perfil dos espetros MIP e NIP foi muito semelhante, e diferente do material SWCNT oxidado, confirmando assim a presença de uma modificação semelhante entre MIP e NIP e que só poderia ter sido a formação de polímero.

## 4.2 Calibração com tampão a pH 6 e 8

Relativamente ao comportamento observado a pH 6, constatou-se que os materiais MIP e NIP foram capazes de produzir resposta potenciométrica, sendo a maior sensibilidade observada para as membranas com material MIP. No entanto, apesar destes materiais oferecem respostas analíticas diferenciadas, a resposta potenciométrica parece ter sido dominada por interações não específicas com o material, uma vez que a diferença de declive entre ambas as unidades ronda apenas os 4 mV/década.

Do ponto de vista do efeito do aditivo a pH 6, parece claro que a resposta dos elétrodos MIP com aditivo é determinada pela presença desse mesmo aditivo. Efetivamente, os valores de declive os elétrodos MIP com aditivo e do controlo respetivo são da mesma magnitude, indicando que o papel do material MIP nestes elétrodos foi secundário, não dominando a resposta potenciométrica. Por outro lado, os elétrodos com aditivo TOB apresentaram declives muito inferiores aos demais ESIs, algo que seria esperado considerando que o aditivo colocado na membrana era da mesma carga que a da espécie que promove a variação de potencial em solução, e que só poderá ser o péptido A $\beta$ -42, uma vez que é a única espécie cuja concentração varia ao longo da curva de calibração.

Nas calibrações a pH 8 todos os elétrodos parecem oferecer uma boa resposta analítica em termos de declive e de LD. Alguns elétrodos apresentaram inclusivamente declives *superNernstianos*, algo que não seria esperado uma vez que se tratam de ESIs de controlo e com apenas material MIP. Um outro registo anómalo neste estudo relacionou-se com a presença de declives superiores para ESIs com aditivo catiónico e declives inferiores para ESIs com aditivo aniónico. O resultado esperado seria exatamente o contrário, e havendo tempo de experiência científica, seria adequado repetir estes ensaios no sentido de se confirmar a ausência de troca destas unidades potenciométricas.

Comparando os resultados obtidos entre os materiais MIP e NIP a valores de pH 6 e 8, os ensaios a pH 8 parecem favorecer as respostas analíticas seletivas ao péptido A $\beta$ -42, isto porque a diferença de comportamento entre MIP e NIP foi notória a pH 8, cujos declives diferiram mais de 30 mV/década. Este aspeto foi considerado muito importante do ponto de vista analítico, uma vez que se assumiu que a resposta do material NIP foi condicionada por interações não específicas com o material polimérico presente e que a diferença entre o material MIP e NIP evidenciou as interações específicas com as cavidades formadas no material polimérico.

### **4.3 Seletividade do sensor**

Os ESIs utilizados no estudo de seletividade foram o NIP e o MIP, tendo por objetivo confirmar se essa diferença em termos de comportamento analítico se traduzia em termos de seletividade. Por outro lado, incluiu-se ainda neste estudo o ESI com material MIP e aditivo aniónico, uma vez que esta composição seria a única capaz de intensificar a resposta do eléctrodo face ao péptido A $\beta$ -42. Isto, independentemente dos maus resultados obtidos para este eléctrodo a pH 8.

De uma forma geral, os resultados obtidos indicaram melhores características de seletividade para os eléctrodos que continham apenas o material MIP, confirmando assim a presença de interações específicas reveladas anteriormente pela diferença significativa entre os declives destes eléctrodos.

### **4.4 Análise de amostras**

Os resultados obtidos confirmam a boa precisão desta nova abordagem analítica e uma boa exatidão, face a índices de recuperação próximos dos 100% e a erros relativos reduzidos, associados a desvios padrão inferiores a 5%.

## Conclusão

Este trabalho permitiu aplicar a tecnologia de impressão molecular na produção de recetores sintéticos para o péptido A $\beta$ -42, capazes de resistirem a condições extremas de temperatura, pressão, pH e solventes orgânicos.

A seleção adequada do processo de impressão foi crucial bem como o tipo de material polimérico. A polimerização em superfície foi relevante, uma vez que a densidade de locais de ligação esperada por esta abordagem é superior àquela decorrente de outra estratégias de polimerização. A utilização de SWCNT como superfície recetora de impressão poderá também ter contribuído para as boas características de resposta observadas, sobretudo a pH 8. Este nanomaterial apresenta características elétricas excepcionais, decorrentes da sua organização nanoestrutural em forma de tubo e da composição da matriz de carbono, quase exclusivamente organizada em carbonos com hibridação sp<sup>2</sup>.

O efeito da presença dos aditivos lipofílicos iónicos na membrana não foi muito consistente. A pH 6 a associação dos materiais MIP aos aditivos forneceu resultados coerentes mas a resposta foi claramente dominada pelo aditivo presente. A pH 8 a associação entre materiais MIP e aditivos não foi consistente. Esta ausência de consistência nos resultados observados levou à escolha de ESIs com material MIP para a aplicação deste sensor à análise de soro.

De uma forma geral, os resultados da análise de soro diluído dopado forneceram resultados precisos e exatos. Comparando com outros métodos concorrenciais, a metodologia proposta apresenta como vantagens uma conceção simples, o baixo tempo de resposta, boa precisão, os baixos LDs e a boa seletividade. Além disso, esta metodologia demonstrou ser simples, precisa e de baixo custo, do ponto de vista do consumo de reagentes e de equipamento envolvido.

Em suma, os resultados obtidos abrem grandes expectativas em torno dos polímeros de impressão molecular, atuando também como uma ferramenta promissora para aplicações diretas em contexto de ponto de cuidado.

## Referências Bibliográficas

- ADI, 2015, *World Alzheimer Report 2015, The Global Impact of Dementia, An Analysis of Prevalence, Incidence, Cost and Trends*, Alzheimer's Disease International, <http://www.alz.co.uk/research/world-report-2015>, acessado em Janeiro de 2016.
- Alves, L., Correia, A. S. A., Miguel, R., Alegria, P., & Bugalho, P. (2012). Alzheimer's Disease: A Clinical Practice-Oriented Review. *Frontiers in Neurology*, 3(April), 1–20. <http://doi.org/10.3389/fneur.2012.00063>
- Alzheimer's Disease Genetics. (2015). *National Institute on Aging*, 15-6424.
- Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I., & Palleschi, G. (2006). Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(8), 1405–1423. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2005.07.012>
- Bakker, E., & Pretsch, E. (2007). Modern Potentiometry, 18(9), 1199–1216. <http://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.07.011>
- Bateman, R. J., Xiong, C., Benzinger, T. L. S., Fagan, A. M., Goate, A., Fox, N. C., ... Morris, J. C. (2012). Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *The New England Journal of Medicine*, 367(9), 795–804. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1202753>
- Bergmann, N. M., & Peppas, N. A. (2008). Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins. *Progress in Polymer Science*, 33(3), 271–288. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2007.09.004>
- Bezbaruah, A. N., & Kalita, H. (2010). *Sensors and biosensors for endocrine disrupting chemicals : State-of-the-art and future trends. Treatment of Micropollutants in Water and Wastewater*.
- Bossi, a, Bonini, F., Turner, a P. F., & Piletsky, S. a. (2007). Molecularly imprinted polymers for the recognition of proteins: the state of the art. *Biosensors & Bioelectronics*, 22(6), 1131–7. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.023>
- Buck, R. P., & Lindner, E. (1994). Recommendations for nomenclature of ionselective electrodes (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and Applied Chemistry*, 66(12), 2527–2536. <http://doi.org/10.1351/pac199466122527>
- Burghard, M. (2005). Electronic and vibrational properties of chemically modified single-wall carbon nanotubes. *Surface Science Reports*, 58(1-4), 1–109. <http://doi.org/10.1016/j.surfrep.2005.07.001>
- Burnett, R. W., Covington, a K., Fogh-Andersen, N., Kùlpmann, W. R., Lewenstam, a, Maas, a H., ... Zijlstra, W. G. (2000). Use of ion-selective electrodes for blood-electrolyte analysis. Recommendations for nomenclature, definitions and conventions. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Scientific Division Working Group on Selective El. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC*, 38(4), 363–70. <http://doi.org/10.1515/CCLM.2000.052>
- Chambers, J. P., Arulanandam, B. P., Matta, L. L., Weis, A., & Valdes, J. J. (2008). Biosensor recognition elements. *Current Issues in Molecular Biology*, 10(1), 1–12.
- Chen, P. Y., Nien, P. C., Wu, C. T., Wu, T. H., Lin, C. W., & Ho, K. C. (2009). Fabrication of a molecularly

- imprinted polymer sensor by self-assembling monolayer/mediator system. *Analytica Chimica Acta*, 643(1-2), 38–44. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.004>
- Chu, L. W. (2012). Alzheimer ' s disease : early diagnosis and treatment, 18(3), 228–237.
- Cook, N. P., & Martí, A. a. (2012). Facile methodology for monitoring amyloid- $\beta$  fibrillization. *ACS Chemical Neuroscience*, 3(11), 896–9. <http://doi.org/10.1021/cn300135n>
- Cummings, J. L. (2011). *Biomarkers in Alzheimer's disease drug development. Alzheimer's & Dementia* (Vol. 16). Elsevier Ltd. <http://doi.org/10.1038/nm.2221>
- Damasceno, L., Ventura, R., Ortuño, J., & Segura, J. (2000). Derivatization procedures for the detection of beta(2)-agonists by gas chromatographic/mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry : JMS*, 35(11), 1285–94. [http://doi.org/10.1002/1096-9888\(200011\)35:11<1285::AID-JMS61>3.0.CO;2-L](http://doi.org/10.1002/1096-9888(200011)35:11<1285::AID-JMS61>3.0.CO;2-L)
- Delgado, R. (1993). Potenciométrica. *Química*, 49, 34–38.
- DeMattos, R. B., Bales, K. R., Parsadanian, M., O'Dell, M. a, Foss, E. M., Paul, S. M., & Holtzman, D. M. (2002). Plaque-associated disruption of CSF and plasma amyloid-beta (A $\beta$ ) equilibrium in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 81, 229–236. <http://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00889.x>
- Denadai, J. (2011). *ANÁLISE QUÍMICA Análise Instrumental*.
- Dickerson, B. C., & Sperling, R. A. (2005). Neuroimaging biomarkers for clinical trials of disease-modifying therapies in Alzheimer's disease. *NeuroRx*, 2(2), 348–360. <http://doi.org/10.1602/neurorx.2.2.348>
- Dogan-Topal, B., Bozal, B., Tolga Demircigil, B., Uslu, B., & Ozkan, S. a. (2009). Electroanalytical studies and simultaneous determination of amlodipine besylate and atorvastatine calcium in binary mixtures using first derivative of the ratio-voltammetric methods. *Electroanalysis*, 21(22), 2427–2439. <http://doi.org/10.1002/elan.200904689>
- Dresselhaus, M. S., Dresselhaus, G., Saito, R., & Jorio, A. (2005). Raman spectroscopy of carbon nanotubes. *Physics Reports*, 409(2), 47–99. <http://doi.org/10.1016/j.physrep.2004.10.006>
- Du, C., Ramaley, C., McLean, H., Leonard, S. C., & Miller, J. (2005). High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the detection of amyloid Beta peptide related with Alzheimer's disease. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 16(4), 356–63. <http://doi.org/16/4/356>
- Dyke, C. a., & Tour, J. M. (2004). Covalent functionalization of single-walled carbon nanotubes for materials applications. *Journal of Physical Chemistry A*, 108(51), 11151–11159. <http://doi.org/10.1021/jp046274g>
- Electrochemistry (potentiometry). (2015). *Medical Chemistry*, 15–18. Retrieved from [http://tera.chem.ut.ee/~koit/arstpr/pot\\_en.pdf](http://tera.chem.ut.ee/~koit/arstpr/pot_en.pdf)
- Fernandes, R. (2013). *Doenças Neurodegenerativas - Bases bioquímicas, celulares e neurológicas*.
- Gai, Q., Liu, Q., Li, W., He, X., Chen, L., & Zhang, Y. (2008). Preparation of bovine hemoglobin-imprinted polymer beads via the photografting surface-modified method. *Frontiers of Chemistry in China*, 3(4),

370–377. <http://doi.org/10.1007/s11458-008-0089-x>

- Galasko, D., & Golde, T. E. (2013). Biomarkers for Alzheimer's disease in plasma, serum and blood - conceptual and practical problems. *Alzheimer's Research & Therapy*, 5(2), 10. <http://doi.org/10.1186/alzrt164>
- Ganjali, M., Faridbod, F., Saboury, A., Davarkhah, N., Divsalar, A., G, B., ... 1. (2010). A New Approach for Protein Binding Isotherm Analysis by Means of an Electrochemical Microsensor. *Int. J. Electrochem. Sci. International Journal*, 5, 630–638.
- Godinho, M. I. (2005). Análise instrumental II. *Departamento de Engenharia Química, Secção de Controlo Analítico, ISEL*.
- Graupner, R. (2007). Recent Advances in linear and nonlinear Raman spectroscopy I. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38(February), 1538–1553. <http://doi.org/10.1002/jrs>
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., & Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, 8(3), 1400–1458. <http://doi.org/10.3390/s8031400>
- Hampel, H., Shen, Y., Walsh, D., Aisen, P., Shaw, L. M., Zetterberg, H., ... Blennow, K. (2010). NIH Public Access, 223(2), 334–346. <http://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.09.024.Biological>
- Hansen, D. E. (2007). Recent developments in the molecular imprinting of proteins. *Biomaterials*, 28(29), 4178–4191. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.017>
- Harvey, D. (2000). Modern Analytical Chemistry. *Modern Analytical Chemistry*, 1, 817 pages. <http://doi.org/10.1136/jcp.30.1.93-a>
- Haupt, K., & Mosbach, K. (2000). Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors. *Chemical Reviews*, 100(7), 2495–2504. <http://doi.org/10.1021/cr990099w>
- Henry, N., & Hayes, D. (2012). Cancer biomarkers. *Molecular Oncology*, 6(2), 140–146. <http://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.01.010>
- Holford, T. R. J., Davis, F., & Higson, S. P. J. (2012). Recent trends in antibody based sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 34(1), 12–24. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2011.10.023>
- Holtzman, D. M., Morris, J. C., & Goate, A. M. (2011). Alzheimer's Disease : The Challenge of the Second Century. *Science Translational Medicine*, 3(77), 1–35. <http://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002369.Alzheimer>
- Hooper, C., Lovestone, S., & Sainz-Fuertes, R. (2008). Alzheimer's Disease, Diagnosis and the Need for Biomarkers. *Biomarkers*, 3(0), 317–323.
- Hudson, S. A., Ecroyd, H., Kee, T. W., & Carver, J. A. (2009). The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds. *FEBS Journal*, 276(20), 5960–5972. <http://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07307.x>
- Humpel, C. (2011). Identifying and validating biomarkers for Alzheimer's disease. *Trends in Biotechnology*, 29(1), 26–32. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.09.007>
- Imtiaz, B., Tolppanen, A.-M., Kivipelto, M., & Soininen, H. (2014). Future directions in Alzheimer's disease from risk factors to prevention. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 661–70.

- <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2014.01.003>
- Koncki, R. (2007). Recent developments in potentiometric biosensors for biomedical analysis. *Analytica Chimica Acta*, 599(1), 7–15. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2007.08.003>
- Krysto, D. R., & Peppas, N. a. (2012). Critical review and perspective of macromolecularly imprinted polymers. *Acta Biomaterialia*, 8(2), 461–473. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.11.005>
- Kumar, A., Singh, A., & Ekavali. (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacological Reports*, 67(2), 195–203. <http://doi.org/10.1016/j.pharep.2014.09.004>
- Li, L., He, X., Chen, L., & Zhang, Y. (2009). Preparation of novel bovine hemoglobin surface-imprinted polystyrene nanoparticles with magnetic susceptibility. *Science in China Series B: Chemistry*, 52(9), 1402–1411. <http://doi.org/10.1007/s11426-009-0182-0>
- Liang, R., Zhang, R., & Qin, W. (2009). Potentiometric sensor based on molecularly imprinted polymer for determination of melamine in milk. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 141(2), 544–550. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2009.05.024>
- Liua, L., Zhaoa, F., Maa, F., Zhanga, L., Yanga, S., & Xiaa, N. (2013). Electrochemical detection of  $\beta$ -amyloid peptides on electrode covered with N-terminus-specific antibody based on electrocatalytic O<sub>2</sub> reduction by A $\beta$ (1–16)-heme-modified gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 231–235. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566313003527>
- Lubert, K. H., & Kalcher, K. (2010). History of electroanalytical methods. *Electroanalysis*, 22(17-18), 1937–1946. <http://doi.org/10.1002/elan.201000087>
- Mayes, A. G., & Mosbach, K. (1997). Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry? *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 16(6), 321–332. [http://doi.org/10.1016/S0165-9936\(97\)00037-X](http://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00037-X)
- Mayeux, R. (2004). Biomarkers: potential uses and limitations. *NeuroRx: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, 1(2), 182–188. <http://doi.org/10.1602/neurorx.1.2.182>
- Mayeux, R., & Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8). <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a006239>
- Memeron. (2009). Retrieved from <http://www.memeron.com/alzheimers.html>
- Moreira, F. (2009). *Determinação de Norfloxacin em Aquacultura*. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
- Moreira, F., Dutra, R. a F., Noronha, J. P. C., Cunha, A. L., & Sales, M. G. F. (2011). Artificial antibodies for troponin T by its imprinting on the surface of multiwalled carbon nanotubes: Its use as sensory surfaces. *Biosensors and Bioelectronics*, 28(1), 243–250. <http://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.026>
- National Institutes of Health. (2013). The dementias.
- Nelson, D. J., Rhoads, H., & Brammer, C. (2007). Characterizing covalently sidewall-functionalized SWNTs. *J. Phys. Chem. C*, 111(48), 17872–17878. <http://doi.org/10.1021/jp071326y>
- Neurologic Diseases. (2015). Retrieved December 24, 2015, from

<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/neurologicdiseases.html>

- Newman, J. D., & Setford, S. J. (2006). Enzymatic biosensors. *Molecular Biotechnology*, 32(3), 249–268. <http://doi.org/10.1385/MB:32:3:249>
- Noyhouzer, T., Valdinger, I., & Mandler, D. (2013). Enhanced potentiometry by metallic nanoparticles. *Analytical Chemistry*, 85(17), 8347–53. <http://doi.org/10.1021/ac401744w>
- Olsen, E. D. (1990). *Métodos ópticos de analisis*. Barcelona: Editorial Reverté. Retrieved from <https://books.google.es/books?id=gtRcq1g4DmYC&printsec=frontcover&hl=pt-PT#v=onepage&q&f=false>
- Ozkan, S. A. (2009). Principles and Techniques of Electroanalytical Stripping Methods for Pharmaceutically Active Compounds in Dosage Forms and Biological Samples. *Current Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 127–143. <http://doi.org/10.2174/157341209788172870>
- Parihar, M. S., & Hemnani, T. (2004). Alzheimer's disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Journal of Clinical Neuroscience : Official Journal of the Neurosurgical Society of Australasia*, 11(5), 456–67. <http://doi.org/10.1016/j.jocn.2003.12.007>
- Pérez-Moral, N., & Mayes, A. . (2004). Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods. *Analytica Chimica Acta*, 504(1), 15–21. [http://doi.org/10.1016/S0003-2670\(03\)00533-6](http://doi.org/10.1016/S0003-2670(03)00533-6)
- Perumal, V., & Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine*, 12(1), 1–15. <http://doi.org/10.1016/j.jab.2013.02.001>
- Piletsky, S. a., Alcock, S., & Turner, A. P. F. (2001). Molecular imprinting: At the edge of the third millennium. *Trends in Biotechnology*, 19(1), 9–12. [http://doi.org/10.1016/S0167-7799\(00\)01523-7](http://doi.org/10.1016/S0167-7799(00)01523-7)
- Pohanka, M., & Republic, C. (2008). Electrochemical biosensors – principles and applications. *Methods*, 6(2), 57–64. Retrieved from [http://www.zsf.jcu.cz/jab/6\\_2/pohanka.pdf](http://www.zsf.jcu.cz/jab/6_2/pohanka.pdf)
- Povova, J., Ambroz, P., Bar, M., Pavukova, V., Sery, O., Tomaskova, H., & Janout, V. (2012). Epidemiological of and risk factors for Alzheimer's disease: a review. *Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia*, 156(2), 108–14. <http://doi.org/10.5507/bp.2012.055>
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: A systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & Dementia*, 9(1), 63–75.e2. <http://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.11.007>
- Qiao, F., Sun, H., Yan, H., & Row, K. H. (2006). Molecularly Imprinted Polymers for Solid Phase Extraction. *Chromatographia*, 64(11-12), 625–634. <http://doi.org/10.1365/s10337-006-0097-2>
- Rama, E. C., González-García, M. B., & Costa-García, A. (2014). Competitive electrochemical immunosensor for amyloid-beta 1-42 detection based on gold nanostructured Screen-Printed Carbon Electrodes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 201, 567–571. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400514005735>
- Reitz, C., & Mayeux, R. (2014). Alzheimer disease: epidemiology, diagnostic criteria, risk factors and

- biomarkers. *Biochemical Pharmacology*, 88(4), 640–51. <http://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.024>
- Rodriguez-Mozaz, S., Marco, M. P., De Alda, M. J. L., & Barceló, D. (2004). Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure and Applied Chemistry*, 76(4), 723–752. <http://doi.org/10.1351/pac200476040723>
- Ronkainen, N. J., Halsall, H. B., & Heineman, W. R. (2010). Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev*, 39(5), 1747–1763. <http://doi.org/10.1039/b714449k>
- Rosén, C., Hansson, O., Blennow, K., & Zetterberg, H. (2013). Fluid biomarkers in Alzheimer’s disease – current concepts. *Molecular Neurodegeneration*, 8(1), 20. <http://doi.org/10.1186/1750-1326-8-20>
- Saerens, D., Huang, L., Bonroy, K., & Muyldermans, S. (2008). Antibody fragments as probe in biosensor development. *Sensors*, 8(8), 4669–4686. <http://doi.org/10.3390/s8084669>
- Saleem, M. (2013). Biosensors a promising future in measurements. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 51, 012012. <http://doi.org/10.1088/1757-899X/51/1/012012>
- Sales, M. G. (1999). *Desenvolvimento de detetores tubulares potenciométricos e de metodologias automáticas de fluxo contínuo com deteção potenciométrica destinados ao controlo químico de produtos farmacêuticos*. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.
- Santana, I., Farinha, F., Freitas, S., Rodrigues, V., & Carvalho, Á. (2015). The Epidemiology of Dementia and Alzheimer Disease in Portugal: Estimations of Prevalence and Treatment-Costs. *Acta Médica Portuguesa*, 28(2), 182–188. Retrieved from <http://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/6025>
- Santos, A. (2014). *Development of a biosensor for a biomarker in breast cancer*. Universidade de Aveiro.
- Singh, M., & Yadav, S. (2014). ISSN : 2320-2831 A label-free electrochemical protein sensor of perchloric acid doped polyaniline Department of Experimental Medicine ( DIMES ) University of Genova , 3(1), 157–168.
- Snyder, H. M., Carrillo, M. C., Grodstein, F., Henriksen, K., Jeromin, A., Lovestone, S., ... Fillit, H. M. (2014). Developing novel blood-based biomarkers for Alzheimer ’ s disease, 10, 109–114.
- Swerdlow, R. H. (2007). Pathogenesis of Alzheimer ’ s disease. *Clinical Interventions in Aging*, 2(3), 347–359.
- Tarley, C. R. T., Sotomayor, M. D. P. T., & Kubota, L. T. (2005). Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em técnicas de extração e separação. *Química Nova*, 28(6), 1076–1086. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422005000600024>
- Teich, A. F., Patel, M., & Arancio, O. (2013). A reliable way to detect endogenous murine  $\beta$ -amyloid. *PloS One*, 8(2), e55647. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0055647>
- Thévenot, D. R., Toth, K., Durst, R. a., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1-2), 121–131. [http://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](http://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
- Titus, E., Ali, N., Cabral, G., Gracio, J., Babu, P. R., & Jackson, M. J. (2006). Chemically Functionalized

- Carbon Nanotubes and Their Characterization Using Thermogravimetric Analysis, Fourier Transform Infrared, and Raman Spectroscopy. *Journal of Materials Engineering and Performance*, 15(2), 182–186. <http://doi.org/10.1361/105994906X95841>
- Umezawa, Y., Umezawa, K., & Sato, H. (1995). Selectivity coefficients for ion-selective electrodes: Recommended methods for reporting KA,Bpot values (Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 67(3), 507–518. <http://doi.org/10.1351/pac199567030507>
- Uslu, B., & Ozkan, S. a. (2011). Electroanalytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals: A Review of Recent Trends and Developments. *Analytical Letters*, 44(February 2015), 2644–2702. <http://doi.org/10.1080/00032719.2011.553010>
- Varesio, E., Rudaz, S., Krause, K., & Veuthey, J. (2002). Nanoscale liquid chromatography and capillary electrophoresis coupled to electrospray mass spectrometry for the detection of amyloid-beta peptide related to Alzheimer's disease.
- Verpillot, R., Esselmann, H., Mohamadi, M. R., Klafki, H., Poirie, F., Lehnert, S., ... Taverna, M. (2011). Analysis of Amyloid- $\beta$  Peptides in Cerebrospinal Fluid Samples by Capillary Electrophoresis Coupled with LIF Detection. *American Chemical Society*, 1696–1703.
- Wang, Y., Zhang, Z., Jain, V., Yi, J., Mueller, S., Sokolov, J., ... Rafailovich, M. H. (2010). Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: Detection of cancer biomarkers and viruses. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 146(1), 381–387. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2010.02.032>
- Wizeman, W. J., & Kofinas, P. (2001). Molecularly imprinted polymer hydrogels displaying isomerically resolved glucose binding. *Biomaterials*, 22(12), 1485–1491. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00303-3](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00303-3)
- World Health Organization. (2014). What are neurological disorders? Retrieved December 27, 2015, from <http://www.who.int/features/qa/55/en/>
- World Health Organization. (2015). Mental Disorders. Retrieved December 24, 2015, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs396/en/>
- Zetterberg, H., Blennow, K., & Hanse, E. (2010). Amyloid beta and APP as biomarkers for Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, 45(1), 23–29. <http://doi.org/10.1016/j.exger.2009.08.002>