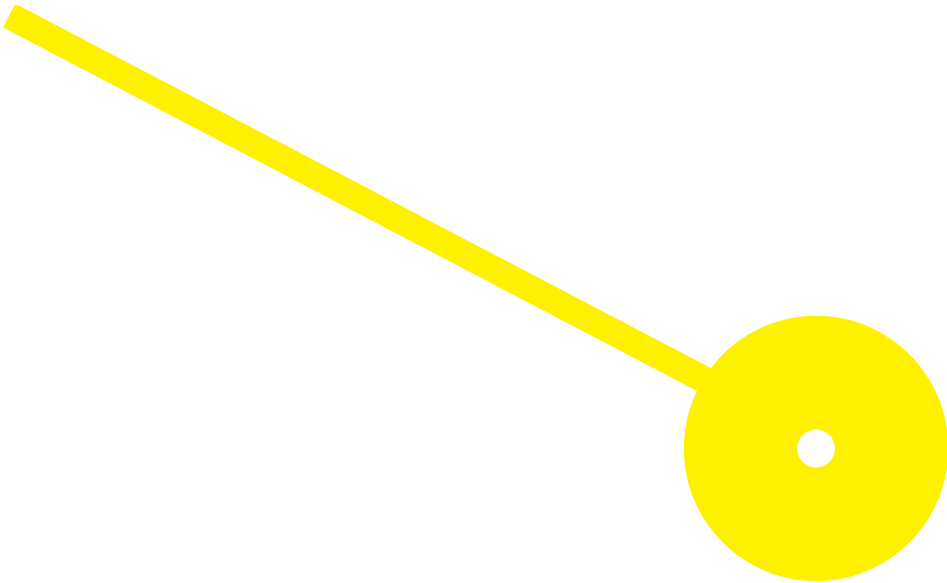




# Desenvolvimento de um Biossensor para a deteção do Ácido 3- Hidroxibutírico na Cetoacidose Diabética

Pedro Daniel Pires Martins

09/2019





**ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE**



METABOLIC BIOMAKERS FOR DIABETES RESEARCH

## **Desenvolvimento de um Biossensor para a deteção do Ácido 3-Hidroxibutírico na Cetoacidose Diabética**

**Autor**

Pedro Daniel Pires Martins

**Orientadores**

Professora Doutora Goreti Sales/ Instituto Superior de Engenharia do Porto

Professor Doutor Rúben Fernandes/ Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto

Doutora Liliana Truta/ Instituto Superior de Engenharia do Porto

**Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde – Ramo em Bioquímica Clínica e Metabólica pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.**

## **Agradecimentos**

A elaboração deste trabalho não teria sido possível sem a colaboração de diversas pessoas. Gostaria, por este facto, de expressar toda a minha gratidão a todos aqueles que, contribuíram para que este trabalho ganhasse forma.

Em primeiro lugar, ao Professor Doutor Rúben Fernandes por me ter permitido fazer parte do seu grupo de trabalho e ter acreditado em mim e nas minhas capacidades

À Professora Doutora Goreti Sales pela disponibilidade, sabedoria, pelas opiniões e críticas que auxiliaram a solucionar os problemas que surgiram ao longo da realização deste trabalho.

À Doutora Liliana Truta, quero de uma forma imensa, expressar o meu muito obrigado. Pela forma como me incentivou e ajudou nos momentos cruciais desta difícil jornada.

À minha namorada, Filomena Pereira, que por inúmeras vezes assegurou o meu trabalho no hospital para me permitir desenvolver o trabalho experimental no Biomark e por todo o apoio que me deu quando os resultados teimavam em não aparecer.

## Resumo

A presente dissertação teve como objetivo o desenvolvimento e caracterização de sensores potenciométricos com base em polímeros de impressão molecular (MIP, do inglês, *Molecularly Imprinted Polymer*), de natureza sintética para a deteção do ácido 3-hidroxi-butírico (3HBA) presente na Cetoacidose Diabética (CAD) e a sua aplicação na construção de sensores potenciométricos. A insulinoopenia provocada pela Diabetes Mellitus (DM) tipo 1 estimula a oxidação de ácidos gordos, resultando no aumento da concentração de corpos cetónicos (ácido 3-hidroxi-butírico, acetoacetato e acetona).

A simplicidade, o baixo custo, a interação rápida e reversível dos sensores potenciométricos com os analitos foram os critérios para a seleção deste tipo de sensor. O material sensor foi obtido por tecnologia de impressão molecular, baseada numa polimerização em bulk, e tendo como molécula molde, o 3HBA. O monómero escolhido para a construção dos sensores foi o 4-Vinilpiridina (4-VP) e como o agente reticulante, o dimetacrilato etilenoglicol (EGDMA). Para controlo da eficiência de impressão da molécula 3HBA no material sintético foi dimensionado um material análogo, em que a molécula molde não estava presente, denominando-se como NIP (do inglês, *Non-Imprinted Polymer*). As caracterizações químicas dos materiais sensores foram analisadas por espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR, do inglês, *Fourier transform infrared spectroscopy*).

Os materiais sensores foram incluídos em membranas poliméricas de policloreto de vinilo (PVC) plastificado, preparadas com ou sem aditivo catiónico lipofílico, de modo a construir sensores biomiméticos seletivos a 3HBA monitorizáveis por transdução potenciométrica. A avaliação do desempenho dos elétrodos foi realizada através de curvas de calibração em solução tampão contendo ácido 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazinoetanossulfónico (HEPES), a pH 5,40, com membranas seletivas baseadas na tecnologia MIP, preparadas com o monómero 4-VP.

As melhores características de resposta analítica em tampão HEPES (pH 5,40) foram obtidas com membranas preparadas com material impresso e com aditivo catiónico lipofílico, 4-tert-octilfenol (TOP), sendo que o sensor que permitiu maior sensibilidade foi o preparado com o polímero 2, em que a molécula 3HBA se encontra mais concentrada e numa proporção 1:1 com o monómero funcional. Os limites de deteção (LD) correspondentes

foram em média  $4,80 \times 10^{-6}$  mol/L de 3HBA para uma resposta linear a partir de  $1,92 \times 10^{-5}$  mol/L e uma sensibilidade aniônica igual a  $-34,7$  mV/década.

De uma forma geral, a aplicação experimental dos sensores biomiméticos permitiram resultados precisos, sugerindo que os biossensores desenvolvidos prossigam com estudos adicionais (ou possam ser otimizados), de modo a serem aplicados em amostras de indivíduos portadores de DM tipo 1 e, assim, implementados num contexto clínico.

**Palavras-chave:** Cetoacidose Diabética; Ácido 3-hidroxi-butírico; Diabetes Mellitus; Biossensor; Impressão molecular; Potenciometria; Eléttodos seletivos de ião.

## Abstract

The main goal of the present work was the development and characterization of potentiometric sensors based on Molecular Imprinted Polymers (MIP), of synthetic nature for the detection of 3-hydroxybutyric acid (3HBA) present in Diabetic Ketoacidosis (DKA). Insulinopenic caused by Diabetes Mellitus (DM) Type 1 stimulates the oxidation of fatty acids, resulting in an increased concentration of ketone bodies (3-hydroxybutyric acid, acetoacetate and acetone).

The simplicity, low cost, fast and reversible interaction of potentiometric sensors with the analytes was the criteria used to select this type of sensor. The sensor was obtained by molecular imprinting technology, based on bulk polymerization, where 3HBA was the template molecule. 4-Vinylpyridine (VP) and ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA) were the monomer and the crosslinking agent selected for the construction of the sensors. In order to control the imprinting efficiency of the 3HBA molecule on the synthetic material, an analogous material, named as non-imprinted polymer (NIP) was synthesized, without the presence of the mold molecule in the construction of sensing material. The chemical characteristics of these materials were analysed by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).

The sensing materials were included in a plasticized polyvinyl chloride (PVC) membrane, containing or not a lipophilic cationic additive, as 4-tert-octylphenol (TOP) on its composition, in order to create selective biomimetic sensors for 3HBA detection. The analytical performance of these electrodes were evaluated in a buffer solution containing 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinoethanesulfonic acid (HEPES) at pH 5.40. The best analytical response in HEPES buffer (pH 5.40) was obtained with membranes composed by MIP material prepared with polymer 2, wherein the 3HBA molecule is more concentrated and in a 1:1 ratio to the functional monomer, and the TOP additive. This sensor showed a good linear response for 3HBA concentrations above to  $1.9 \times 10^{-5}$  mol/L, with a slope of  $-34.7$  mV/decade and a limit of detection (LD) of  $4.80 \times 10^{-6}$  mol/L.

In general, despite the experimental application of these biomimetic sensors allowed to obtain accurate results, furthers studies should be developed, in order to optimize some parameters of these sensors and testing them in individuals with DM type 1 samples, aiming to be implemented in a clinical context.

**Key words:** Diabetic Ketoacidosis, 3-Hydroxybutyric Acid, Diabetes Mellitus, Biosensor; Molecular Imprinting; Potentiometry; Ion-selective electrodes.

## Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Diabetes Mellitus.....	1
1.1.1. Diabetes Tipo 1.....	1
1.1.2. Diabetes Tipo 2.....	2
1.1.3. Diabetes Gestacional.....	3
1.2. Epidemiologia da Diabetes.....	3
1.3. Testes de diagnóstico da Diabetes.....	4
1.4. Complicações Agudas e Crônicas da DM.....	5
1.4.1. Cetoacidose Diabética.....	6
1.4.2. Fisiopatologia da CAD.....	6
1.4.3. Diagnóstico da Cetoacidose Diabética.....	9
1.4.4. Determinação laboratorial da concentração de corpos cetônicos.....	10
1.5. Polímeros de Impressão Molecular.....	12
1.5.1. Síntese dos Polímeros.....	14
1.6. Biossensores.....	15
1.7. Potenciometria.....	16
1.7.1. Eléctrodo de referência.....	17
1.7.2. Eléctrodo indicador.....	18
1.7.3. Base teórica.....	18
1.7.4. Curva de Calibração.....	19
1.7.5. Tempo de resposta.....	20
1.7.6. Drift.....	20
1.7.7. Efeito do pH.....	21
2. Métodos.....	22
2.1. Material e equipamentos.....	22
2.2. Reagentes.....	23
2.3. Construção dos eléctrodos.....	24
2.4. Preparação do sensor.....	24
2.5. Caracterização dos materiais sensores.....	25
2.6. Preparação das membranas seletivas.....	26

2.7. Avaliação comparativa do desempenho dos elétrodos.....	27
3. Resultados e discussão.....	28
3.1. Material biomimético.....	28
3.2. Membranas seletivas .....	28
3.3. Análise da superfície dos materiais sensores.....	29
3.4. Desempenho dos sensores potenciométricos .....	31
3.4.1. Efeito da razão Monómero/Analito.....	32
3.4.2. Efeito do Aditivo TOP.....	33
4. Conclusões e perspectivas futuras.....	36
5. Referências Bibliográficas .....	37

## Lista de abreviaturas

AcAc	Acetoacetato
Acetil-coA	Acetil-coenzima A
ACN	Acetonitrilo
ADA	Associação Americana de Diabetes
ADP	Adenosina difosfato
AGJ	Anomalia da glicemia de jejum
ATP	Adenosina trifosfato
BPO	Peróxido de benzoílo
CAD	Cetoacidose diabética
DM	Diabetes Mellitus
EGDMA	Dimetacrilato de Etilenoglicol
ESI	Elétrodo seletivo de ião
f.e.m	Força eletromotriz
HbA1c	Hemoglobina glicada A1c
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxiethyl)1-piperazinaetanosulfónico
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LIRL	Limite inferior de resposta linear
LD	Limite de deteção
MIP	Polímeros de impressão molecular ( <i>Molecularly Imprint Polymer</i> )
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NIP	Polímeros sem impressão molecular ( <i>Non Imprinted Polymer</i> )
OMS	Organização Mundial de Saúde
oNPOE	2-Nitrofenil octil éter
PTGO	Prova de tolerância à glicose oral
PVC	Policloreto de vinilo
TDG	Tolerância diminuída à glicose
THF	Tetrahidrofurano
TOP	4-tert-octilfenol
3HBA	Ácido 3-hidroxibutírico
4-VP	4-vinilpiridina

## Índice de Figuras

Figura 1.1 – Inter-relações metabólicas na DM tipo 1.....	7
Figura 1.2 – Relação entre o metabolismo dos hidratos de carbono e dos lípidos.....	8
Figura 1.3 – Conversão dos corpos cetónicos.....	10
Figura 1.4 – Representação esquemática do processo de impressão molecular.....	12
Figura 1.5 – Procedimento de preparação do MIP em bulk.....	14
Figura 1.6 – Componentes de um biossensor.....	15
Figura 1.7 – Célula eletroquímica com análise da potenciometria com recurso a um ESI.....	16
Figura 1.8 – Características gerais da curva de calibração.....	19
Figura 1.9 – Representação gráfica do tempo de resposta.....	20
Figura 2.1 – Eléctrodo de referência Ag/AgCl e eléctrodo indicador ESI.....	22
Figura 2.2 – Sistema de leitura múltipla e sequencial de vários ESIs.....	23
Figura 2.3 – Constituição dos corpos ESI.....	24
Figura 2.4 – Esquema exemplificativo da síntese de MIPs.....	25
Figura 2.5 – Aplicação das soluções de membranas seletivas.....	27
Figura 3.1 – Espectros de FTIR dos materiais sensores: NIP1 e MIP1.....	29
Figura 3.2 – Espectros de FTIR dos materiais sensores: NIP2 e MIP2.....	30
Figura 3.3 – Curvas de calibração.....	32
Figura 3.4 – Efeito do aditivo lipofílico catiónico TOP.....	34

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1.1 – Comparação de resultados laboratoriais associados à CAD.....	9
Tabela 1.2 – Métodos analíticos para a determinação de Corpos Cetónicos.....	11
Tabela 2.1 – Constituição dos materiais sensores .....	25
Tabela 2.2 – Composição das membranas seletivas.....	26
Tabela 3.1 – Características potenciométricas dos ESIs.....	32

## **1. Introdução**

Neste capítulo são apresentados os vários aspetos teóricos que sustentam o trabalho realizado ao longo desta dissertação. Para este efeito, focam-se aspetos relacionados a molécula alvo em estudo, o ácido 3-hidroxiacetilcárbico (3HBA), abordando a sua composição, metabolismo e associação à fisiopatologia da cetoacidose diabética. São ainda referidos os métodos inerentes à construção de um biossensor para a deteção de 3HBA.

### **1.1. Diabetes Mellitus**

A Diabetes Mellitus (DM) é uma doença metabólica crónica de etiologia complexa que se caracteriza pela presença de hiperglicemia causada pelo defeito total de produção de insulina pelas células beta dos ilhéus de Langerhans, pela insulinoresistência a nível dos tecidos-alvo, ou ambos. Esta desordem complexa afeta o metabolismo das proteínas, hidratos de carbono e lípidos (2). A hiperglicemia crónica está associada a danos a longo prazo, como a disfunção e falha em diversos órgãos, principalmente nos olhos, rins, nervos, coração e vasos sanguíneos. Os sintomas tradicionalmente presentes na diabetes englobam a poliúria, polidipsia, polifagia, fadiga, visão embaçada, enjoos ou dor abdominal. (2, 3).

A classificação da DM foi estabelecida pela Associação Americana de Diabetes (ADA) em 1997 e Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2006, determinando a existência de quatro tipos clínicos, etiológicamente distintos: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes gestacional e outros tipos específicos de diabetes (3, 4).

#### **1.1.1. Diabetes Tipo 1**

A fisiopatologia da DM tipo 1 está relacionada com o défice total na produção de insulina e representa cerca de 5 a 10% do número total de casos de diabetes. Esta patologia pode subdividir-se em DM autoimune, mais comum, e em DM idiopática, etiologia mais rara (2, 5). A DM autoimune, está relacionada com mecanismos autoimunes, que levam à destruição das células beta pancreáticas produtoras de insulina. Sob este estado podem ser encontrados autoanticorpos responsáveis pela resposta imunológica contra as células dos ilhéus de Langerhans, anti-insulina, glutamato descarboxilase (GAD65) e fosfatases da tirosina (IA-2 e IA-2 $\beta$ ). Apresenta-se ainda associada ao antígeno leucocitário humano

(HLA) e os genes envolvidos na sua codificação. É mais prevalente em crianças e adolescentes e, nestes casos, a cetoacidose pode ser a primeira manifestação da doença. No adulto a progressão é lenta, sendo denominada diabetes latente autoimune do adulto (LADA). Neste caso, as células beta vão retendo alguma atividade de produção residual de insulina e a cetoacidose pode ser mascarada durante anos (5, 6). Nas duas situações existe uma destruição progressiva das células beta dos ilhéus de Langerhans que usualmente provoca um déficit absoluto de insulina endógena. Desta forma, a terapêutica com insulina é indispensável para assegurar a sobrevivência do paciente (4, 5). Na forma idiopática a etiologia é desconhecida. Os pacientes apresentam cetoacidose e insulinopenia, não apresentando, no entanto, evidências de qualquer processo autoimune (5).

Na generalidade, os pacientes com DM tipo 1 têm predisposição a outras desordens autoimunes, como doença de Graves, tiroidite de Hashimoto e hepatite autoimune (5, 7).

### **1.1.2. Diabetes Tipo 2**

A prevalência da DM tipo 2 corresponde a cerca de 90 a 95% dos casos de diabetes e está relacionada com fatores ambientais, nomeadamente hábitos alimentares, falta de exercício físico, sedentarismo e obesidade (5). A incidência aumenta com a idade e o diagnóstico é feito predominantemente a partir dos 40 anos de idade. No entanto, estes fatos têm vindo a sofrer alterações devido a mudanças nos hábitos alimentares e ao sedentarismo em idades jovens, sendo cada vez mais comum o aparecimento da diabetes tipo 2 em crianças e jovens adultos (3).

A diabetes tipo 2 caracteriza-se pela resistência periférica à insulina, especialmente nas células musculares, pelo aumento de produção de glicose pelo fígado (gliconeogénese) e por alterações na secreção pancreática de insulina. Numa fase inicial, os indivíduos apresentam níveis de insulina normais ou ligeiramente elevados em jejum, mas gradualmente aumenta o desequilíbrio da produção de insulina em relação aos níveis de glicose no sangue. Consequentemente, resulta num progressivo comprometimento das células beta pancreáticas, até que atinge um desequilíbrio entre a produção hepática de glicose e a utilização pelos tecidos periféricos (5). A maioria dos indivíduos com resistência à insulina desenvolve a patologia, embora em alguns casos, com alterações no estilo de vida, exista uma reversão no processo, diminuindo os casos de morbilidade prematura provocados pelas complicações decorrentes da diabetes (8).

### **1.1.3. Diabetes Gestacional**

A DM gestacional é definida como qualquer alteração no metabolismo dos hidratos de carbono diagnosticado ou detetado pela primeira vez durante a gravidez (4, 5). É mais frequente o desenvolvimento da DM gestacional na segunda metade da gravidez. Neste período, ocorrem grandes alterações metabólicas, nomeadamente a redução na sensibilidade à insulina, auxiliando o fornecimento de glicose para o crescimento fetal (6). Frequentemente, a DM gestacional é revertida após o nascimento do bebé, embora 30 a 50% da população apresenta um maior risco de desenvolver diabetes do tipo 2. Existe de igual forma uma maior probabilidade de o feto, cujas mães desenvolveram diabetes gestacional, desenvolverem obesidade e DM tipo 2 em idade adulta (3).

Existem ainda outros tipos de diabetes que apresentam uma baixa incidência. São estes os que incluem defeitos genéticos na função das células ou da ação da insulina, endocrinopatias, patologias do pâncreas exócrino (fibrose cística), infeções e indução por fármacos ou químicos (5).

## **1.2. Epidemiologia da Diabetes**

A OMS estima que o número de pessoas diagnosticadas com diabetes tenha evoluído de 108 milhões em 1980 para 422 milhões em 2014, correspondendo a uma prevalência de 8,5% em pessoas acima dos 18 anos (9).

O primeiro estudo de base populacional com exame físico, realizado com o objetivo específico de estimar a prevalência de diabetes em Portugal, foi realizado em 2009. Neste estudo estimou-se uma prevalência de 11,7% no grupo populacional dos 20 aos 79 anos; 6,6% nos indivíduos cujo o diagnóstico da diabetes já tinha sido realizado e 5,1% nos indivíduos em que a doença não estava diagnosticada. A prevalência da população na fase pré-diabética situava-se nos 23,3% (10). O Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes de 2015 considerou que a prevalência estimada da diabetes na população portuguesa com idades compreendidas entre os 20 e os 79 anos (7,7 milhões de indivíduos) seria de 13,3%. O impacto do envelhecimento da estrutura etária da população portuguesa (20-79 anos) refletiu-se num aumento de 1,6 pontos percentuais da taxa de prevalência da diabetes entre 2009 e 2015 (11). Considerando que a despesa de saúde em diabetes, de acordo com o estudo CODE-2 da Estrutura da Despesa de Saúde em Diabetes, correspondeu a cerca de 50 a 60% do total da despesa de saúde em 2014, em Portugal, a

diabetes representou um custo direto estimado entre 1300 e 1550 milhões de euros, ou seja, cerca de 0,7 a 0,9% do produto interno bruto português (11).

### **1.3. Testes de diagnóstico da Diabetes**

Os sintomas clássicos da DM são a poliúria, a polidipsia e a polifagia. Existem outros sintomas que levam à sua suspeita da patologia, como a fadiga, perda involuntária de peso, fraqueza, prurido cutâneo e infeções de repetição (2, 3). Com alguma frequência, a DM só é diagnosticada quando são detetadas as suas complicações crónicas, como a diabetes é assintomática numa grande percentagem dos casos, a suspeita clínica ocorre apenas na presença de fatores de risco ou quando são detetados valores alterados de glicémia em exames de rotina. O diagnóstico de diabetes é feito com base na presença de um dos seguintes parâmetros (3-5):

- Glicemia em jejum  $\geq 126$  mg/dL ( $\geq 7,0$  mmol/L);
- Sintomas clássicos e glicemia ocasional  $\geq 200$  mg/dL (ou  $\geq 11,1$  mmol/L);
- Glicemia  $\geq 200$  mg/dL ( $\geq 11,1$  mmol/L) às 2 horas, na prova de tolerância à glicose oral (PTGO) com 75g de glicose;
- Hemoglobina glicada A1c (HbA1c)  $\geq 6,5\%$ .

No entanto, o diagnóstico de diabetes numa pessoa assintomática não deve ser realizado na base de um único valor anormal de glicemia de jejum ou de hemoglobina glicada A1c (HbA1c), devendo ser confirmado numa segunda análise, após uma a duas semanas (3-5).

O diagnóstico da pré-diabetes ou identificação de categorias de risco aumentado para diabetes, faz-se com base nos seguintes parâmetros (3-5):

- Anomalia da glicemia em jejum (AGJ): glicemia em jejum  $\geq 110$  e  $< 126$  mg/dL ( $\geq 6,1$  e  $< 7,0$  mmol/L);
- Tolerância diminuída à glicose (TDG): glicemia às 2 horas na PTGO  $\geq 140$  e  $< 200$  mg/dL ( $\geq 7,8$  e  $< 11,1$  mmol/L).

No caso da diabetes gestacional, o diagnóstico é realizado com base nas seguintes condições (4, 5):

- Glicemia em jejum, a realizar na primeira consulta de gravidez,  $\geq 92$  mg/dL e  $< 126$  mg/dL ( $\geq 5,1$  e  $< 7,0$  mmol/L);

Se a glicemia em jejum for inferior a 92 mg/dL, é realizada a PTGO com 75 g de glicose, às 24–28 semanas de gestação. É critério para diagnóstico de diabetes gestacional, a confirmação de um ou mais valores:

- Glicemia  $\geq$  92 mg/dL ( $\geq$  5,1 mmol/L) às 0 horas;
- Glicemia  $\geq$  180 mg/dL ( $\geq$  10,0 mmol/L) à 1 hora;
- Glicemia  $\geq$  153 mg/dL ( $\geq$  8,5 mmol/L) às 2 horas.

#### **1.4. Complicações Agudas e Crônicas da DM**

Existem diversas complicações que se vão manifestando ao longo do tempo após a instalação desta patologia. As complicações agudas estão relacionadas com as alterações metabólicas abruptas que podem ser prevenidas com uma correta terapêutica farmacológica. As complicações agudas mais frequentes são a hipoglicemia, cetoacidose e a hiperosmolaridade hiperglicêmica não cetônica (5).

As complicações crônicas da diabetes surgem em qualquer um dos tipos da diabetes, estando estas relacionadas com um mau controlo glicémico durante extensos períodos de tempo. Esta situação origina dois grandes grupos de lesões, as microvasculares e as macrovasculares (12). As lesões microvasculares correspondem aos vasos sanguíneos de pequeno calibre e estão na origem da neuropatia, retinopatia e nefropatia. Na neuropatia periférica ocorrem lesões inflamatórias ou degenerativas nas fibras nervosas e nos axónios dos neurónios, levando a problemas sensitivos ou motores. No caso desta complicação pode estar a origem do pé diabético que por perda de sensibilidade, as feridas progridem sem dor, e como o indivíduo não as valoriza, há risco de necrose com posterior necessidade de amputação. A hemorragia e a angiogénese nos vasos de pequeno calibre estão na génese da retinopatia, levando a alterações na irrigação da retina que potencialmente levam à cegueira. A nefropatia pode surgir como resultado da crescente eliminação de albumina na urina, elevação da hipertensão arterial ou falência renal (12). As complicações macrovasculares caracterizam-se por lesões de vasos de maior calibre, devendo-se sobretudo ao processo de aterosclerose. Estas poderão estar na origem da doença arterial coronária, doença cerebrovascular e doença arterial periférica (12).

#### **1.4.1. Cetoacidose Diabética**

A Cetoacidose Diabética (CAD) é um estado patológico caracterizado pela presença de hiperglicemia, acidose metabólica, desidratação e cetose, resultante de um déficit na produção de insulina, ou devido à insulinoresistência. Afeta sobretudo pessoas com DM tipo 1, embora também existam casos descritos de CAD em DM tipo 2, nomeadamente em Afro-Americanos e algumas minorias étnicas, e sob determinadas circunstâncias, como situações de trauma, cirurgia ou infeção (13, 14). A CAD é frequentemente a primeira manifestação da diabetes, ocorrendo em cerca de 20 a 30% dos doentes com diabetes tipo 1 (13). Os fatores que a desencadeiam incluem infeções (responsáveis por cerca de 30-50% dos casos), a omissão da administração de insulina exógena, acidente vascular cerebral, enfarte agudo do miocárdio, traumatismos, choque, hipovolémia, queimaduras, embolia pulmonar, e administração de drogas terapêuticas que afetam o metabolismo dos hidratos de carbono (corticoesteróides, tiazidas e agentes simpaticomiméticos) (13).

#### **1.4.2. Fisiopatologia da CAD**

A origem patológica da CAD está relacionada com o déficit na produção de insulina, associada a um aumento das hormonas de contra-regulação, especificamente glucagon, cortisol, catecolaminas e hormona de crescimento. Esta situação induz um aumento da síntese de glicose a nível hepático e uma diminuição da sua utilização ao nível dos tecidos periféricos, resultando em hiperglicemia e hiperosmolaridade (13-15).

Em indivíduos saudáveis, durante o jejum, a glicose sanguínea é mantida constante, entre 70-110 mg/dL (3.9 a 6.1 mmol/L), por um processo equilibrado entre a produção hepática de glicose e a sua utilização pelos tecidos periféricos. A insulina controla a produção hepática de glicose, por supressão da produção de glicose a partir do piruvato, lactato, glicerol e aminoácidos (gliconeogénese) e do glicogénio hepático (glicogénólise). Nos tecidos periféricos, como o tecido muscular, a insulina promove o anabolismo proteico, a absorção de glicose e a síntese de glicogénio, e inibe a glicogénólise, funcionando também como um inibidor da lipólise, da oxidação de ácidos gordos livres e da cetogénese (6, 13).

Durante o jejum prolongado, a glicemia diminui, levando a uma redução da libertação de insulina. Na DM tipo 1, a causa da redução da libertação de insulina deve-se ao defeito de produção da insulina pelas células beta dos ilhéus de Langerhans (Figura 1.1). Uma vez que a insulina é uma hormona anabólica, o seu déficit favorece os processos catabólicos,

nomeadamente a lipólise, proteólise e glicogenólise. Nos adipócitos, a insulinopenia provoca o aumento da atividade da lipase hormono-sensível que promove a hidrólise dos triglicerídeos e, conseqüentemente, a libertação de ácidos gordos para a corrente sanguínea como representado na Figura 1.1. Nestas circunstâncias, os tecidos passam a metabolizar principalmente ácidos gordos.

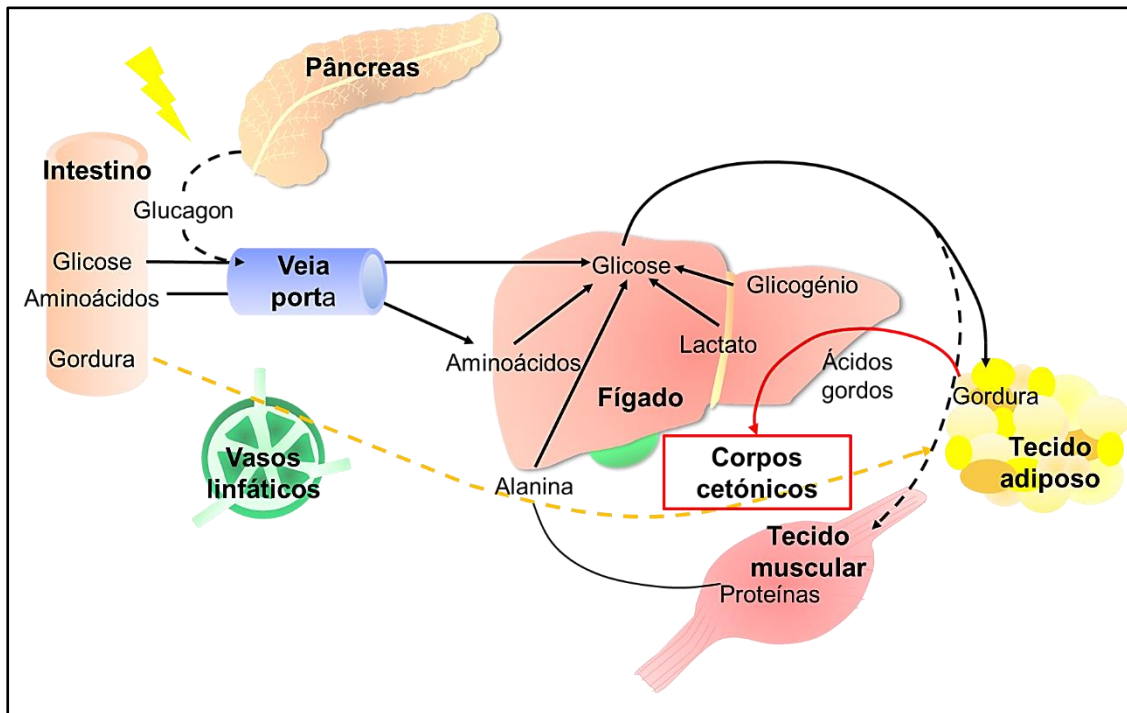


Figura 1.1 – Inter-relações metabólicas na DM tipo 1 (Adaptado Devlin T. 2011) (1).

O aumento da lipólise conduz a um aumento da produção de ácidos gordos livres, que são oxidados nas mitocôndrias do fígado e convertidos em acetil-coenzima A (acetil-CoA). Quando a produção de acetil-CoA ultrapassa a capacidade de utilização hepática e não podendo ser convertida em glicose, esta substância passa a atuar como substrato para a produção de corpos cetónicos (ácido 3-hidroxibutírico, acetoacetato e acetona) (Figura 1.2). Embora o substrato preferencial do tecido cerebral seja a glicose, à medida que o tempo de jejum aumenta, o cérebro passa também a metabolizar os ácidos 3-hidroxibutírico (3HBA) e acetoacetato (AcAc). Parte do AcAc formado pode converter-se nos outros dois corpos cetónicos; o 3HBA que se forma por ação catalítica da  $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase e a acetona através da descarboxilação espontânea do AcAc, sem ação enzimática (Figura 1.3) (13, 14, 16, 17).

A hiperglicemia presente na CAD, causada pela diminuição da utilização periférica de insulina e pelo aumento da secreção hepática de glicose, tem como consequência o

aumento da osmolaridade plasmática, que origina a deslocação de fluídos do espaço intracelular para o espaço extracelular, com desenvolvimento de desidratação celular. Concomitantemente, uma vez ultrapassado o limiar renal, surge glicosúria e diurese osmótica, induzindo também a perda de volume extracelular. Essa diurese é a principal responsável pela perda de fluídos na CAD, bem como pela perda de eletrólitos (14).

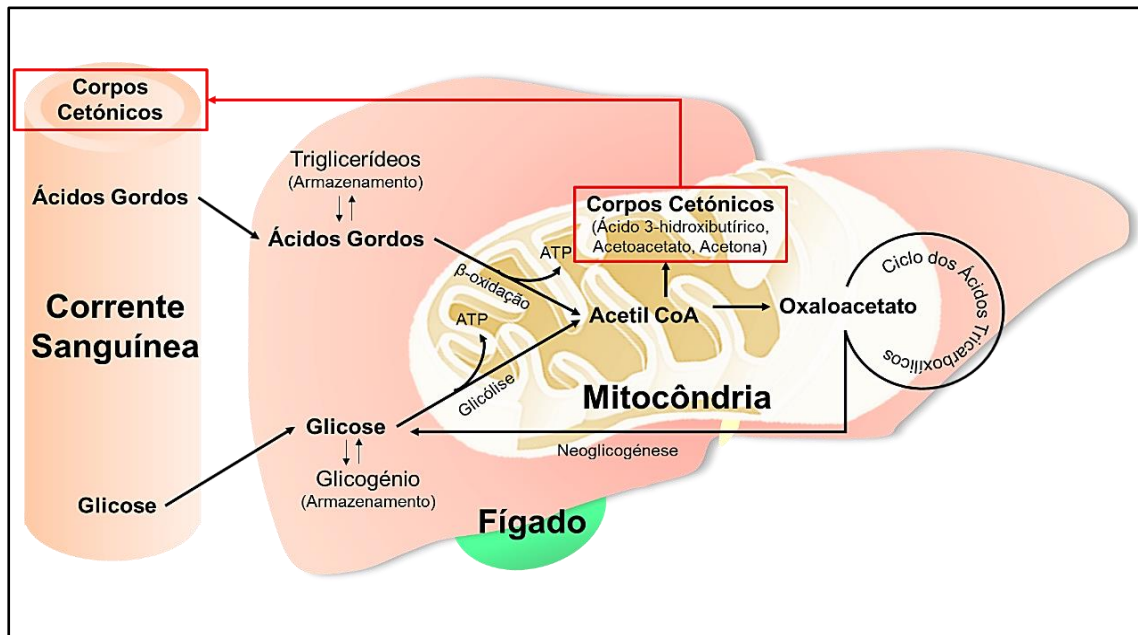


Figura 1.2 – Relação entre o metabolismo dos hidratos de carbono e dos lípidos na formação de corpos cetônicos nos hepatócitos

A cetose envolve o metabolismo de conversão de lípidos em ácidos gordos e corpos cetônicos no fígado. A acidose consiste na diminuição do pH sanguíneo, pela produção excessiva de iões  $H^+$  que não são tamponados pelos tampões fisiológicos, sendo o ião bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) o principal responsável pelo tamponamento sanguíneo. O pKa das moléculas 3HBA e AcAc é inferior a 5, o que explica que ao pH fisiológico do sangue, estas moléculas estejam predominantemente sob a sua forma ionizada. Durante a formação, os ácidos orgânicos sofrem protólise gerando iões  $H^+$  e os respetivos sais 3HBA e AcAc. Desta forma, os protões libertados originam uma descida do pH sanguíneo (acidose). À medida que a concentração de  $H^+$  excede a capacidade de tampão de bicarbonato, as reservas deixam de ser capazes de compensar o excesso de produção de iões  $H^+$ , resultando assim a acidose (16, 18).

Os corpos cetônicos apresentam-se em baixas concentrações no sangue de indivíduos saudáveis durante o jejum, exercício físico prolongado, no início da infância e durante a gravidez. A presença de concentrações altas de corpos cetônicos são

encontradas no sangue de indivíduos com cetoacidose diabética, cetoacidose alcoólica, intoxicação por salicilatos e outras condições raras (Tabela 1.1) (17, 19).

**Tabela 1.1 – Comparação de resultados laboratoriais associados à CAD e a outros estados que alteram o metabolismo dos corpos cetônicos (Laffel 1999) (17)**

	Corpos cetônicos plasmáticos	Glicémia	Glicosúria	pH sanguíneo
<b>Cetoacidose Diabética</b>	Grande aumento	Aumenta	Positiva	Diminui
<b>Jejum</b>	Pequeno aumento	Normal	Negativa	Normal
<b>Cetoacidose alcoólica</b>	Aumento ligeiro a moderado	Normal ou diminui	Negativa	Diminui ou aumenta
<b>Intoxicação por salicilatos</b>	Normal	Normal ou diminui	Negativa	Diminui ou aumenta

### **1.4.3. Diagnóstico da Cetoacidose Diabética**

O diagnóstico da CAD pode ser determinado pela presença de hiperglicemia, acidose metabólica e pelo aumento da concentração de corpos cetônicos circulantes (cetonemia e cetonúria). De uma forma geral, a avaliação laboratorial inicial num doente com suspeita de CAD deve incluir hemograma, glicémia, ionograma, osmolalidade, ureia, creatinina, cálcio, fósforo, magnésio, gasometria arterial e corpos cetônicos na urina e sangue. No caso de suspeita de infeção é importante incluir urocultura, hemocultura ou cultura de outros produtos biológicos (13). No exame físico, os pacientes apresentam frequentemente sinais de desidratação, hipotensão, taquicardia, hálito cetónico e respiração de Kussmaul (um padrão respiratório profundo e com hiperventilação como compensação respiratória para a acidose metabólica) (15).

O grau de gravidade da acidose metabólica pode não estar diretamente relacionado com o grau de severidade da hiperglicemia, uma vez que existem casos descritos de cetoacidose com relativa normoglicemia (glicemia inferior a 250mg/dL). Este episódio poderá ocorrer durante a gravidez, em doentes com vômitos ou jejum prolongado. De forma similar, concentrações relativamente baixas de glicose podem ser encontradas no caso de existência de um comprometimento da gliconeogénese, como no caso de doentes com níveis de alcoolemia elevada ou insuficiência hepática, tal como descrito na Tabela 1.1 (13).

#### 1.4.4. Determinação laboratorial da concentração de corpos cetónicos

A avaliação do aumento da cetonemia era inicialmente determinada através da reação com nitroprussiato de sódio, cuja reação permitia uma avaliação semiquantitativa dos níveis de AcAc e acetona (Tabela 1.2). No entanto, este reagente pode desvalorizar a severidade da cetoacidose, devido a não ter sensibilidade para a determinação do principal produto metabólico da CAD, o 3HBA (16, 20). Os métodos enzimáticos com quantificação espectrofotométrica são uma alternativa para a quantificação laboratorial do 3HBA (Tabela 1.2), apesar de não estarem disponíveis em todos os laboratórios e apresentarem um custo elevado. Na CAD, a proporção entre o 3HBA e o AcAc pode aumentar de 1:1 para 6:1, sendo este o corpo cetónico com maior contribuição para acidose. De igual forma, durante o tratamento do paciente, a cetonúria pode acentuar-se com o tempo, apesar de existir uma melhoria clínica do paciente. Este facto deve-se a uma diminuição da concentração sérica de 3HBA pela oxidação em AcAc (Figura 1.3) devido ao estado redox intramitocondrial dos hepatócitos (19–21).

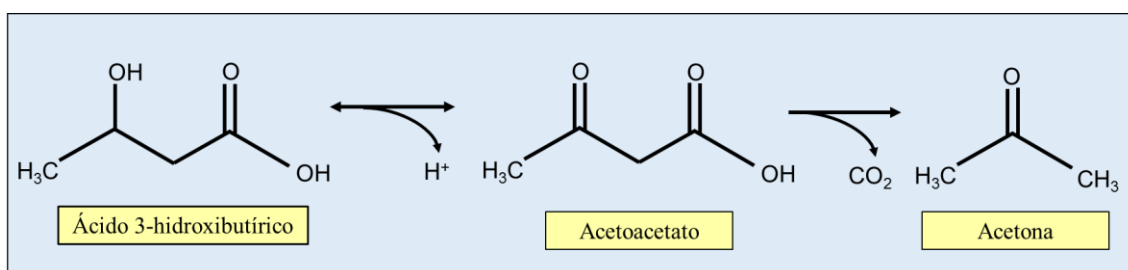


Figura 1.3 – Conversão dos corpos cetónicos

A concentração de corpos cetónicos pode também demonstrar-se elevada na cetoacidose alcoólica, na hipóxia grave, na doença hepática terminal, na isquemia hepática, em vários distúrbios metabólicos e na falência múltipla de órgãos. Todos estes estados patológicos são caracterizados por alterações no potencial das reações oxidação/redução ( $\beta$ -oxidação de ácidos gordos, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e cadeia respiratória) nas mitocôndrias hepatocelulares, de modo a que os níveis da forma reduzida de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADH) sejam elevados e que os níveis da forma oxidada ( $NAD^+$ ) sejam baixos (19).

**Tabela 1.2 – Métodos analíticos para a determinação da concentração de corpos cetônicos**

<b>Analito</b>	<b>Método</b>	<b>Linearidade</b>	<b>Amostra</b>	<b>Referência</b>
<b>3HBA</b>	Enzimático $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase	0-10 mmol/L	Soro	(22)
<b>3HBA</b>	Enzimático $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase	0.005-0.5 mmol/L	Plasma	(23)
<b>3HBA</b>	Ensaio eletroquímico $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase	0-6 mmol/L	Sangue total	(24)
<b>3HBA</b>	Ensaio eletroquímico $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase	0.01-0.4 mmol/L	Soro	(25)
<b>3HBA</b>	Ensaio Fluorimétrico NADPH diaforase	0.01-0.63 mmol/L	Soro, Leite	(26)
<b>3HBA</b>	Fotometria de refletância $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase	0-2 mmol/L	Plasma, Soro, Sangue total	(19)
<b>3HBA</b>	HPLC Benzofurazan	0.2-5 mmol/L	Plasma	(27)
<b>3HBA</b>	GC-MS	0.019-0.057mmol/L	Soro, Urina	(28)
<b>3HBA e AcAc</b>	HPLC $\beta$ -hidroxibutirato desidrogenase	3HBA 0.0015-2 mmol/L AcAc 0.001-0.4 mmol/L	Plasma	(29)
<b>AcAc</b>	Colorimétrico Solução 10% de Cloreto de Ferro	<7.8 mmol/L	Urina	(30)
<b>AcAc e acetona</b>	Colorimétrico Nitroprossiato	AcAc 0.49-0.98 mmol/L Acetona >3.4 mmol/L	Urina	(30)
<b>AcAc</b>	Colorimétrico Nitroprussiato	AcAc >0.49 mmol/L	Urina	(30)

A determinação da proporção 3HBA:AcAc pode ser útil na identificação de alguns erros inatos do metabolismo, tais como na avaliação de insuficiência hepática ou de múltiplos órgãos, de choque, ou da viabilidade hepática para transplantação. Esta proporção revela o estado redox mitocondrial (19, 31). A relação lactato/piruvato fornece informações sobre o estado de oxidação tecidual (31).

O valor de referência de concentração de corpos cetônicos presentes no soro em indivíduos saudáveis é inferior a 0,5 mmol/L. Por sua vez, em casos de hipercetonemia, os níveis de referência são superiores a 1 mmol/L e em caso de cetoacidose, estes valores são superiores a 3 mmol/L (17). O valor de referência do 3HBA em adultos foi estabelecido até 0,27 mmol/L (32, 33).

## 1.5. Polímeros de Impressão Molecular

O conceito de impressão molecular surge a partir da teoria de Pauling, em 1940, para a formação de anticorpos (34). Segundo esta teoria, o antígeno era usado como uma molécula molde para moldar a cadeia polipeptídica de anticorpos, resultando numa configuração complementar do antígeno na respetiva cadeia de anticorpos (34). A partir deste conceito, surgiu a ideia de produzir uma estrutura rígida tridimensional (polímero) envolvendo uma molécula molde que pudesse atuar de forma similar ao anticorpo. Estes polímeros podem designar-se por materiais biomiméticos, sendo atualmente também conhecidos como MIP (do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*) (35, 36).

O primeiro passo para a síntese dos MIP consiste em estabelecer criteriosamente a escolha de um monómero e de uma molécula molde. A molécula molde necessita conter na sua estrutura molecular grupos funcionais capazes de interagir fortemente com os monómeros, a fim de formar uma espécie de complexo estável. A síntese de materiais MIP inicia-se pela formação de um complexo entre os monómeros funcionais e a molécula molde (Figura 1.4), cuja interação pode acontecer através de uma ligação covalente ou não covalente, por meio de ligações de hidrogénio, por interações dipolo/dipolo, por interações iónicas ou por interações hidrofóbicas (37, 38).

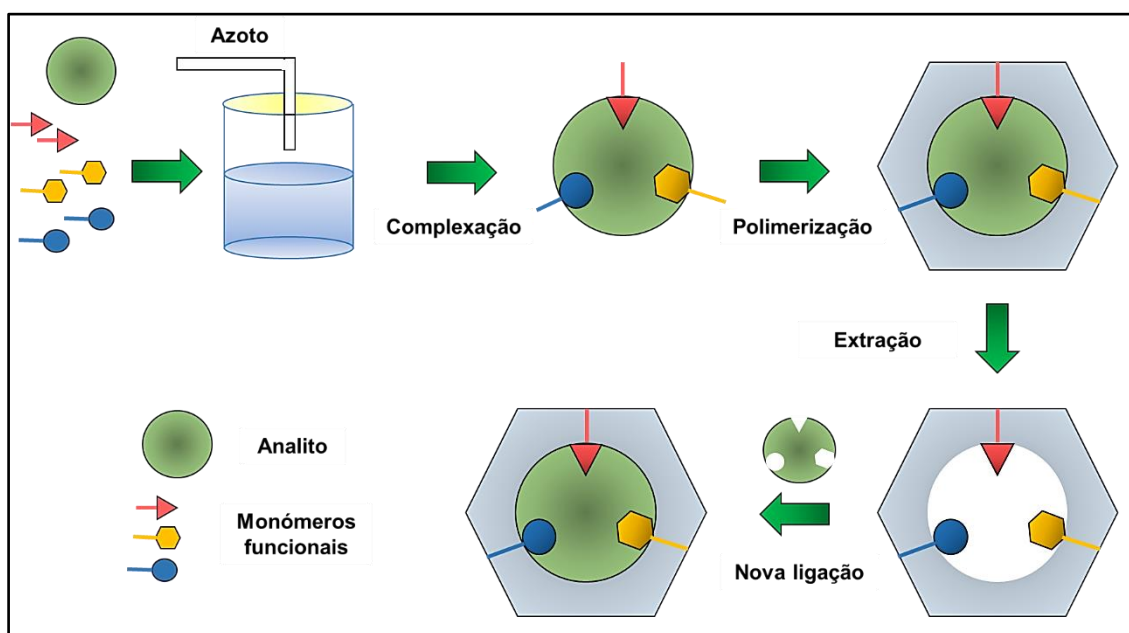


Figura 1.4 - Representação esquemática do processo de impressão molecular

A fase seguinte de preparação de materiais sensores consiste na polimerização desses monómeros na presença de um agente que promove ligações cruzadas designado por agente de reticulação, permitindo formar uma rede polimérica tridimensional, como

demonstra a Figura 1.4. Esta reação de polimerização é iniciada após a adição de um iniciador radicalar e a mistura de polimerização possui, geralmente, um solvente porogénico que induz a formação de poros no polímero (39).

Após o processo de polimerização, é necessário remover a molécula molde aprisionada na matriz polimérica, através da realização de extrações com solventes, que permitem quebrar as ligações entre a molécula molde e a matriz polimérica, dando origem a cavidades específicas. O solvente deve funcionar como um meio onde o analito e o monómero funcional sejam solúveis, não devendo afetar a matriz polimérica formada. O polímero resultante dispõe de microcavidades complementares ao molde em tamanho e forma e da presença de grupos funcionais capazes de reter seletivamente o analito presente numa amostra complexa (Figura 1.4). As cavidades constituem sítios específicos de ligação que agem no reconhecimento deste analito e/ou de compostos com estruturas semelhantes a ele (35, 36, 38).

A técnica de impressão molecular envolve a preparação em paralelo do MIP de um polímero não impresso, o NIP (do inglês *Non Imprinted Polymer*), ou seja, um polímero sintetizado sem a presença da molécula molde. A formação das cavidades complementares do MIP pela interação com a molécula molde pode ser verificada pela maior retenção desse no polímero impresso, comparado com o NIP, em determinadas condições de análise que devem ser otimizadas para cada composto. No NIP pode ocorrer a formação de sítios não seletivos, de forma aleatória, desprovidos de cavidades complementares ao volume e posição de grupos que podem interagir com a molécula molde, promovendo alguma retenção do mesmo (38, 39).

Apesar de o processo de produção ser relativamente simples, a escolha dos reagentes químicos, as concentrações e o procedimento a utilizar devem ser feitas criteriosamente, evitando que o polímero adquira características indesejáveis em termos de morfologia e uniformidade das partículas e respetivas cavidades seletivas (40, 41).

A tecnologia de impressão molecular tem sido alvo de vários estudos ao longo dos últimos anos levando a um desenvolvimento significativo da sua performance. Os MIPs apresentam uma boa estabilidade em condições físico-químicas agressivas, facilidade de preparação, afinidade e seletividade para um determinado analito, possibilidade de reutilização, sem que ocorra perda de performance do sensor, baixo custo relativo à

produção e robustez, o que os torna atrativos para uma variedade de aplicações em diversas áreas científicas (40, 42).

### 1.5.1. Síntese dos Polímeros

A seletividade dos MIPs depende fundamentalmente do processo de síntese e, conseqüentemente, das variáveis envolvidas: proporções molares entre a molécula molde e o monómero funcional, tipo e quantidade de solvente, quantidades do agente reticulante e do iniciador radicalar, tempo e processo de polimerização (43).

A preparação dos MIP é feita, convencionalmente, pelo método conhecido por polimerização em bulk, onde a reação é realizada em sistema homogéneo. A reação é conduzida num recipiente fechado contendo monómero funcional, molécula molde, solvente, reagente de ligação cruzada e o iniciador radicalar. A reação ocorre na ausência de oxigénio sob fluxo de azoto e induzida com aquecimento e/ou radiação UV (Figura 1.5). O oxigénio deve ser eliminado do meio reacional, pois retarda a reação de polimerização radicalar (39). No final, a matriz polimérica resultante é moída, peneirada e submetida a uma lavagem com solventes para extração completa da molécula molde. Esta técnica tem a vantagem de ser um processo tecnicamente muito simples, que produz grandes quantidades de material biomimético, muito estável e de baixo custo. Por outro lado, a polimerização em bulk, é bastante mais rápida quando comparada com a de superfície, pois durante a síntese do MIP, a molécula molde pode estar distribuída em torno da matriz polimérica, independentemente do tempo de polimerização (44).

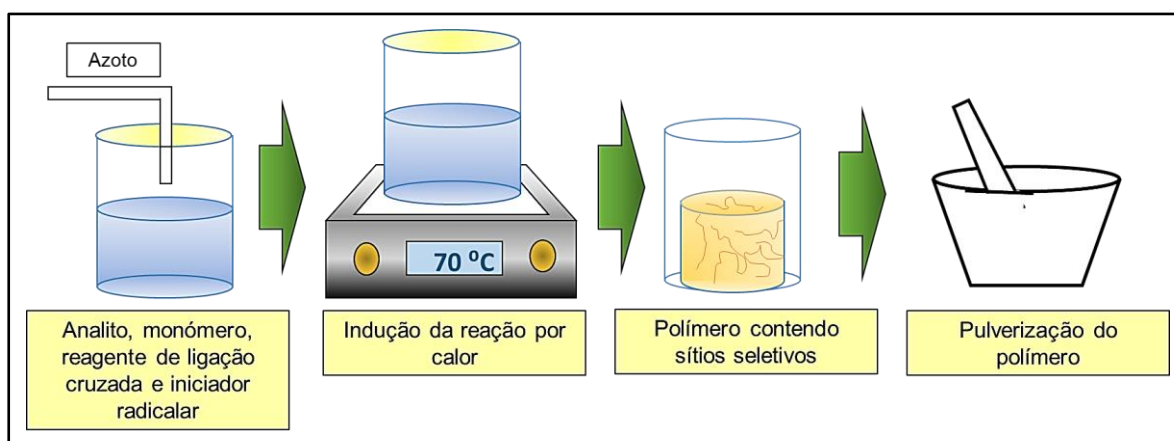


Figura 1.5 – Procedimento de preparação do MIP recorrendo ao método de polimerização em bulk

## 1.6. Biossensores

Os biossensores são dispositivos analíticos que combinam um componente biológico ou biologicamente derivado com capacidade de reconhecimento seletivo ao analito e um componente físico-químico, o transdutor, que pode converter a informação bioquímica num sinal de medida relacionado com a concentração ou grupo de analitos na amostra (44, 45).

O elemento de reconhecimento tem como objetivo principal estabelecer uma ligação seletiva e sensível ao composto alvo, de forma direta ou indireta, podendo ser de natureza biológica ou sintética (Figura 1.6). Os elementos mais utilizados para biomoléculas de interesse clínico são os anticorpos naturais. Uma alternativa a estes anticorpos naturais são os seus análogos sintéticos, baseados em materiais biomiméticos (46, 47).

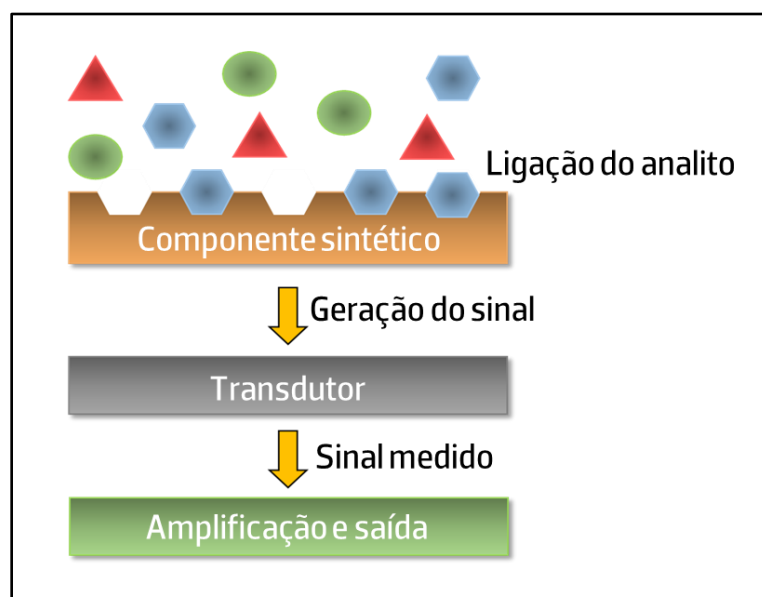


Figura 1.6 – Componentes de um biossensor

O sistema de transdução pode ser ótico, de massa ou eletroquímico. De acordo com a propriedade medida, os biossensores podem ser subdivididos em potenciométricos, amperimétricos, voltamétricos ou impedimétricos, conforme a entidade medida seja potencial, corrente, corrente versus potencial ou impedância (46).

Os métodos eletroquímicos são métodos instrumentais de análise que recorrerem a medidas de uma propriedade de natureza elétrica, como potencial (V, em volts) ou corrente (I, em amperes), para determinarem a concentração de um analito. Comparativamente a outros métodos instrumentais, as principais vantagens destes métodos são a seletividade e especificidade para um determinado elemento, a necessidade

de utilização de equipamento pouco dispendioso, a velocidade e reversibilidade de reações, grande sensibilidade com baixos limites de detecção e a sua não afetação pela cor ou turvação das amostras (46).

Uma das técnicas de natureza elétrica ainda por explorar é a detecção potenciométrica direta do 3HBA, com recurso a materiais biomiméticos capazes de incorporar o composto alvo numa membrana de PVC e de promover variações de potencial úteis do ponto de vista analítico. Esta técnica é, por isso, alvo de estudo no presente trabalho.

### 1.7. Potenciometria

A potenciometria é uma técnica eletroanalítica que estabelece relações entre a diferença de potencial de dois elétrodos mergulhados numa solução, em condições de corrente nula, e a atividade de espécies presentes na referida solução. Um dos elétrodos é denominado por elétrodo de referência e deve manter o seu potencial constante, o outro elétrodo é o indicador (ESI) e deve variar o seu potencial com a concentração do ião alvo, de modo previsível (Figura 1.7) (48, 49).

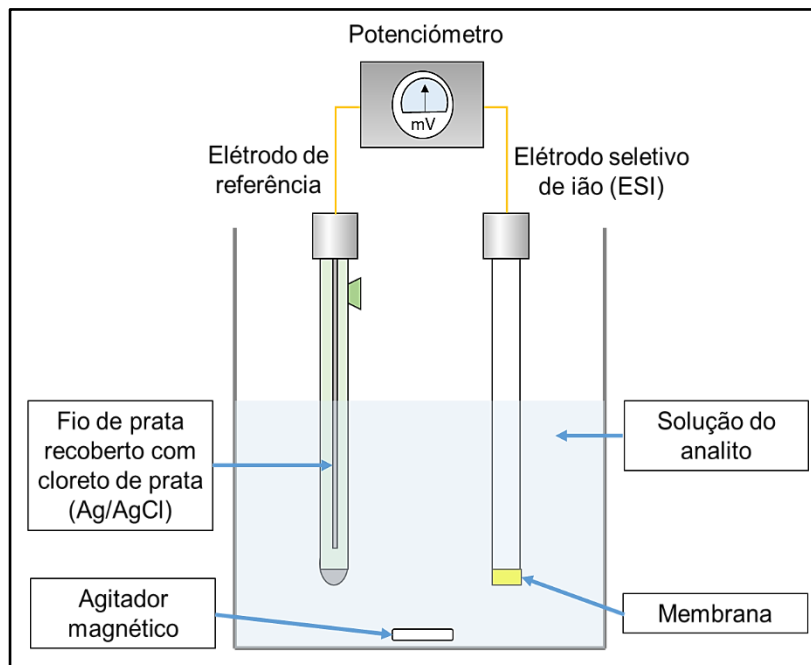


Figura 1.7 – Célula eletroquímica com análise da potenciometria com recurso a um ESI.

Os materiais MIP podem ser utilizados na preparação de sistemas sensores potenciométricos, com base na imobilização de um componente ionóforo numa matriz de natureza polimérica de PVC, plastificada com solvente mediador que devem conferir, no

essencial, propriedades de borracha ao material de suporte, conferindo-lhe, assim, um meio favorável à permuta iônica. O ionóforo é o material eletroquímico responsável pela permuta do ião principal entre a membrana e a solução aquosa a analisar e pode apresentar carga positiva, negativa ou ser neutro. O solvente mediador deve possuir baixa solubilidade em água, elevada viscosidade e estabilidade à luz, devendo ainda constituir um meio favorável à permuta do ião desejado. A associação dos MIP aos sensores potenciométricos pode traduzir-se numa vantagem analítica, esperando-se melhores características gerais de resposta, entre as quais seletividade, sensibilidade e limite de detecção (LD) (50, 51).

Considerando que esta associação não foi proposta até à data na literatura, não foi possível identificar as características físico-químicas do permutador com as características mais adequadas para a preparação destes dispositivos. O presente trabalho propõe o desenvolvimento de materiais MIP para a detecção de 3HBA e a sua incorporação em membranas seletivas de PVC. Para este efeito, propõe-se o recurso aos materiais convencionais de preparação de MIPs: monómero, 4-VP e agente reticulante, EGDMA. Estes materiais são posteriormente incorporados em membranas de PVC, que podem conter ou não um aditivo iônico lipofílico. Este aditivo é utilizado tendo em vista assegurar a seletividade iônica da membrana, no caso do próprio polímero obtido não apresentar carga no interior da membrana.

### **1.7.1. Eléctrodo de referência**

O eléctrodo de referência deve manter um valor de potencial constante e estável, uma vez que serve de comparação ao eléctrodo indicador. Além disso, o eléctrodo de referência ideal deve ser reversível; retomar o valor de potencial original após submetido a pequenas correntes; exibir baixa histerese, ou seja, baixa variação de potencial com as variações de temperatura, regressando ao valor inicial após o restabelecimento da temperatura inicial) e não deve polarizar, de modo a fornecer um valor de potencial que é independentemente da corrente que passe (51).

O eléctrodo de referência mais utilizado é composto por Ag/AgCl, face à sua simplicidade, potencial constante e baixo custo de produção. Este é constituído por um fio de prata com revestimento eletrolítico de uma fina camada de cloreto de prata, imerso numa solução de cloreto de potássio (KCl) saturado com cloreto de prata (AgCl) (52, 53).

### 1.7.2. Eléctrodo indicador

O potencial do eléctrodo indicador depende da atividade da espécie eletroativa. O eléctrodo indicador ideal promove uma grande variação na diferença de potencial, dentro dos valores teoricamente esperados para uma pequena variação de concentração do analito. Além disso, o eléctrodo indicador ideal deve apresentar elevada sensibilidade à espécie a ser determinada, elevado grau de reprodutibilidade e resposta rápida à variação de concentração da espécie em estudo (51).

Os eléctrodos indicadores mais comuns são os eléctrodos seletivos de ião (ESIs) (52, 53). Estes eléctrodos apresentam uma membrana seletiva que permite diferenciar seletivamente uma determinada espécie iónica. O potencial interno da membrana pode ser estabelecido através de um contacto sólido ou líquido. O contacto líquido implica a colocação da membrana entre dois compartimentos líquidos, a solução da amostra e a solução de referência interna, tipicamente uma solução do ião a medir, na qual se mergulha um fio de prata que serve de contacto eléctrico. O contacto sólido implica a deposição da membrana sobre um suporte sólido condutor, embora os eléctrodos seletivos de ião de contacto líquido permitam uma manipulação mais eficaz das características de funcionamento dos eléctrodos, como o LD, este tipo de eléctrodos são mais eficazes para medidas no local, uma vez que a manipulação dos eléctrodos não requer cuidados especiais (52).

### 1.7.3. Base teórica

De acordo com as recomendações da *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), a diferença de potencial da célula eletroquímica de um ESI é linearmente dependente do logaritmo da atividade do ião alvo na solução, de acordo com a equação de *Nernst-Nicolisk* (equação 1.1) (49), na qual  $\Delta E$  corresponde à força eletromotriz (f.e.m.) de uma célula eletroquímica, definida como sendo a diferença de potencial do ESI e do eléctrodo de referência;  $R$  é a constante universal dos gases ( $8.314 \text{ J}/(\text{K}\times\text{mol})$ );  $T$  é a temperatura em Kelvin;  $F$  é a constante de Faraday ( $9.6485\times 10^4 \text{ C}/\text{mol}$ );  $Z_A$  é a carga do ião principal,  $A$ ;  $a_A$  é a atividade do ião  $A$  expressa em mol/L ou mol/kg; "constante" corresponde ao valor de f.e.m. que inclui o potencial normal do ESI, do eléctrodo de referência e da junção líquida, expressa em mV.

$$\Delta E = \text{"constante"} + \frac{2,303RT}{Z_A F} \times \log a_A \quad (1.1)$$

A equação 1.1 tem por base a atividade, “a”, em vez da concentração, “c”, da espécie iônica a medir presente na solução. O cálculo de atividade implica, porém, a identificação de alguns parâmetros, tais como o “tamanho iônico” do íon específico da solução de ensaio, cujo valor é desconhecido para a maioria das espécies iônicas de caráter orgânico em solução aquosa. Considerando que a substituição de “a” por “c” é possível em condições de força iônica ajustada, as medidas potenciométricas são realizadas num valor de força iônica (I) fixado a um valor elevado e constante, (equação 1.2).

$$I = \frac{1}{2} \sum i c_i Z_i^2 \quad (1.2)$$

De uma forma simples, a força iônica corresponde à intensidade do campo elétrico na presença dos íons em solução, considerando  $c_i$  como concentração do íon, expressa em mol/L; e  $z_i$ : carga desse íon (51).

#### 1.7.4. Curva de Calibração

A curva de calibração corresponde ao traçado gráfico do logaritmo  $c$  da concentração de um íon alvo em função da f.e.m. da célula eletroquímica. A partir da análise da curva de calibração, é possível obter informações tais como o LD, o limite inferior de resposta linear (LIRL) e o declive (Figura 1.8) (51).

O LIRL, o LD e o declive são os três parâmetros mais relevantes de uma curva de calibração. O valor de interseção entre os segmentos que prolongam o comportamento linear e o não linear corresponde ao valor de LD, ao passo que o LIRL é determinado pelo

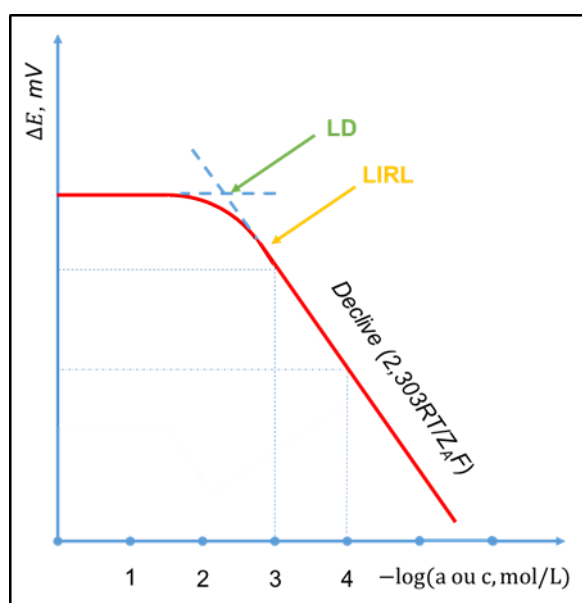


Figura 1.8 – Características gerais da curva de calibração

valor de concentração mínimo a partir do qual a resposta potenciométrica típica pode ser considerada um comportamento linear (Figura 1.8). O valor teórico de declive experimental sob condições normais de pressão e temperatura deverá ser igual a  $59.16/z_A$  mV/década (51, 53).

### 1.7.5. Tempo de resposta

O tempo de resposta é outra propriedade utilizada para avaliar o desempenho de ESIs. Segundo as recomendações da IUPAC, o tempo de resposta de uma célula potenciométrica é o período de tempo durante o qual o eletrodo de referência e o ESI estão em contacto com uma amostra de solução com o ião alvo, ou em que a ou c do ião em solução é alterada, e o primeiro instante no qual o declive  $\Delta E/\Delta t$  é igual ao valor limite selecionado ( $\Delta t$ ), de acordo com a Figura 1.9 (51).

A escolha do valor limite advém de questões de ordem experimental ou da exatidão desejada para a leitura potenciométrica. O tempo de resposta dos ESIs depende, geralmente, da concentração absoluta presente na solução, bem como da variação de c do ião ( $C_{\text{inicial}}-C_{\text{final}}$ ) incorporada no sistema (51, 53).

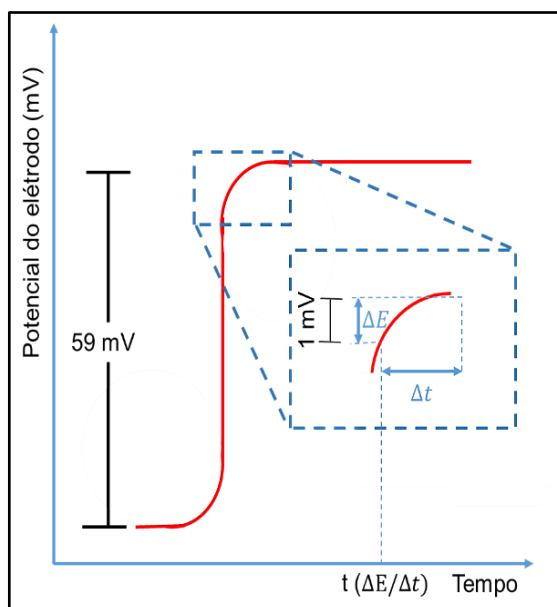


Figura 1.9 – Representação gráfica do tempo de resposta,  $t(\Delta E/\Delta t)$

### 1.7.6. Drift

O drift corresponde a uma mudança lenta e não aleatória da diferença de potencial da célula ESI ao longo do tempo, numa solução com temperatura e composição constante.

A determinação do drift é efetuada através de uma curva linear com encaixe no conjunto de dados recolhidos durante um determinado período de tempo numa solução. O declive da linha do potencial versus tempo é denominado drift. Os desvios aleatórios de potencial em torno da linha definem o desvio padrão dos dados medidos (51, 53).

#### **1.7.7. Efeito do pH**

De uma forma geral, os ESI têm a capacidade de detetar um ião seletivamente, mas outros iões que coexistam na amostra podem ter a capacidade de alterar a resposta potenciométrica, atuando como interferentes. É de extrema importância utilizar soluções padrão de ajuste de pH, optando por ter sempre um mesmo valor de pH com o intuito de minimizar as interferências na resposta potenciométrica, através do controlo da atividade dos iões  $H^+$  e  $HO^-$  e da força iónica. A gama de valores de pH a escolher para a calibração pode ser determinada por curvas de calibração efetuadas em diferentes valores de pH, ou pelo traçado de diagramas de Reilley, onde o valor de potencial é monitorizado continuamente face à variação de pH da solução (51).

## 2. Métodos

O trabalho proposto consiste no desenvolvimento de uma metodologia rápida e de baixo custo para a detecção de 3HBA, através da síntese de material sensor e a sua utilização na construção de um biossensor. Ao longo deste capítulo são abordadas as metodologias envolvidas na síntese do material sensor, construção do biossensor e avaliação do desempenho analítico dos dispositivos obtidos.

### 2.1. Material e equipamentos

As soluções de concentração rigorosa foram preparadas em balões volumétricos de classe A, com 5,00, 10,00, 50,00, 100 e 250,00 mL de capacidade total. Na medição de volumes foram utilizadas pipetas graduadas, classe A, para volumes rigorosos, com capacidade de 2,00 mL e pipetas automáticas de volume regulável da VWR para volumes inferiores, de 2–20  $\mu\text{L}$ , 100–1000  $\mu\text{L}$ , 1000–5000  $\mu\text{L}$  e SOCOREX, entre 20–200  $\mu\text{L}$ . As pesagens dos reagentes foram efetuadas na balança RADWAG XA 110/X, com uma precisão de  $\pm 0,0001$  g.

A secagem de materiais foi realizada em exsiccador com atmosfera de azoto. A homogeneização de soluções/suspensões foi realizada em placa de agitação Reypa.

A célula potenciométrica foi constituída pelo eléctrodo indicador e pelo eléctrodo de referência Ag/AgCl da Metrohm (Figura 2.1). O eléctrodo indicador usado foi o ESI seletivo a 3HBA, constituído por um corpo plástico de uma seringa de 1 mL, que foi empacotado com uma pasta condutora de grafite (mistura condutora de grafite e resina epoxídica) e sobre a qual foi, posteriormente depositada a membrana seletiva (Figura 2.1). A diferença de

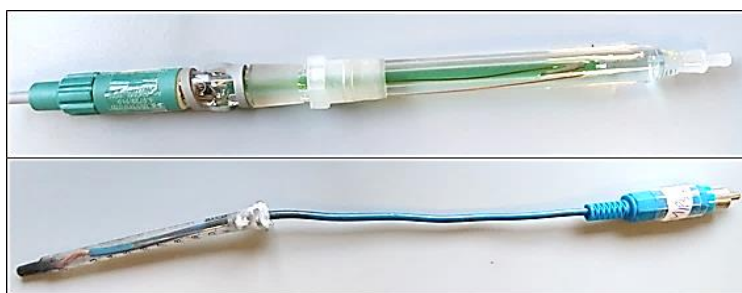


Figura 2.1 – Eléctrodo de referência Ag/AgCl (superior) e eléctrodo indicador ESI (inferior)

potencial entre os dois eléctrodos foi medida à temperatura ambiente num potenciómetro Crison GLP21 (sensibilidade  $\pm 0,1$  mV), que incluía um agitador magnético acoplado. O sinal

de saída do potenciômetro foi ligado a um ponto de comutação com seis saídas, permitindo assim uma leitura simultânea de seis ESI (Figura 2.2).

A caracterização dos materiais sensores e da molécula 3HBA foi realizada através de espectroscopia de infravermelhos com transformada de Fourier (FTIR do inglês, Fourier transform infrared spectroscopy) da Thermo Scientific, Nicolet iS10. Este equipamento continha acoplado um acessório de refletância total atenuada (ATR) para suporte e leitura direta das amostras, sem necessidade de qualquer tratamento prévio das mesmas.

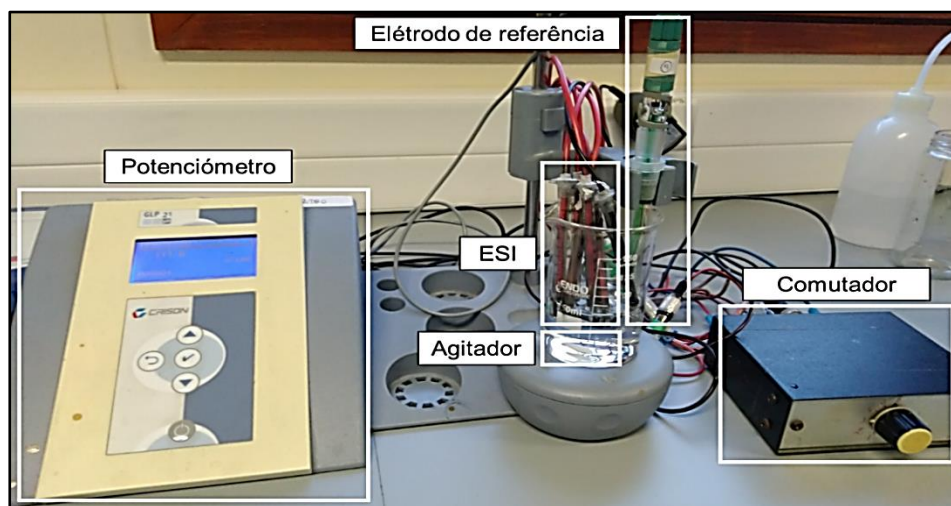


Figura 2.2 – Sistema de leitura múltipla e sequencial de vários ESIs e agitador magnético

## 2.2. Reagentes

Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico e a água utilizada para a preparação das soluções aquosas foi de qualidade ultra-pura, com uma condutividade igual ou inferior a  $0,1 \mu\text{S}/\text{cm}$  a  $25^\circ\text{C}$ . As soluções aquosas foram preparadas por pesagens rigorosas dos sólidos correspondentes, bem como por medições rigorosas de líquidos, e posterior diluição em tampão.

O ácido 3-hidroxibutírico (3HBA), o 4-tert-octilfenol (TOP) foram produzidos pela Sigma-Aldrich; o 2-nitrofenil octil éter (oNPOE) e policloreto de vinilo (PVC) foram comercializados pela Fluka; o tetrahidrofurano (THF) e acetonitrilo (ACN) foram comercializados pela VWR; o dimetacrilato etilenoglicol (EGDMA) e 4-vinilpiridina (4-VP) foram fornecidos pela TCI; o peróxido de benzoílo (BPO) foi produzido pela Himedia e, finalmente, o ácido 4-(2-hidroxietil)1-piperazinaetanosulfónico (HEPES) foi comercializado pela AppliChem.

### 2.3. Construção dos elétrodos

A fase inicial da construção dos suportes condutores passou pela preparação da estrutura de suporte à membrana sensora. A construção de cada suporte passou pela utilização de uma seringa, na qual foi colocado um fio elétrico condutor, fixado à extremidade superior do corpo do eletrodo através da aplicação de uma mistura 10:4 (g/g) araldite/endurecedor juntamente com grafite em pó (Figura 2.3). Na extremidade livre do fio elétrico condutor foi adaptado um terminal através do qual foi possível estabelecer o contacto elétrico com o decimilivoltímetro. As soluções de membranas foram depositadas, gota-a-gota, sob a superfície condutora de grafite dos elétrodos.

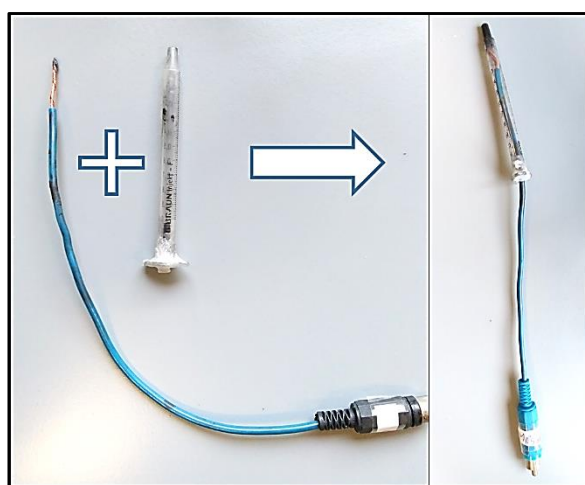


Figura 2.3 – Constituição dos corpos ESI para suporte à membrana seletiva

### 2.4. Preparação do sensor

A preparação de materiais impressos (MIP) foi realizada em bulk, tendo-se preparado em paralelo, materiais de controlo não impressos (NIP), recorrendo ao mesmo procedimento, mas na ausência de 3HBA. Foram preparados dois polímeros, utilizando as mesmas moléculas para construção, mas variando as concentrações (Tabela 2.1).

Para a preparação dos MIPs, uma mistura de molécula molde, 3HBA com o monómero funcional, 4-VP dissolvida em 2mL de uma solução de acetonitrilo e água (7:3), foi colocada previamente em agitação. Em seguida adicionou-se o agente de ligação cruzada, EGDMA à restante solução e permaneceu em agitação durante 20 minutos. Após este período, adicionou-se o iniciador BPO, acrescentando 1 mL de solução ACN:H<sub>2</sub>O que atuou como solvente porogénico, perfazendo, no total, 3mL de solução. Esta mistura ficou

em agitação durante 15 minutos, para dissolução completa e desarejada, em atmosfera de azoto, durante 5 minutos.

Tabela 2.1 – Constituição dos materiais sensores

Constituição dos polímeros	Materiais sensores			
	Polímero 1		Polímero 2	
	NIP1	MIP1	NIP2	MIP2
Molécula molde, 3HBA (mmol)	-----	0,5	-----	1,5
Monómero funcional, 4-VP (mmol)	3,0	3,0	1,5	1,5
Agente reticulante, EGDMA (mmol)	15,0	15,0	4,5	4,5
Iniciador, BPO (mmol)	0,32	0,32	0,16	0,16

Posteriormente, esta mistura foi colocada num banho-maria, previamente aquecido até aos 70°C, de modo a permitir a formação do polímero. Para este efeito, foram necessários cerca de 10 minutos para a sua total formação. O polímero sem impressão molecular (NIP) foi preparado de forma análoga, mas com a exclusão da molécula molde do procedimento descrito.

Os polímeros obtidos foram posteriormente triturados e lavados com acetonitrilo/ácido acético (5:1 v/v), até extração completa da molécula molde (Figura 2.4). A validação da lavagem do material foi realizada por análise comparativa dos espectros de FTIR da superfície de cada polímero após o procedimento de extração. Todos os polímeros foram secos à temperatura ambiente, num exsiccador com atmosfera de azoto.

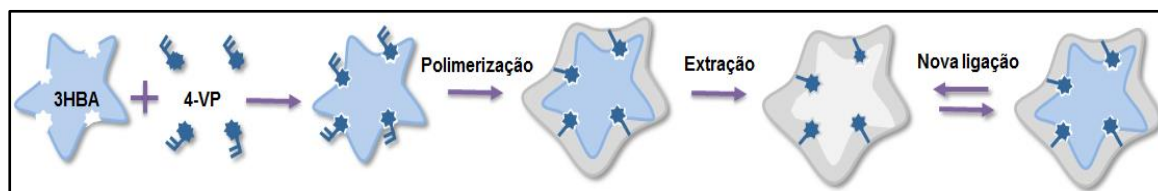


Figura 2.4 – Esquema exemplificativo da síntese de polímeros de impressão molecular

## 2.5. Caracterização dos materiais sensores

A análise de superfície dos materiais sensores mencionados neste trabalho e a molécula molde (3HBA) foram sujeitos a análise de FTIR, a partir da qual foram traçados os

respetivos espectros. A análise dos materiais sensores foi realizada colocando o material sólido diretamente sobre o cristal de diamante central do acessório de refletância total atenuada (ATR). Todos os espectros foram recolhidos em condições de controlo de temperatura/humidade, e expressaram a média da aquisição consecutiva de 250 espectros, resolução de 8 cm<sup>-1</sup>, com correção atmosférica. O intervalo de números de onda (eixo x) variou entre 500 e 4000 cm<sup>-1</sup> e o sinal obtido (eixo Y) foi representado em % de transmitância.

## 2.6. Preparação das membranas seletivas

Neste trabalho experimental foram preparadas 10 membranas seletivas, de constituição indicadas na Tabela 2.2. Cada membrana continha material sensor, MIP ou NIP, solvente mediador plastificante (oNPOE) e PVC. Em algumas membranas foi adicionado aditivo catiónico lipofílico, TOP. Para efeito de controlo, foi ainda preparada uma membrana sem material sensor designada por ESI 10 e uma membrana sem material sensor e com aditivo catiónico TOP, designada por ESI 9. A dissolução/suspensão dos materiais referidos foi realizada em 2 mL de solvente THF acompanhada de agitação magnética.

Tabela 2.2 – Composição das membranas seletivas

Constituintes	Polímero 1				Polímero 2				Controlos	
	ESI1	ESI2	ESI3	ESI4	ESI5	ESI6	ESI7	ESI8	ESI9	ESI10
MIP, mg	-----	2,43	-----	2,57	-----	2,36	-----	2,53	-----	-----
		5,33%		5,15%		5,02%		5,01%		
NIP, mg	2,40	-----	2,56	-----	2,31	-----	2,55	-----	-----	-----
	5,06%		5,07%		4,98%		5,02%			
TOP, mg	-----	-----	4,05	3,94	-----	-----	3,96	3,88	3,75	-----
			8,03%	7,90%			7,79%	7,68%	7,72%	
oNPOE, mg	30,80	29,08	29,70	29,24	30,10	30,45	30,20	29,95	29,30	29,14
	64,92%	63,73%	58,86%	58,63%	64,94%	64,74%	59,45%	59,27%	60,34%	67,03%
PVC, mg	14,24	14,12	14,15	14,12	13,94	14,22	14,09	14,17	15,51	14,33
	30,02%	30,94%	28,04%	28,32%	30,08%	30,24%	27,74%	28,04%	31,94%	32,97%

As membranas preparadas foram posteriormente aplicadas nos suportes condutores baseados em grafite para obtenção dos elétrodos seletivos (Figura 2.5). Cada uma das aplicações foi efetuada após secagem do volume aplicado anteriormente. Todos os elétrodos foram preparados em duplicado. O aspeto final das membranas após secagem

de 24 horas, assume um formato côncavo. Uma vez secas, as membranas foram acondicionadas numa solução de  $7,93 \times 10^{-7}$  mol/L de 3HBA, por um período de 24 horas.

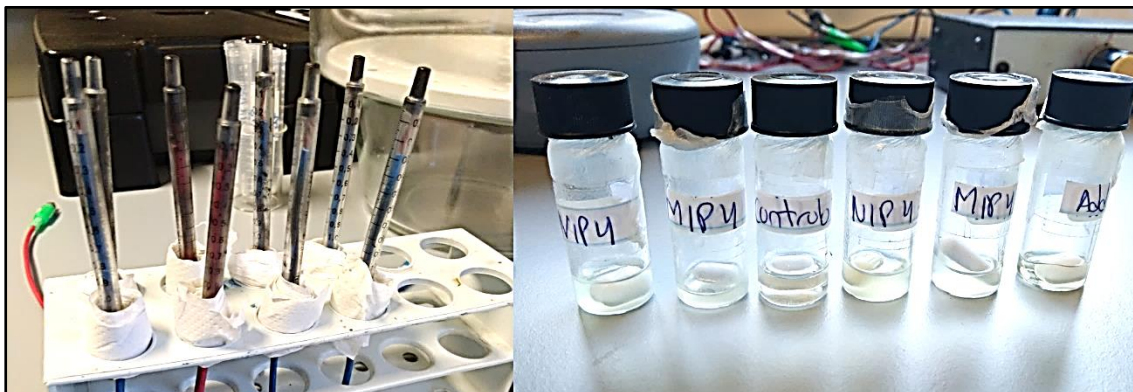


Figura 2.5 - Aplicação das soluções de membranas seletivas (direita) nos suportes condutores (esquerda)

## 2.7. Avaliação comparativa do desempenho dos eletrodos

A avaliação comparativa do desempenho dos eletrodos com as diferentes membranas foi efetuada através das curvas de calibração obtidas pela diferença de potencial gerada entre o eletrodo de referência e o eletrodo seletivo em meio tampão HEPES de concentração  $1 \times 10^{-3}$  mol/L (pH 5,40), ou mais precisamente da força eletromotriz da célula, f.e.m. Toda a medição da potenciometria foi realizada à temperatura ambiente e em agitação controlada e constante, até à estabilização do sistema. O valor da força eletromotriz de cada um dos eletrodos variou entre 0,2-0,3mV, num valor constante de pH, demonstrando assim ser estável.

As concentrações crescentes das soluções em análise começaram com uma quantidade inicial de 20mL de solução tampão HEPES  $1 \times 10^{-3}$  mol/L, com adição de diferentes quantidades de solução padrão ao longo da calibração. O objetivo deste estudo visou encontrar a gama de concentração detetável pelo sensor de forma a obter uma resposta linear que fosse coincidente com o valor de referência encontrada na gama fisiológica da molécula alvo.

Foram realizadas várias calibrações para as mesmas condições em todos os ensaios e as suas curvas de calibração foram tratadas no programa Microsoft Excel Office 2016. Também foram avaliados os parâmetros LIRL, LD e declive para cada um dos ensaios. De acordo com estes parâmetros foi possível determinar a reprodutibilidade através da média e do desvio padrão relativo (%) das três curvas de calibração com melhor resultado. Entre cada um dos ensaios, os eletrodos seletivos foram acondicionados em água ultrapura

### **3. Resultados e discussão**

Neste capítulo é abordada a análise da composição dos polímeros, a interação entre os materiais biomiméticos e a molécula 3HBA durante a preparação do sensor e a avaliação do seu desempenho, quando comparado com elétrodos compostos por diferentes membranas.

#### **3.1. Material biomimético**

Para se obter um material biomimético para a molécula 3HBA usando a técnica de impressão molecular, optou-se pela polimerização em bulk, uma vez que a molécula a ser impressa era de pequena dimensão e não havia restrições relativas à sua disponibilidade. O monómero escolhido para sintetizar o material biomimético foi o 4-VP por ser um monómero frequentemente utilizado na preparação de MIPs e pelo facto de os monómeros com características básicas interagirem preferencialmente com moléculas molde ácidas (38, 54). O agente reticulante selecionado foi o EGDMA, este componente tem sido usado na preparação de material sensor, pois promove a formação de polímeros térmica e mecanicamente estáveis e com rápida transferência de massa (55). A combinação destes dois compostos permitiu obter um complexo estável e compatível com a molécula molde (3HBA). Aquando da adição de 3HBA e do iniciador BPO, formou-se um polímero com boas propriedades condutoras.

É importante referir que ainda não existem, na literatura, trabalhos publicados sobre a deteção potenciométrica de 3HBA, com recurso a materiais biomiméticos. A obtenção deste material foi, portanto, uma experiência e que possibilitou a monitorização da molécula 3HBA através da deteção potenciométrica.

#### **3.2. Membranas seletivas**

A preparação das membranas seletivas foi efetuada com base na imobilização de um componente ionóforo, que é o material sensor sintetizado numa matriz polimérica de PVC, plastificada com o solvente mediador oNFOE. A preparação de uma membrana seletiva tipo NIP, de composição análoga à membrana MIP e de membranas controlo sem composto ionóforo, permitiram, por comparação direta, aferir a contribuição e relevância do processo de impressão molecular na resposta potenciométrica do eléctrodo.

Considerando que as membranas seletivas podem ainda requerer um aditivo iônico lipofílico, quando constituídas por materiais poliméricos neutros, para se obter alguma resposta potenciométrica, e que a molécula 3HBA se encontra carregada negativamente a pH fisiológico, avaliou-se também o efeito de membranas com adição de um aditivo lipofílico catiónico, o TOP. De uma forma geral, a adição deste composto iônico de natureza lipofílica permitirá diminuir a interferência de espécies de carga contrária e diminuir a resistência elétrica das membranas, resultando assim num aumento da afinidade da molécula 3HBA para o seu local de ligação na matriz polimérica. Tendo em vista a assegurar que a resposta potenciométrica das membranas que continham TOP não dependia apenas deste componente, foi ainda preparada em paralelo uma membrana controlo, composta apenas pelo aditivo catiónico TOP.

### 3.3. Análise da superfície dos materiais sensores

Os espectros FTIR dos materiais sólidos foram traçados tendo em vista estabelecer algumas considerações sobre as diferenças na composição química dos materiais poliméricos, com e sem a presença da molécula na matriz sólida.

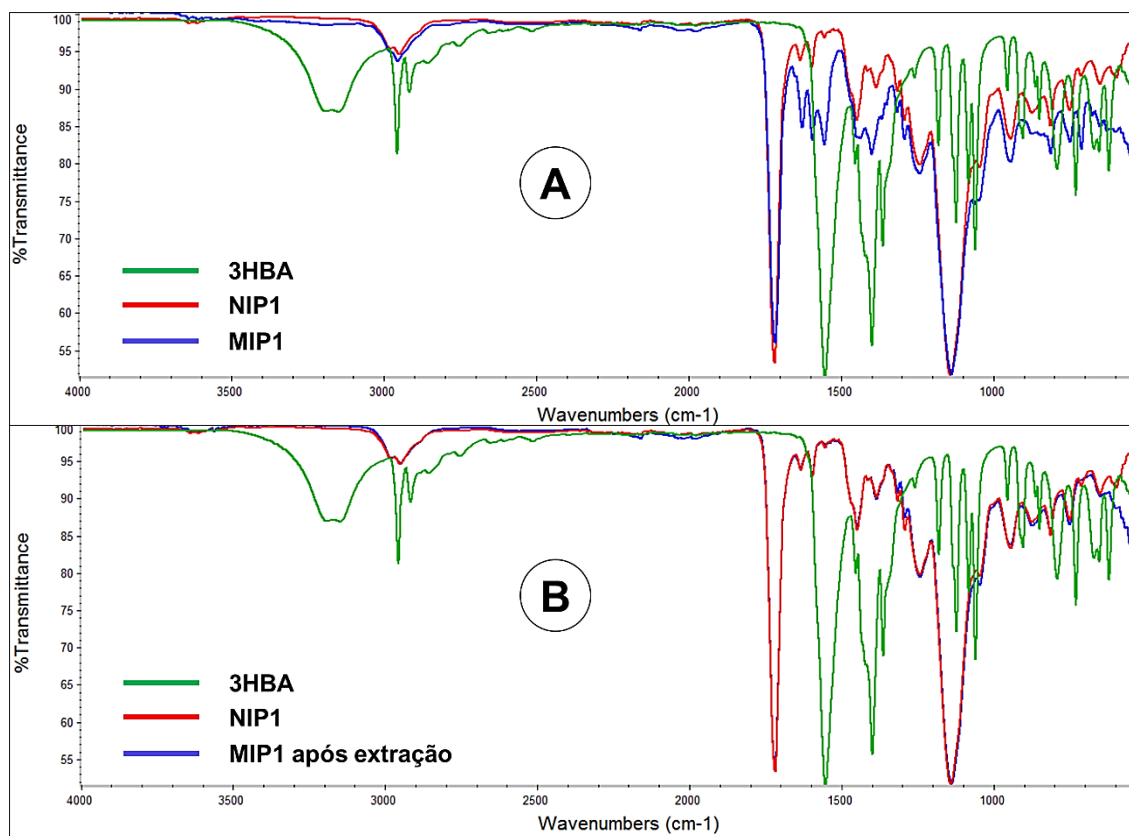


Figura 3.1 – Espectros de FTIR dos materiais sensores: (A) NIP1 e MIP1, (B) NIP1 e MIP1 após extração e molécula 3HBA

Foram traçados espectros de FTIR para os materiais sensores MIP 1 e 2, NIP 1 e 2, 3HBA e MIP 1 e 2 após remoção da molécula. Na Figura 3.1A encontram-se representados os espectros dos materiais sensores (MIP1 e NIP1) preparados com o monómero funcional 4-VP. Na Figura 3.1B está representado o espectro do material sensor MIP1 após remoção da molécula molde 3HBA. De forma análoga, na Figura 3.2A encontram-se representados os materiais sensores, NIP2 e MIP2, que têm a mesma composição que o material sensor descrito anteriormente, mas com diferentes rácios de molécula, monómero e agente reticulante. A constituição dos materiais sensores está representada na Tabela 2.1. De uma forma geral, no material sensor MIP1 a quantidade de monómero funcional utilizado foi seis vezes superior à quantidade de molécula molde, relativamente ao agente reticulante, a proporção utilizada foi cinco vezes superior ao monómero funcional. No material sensor MIP2, foi utilizada a mesma proporção entre a molécula molde e o monómero funcional e uma quantidade de agente reticulante três vezes superior. Para finalizar, a Figura 3.2B representa o espectro do material sensor MIP2 após remoção da molécula molde 3HBA.

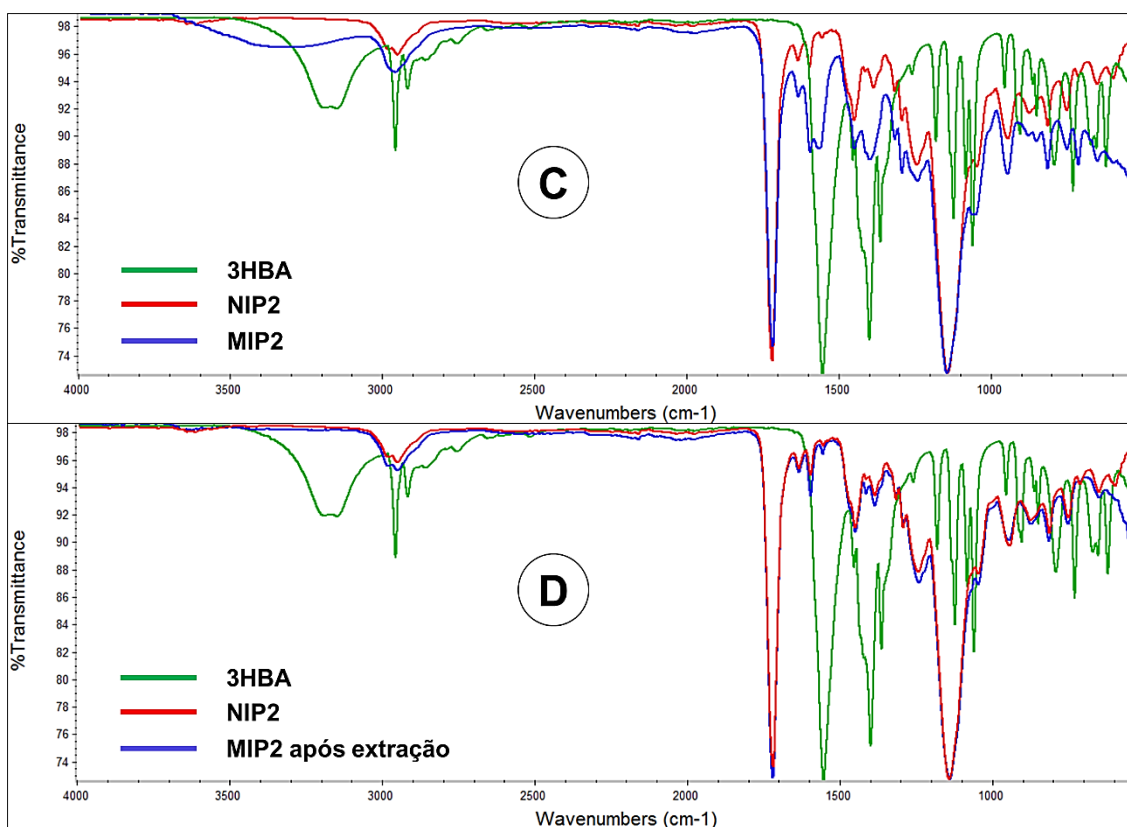


Figura 3.2 - Espectros de FTIR dos materiais sensores: (A) NIP2 e MIP2, (B) NIP2 e MIP2 após extração e molécula 3HBA

De uma forma geral, a presença da molécula 3HBA foi detetada pela existência de absorção de radiação na região entre os 3208 e 3146 cm<sup>-1</sup>, resultante do estiramento O-H

presente no 3HBA. De acordo com os materiais sensores MIPs, a presença da molécula 3HBA encontra-se mais visível no material sensor MIP2 (Figura 3.2C), que possui uma proporção de molécula:monómero de 1:1. A presença da molécula molde causou ainda uma alteração visível a  $1556\text{ cm}^{-1}$  que poderá corresponder ao estiramento C=O do grupo carboxílico e a  $1400\text{ cm}^{-1}$  que poderá corresponder à deformação no plano C-O-H (56). Era espectável que não existissem variações acentuadas entre os espectros traçados, uma vez que na construção dos polímeros foi usada a mesma molécula molde, monómero funcional, agente reticulante e iniciador, variando apenas as concentrações utilizadas. O MIP2 apresenta os três picos referidos anteriormente e o MIP1 apresenta um pico a  $1556\text{ cm}^{-1}$  e  $1400\text{ cm}^{-1}$ . Os espectros apresentam, de igual forma, dois picos a  $1435$  e  $1473\text{ cm}^{-1}$  que podem ser atribuídos ao estiramento C-C do anel aromático da piridina e dois picos de  $1500$  a  $1600\text{ cm}^{-1}$  que podem ser associados às vibrações de estiramento C=N do grupo piridina, estes espectros são comuns aos NIPs e MIPs (57).

Após o processo de três extrações com uma solução de acetonitrilo/ácido acético (5:1 v/v), verificou-se que a solução utilizada no processo de extração foi capaz de remover a molécula 3HBA da matriz polimérica, uma vez que os espectros do material sensor MIP1 e MIP2 após as três extrações, ficam sobrepostos de forma quase perfeita com o material sensor de controlo NIP1 e NIP2, que não possui a molécula molde 3HBA na sua construção.

### **3.4. Desempenho dos sensores potenciométricos**

Tendo em conta que o 3HBA é um ácido carboxílico com pKa 4,41, cujo grau de ionização depende do pH da solução, e que as espécies detetadas pelos elétrodos seletivos são iões, os ensaios foram todos efetuados com uma solução tampão com pH superior ao pKa do analito alvo, ou seja com tampão HEPES, a pH 5,40. As avaliações dos ensaios realizados para a determinação das suas principais propriedades analíticas decorreram de acordo com as recomendações da IUPAC (49).

A preparação de diferentes membranas permitiu identificar a composição que origina o melhor desempenho potenciométrico dos ESIs. As curvas de calibração típicas obtidas em solução HEPES,  $1 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ , com pH igual a 5,40 foram traçadas para concentrações de 3HBA entre  $4,80 \times 10^{-6}$  e  $2,96 \times 10^{-3}\text{ mol/L}$ , originando sempre declives aniónicos (associados à presença de 3HBA carregado negativamente). Os resultados gerais das curvas de calibração dos ESIs avaliados estão detalhados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Características potenciométricas dos ESIs avaliados em solução tampão HEPES  $1 \times 10^{-3}$  mol/L, pH 5,40

Características	Polímero 1				Polímero 2				Controlos	
	ESI1	ESI2	ESI3	ESI4	ESI5	ESI6	ESI7	ESI8	ESI9	ESI10
	NIP1	MIP1	NIP1 TOP	MIP1 TOP	NIP2	MIP2	NIP2 TOP	MIP2 TOP	TOP	-----
Declive (mV/década)	$-4,84 \pm 3,6$	$-9,31 \pm 0,8$	$-10,16 \pm 0,9$	$-16,40 \pm 0,7$	$-10,69 \pm 2,0$	$-20,48 \pm 4,3$	$-20,61 \pm 6,7$	$-34,73 \pm 4,5$	$-7,66 \pm 2,3$	$-4,75 \pm 2,8$
$r^2$ (n=3)	0,997	0,997	0,995	0,995	0,997	0,997	0,997	0,998	0,994	0,995
LD (mol/L)	$4,80 \times 10^{-6}$	$4,80 \times 10^{-6}$	$4,80 \times 10^{-6}$	$4,80 \times 10^{-6}$	$4,80 \times 10^{-6}$	$4,80 \times 10^{-6}$	$4,80 \times 10^{-6}$	$4,80 \times 10^{-6}$	$4,80 \times 10^{-6}$	$4,80 \times 10^{-6}$
LIRL (mol/L)	$1,92 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-5}$	$9,60 \times 10^{-6}$	$1,92 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-5}$	$1,92 \times 10^{-5}$

### 3.4.1. Efeito da razão Monómero/Analito

A Figura 3.3, representa os dados analíticos médios das calibrações dos ESIs utilizando material sensor NIP1, MIP1, NIP2 e MIP2 em solução tampão HEPES  $1 \times 10^{-3}$  mol/L a pH 5,40. De uma forma geral, verificou-se que o ESI 1 e o ESI 5 foram incapazes de promover variações de potencial significativas quando comparados com os seus análogos ESI 2 e ESI 6 respetivamente. O declive médio registado do elétrodo com material sensor

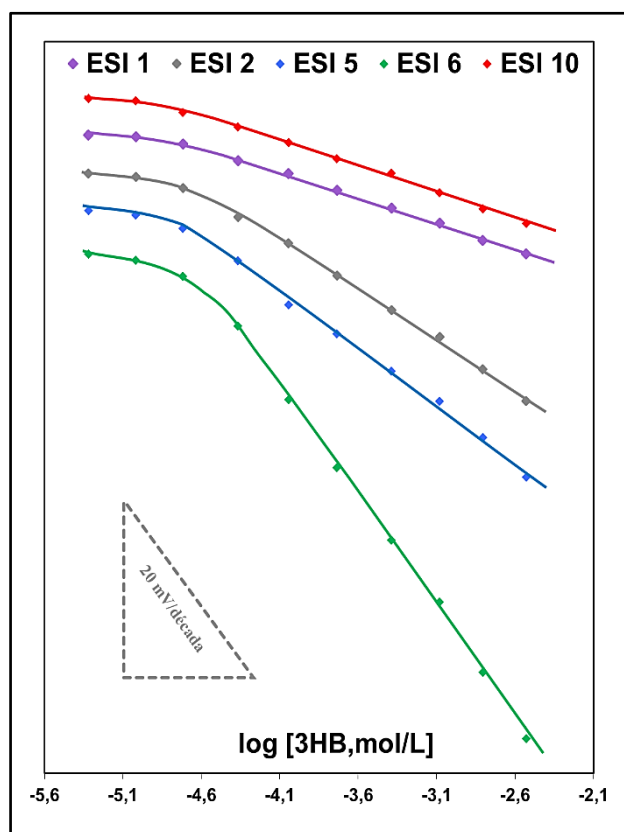


Figura 3.3 – Curvas de calibração do material sensor NIP 1 e 2 e MIP 1 e 2.

MIP1 (ESI 2) foi  $-9,31$  mV/década, associado a um desvio-padrão relativo de 2,8%. Por outro lado, o declive médio do eletrodo com material sensor MIP2 (ESI 6) foi  $-20,48$  mV/década, associado a um desvio-padrão relativo de 2,7%. A utilização do material sensor MIP2 como ionóforo promoveu um aumento significativo de sensibilidade, considerando que este material sensor contém na sua formulação uma proporção de molécula molde igual ao monómero funcional. O MIP1 apresenta uma composição com um rácio 4-VP:3HBA de 6:1 e 4-VP:EGDMA de 5:1, enquanto que o MIP2 apresenta uma proporção 4-VP:3HBA de 1:1 e 4-VP:EGDMA de 3:1.

O ESI 10 foi utilizado como eletrodo de controlo e demonstrou o declive mais baixo de todos os ESIs, ou seja,  $-4,75$  mV/década e um desvio-padrão relativo de 2%. Na preparação da membrana seletiva deste eletrodo, não foi adicionado ionóforo ou aditivo catiónico TOP. De realçar que os valores de correlação quadráticos ( $r^2$ ) são superiores a 0,99 em todos os eletrodos.

#### **3.4.2. Efeito do Aditivo TOP**

A Figura 3.4, representa os dados analíticos médios das calibrações dos ESIs utilizando o material sensor NIP1, MIP1, NIP2, MIP2 e aditivo lipofílico catiónico TOP em solução tampão HEPES  $1 \times 10^{-3}$  mol/L a pH 5,40.

A utilização do material sensor MIP1 como ionóforo não promoveu uma variação de sinal útil do ponto de vista prático, com um valor médio de declive igual a  $-9,31$  mV/década (ESI 2). Contudo verifica-se uma melhoria com o seu análogo que contém aditivo lipofílico catiónico (ESI 4), através de um aumento no declive de  $-16,40$  mV/década e um desvio-padrão relativo de 0,6%, atestando assim o efeito benéfico da presença do aditivo catiónico neste eletrodo. De forma semelhante, o material NIP apresentou um declive médio de  $-4,84$  mV/década (ESI 1) na ausência de aditivo, tendo aumentado para  $-10,16$  mV/década (ESI 3) com a inclusão do aditivo TOP na membrana seletiva. Com a modificação realizada no material sensor MIP2, um aumento do valor médio de declive para  $-20,48$  mV/década (ESI 6) foi observado, verificando-se igualmente uma melhoria no seu análogo com aditivo TOP (ESI 8), que evidenciou um declive igual a  $-34,73$  mV/década, associado a um desvio-padrão relativo de 3,4%. Relativamente ao ESI 5, material sensor controlo ao MIP2, um declive médio de  $-10,69$  mV/década foi obtido, sendo este inferior ao ESI 6 que contém o molde da molécula 3HBA. Após a adição do aditivo lipofílico catiónico (ESI 7), um aumento

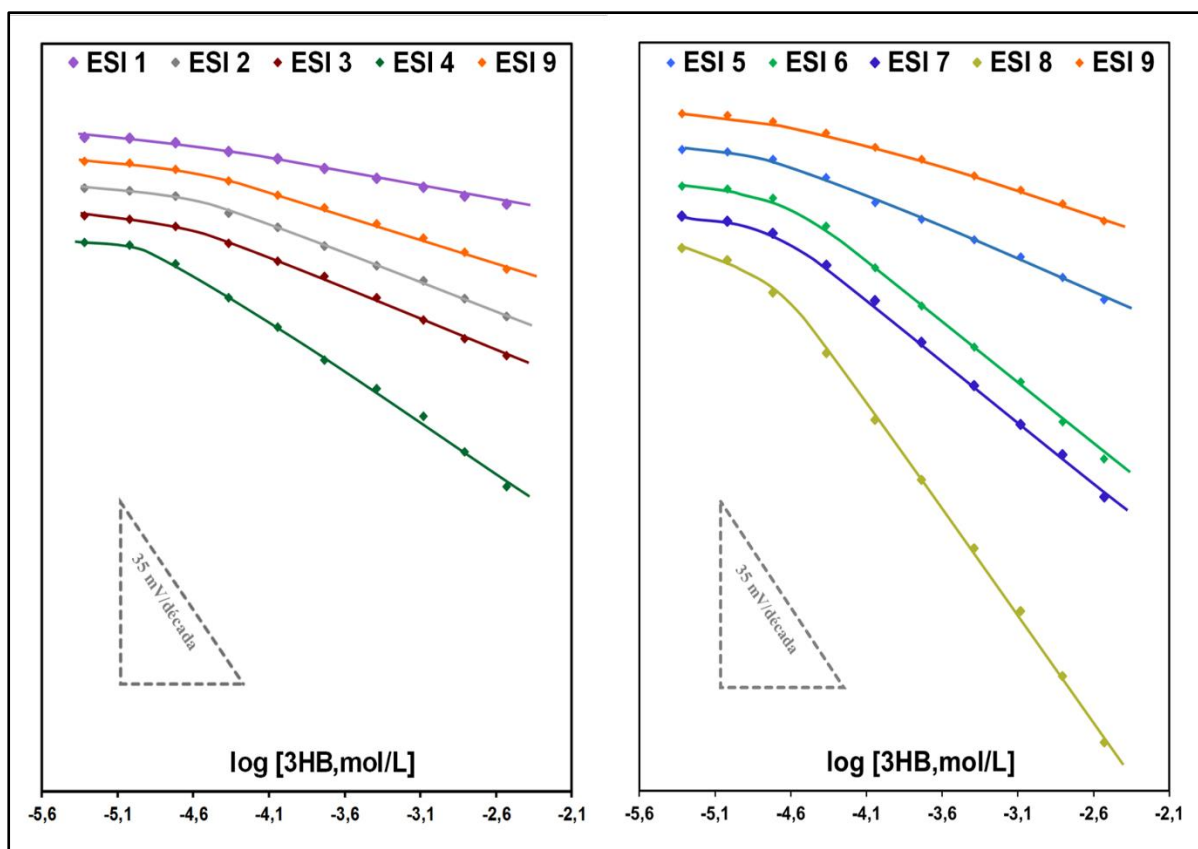


Figura 3.4 – Efeito do aditivo lipofílico catiónico TOP nas curvas de calibração dos elétrodos do material sensor NIP1 e MIP1 (esquerda) e NIP2 e MIP2 (direita).

de declive para  $-20,61 \text{ mV/década}$  foi observado, sendo este também inferior ao declive do ESI 8. A membrana que serviu de controlo sem adição de ionóforo e aditivo TOP (ESI 10) demonstrou o declive mais baixo de todos os ESIs,  $-4,75 \text{ mV/década}$ . A membrana que serviu de controlo às membranas seletivas com aditivo TOP (ESI 9), apresentou um declive significativamente mais baixo relativamente aos ESI 3, 4, 7 e 8, sendo esta diferença mais evidente nas membranas compostas pelo polímero 2 e que incluíram o aditivo catiónico lipofílico na preparação. O LIRL apresentado na maioria dos sensores foi de  $1,92 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$  e o LD de  $4,80 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ . Desta forma, os sensores preparados evidenciaram um LIRL inferior aos níveis fisiológicos de 3HBA presentes no soro em indivíduos adultos saudáveis ( $[3\text{HBA}] = 0,27 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ ) (32, 33).

Neste sentido, os resultados obtidos em solução tampão HEPES, indicaram que a inclusão do monómero básico e o aumento da proporção de molécula molde 3HBA na formulação do MIP2 promoveram um aumento significativo de sensibilidade na resposta potenciométrica e que a resposta dos elétrodos foi proveniente da presença de cavidades impressas na matriz polimérica, sendo a contribuição da resposta não específica observada nos materiais NIP 1 e 2 pouco significativa. A adição de aditivo lipofílico catiónico, TOP,

promoveu um aumento do valor médio de declive em todas as membranas seletivas preparadas. Apesar disso, o valor de declive médio da membrana controlo ESI 9 que continha apenas aditivo foi significativamente inferior relativamente ao MIP2 (ESI 6), o que sugere, a resposta dos eléctrodos foi proveniente da presença das cavidades impressas na matriz polimérica e não apenas da adição do aditivo catiónico. De igual forma, tal como esperado, a membrana sem ionóforo e sem aditivo catiónico (ESI 10) não apresentou um declive significativo, comparativamente com as restantes membranas.

De uma forma geral, verificou-se que a membrana ESI 8, avaliada na solução tampão HEPES a pH 5,40, apresentou o melhor coeficiente de correlação linear, apresentando o menor desvio ao declive da curva de calibração, com valores de LIRL abaixo do valor de referência séricos da molécula 3HBA em adultos saudáveis.

#### **4. Conclusões e perspectivas futuras**

A técnica de impressão molecular do 3HBA em bulk foi desenvolvida com sucesso na produção de sensores biomiméticos, recorrendo a processos tecnicamente simples. A introdução de um monómero com características básicas e o aumento da proporção de molécula molde na fase de impressão molecular revelou-se importante, contribuindo para que a resposta potenciométrica não dependesse apenas da adição de aditivos lipofílicos externos. A interação entre a molécula molde, monómero funcional e agente reticulante revelaram-se de grande importância para a leitura potenciométrica, uma vez que os materiais sem impressão molecular (NIP) não promoveram uma resposta potenciométrica adequada. De acordo com os resultados apresentados, foi possível concluir que o material sensor aplicado no ESI 8, que contém o material sensor MIP2 e o aditivo catiónico TOP na sua composição, foi o dispositivo que permitiu obter melhores propriedades de resposta, comparativamente com restantes dispositivos em estudo. Os sensores preparados apresentaram simplicidade na conceção, baixo tempo de resposta, boa precisão e baixo limite de deteção.

No entanto, como sugestões para trabalhos futuros, e tendo em vista a melhoria deste trabalho, é importante considerar que estes sensores biomiméticos poderiam ser alvo de melhorias posteriores através de um estudo de possíveis interferentes, estudo do efeito do pH, variação das proporções de aditivo catiónico e alargamento da gama de concentrações em estudo. A aplicação prática deste dispositivo também poderia ser considerada num contexto clínico, sendo necessário realizar ensaios com amostras reais de urina e soro de amostras de indivíduos saudáveis e indivíduos com DM tipo 1.

## 5. Referências Bibliográficas

1. Devlin T. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas, Edição 7. Edgard Blucher. 2011.
2. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes care. 2014;37:81-90.
3. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas – 8th Edition. IDF Diabetes Atlas. 2017;8.
4. Direção Geral de Saúde. Diagnóstico e Classificação da Diabetes Mellitus. Norma da Direção Geral da Saúde. 2011.
5. American Diabetes Association. Standards Medical Care in Diabetes. Diabetes care. 2017;40.
6. Bilous R, Donnelly R. Handbook of Diabetes, 4th Edition. Wiley-Blackwell. 2010.
7. Sacks D, Arnold M, Bakris G, Bruns D, Horvath A, Kirkman M, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and Management of diabetes Mellitus. Diabetes Care. 2011;34:61-99.
8. Holt R, Hanley A. Essential Endocrinology and Diabetes, 6th Edition. Wiley-Blackwell. 2012.
9. World Health Organization. Global Status report on noncommunicable diseases. 2014.
10. Gardete-Correia L, Boavida J, Raposo J, Mesquita A, Fona C, Carvalho R, et al. First diabetes prevalence study in Portugal: PREVADIAB study. Diabetic medicine : A Journal of the British Diabetic Association. 2010;27:879-81.
11. Sociedade Portuguesa de Diabetologia. Diabetes: Factos e Números – O Ano de 2015. Relatório Anual do Observatório Nacional da Diabetes. 2016.
12. Fowler M. Microvascular and Macrovascular Complications of Diabetes. Clinical Diabetes. 2008;26:77-82.
13. Umpierrez E, Kitabchi E. Diabetic Ketoacidosis. Treat Endocrinol 2 2003:95-108.
14. Kearney T, Dang C. Diabetic and endocrine emergencies. Postgraduate medical journal. 2007;83:79-86.
15. Kitabchi A, Umpierrez G, Miles J, Fisher J. Hyperglycemic crises in adult patients with diabetes. Diabetes care. 2009;32:1335-43.

16. Wallace T, Matthews D. Recent advances in the monitoring and management of diabetic ketoacidosis. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2004;97:773–80.
17. Laffel L. Ketone Bodies: a Review of Physiology, Pathophysiology and Application of Monitoring to Diabetes. *Diabetes/Metabolism Research and Review*. 1999;15:412–26.
18. Brandenburg M, Dire D. Comparison of arterial and venous blood gas values in the initial emergency department evaluation of patients with diabetic ketoacidosis. *Annals of Emergency Medicine*. 1998;31:459–65.
19. Porter W, Yao H, Karounos D. Laboratory and clinical evaluation of assays for beta-hydroxybutyrate. *American Journal of Clinical Pathology*. 1997;107:353–8.
20. Burtis C, Bruns D. *Tietz Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular*, Edição 7. Elsevier. 2016.
21. Stephens J, Sulway M, Watkins P. Relationship of Blood Acetoacetate and BHB in diabetes. *Diabetes*. 1971:485–9.
22. McMurray C, Blanchflower W, Rice D. Automated Kinetic Method for D-3-Hydroxybutyrate in Plasma or Serum. *Clinical Chemistry*. 1984;30:421–5.
23. Laun R, Rapsch B, Abel W, Schroder O, Roher H, Ekkernkamp A, et al. The determination of ketone bodies: preanalytical, analytical and physiological considerations. *Clinical and Experimental Medicine*. 2001;1:201–9.
24. Byrne H, Tieszen K, Hollis S, Dornan T, New J. Evaluation of an electrochemical sensor for measuring blood ketones. *Diabetes care*. 2000;23:500–3.
25. Martinez-Garcia G, Perez-Julian E, Agui L, Cabre N, Joven J, Yanez-Sedeno P, et al. An Electrochemical Enzyme Biosensor for 3-Hydroxybutyrate Detection Using Screen-Printed Electrodes Modified by Reduced Graphene Oxide and Thionine. *Biosensors (Basel)*. 2017;7:1–11.
26. Larsen T, Nielsen N. Fluorometric determination of beta-hydroxybutyrate in milk and blood plasma. *Journal of Dairy Science*. 2005;88:2004–9.
27. Cevasco G, Piatek A, Thea S. HPLC determination of D-3-hydroxybutyric acid by derivatization with a benzofurazan reagent and fluorescent detection: application in the analysis of human plasma. *Clinica Chimica Acta*. 2014;429:90–5.
28. Hassan H, Cooper G. Determination of  $\beta$ -Hydroxybutyrate in Blood and Urine Using Gas Chromatography– Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*. 2009;33:502–7.

29. Yamato S, Shinohara K, Nakagawa S, Kubota A, Inamura K, Watanabe G, et al. High-performance liquid chromatography determination of ketone bodies in human plasma by precolumn derivatization with p-nitrobenzene diazonium fluoroborate. *Anal Biochem.* 2009;384:145-50.
30. Walker K, Hall D, Hurst W. *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations.* Butterworth-Heinemann. 1990;Edition 3:658-61.
31. Artuch R, Vilaseca M, Farre C, Ramon F. Determination of lactate, pyruvate, beta-hydroxybutyrate and acetoacetate with a centrifugal analyser. *European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry.* 1995;33:529-33.
32. Chiu R, Ho C, Tong S, Ng K, Lam C. Evaluation of a new handheld biosensor for point-of-care testing of whole blood beta-hydroxybutyrate concentration. *Hong Kong Medical Journal.* 2002;8:172-6.
33. Burtis C, Ashwood R. *Tietz textbook of clinical chemistry, Third Edition.* Philadelphia: WB Saunders. 1999.
34. Pauling L. A Theory of the Structure and Process of Formation of Antibodies. *Journal of the American Chemical Society.* 1940;62:2643-57.
35. Mayes A, Mosbach K. Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry? . *Trends in Analytical Chemistry.* 1997;16:321-32.
36. Masqueé N, Marceé R, Borrull F. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. *Trends in Analytical Chemistry.* 1998;17:384-94.
37. Al-Kindy S, Badía R, Suárez-Rodríguez J, Díaz-García M. Molecularly Imprinted Polymers and Optical Sensing Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* 2000;30:291-309.
38. Ye L, Mosbach K. The Technique of Molecular Imprinting - Principle, State of the Art, and Future Aspects. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry.* 2001;41:107-13.
39. Cormack P, Elorza A. Molecularly imprinted polymers: synthesis and characterisation. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.* 2004;804:173-82.
40. Pichon V, Chapuis-Hugon F. Role of molecularly imprinted polymers for selective determination of environmental pollutants-A review. *Anal Chim Acta.* 2008;622:48-61.

41. Chen L, Xu S, Li J. Recent advances in molecular imprinting technology: current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*. 2011;40:2922-42.
42. Vasapollo G, Sole R, Mergola L, Lazzoi M, Scardino A, Scorrano S, et al. Molecularly imprinted polymers: present and future prospective. *International Journal of Molecular Sciences*. 2011;12:5908-45.
43. Katz A, Davis M. Investigations into the Mechanisms of Molecular Recognition with Imprinted Polymers. *Macromolecules*. 1999;32:4113-21.
44. Puoci F, Cirillo G, Curcio M. Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) in Biomedical Applications. Department of Pharmaceutical Sciences, University of Calabria, Italy. 2010:547-74.
45. Newman J, Setford S. Enzymatic biosensors. *Molecular Biotechnology*. 2006;32:249-68.
46. Prasada T, Kala R. Potentiometric transducer based biomimetic sensors for priority envirototoxic markers--an overview. *Talanta*. 2008;76:485-96.
47. Yang H, Yuan R, Chai Y, Mao L, Su H, Jiang W, et al. Electrochemical immunosensor for detecting carcinoembryonic antigen using hollow Pt nanospheres-labeled multiple enzyme-linked antibodies as labels for signal amplification. *Biochemical Engineering Journal*. 2011;56:116-24.
48. Thevenot D, Toth K, Durst R, Wilson G. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*. 2001;16:121-31.
49. Ganjali M, Faridbod F, Saboury A, Davarkhah N, Divsalar A, Behbehani G, et al. A New Approach for Protein Binding Isotherm Analysis by Means of na Electrochemical Microsensor. *International Journal of Electrochemical Science*. 2010:630-8.
50. Liang R, Zhang R, Qin W. Potentiometric sensor based on molecularly imprinted polymer for determination of melamine in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2009;141:544-50.
51. Buck R, Lindner E. Recomendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes. *International Union of Pure and Applied Chemistry*. 1994;66:2527-36.
52. Moreira F. Determinação de Norfloxacin em aquacultura, Dissertação de Mestrado 2009.

53. Burnett R, Covington A, Fogh-Andersen N. Use of ion-selective electrodes for blood-electrolyte analysis. Recommendations for nomenclature, definitions and conventions. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 2000;38:363-70.
54. Martín-Esteban A. Molecularly imprinted polymers: new molecular recognition materials for selective solid-phase extraction of organic compounds. Fresenius J Anal Chem. 2001;370(7):795-802.
55. Navarro-Villoslada F, Vicente B, Moreno-Bondi M. Application of multivariate analysis to the screening of molecularly imprinted polymers for bisphenol A. Analytica Chimica Acta. 2004;504:149-62.
56. Chappell J, Meyn A, Ngim K. The Extraction and Infrared Identification of Gamma-Hydroxybutyric Acid (GHB) from Aqueous Solutions. Journal of Forensic Sciences. 2004;49:1-8.
57. Long J, Azmi A, Kim M, Ali F. Comparative Study of Poly(4-vinylpyridine) and Polylactic Acid-block-poly (2-vinylpyridine) Nanocomposites on Structural, Morphological and Electrochemical Properties. Sains Malaysiana. 2017;46:1097-102.